



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO MARCONDES ALVES

**EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO DA
Sphagneticola trilobata E AVALIAÇÃO DO EFEITO
FARMACOLÓGICO EM MODELO DE LESÃO HEPÁTICA
INDUZIDA POR ACETAMINOFENO**

LEANDRO MARCONDES ALVES

**EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO DA
Sphagneticola trilobata E AVALIAÇÃO DO EFEITO
FARMACOLÓGICO EM MODELO DE LESÃO HEPÁTICA
INDUZIDA POR ACETAMINOFENO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa.

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A474e Alves, Leandro Marcondes.
Extração e isolamento do ácido caurenóico da *Sphagneticola trilobata* e avaliação do efeito farmacológico em modelo de lesão hepática induzida por acetaminofeno / Leandro Marcondes Alves. - Londrina, 2017.
51 f.: il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Teses. 2. Hormônios vegetais - Teses. 3. Extração (Química) - Teses. 4. Acetaminofen - Teses. I. Arakawa, Nilton Syogo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 547.9

LEANDRO MARCONDES ALVES

**EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO DA
Sphagneticola trilobata E AVALIAÇÃO DO EFEITO
FARMACOLÓGICO EM MODELO DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA
POR ACETAMINOFENO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Marcela Maria Bacarat
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de abril de 2017

Dedico este trabalho a minha esposa
Cristiane, minha filha Mariana e meus Pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a oportunidade de estar aqui.

A Jesus, pelos ensinamentos do conceito filosófico ÁGAPE, que me molda diariamente.

Aos meus pais, pelo grande esforço em mim investido.

A minha esposa e minha filha, que mesmo nas horas difíceis não me deixaram esmorecer.

A Prof^a.Dr^a Isabel Craveiro e o Prof. Dr. César C. Andrei pelo grande incentivo e ajuda para o ingresso neste mestrado.

Ao orientador, amigo e Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa (Nirto) por ter acreditado em mim desde o início e sido fundamental na construção dos meus conhecimentos fitoquímicos.

Ao grande amigo Msc. Victor Fattori, pela paciência e disposição ao me ensinar o manejo com os camundongos e a ajuda ao longo do meu trabalho

Aos amigos do departamento de Patologia que sempre nos receberam com carinho, em especial ao Prof. Dr. Waldiceu A. Verri Junior.

Aos grandes amigos que me ajudaram nas matérias mais difíceis: Carol Tonetti, Cristiana Gonzaga, Daniel Nanicuacua, Galileu Malta, Ingrid Barbosa, Manoela Gonçalves, Pedro Henrique, Renan Marim, Silvia Muller, Simoni.

Ao Dr. Percy Lavon Julian, *in memoriam*, grande químico americano, o qual, sua história me motivou a persistir em meu sonho como fitoquímico

Aos membros da banca examinadora, pela paciência, disposição e contribuição fundamental para a construção dessa dissertação.

“O cientista não se destina a resultados imediatos. Ele não espera que suas idéias avançadas serão prontamente aceitas. Seu dever é preparar o terreno para aqueles que virão, e apontar o caminho”

Nikola Tesla

ALVES, Leandro Marcondes. **Extração e isolamento do ácido caurenóico da *Sphagneticola trilobata* e avaliação do efeito farmacológico em modelo de lesão hepática induzida por acetaminofeno.** 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Sphagneticola trilobata é uma planta da família das Asteraceae, nativa do Brasil, cujo nome popular pode variar de acordo com a região, chamada de pseudo-arnica, margaridão, pingo-de-ouro, mal-me-quer-do-brejo, picão-da-praia ou vedélia. Possui entre seus fitoconstituintes o Ácido Caurenóico (AC), um fitohormônio diterpênico que além de possuir papel importante na fisiologia vegetal, apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica. A *Sphagneticola trilobata* foi colhida nos meses de outubro a novembro de 2014 e as raízes foram secadas, pulverizadas e submetidas à extração exaustiva com diclorometano, com posterior secagem do solvente. O extrato diclorometânico foi fracionado através da CLV (Cromatografia Líquida a Vácuo) e lavagem com solvente, isolando-se 302 mg do ácido caurenóico. O AC foi investigado sobre o modelo de lesão hepática induzida por acetaminofeno (APAP). Todas as amostras, sangue ou fígado, foram coletadas 10h após o estímulo com APAP. Camundongos Swiss machos foram tratados com AC via oral nas doses de 3, 10, e 30mg/kg. Posteriormente foi realizada a administração de APAP na dose de 650mg/kg. A determinação da dosagem de 30mg/Kg, foi através do ensaio de sobrevida após estímulo com APAP. O tratamento com AC reduziu os níveis plasmáticos de marcadores de lesão hepática aminotransferase de alanina (ALT) e aminotransferase de aspartato (AST). Além disso, AC reduziu o recrutamento de neutrófilos por meio da atividade da MPO e macrófagos por atividade da NAG e estresse oxidativo, observado através da normalização dos níveis de GSH e peroxidação lipídica. Como consequência, o AC reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-33, além de normalizar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Assim, o AC apresenta um grande potencial para o tratamento de intoxicação hepática por APAP.

Palavras-chaves: *Sphagneticola trilobata*. Ácido Caurenóico. Acetaminofeno. Glutathiona. Citocinas. Antioxidante.

ALVES, Leandro Marcondes. **Extraction and isolation of kahaloic acid from *Sphagneticola trilobata* and evaluation of the pharmacological effect in a model of hepatic injury induced by acetaminophen.** 2017. 51 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Sphagneticola trilobata Brazilian plant that has in its sap the kaurenoic acid (KA), a substance derived from the mevalonate biosynthetic pathway and belonging to a phase of the cyclization of the phytohormone geranylgeranyl diphosphate (GGPP). The KA is a diterpene found in several plant species such as *Copaifera langsdorffii*, *Montanoa tomentosa*, *Cosmos sulphureo* and *Sphagneticola trilobata*, the latter being the plant of choice because it contains large amounts of this diterpene in its roots. Studies have shown that KA can stimulate erythroid nuclear factor (Nrf2), which are receptor proteins, present mainly in the membrane of megakaryocytes, responsible for the stimulation of transcription of the production of antioxidants. This production can promote cell protection and prevent cancer, Alzheimer's disease, and liver damage, among others. The extraction of the KA was done by collecting the roots that were pulverized and the material was subjected to exhaustive extraction with dichloromethane 100%, this extract was submitted to an increasing polarity gradient through the CLV (liquid column vacuum), resulting in the isolation of KA with the aid of the thin layer chromatography CCD analysis, its purity was subsequently determined by HPLC and its molecular structure identified by NMR. The hepatoprotective potential of KA was investigated in an acetaminophen (APAP) induced liver injury model. Oral KA was tested at 3, 10 and 30 mg/kg following the intraperitoneal application of APAP 650 mg/kg. The dose of KA that had the best hepatoprotective performance was chosen for the biochemical tests, these tests were performed in Swiss mice, investigating liver protection through the levels of aminotransferases AST and ALT, which are markers of liver damage, we also analyzed hepatic cytokines: interleukin-33 (IL-33), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin beta (IL- β), proinflammatory substances that mark the inflammation level of hepatic tissue and Interleukins 10 (IL-10), which are anti-inflammatory cytokines. The enzymes myeloperoxidase (MPO) and n-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) determined the migration of neutrophils and macrophages into the liver tissue. The production of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation through malonaldehyde (MDA) was determined to quantify the KA response to free radicals. Histological sections were also made to identify and compare necrotic foci of hepatic tissue. We propose, therefore, that hepatic injury caused by the toxic levels of APAP can be inhibited by the action of KA, according to which it can act by stimulating the kappa nuclear factor system (NF- κ B), promoting the stabilization of pro and anti-cytokines Inflammatory and preventing apoptosis and also interact with the erythroid nuclear factor system (Nrf2).

Keywords: *Sphagneticola trilobata*. Diterpene. Kaurenoic acid. Cytokines Acetaminophen. Nuclear factor erythroid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Partes aéreas da *Sphagneticola trilobata*18
- Figura 2** – Vias de sinalização do Nrf2 Uma representação esquemática de fármacos, químicos e xenobióticos que induzem a resposta de stress oxidativo21
- Figura 3** – Esquema metabólico do acetaminofeno24
- Figura 4** – Mecanismo da hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno25
- Figura 5** – RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm, *mult.* e *J* em Hz) da mistura FR2 e FR3 da *Sphagneticola trilobata*.....35
- Figura 6** – RMN ¹³C da substância (75 MHz, CDCl₃, δ em ppm) da mistura FR2 e FR3 do extrato *Sphagneticola trilobata*.....36
- Figura 7** – Cromatograma obtido por CLAE para o ácido caurenóico.36
- Figura 8** – Avaliação da letalidade induzida pelo APAP (600mg / kg, via intraperitoneal) e tratado com AC nas concentrações 3, 10 e 30mg/Kg, onde os níveis de sobrevida mais proeminentes foram os tratados na concentração de 30mg/Kg de AC cerca de 90% (A). Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno. (Kaplan-Meier, seguido pelo teste log-rank. (A e B)). Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 15 por grupo por experiência, representativa de duas experiências separadas). * P <0,05 versus grupo salino #p <0,05 versus grupo AC (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni).....37
- Figura 9** – Os camundongos que foram tratados com AC (30mg/kg, via enteral), 30 min antes do acetaminofeno, obtiveram concentrações plasmáticas de ALT (B) e AST (C) menores que os não tratados com AC, respectivamente houve uma redução de aproximadamente 57% e de 72%. Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno.

- (ANOVA de uma via conforme Tukey).....38
- Figura 10** – O recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o fígado foi avaliado pela determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da n-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) em 10 h após APAP (650mg / kg). Ocorreu uma diminuição de 27% da produção de MPO e de 33% de NAG através do uso do AC (30mg/Kg). Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno (ANOVA unidirecional conforme Tukey).....39
- Figura11** – Avaliação da indução e a produção de citocinas hepáticas através da determinação dos níveis de (A) IL33 , (B) TNF-α, (C) IL-1β e (D) IL-10. Onde houve uma redução dos níveis de (A) IL33 (33%), (B) TNF-α (22%) e (C) IL-1β (22%)e um aumento nos níveis de (D) IL-10 (28%) em comparação com o APAP sem AC.Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno (ANOVA unidirecional conforme Tukey).....40
- Figura 12** – Avaliação dos níveis de GSH e MDA em camundongos tratados via oral com AC (30 mg / kg), ou veículo (Tween 20%) 30 min antes de se administrar intraperitoneal APAP (600mg / kg), ou solução salina. Após 4 h, houve um aumento na concentração de (A) glutatona (GSH), cerca de 41% nos animais que fizeram uso do AC em comparação ao APAP sem o AC. O Malondialdeido MDA teve uma redução de cerca de 28% nos camundongos que receberam o AC, em comparação dos que não receberam. Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,0001 em comparação com solução salina, # p <0,01 em comparação com veículo + acetaminofeno (ANOVA unidirecional conforme Tukey).....41

Figura 13 – Exame histológico de tecido hepático de camundongos Swiss, tratados com APAP, quando comparado ao controle (A), houve uma reação inflamatória difusa com focos necróticos e hemorrágicos (B) e (E). As secções hepáticas de camundongos tratados por via enteral com ácido caurenóico (30 mg / kg) (C) e (G), atenuaram a perturbação morfológica e reduziram o edema mucoso e o foco hemorrágico causado pela administração de APAP.....42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Gradiente crescente de polaridade de solventes para a eluição na CLV – Coluna Líquida a Vácuo do extrato diclorometânico da raiz da *Sphagneticola trilobata*.....34
- Tabela 2** – Dados do espectro de RMN ^1H da substância (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, *mult.* e *J* em Hz).34
- Tabela 3** – Dados do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) em relação aos dados da literatura.35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido caurenóico
ALT	Alanina aminotransferase
APAP	Acetaminofeno
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AST	Aspartato aminotransferase
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLV	Coluna líquida a vácuo
COX	Ciclo-oxigenase
CYP	Enzima do citocromo 450
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GGPP	Geranilgeranildifosfato
GSH	Glutathiona Reduzida
HO-1	Heme Oxigenase-1
IL	Interleucina
Keap-1	Proteína 1 associada a ECH similar a Kelch
MDA	Malondialdeido
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Fosfato de Dinucleotídio de Nicotinamida e Adenina
NAG	N-acetilglicosamina
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona-imina
Nrf2	Fator 2 Relacionado ao Fator de Transcrição Nuclear Eritróide 2
PGE2	Prostaglandina E2
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	<i>SPHAGNETICOLA TRILOBATA</i>	18
2.2	DITERPENOS	19
2.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÁCIDO CAURENÓICO (AC)	19
2.4	FORMAÇÃO DE EROS (ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO)	21
2.5	FISIOLOGIA HEPÁTICA	21
2.6	ACETAMINOFENO – APAP	22
2.7	RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA LESÃO HEPÁTICA PROVOCADA PELO APAP	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAL VEGETAL	28
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO – CLV	28
4.3	IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA	28
4.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE	29
4.5	ANIMAIS	29
4.6	INDUÇÃO DE LETALIDADE	29
4.7	ANÁLISE BIOQUÍMICA	30
4.7.1	Aminotransferases	30
4.7.2	Citocinas	30
4.7.3	Migração leucocitária (neutrófilos e macrófagos)	30
4.7.4	Glutathiona reduzida (GSH)	31
4.7.5	Peroxidação Lipídica.	31
4.8	CORTE HISTOLÓGICO	31
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1	RESULTADOS	33
5.1.1	Identificação química das frações	33
5.1.1.1	RMN	33
5.1.1.2	Polarização do AC.....	33
5.2	TAXA DE LETALIDADE	36
5.3	MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA	37
5.4	ATIVIDADE DAS ENZIMAS MPO E NAG	38
5.5	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS HEPÁTICAS.....	39
5.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: GSH E MDA	40
5.7	CORTES HISTOPATOLÓGICOS.....	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Desde antes de Cristo (século IX e VIII a.C.) (VIDAL-NAQUET, 2000), há indícios de que o homem busca na natureza recursos para melhorar sua própria condição de vida. Envolvem atualmente componentes sociais e culturais, especialmente nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, encontrando nas plantas medicinais uma importante oportunidade de solução de problemas de saúde por meio da produção, comercialização e utilização de fitoterápicos padronizados (DI STASI, 1996).

As plantas da família Asteraceae, estão entre as espécies de plantas mais utilizadas pelo empirismo popular e na fitoterapia como: alcachofra (*Cynara scolymus*) para disfunções hepáticas, arnica (*Arnica montana*) como analgésica, artemísia (*Artemisia annua*) no tratamento da malária, calêndula (*Calendula officinalis*) como anti-inflamatória, camomila (*Matricaria chamomilla*) como antiespasmódica, principalmente o gênero *Sphagneticola* (PRUSKI, 1955; ROQUE; BAUTISTA, 2008). Deste modo destaca-se a ampla distribuição desta família no mundo todo (TAKASUGI; MASUDA, 1996; TESK, M. & TRENTINI, 2001), sendo uma das maiores famílias de plantas, compreendendo cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies (ANDENBERG, A.A., BALDWIN, B.G., BAYER, R.G., BREITWIESER et al., 2007). No Brasil, a família é representada por aproximadamente 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formas vegetais (BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, 1991); considerada como a família de maior importância entre as fanerógamas, representando dez por cento do total da flora de angiospermas (WILSON, 1986).

Estudos fitoquímicos realizados com a *Sphagneticola trilobata* (folhas, flor, caule e raiz) demonstraram maiores concentrações de compostos de natureza terpênica, como por exemplo, o ácido caurenóico (AC) produzido e armazenado principalmente na raiz (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005; ROBLES-ZEPEDA et al., 2009). O AC é um precursor do fitormônio de crescimento vegetal, as giberelinas (CASTILLO; MARTINEZ, 1997; KENDE; ZEEVAART, 1997; KHLESTKINA; KUMAR; RÖDER, 2010), possui atividades biológicas importantes, tais como, ação antibacteriana (MOREIRA et al., 2016), antiparasitária (MIRANDA et al., 2015), antifúngica (COTORAS; FOLCH; MENDOZA, 2004), anticancerígena (FERNANDES et al., 2013), hipoglicêmica (BRESCIANI et al., 2004), analgésica e anti-inflamatória

(FUCINA et al., 2012; MIZOKAMI et al., 2012). Estudos evidenciaram que o diterpeno AC é um ativador do fator nuclear eritróide (Nrf2), responsável por promover a transcrição, ativando a translocação para o núcleo e aumentando assim a expressão de genes relacionados às enzimas antioxidantes e diminuição da resposta anti-inflamatória, podendo ter ação hepatoprotetora (PAIVA et al., 2004;LYU et al., 2011;), devido a essa possível ação, foi proposto neste trabalho, um modelo de lesão do tecido hepático, induzido por acetaminofeno (APAP).

Desde a década de 70 já havia conhecimento da interação entre o estresse oxidativo e a hepatotoxicidade induzida pelo APAP, através do excesso de metabólitos tóxicos produzidos pela depleção de glutathiona (MITCHELL et al., 1973). O APAP é um medicamento analgésico, amplamente utilizado para alívio de dores leves, por meio da inibição seletiva de isoenzimas da ciclooxigenase do sistema nervoso central (RANG; DALE; RITTER, 1999). Sua metabolização ocorre através das enzimas do complexo citocromo P450, majoritariamente pela CYP2E1 (KAPLOWITZ, 2004), na CYP2E1 ocorre uma desidrogenação do APAP e rápida degradação a n-acetil-p-benzoquinona, produzindo o principal metabólito, o n-acetil-p-benzoquinonimina (NAPQI), espécie extremamente reativa. A superdosagem do APAP, intencional ou acidental, provoca o acúmulo de NAPQI nos hepatócitos, ocasionando disfunção mitocondrial, dano de DNA e estresse oxidativo (YOKOI, 2010), conseqüentemente essa combinação de fatores acarretará necrose e falência hepática (HEIT; KUBES, 2011; NAKAMURA et al., 2011). Outro fator que contribui para o aumento da lesão hepática é o próprio processo inflamatório, pois células recrutadas e ativadas liberam citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1 β) e fatores de necrose tumoral (TNF- α), além de espécies reativas de oxigênio e leucotrienos (BORGHI et al., 2013) que promovem a apoptose.

O AC extraído das raízes da *Aralia continentalis* é capaz de aumentar a ativação do fator de transcrição Nrf2 em modelo *in vitro* e quando ativado aumenta a expressão de genes citoprotetores, aumentando os níveis de glutathiona (XU; LI; KONG, 2005; LYU et al., 2011). Mizokami e colaboradores (2012) avaliaram o efeito antinociceptivo do AC obtido por meio das raízes da *Sphagneticola trilobata*, que exibiu efeito analgésico devido à inibição da produção de citocinas. O AC surgiu como alternativa possivelmente viável para aumentar a produção de GSH, através da ativação da via Nrf2 (LYU et al., 2011; TURPAEV, 2013) e promover a proteção hepática.

Considerando a atividade farmacológica do AC, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos hepatoprotetores *in vivo* do AC isolado das raízes da *Sphagneticola trilobata*, em modelo de lesão hepática induzida por APAP em camundongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SPHAGNETICOLA TRILOBATA

A espécie *Sphagneticola trilobata* (**Figura 1**) pertence à família *Asteraceae* tem se destacado, pois estudos fitoquímicos realizados com a planta demonstraram maior concentração de compostos de natureza terpênica, esteroidal, fenólica (flavonóides) com ausência de alcalóides. As diferentes partes da planta (raiz, caule, folha e flor) possuem perfis cromatográficos distintos, indicando uma constituição química diferente entre elas, porém com alguma similaridade em relação a alguns compostos (FILHO et al., 2004), o diterpeno ácido caurenóico encontra-se em todas as partes da planta, porém em concentrações maiores na raiz (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005; ROBLES-ZEPEDA et al., 2009). Esta espécie foi descrita anteriormente como, *Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa* e atualmente *Sphagneticola trilobata*, é nativa do Brasil e muito freqüente em regiões litorâneas e em terrenos baldios, sendo conhecida popularmente por pseudo-arnica, margaridão, pingo-de-ouro, mal-me-quer-do-brejo, picão-da-praia ou simplesmente vedélia (MICHALAK, 1997).

Figura 1 – Partes aéreas da *Sphagneticola trilobata*



© Yonatan Matalon, www.ColorfulNature.com

Fonte: MATALON. at al.(2014).

2.2 DITERPENOS

Os diterpenos são compostos provenientes do metabolismo secundário da classe dos terpenos, constituídos por 20 átomos de carbono, correspondendo à condensação de quatro unidades isoprênicas. Estas substâncias naturais são bastante comuns em plantas e são biossintetizadas nos plasmídeos, mais comumente pela via mevalonato através da ciclização do geranylgeranildifosfato (GGPP) sendo precursor direto de todos os diterpenos. O Ácido Caurenóico (AC) é um diterpeno tetracíclico proveniente dos *ent*-cauranos (NATURAL; PAUL, 2002) e que também são produzidos em algumas plantas como: *Copaifera langsdorffii* (PAIVA et al., 2002), *Montanoa tomentosa* (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005), *Cosmos sulphureo* e *Sphagneticola trilobata* (FUCINA et al., 2012). O AC é um intermediário na produção de giberelinas (KHLESTKINA; KUMAR; RÖDER, 2010), substância pertence a um importante grupo de hormônios do crescimento vegetal, envolvidos no controle de diferentes processos fisiológicos como: regulação da brotação de muitas culturas comerciais, ajuste da floração em algumas plantas bienais e também influencia na maturação e desenvolvimento de frutos (CASTILLO; MARTINEZ, 1997; KENDE; ZEEVAART, 1997).

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÁCIDO CAURENÓICO (AC)

O AC possui atividades biológicas importantes, tais como, ação antibacteriana (MOREIRA et al., 2016), antiparasitária (MIRANDA et al., 2015), antifúngica (COTORAS; FOLCH; MENDOZA, 2004), anticancerígena (FERNANDES et al., 2013), hipoglicêmica (BRESCHIANI et al., 2004), analgésica e anti-inflamatória (FUCINA et al., 2012; MIZOKAMI et al., 2012). Através da literatura (LYU et al., 2011), foram encontrados indícios de que o AC promove a ativação do Nrf2. O Nrf2 é um fator de transcrição que desempenha importante papel no mecanismo de defesa celular contra o estresse oxidativo, através do controle da expressão de genes relacionados com desintoxicação, eliminação de oxidantes reativos e agentes eletrófilos (ITOH et al., 1997; CHAN; KAN, 1999; KWAK et al., 2001; KWAK et al., 2002). Este controle da atividade transcricional do Nrf2 é feito pela proteína Keap1 citosólica, molécula rica em resíduos de cisteína e com atividade ubiquitina-ligase, que conseqüentemente é o inibidor dessa via de sinalização (ITOH et al., 1997). Portanto,

sob condições fisiológicas o Nrf2 está associado ao Keap-1, constantemente ligado a proteína ubiquitina, após modificações em Keap-1 decorrente de ataque eletrofílico em resíduos tióis específicos de cisteína, associado à fosforilação em resíduos específicos de serina do Nrf2, ocorre a dissociação do Keap-1 e estabilização do fator de transcrição, que é degradado via proteossomo. O Nrf2 estável é capaz de se dimerizar com proteína sMaf (smallMaf) e com consequente translocação para núcleo (HUANG; NGUYEN; PICKETT, 2002), onde ativam genes de regiões promotoras denominadas Elemento de resposta antioxidante (ARE), para que haja aumento da expressão de genes relacionados à resposta citoprotetora (TURPAEV, 2013).

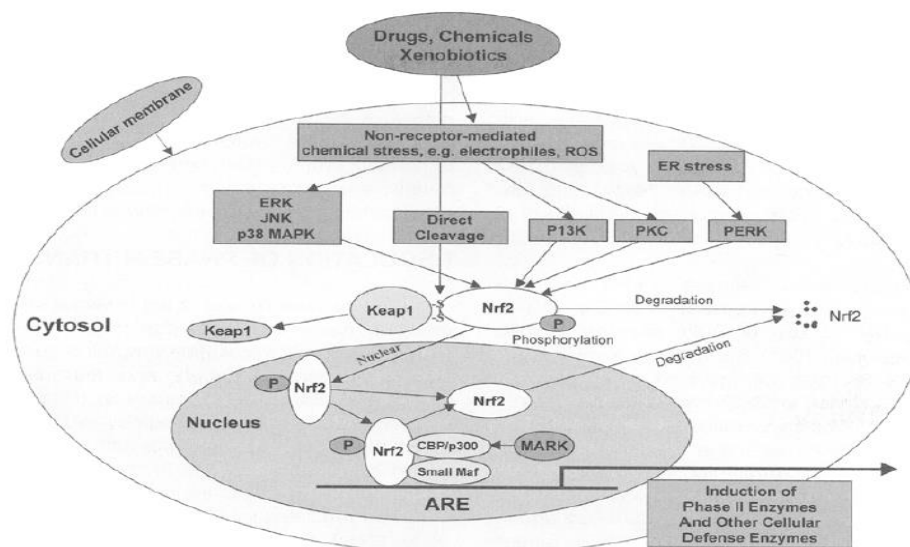
O metabolismo de substâncias (FOYE et al., 2008) como drogas, toxinas, xenobióticos entre outras, são realizadas pelo citocromo celular através de enzimas microssomais divididas em duas fases, na primeira fase, dependendo da substância, ela pode sofrer efeitos como: oxidação, redução, hidrólise e desmetilação, na segunda fase denominada conjugação, uma molécula é conjugada ao metabólito para torná-lo mais hidrossolúvel, com o intuito de facilitar a excreção renal. Nesta última fase o Nrf2 está envolvido na expressão de vários genes de desintoxicação, como a subunidade catalítica de glutamato-cisteína ligase (GCLC), NAD (P) H: quinina oxidoreductase-1 (NQO1), e heme oxigenase-1 (HO-1) (ALAM et al., 1999; CHANAS et al., 2002; BLOOM; JAISWAL, 2003). Experimentos *in vitro* demonstraram que o AC também inibe a indução promovida pelo lipopolissacarídeo (LPS - componente de bactérias gram-negativas, que desencadeiam processos inflamatórios) ao processo inflamatório, bem como a produção de óxido nítrico, produção de prostaglandina E2 (PGE2), a expressão de ciclooxigenase-2 e produção de NO induzível (iNOS) em macrófagos RAW 264.7. (FELIPE; FERNANDES, 2013). Esta ação do AC sobre o processo inflamatório pode estar relacionada com a atividade do NFκB (MIZOKAMI et al., 2012) e também com o aumento da expressão de ciclooxigenase, iNOS, e da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- α , IL-1 β , IL-33.

Pode-se perceber a relação Nrf2-glutationa, pois a perda do fator de transcrição Nrf2 provoca uma diminuição acentuada na expressão constitutiva e induzível da glutatona S-transferase de genes *Gsta1*, *Gsta2*, *GSTM1*, *Gstm2*, *GSTM3* e *Gstm4* nos fígados de ratos machos e fêmeas (CHANAS et al., 2002) (**Fig2**). Portanto, o AC pode estar envolvido na regulação das respostas inflamatórias através de NFκB e detoxificante e antioxidante através do Nrf2 (XU; LI; KONG, 2005).

2.4 FORMAÇÃO DE EROS (ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO)

O oxigênio é uma molécula fundamental para a existência da vida. Apesar de indispensável, o oxigênio promove a formação de radicais livres e demais moléculas que surgem em função das suas ações oxidativas nos sistemas biológicos, que são denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs), são formadas após a transferência de elétrons na cadeia fosforilativa (mitocôndria) ou através do sistema da NADPH oxidase (JONES, 2008), quando ativo, o sistema multienzimático NADPH oxidase é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido (BEDARD; KRAUSE, 2007) causando a peroxidação dos lipídios das membranas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) e também são capazes de oxidar diversas proteínas, especialmente com resíduos de cisteína (tióis). Para se protegerem contra oxidações, o organismo dispõe de mecanismos químicos e enzimáticos, que permitem ativar diversas vias de sinalização, entre elas o Nrf2 (GLOIRE; PIETTE, 2009; TURPAEV, 2013).

Figura 2 – Vias de sinalização do Nrf2 Uma representação esquemática de fármacos, químicos e xenobióticos que induzem a resposta de stress oxidativo



Fonte: XU; LI; KONG et al (2005)

2.5 FISIOLOGIA HEPÁTICA

O fígado metaboliza uma enorme variedade de compostos, não só endógenos como sais biliares, bilirrubina e hormônios, mas também exógenos (drogas e toxinas)(NUNES; MOREIRA, 2007). O hepatócito lida com todas estas moléculas

por meio da captação de substâncias plasmáticas por vários transportadores e canais existentes na sua membrana basolateral, pelo processamento dessas substâncias, o que inclui o transporte e modificação química intracelular, através de numerosas enzimas e cofatores, este passo é essencial, já que muitas das substâncias captadas pelos hepatócitos são lipofílicas e estas modificações tornam as substâncias mais hidrossolúveis, permitindo a sua posterior excreção via renal ou via biliar, este último, através da membrana apical para a bile. Apesar de alguns compostos serem completamente digeridos dentro dos lisossomas dos hepatócitos, muitas outras substâncias sofrem uma série de reações de biotransformação, que geralmente ocorrem em 2 fases. As reações de fase I representam reações de oxidação/redução (hidroxilação, desalogenação, dealquilação, etc) que têm como característica comum, a inserção de um átomo de oxigênio no substrato, transformando-o num composto mais polar. As principais enzimas envolvidas nestas reações de fase I são os citocromos P-450, que existem principalmente no retículo endoplasmático (RE) e tipicamente catalizam reações de hidroxilação. Como as reações de fase I, apesar de essenciais, apenas conferem um aumento modesto na solubilidade, a maioria das substâncias, mas não todas, terão que sofrer reações da fase II. Nesta fase o hepatócito procede à conjugação dos metabólitos formados na fase I, com compostos como o glucuronato, sulfato, glutathione, radicais metil e acetil entre outros, de maneira a produzir compostos mais hidrofílicos e/ou menos tóxicos que rapidamente são secretados no sangue ou na bile. Apesar de o hepatócito usar várias reações de conjugação, as três mais importantes são: (1) a conjugação com o glucuronato através das UGTs (uridinediphosphateglucuronosyl transferases) que existem principalmente no retículo endoplasmático celular; (2) a conjugação com o sulfato, através das sulfotransferases; (3) a conjugação com a glutathione através da glutathione-S-transferases, estas duas últimas enzimas, existem principalmente no citosol.

2.6 ACETAMINOFENO – APAP

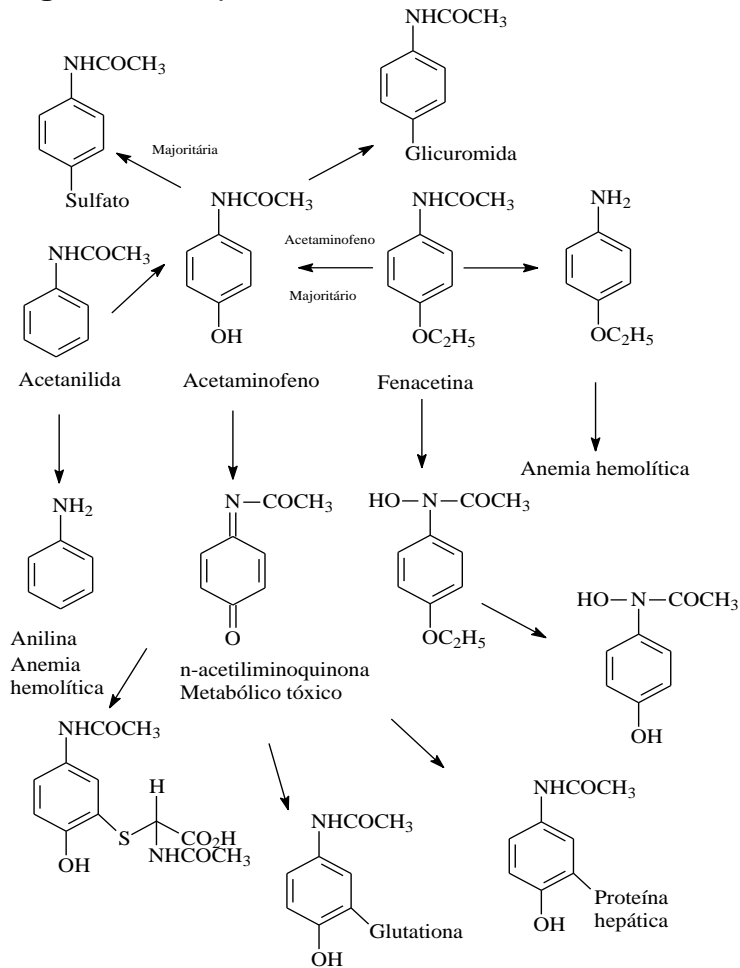
O APAP é amplamente utilizado como medicamento analgésico para alívio de dores leves, através da inibição seletiva de isoenzimas (ciclooxigenases) do sistema nervoso central (RANG; DALE; RITTER, 1999). Sua metabolização ocorre em duas fases: na primeira fase através das enzimas do complexo citocromo P450,

majoritariamente pela CYP2E1 (KAPLOWITZ, 2004) onde há uma n-hidroxilação, o derivado de n-hidroxi que sofre rápida degradação espontânea a n-acetil-p-benzoquinona (MOLDÉUS, 1978), espécie reativa do fármaco e o principal metabólito produzindo o n-acetil-p-benzoquinona-imina (NAPQI). A intoxicação por acetaminofeno é rara, porém letal. Após superdosagem intencional ou acidental, ocorre o acúmulo de NAPQI nos hepatócitos, ocasionando disfunção mitocondrial, dano de DNA e estresse oxidativo (YOKOI, 2010). A combinação desses fatores tem como denominador final necrose e falência hepática. Em condições normais, esse metabólito é rapidamente detoxificado pela glutathiona reduzida (GSH) Fig 3.

Entretanto, após doses tóxicas de APAP, o GSH é depletado e, como consequência o NAPQI acumula e liga-se covalentemente a proteínas hepáticas, iniciando a lesão hepática (HEIT; KUBES, 2011; NAKAMURA et al., 2011). Durante o processo inflamatório, as células recrutadas e ativadas liberam citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1 β) e fatores de necrose tumoral (TNF- α), além de espécies reativas de oxigênio e leucotrienos, contribuindo para a lesão hepática. O AC pode ser capaz de aumentar a expressão do Nrf2 (LYU et al., 2011), por conseguinte, um fator de transcrição que quando ativado, aumenta a expressão de genes citoprotetores (XU; LI; KONG, 2005), que por sua vez, aumenta significativamente os níveis de glutathiona, promovendo sua conjugação com APAP, evitando a formação de NAPQI (forma tóxica) impedindo assim a lesão no hepatócito. Sendo assim, o AC parece ser uma alternativa viável em casos de intoxicações por APAP. Na Figura 4 pode-se observar o Mecanismo da hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (TUJIOS; FONTANA, 2011). Em (A) o papel do sistema metabólico. A maioria do acetaminofeno ingerido é transformada por glucuroniltransferases e sulfotransferases a metabólitos estáveis, que são seguramente excretados na urina e na bile. No entanto, se este sistema for estropado, uma maior proporção de paracetamol é oxidativamente metabolizada pelas isoenzimas CYP para o metabólito intermediário altamente reativo, NAPQI. Este metabólito liga-se covalentemente às proteínas dos hepatócitos e pode perturbar a função mitocondrial, resultando em danos nos hepatócitos. Em (B) o papel do sistema imunológico do paciente. Os macrófagos infiltrados no fígado podem reconhecer hepatócitos danificados e levar à liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL33, TNF α), bem como citocinas pró-regenerativas (IL-10). No entanto, a expressão reduzida de CD44 em linfócitos é hipotetizada para conduzir a uma maior tendência para a sinalização de citocinas pró-

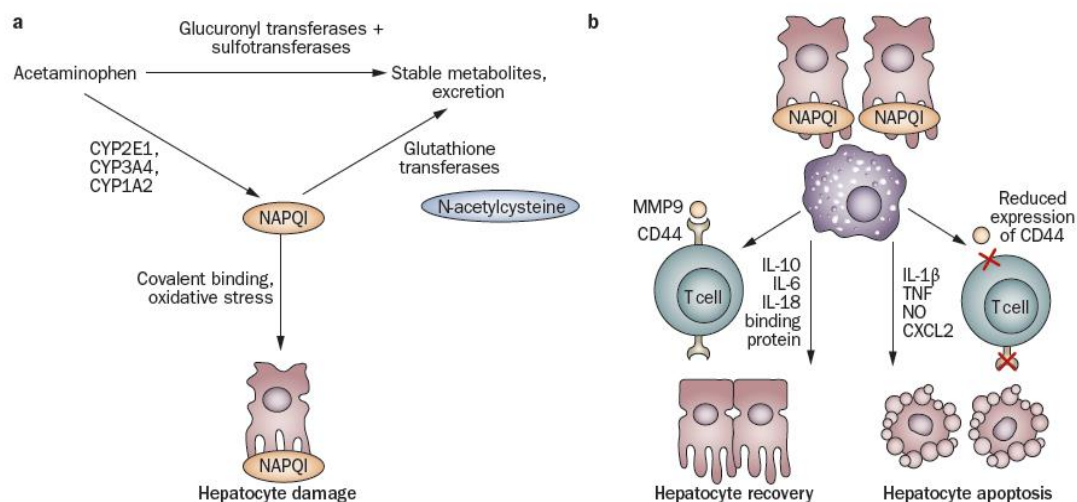
inflamatórias que, em última análise, resulta em apoptose de hepatócitos. O CD44 é uma molécula de adesão que se expressa em linfócitos-B e T, participa na mediação de adesão destas células e dos componentes da matriz extracelular e na adesão a células endoteliais vasculares.

Figura 3 – Esquema metabólico do acetaminofeno



Fonte: FOYE et al., (2008)

Figura 4 – Mecanismo da hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno



Fonte: TUJIOS; FONTANA, (2011).

2.7 RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA LESÃO HEPÁTICA PROVOCADA PELO APAP

Após a sobredose de APAP (650mg/Kg) em camundongos, quimiocinas e produtos mitocondriais colaboram para a migração e ativação de neutrófilos hepáticos, causando hepatotoxicidade adicional. Ocorre um aumento de lesões por estes neutrófilos, através da produção de ROS, contribuindo para a resposta inflamatória sistêmica, podendo promover insuficiência hepática aguda. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, sendo um dos pilares da resposta imune inata (PHILLIPSON; KUBES, 2011). Além disso, após a morte celular estéril, os neutrófilos migram para locais de necrose, resultando na cicatrização e remoção de detritos celulares (JAESCHKE et al., 2012). No entanto, a migração e ativação descontrolada de neutrófilos ajuda a promover o “choque necrótico” dos hepatócitos. O descontrole dos neutrófilos ocorre, pois o APAP promove danos mitocondriais levando a liberação do receptor do formil peptídeo (FPR), classe de receptores acoplados à proteína G envolvidos na quimiotaxia, através da sinalização de FPR1 (MARCH et al., 2011). Os neutrófilos precisam de um contato mais íntimo com o alvo para promover a morte da célula, através de um microambiente, no qual a produção de ROS facilita a citotoxicidade pela liberação do conteúdo dos grânulos. As populações de células hepáticas (células de Kupffer e hepatócitos) (YE et al., 2009) e também os neutrófilos, possuem receptores CXCR2

(SAHIN; TRAUTWEIN; WASMUTH, 2010) e FPR1, moléculas de relevância no contexto de necrose celular, as quimiocinas CXCR2 e os formil peptídeos trabalham em conjunto para orientar os neutrófilos para sítios de necrose hepática, onde podem causar lesões hepáticas adicionais, contribuindo para uma resposta inflamatória sistêmica e ainda para lesões de órgãos remotos. O APAP ao promover a lesão mitocondrial do hepatócito, promove também a liberação de gDNA, o qual é reconhecido via TLR9 (MCGILL et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Extrair e isolar o AC da *Sphagneticola trilobata* e investigar seu efeito em modelo de lesão hepática induzida por APAP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Coletar e preparar o extrato bruto em diclorometano da *Sphagneticola trilobata*.
- b) Fracionar, purificar e identificar o AC.
- c) Determinar a melhor dose de AC no ensaio de sobrevivência, após estímulo com APAP.
- d) Avaliar o efeito do AC sobre os marcadores de lesão hepática ALT e AST, após estímulo com APAP.
- e) Avaliar o efeito do AC sobre a atividade do recrutamento de neutrófilos e macrófagos, através da mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- β -glicosamina (NAG), respectivamente, após estímulo com APAP.
- f) Avaliar o efeito do AC sobre a produção das citocinas IL-33, IL-10, IL-1 β , TNF- α , após estímulo com APAP.
- g) Avaliar o efeito do AC sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, GSH e MDA, após estímulo com APAP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As raízes da *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae), foram coletadas no município de Londrina-PR- Brasil (“832 m de altitude, 23°20’20.87” Latitude S e 51°7’11.96” Longitude O) na ACEL (Associação Cultural Esportiva de Londrina) - Estrada Major Archilles Pimpão, 2300 - Jardim Vale Verde, 86040-020, no período de outubro a novembro de 2013, época de florescência da planta. Posteriormente, as raízes foram secas ao ar livre, protegido da luz solar, à temperatura ambiente por uma semana, seguida de moagem em moinho de facas (Willye).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO – CLV

Para a extração do AC, 861,95g das raízes pulverizadas foram submetidas à extração exaustiva com diclorometano, obtendo-se um extrato concentrado de 73,852g. O extrato diclorometânico foi submetido a gradiente crescente de polaridade (Tabela 1), através de CLV resultando 13 frações, das quais, ocorreu a cristalização na fração 2 (148mg). Através da análise em CCDC - cromatografia de camada delgada comparativa (25DC-Alufolien 20x20cm/Kiesel gel 60 F₂₅₄, Merck), revelado com *p*-anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento a 110 °C pode-se observar a presença de único composto, indicando a possibilidade de pureza, já na fração 3 também observamos o mesmo composto, com certa impureza, que através da técnica de recristalização, onde a amostra foi aquecida com 3mL de metanol, seguida de refrigeração, com a formação de cristais, estes foram separados, obtendo-se o rendimento de 154mg. As frações 2 (148mg) e 3.(154mg) foram submetidas à análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C.

4.3 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

Ressonancia Magnética Nuclear - RMN

Os espectros de RMN de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) da mistura

das FR2 e FR3 foram registrados em equipamento Bruker Avance III (Daltonics, Billerica, MA, EUA), no qual utilizou o sinal de tetrametilsilano (TMS) como referência primária (^1H -RMN, 0,00 ppm) em relação aos deslocamentos químicos (δ , ppm) das frações e o clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e referência secundária (^1H -RMN, 7,27 ppm; ^{13}C -RMN, 77,0 ppm).

4.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

O fator de retenção característico do AC foi identificado através da (CLAE) (Shimadzu CBM-20a, software LC solution, detector Shimadzu UV-DAD (SPD-M10A) e coluna Waters ODS (4.6 x 250 mm, 5 μm , 100 Å). Como fase móvel, utilizou-se Acetonitrila:Água (85:15) para um fluxo de 1mL/min com $\lambda = 210$ nm.

4.5 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em camundongos da linhagem albina Swiss machos (20-30g), provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os camundongos foram mantidos sob ciclo de claro/escuro (12/12 h), por pelo menos dois dias antes dos experimentos, evitando assim estresse dos camundongos e interferência nos resultados bioquímicos. Os animais foram divididos em gaiolas de polipropileno padrão, medindo 41 x 34 x 16 cm (Insight®) de acordo com os grupos experimentais (máximo de 12 animais por gaiola), com livre acesso à água e ração, e adaptados aos ambientes e condições experimentais com pelo menos 1 hora de antecedência em relação aos experimentos, para que não haja alimento no estômago do animal e interfira na absorção da droga a ser administrada. Os procedimentos de cuidado e manuseio de animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina (número do processo 26405.2014.43).

4.6 INDUÇÃO DE LETALIDADE

Os camundongos foram pré-tratados com AC via oral nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Após 30 minutos, foi

administrado o APAP na dose letal de 650 mg/kg (i.p) (ISHIDA; KONDO; OHSHIMA, 2002; LIU et al., 2006). O efeito do AC sobre a sobrevivência dos camundongos foi avaliado em intervalos de 6h durante 72h. Esse ensaio foi determinante para a escolha da melhor dose de AC.

4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA

4.7.1 Aminotransferases

O aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) (Baynesand; Dominiczak, 2000), foram obtidos através da análise do sangue, coletado em microtubos, contendo 50µL de EDTA (5000 UI/mL) e centrifugados (200 g/10 minutos, 4°C), para separação do plasma. Para determinar a atividade enzimática de AST e ALT, o plasma foi processado de acordo com as instruções do fabricante (Labteste Diagnóstico S.A., Brasil).

4.7.2 Citocinas

A produção das citocinas hepáticas (DE OLIVEIRA et al., 2011) IL-1 β , TNF- α e IL-10, foram analisadas através do método *Enzyme-linked Immuno sorbent Assay* (ELISA), onde o tecido hepático foi coletado para dosagem destas citocinas e as amostras foram trituradas e homogeneizadas em tampão PBS. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis das citocinas por ELISA, utilizando kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.3 Migração leucocitária (neutrófilos e macrófagos)

A produção de mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- β -glicosaminidase (NAG) no fígado foi analisada através de ensaio colorimétrico, onde o tecido hepático foi coletado em 200µl de tampão fosfato com HTAB, uma parte do homogenato foi separada para MPO, e outra, para o ensaio de NAG. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm, 2 minutos, 4°C). No ensaio enzimático o substrato do NAG foi adicionado aos macrófagos e o MPO aos neutrófilos.

4.7.4 Glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram determinadas espectrofotometricamente, como previamente descrito por Hohmann et al., 2015. As amostras de fígado perfundidas congeladas foram homogeneizadas em EDTA frio 0,02 M. Tratou-se o homogeneizado com ácido tricloroacético a 50% e centrifugou-se (1.500 x g, 15 min), e adicionou-se ao sobrenadante Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9. Em seguida, as amostras foram misturadas com vórtex, e adicionou-se ácido ditiobisobenzóico 10 mM, seguido por mistura com vórtex. As amostras foram deixadas em repouso durante 5 minutos antes de serem lidas a 412 nm. Preparou-se uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de GSH, para além dos outros reagentes mencionados antes. Os resultados são apresentados como nmol GSH / mg de fígado.

4.7.5 Peroxidação Lipídica.

A peroxidação lipídica no fígado foi avaliada pela determinação dos níveis de TBARS, utilizando um método adaptado de Hohmann et al., 2013. Os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA) - substâncias reativas (TBARS), principalmente malondialdeído (MDA), foram quantificados espectrofotometricamente usando um método de Vitorino e Alper (2013) com adaptações. O homogenato de tecido foi colocado em reação com TBA para formar complexos MDA- (TBA) 2, e as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético. As amostras foram incubadas durante 15 minutos, em banho de água fervente e transferidas para um banho de gelo. O MDA, um produto intermediário de peroxidação lipídica, foi determinado pela diferença entre a absorvância a 535 e 572 nm, utilizando um leitor espectrofotométrico de microplacas (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia). Os resultados são apresentados como peroxidação lipídica ($\Delta OD A535-A572$ / mg de fígado).

4.8 CORTE HISTOLÓGICO

Para a análise histopatológica do fígado, as secções medianas dos lobos esquerdos do fígado foram fixadas em solução de formalina neutra tamponada a 10% durante 24 h e embebidas em cera de parafina, e secções de 5 μ m foram

preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (H & E). As secções de fígado manchadas H & E foram capturadas utilizando uma câmara de alta resolução (Moticam 2500, 5,0 megapixel, USB 2.0) ligada ao microscópio óptico Zeiss Axiophot. As secções do fígado foram examinadas e o grau de necrose foi determinado como previamente descrito (Yaman et al., 2013). O grau de necrose foi classificado em uma escala de 0-3 [normal: 0 (0%), leve: 1 (1-25%), moderado: 2 (26-49%), severo: 3 (50-100%)] e expressa como a média de 10 campos de alta potência (HPFs), escolhidos aleatoriamente.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os ensaios, os resultados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). Utilizando a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, procedimento utilizado para comparar três ou mais análises dentro de um experimento, seguido pelo pós-teste de Tukey, que consiste em definir a menor diferença significativa para experimentos. As taxas de sobrevivência foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier, método que descreve livremente o acontecimento baseado em dados quantitativos que gera uma função de distribuição no tempo, até a ocorrência de um determinado evento (BUSTAMANTE-TEIXEIRA; FAERSTEIN; LATORRE, 2002), a análise estatística foi confirmada pelo teste de log rank para avaliar a igualdade das curvas, consideradas significativas diferenças para $P < 0,05$ para ambas as análises (HOHMANN et al., 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RESULTADOS

5.1.1 Identificação química das frações

5.1.1.1 RMN

No espectro de RMN ^1H , observa-se que a substância (**Figura 5**) apresenta poucos sinais desprotegidos, indicando a presença de um sistema cíclico pouco oxigenado e/ou pouco insaturado. Através da análise de seus dados, pode-se deduzir que esta substância trata-se de um diterpeno, visto que substâncias com o mesmo perfil já foram isoladas de diversas espécies do gênero *Sphagneticola* (BLOCK et al., 1998). Os singletos em δ 4,79 e 4,75 (^1H cada) podem ser atribuídos a dois hidrogênios pertencentes a uma ligação dupla exocíclica, típica de derivados do AC, a qual ocorre entre C16-C17. Pode-se observar também a presença de um *s* em δ 2,63 atribuído ao H13 (alílico) e a ocorrência de dois singletos integrados para 3H cada em δ 1,24 e 0,95, indicando a presença de dois grupamentos metila. Esses hidrogênios metílicos foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H18 e H20 (ARAKAWA, 2003).

A análise do espectro de RMN ^{13}C dessa substância (**Figura 6**) indicou a presença de 20 sinais, reforçando a possibilidade de a substância tratar-se de um diterpeno. Um sinal em δ 184,2 foi atribuído ao carbono de uma carboxila, que geralmente ocorre em C19. Outro sinal em δ 155,8 foi atribuído ao carbono olefínico C16 e o carbono metilênico C17 foi relacionado a um sinal em δ 102,9. A partir destes dados foi possível confirmar que a substância isolada trata-se de um diterpeno do tipo caurano, mais precisamente o ácido *ent-caur-16-en-19-óico*

5.1.1.2 Polarização do AC

Confirmamos também o ângulo de rotação no polarímetro é de $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ -110° , muito comum em espécies de *Sphagneticola*. Os dados foram confirmados com base na literatura (DA COSTA, 1996) e os valores atribuídos aos hidrogênios (H) e carbono (C) das substâncias encontram-se nas **Tabelas 2 e 3** respectivamente

(ARAKAWA; COSTA, 2003).

A análise cromatográfica da mistura das FR2 e FR3, (**Figura 7**) apresentou um pico bem definido em 16,486 min, evidenciando assim a presença majoritária do ácido caurenóico. A extração e fracionamento cromatográfico do extrato e a análise de ressonância magnética das frações, permitiram a identificação e isolamento do AC com a pureza de 92%, determinado através do cálculo da área do pico do fator de retenção do CLAE. O AC isolado foi submetido aos testes biológicos.

Tabela 1 – Gradiente crescente de polaridade de solventes para a eluição na CLV – Coluna Líquida a Vácuo do extrato diclorometânico da raiz da *Sphagneticola trilobata*

Frações	Solventes	Concentrações	Rendimento*
1	Hexano	100%	270mg
2	Hexano / Acetato de Etila	90:10	200mg
3	Hexano / Acetato de Etila	80:20	569mg
4	Hexano / Acetato de Etila	70:30	946mg
5	Hexano / Acetato de Etila	60:40	320mg
6	Hexano / Acetato de Etila	50:50	324mg
7	Hexano / Acetato de Etila	30:70	302mg
8	Hexano / Acetato de Etila	100%	291mg
9	MeOH	100%	195mg

(*) - Rendimento das amostras obtidas ao longo dos processos cromatográficos (CLV e CMP).

Tabela 2 – Dados do espectro de RMN ¹H da substância (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm, *mult.* e *J* em Hz).

Hidrogênio	Dados Teóricos*	Deslocamento Químico do AC (δ)
3	2,62; sl	2,63; sl
15	2,08 sl	2,15 sl
17a	4,66; s	4,75; s
17b	4,72; s	4,79; s
18	1,16; s	1,24; s
20	0,87 s	0,95; s

Fonte*:(Da Costa, 1996)

Figura 5 – RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, *mult.* e *J* em Hz) da mistura FR2 e FR3 da *Sphagneticola trilobata*.

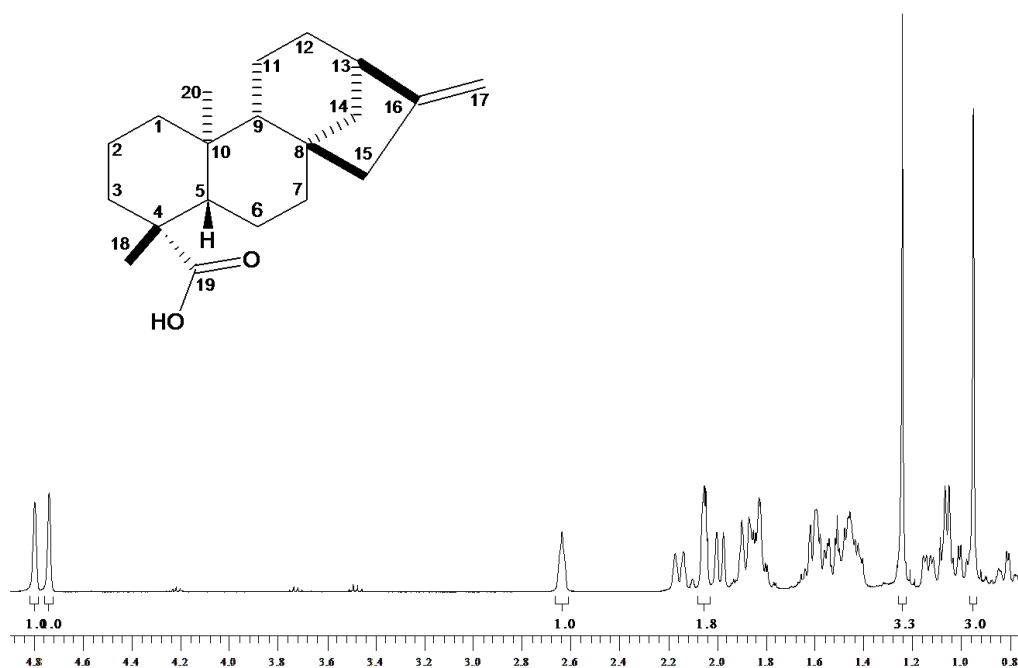


Tabela 3 – Dados do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) em relação aos dados da literatura.

Carbono	Dados Teóricos (δ , ppm)	Deslocamento Químico (δ , ppm)
1	40,7	40,7
2	19,0	19,0
3	37,7	37,8
4	43,8	43,7
5	57,0	57,0
6	21,8	21,8
7	41,3	41,2
8	44,2	44,2
9	55,0	55,1
10	39,7	39,6
11	18,4	18,4
12	33,0	33,0
13	43,9	43,8
14	39,7	39,6
15	48,9	48,9
16	155,8	155,8
17	103,0	102,9
18	29,0	28,9
19	185,0	184,2
20	15,5	15,5

Fonte: (Da Costa, 1996).

Figura 6 – RMN ^{13}C da substância (75 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) da mistura FR2 e FR3 do extrato *Sphagneticola trilobata*.

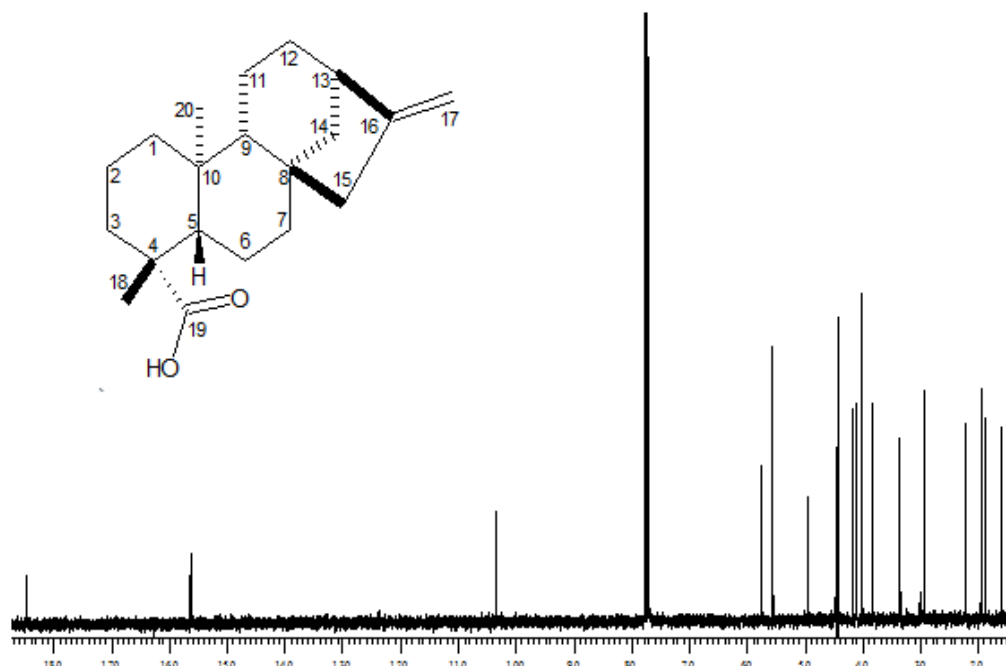
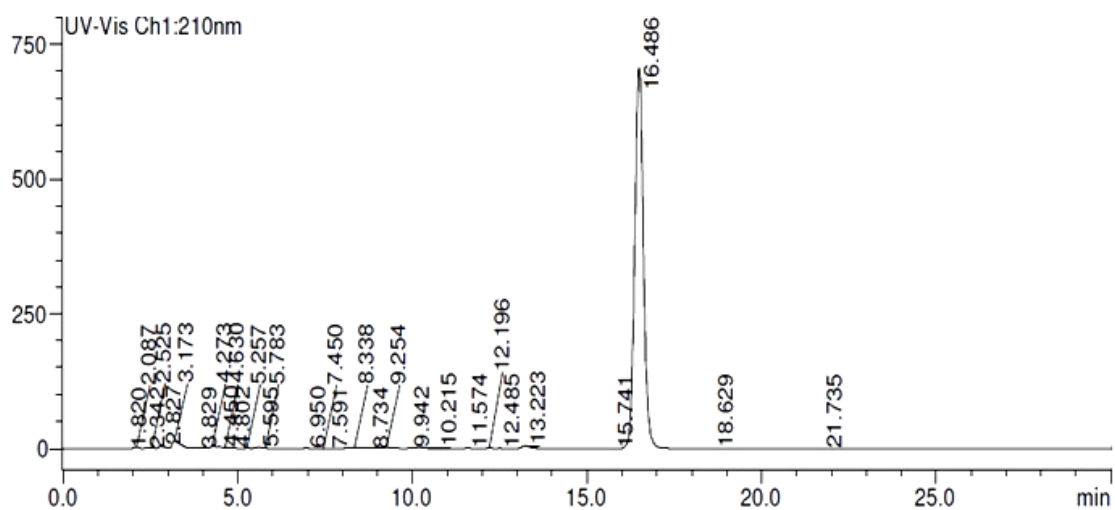


Figura 7 – Cromatograma obtido por CLAE para o ácido caurenóico.

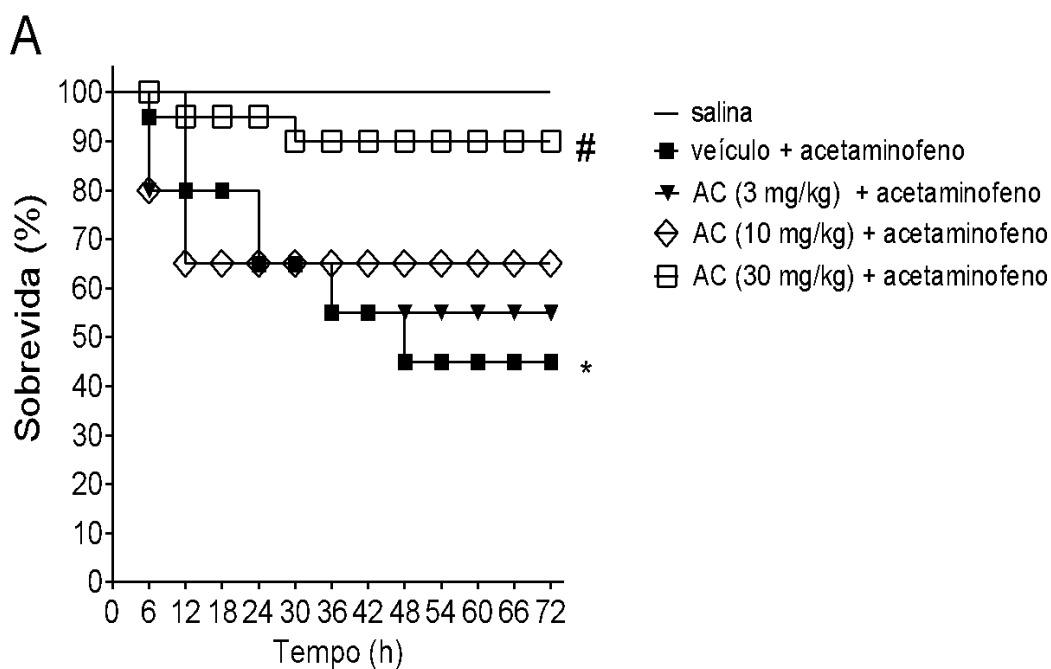


5.2 TAXA DE LETALIDADE

A taxa de sobrevivência para o grupo APAP foi de 45%, enquanto os tratados com AC apresentaram sobrevivência maior que 55% em 42 horas, para a menor dose, (**Figura 8**). Os tratados com dose de 3 mg/kg e 10 mg/kg não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Observa-se na **Figura 8**, que a dose de 10 mg/kg apresentou uma resposta constante a partir de 10 horas,

evidenciando uma resposta lenta no efeito do AC sobre o APAP. Animais tratados com a dose de 30 mg/kg apresentaram uma sobrevida de 90%, sendo esta a dose definida para os testes biológicos.

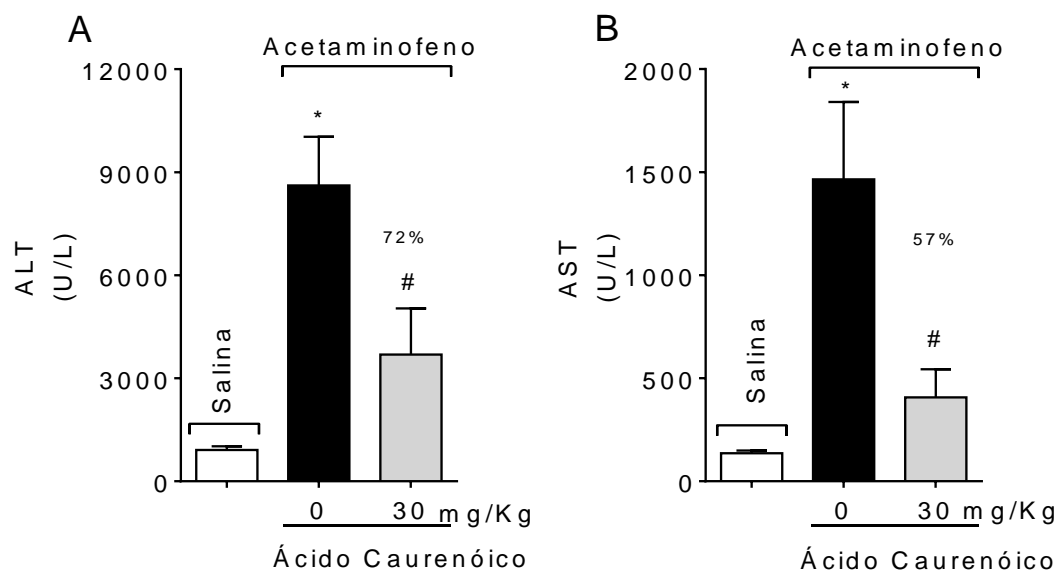
Figura 8 – Avaliação da letalidade induzida pelo APAP (600mg / kg, via intraperitoneal) e tratado com AC nas concentrações 3, 10 e 30mg/Kg, onde os níveis de sobrevida mais proeminentes foram os tratados na concentração de 30mg/Kg de AC cerca de 90% (A). Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno. (Kaplan-Meier, seguido pelo teste log-rank. (A e B)). Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 15 por grupo por experiência, representativa de duas experiências separadas). * P <0,05 versus grupo salino #p <0,05 versus grupo AC (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni).



5.3 MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA

A avaliação da lesão hepática foi reduzida por meio da detecção plasmática dos níveis de ALT e AST, (Figura 5). O APAP aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de ALT e AST quando comparado ao controle nos camundongos, enquanto os animais tratados com 30 mg/kg de AC sofreram redução dos níveis de ALT de 57% e AST de 72% quando comparados ao APAP somente, (Figura 9).

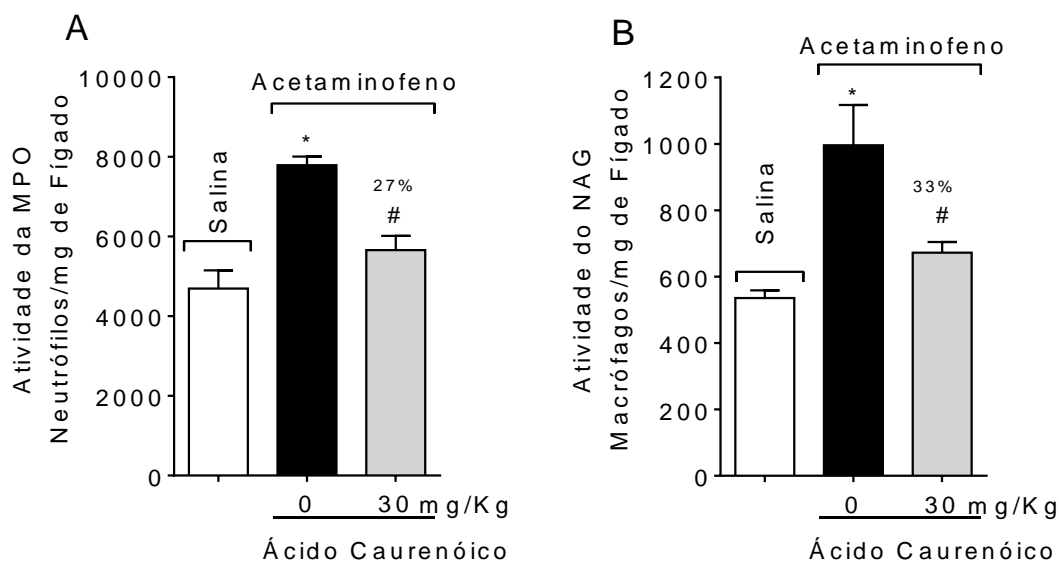
Figura 9 – Os camundongos que foram tratados com AC (30mg/kg, via enteral), 30 min antes do acetaminofeno, obtiveram concentrações plasmáticas de ALT (B) e AST (C) menores que os não tratados com AC, respectivamente houve uma redução de aproximadamente 57% e de 72%. Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno. (ANOVA de uma via conforme Tukey)



5.4 ATIVIDADE DAS ENZIMAS MPO E NAG

O recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o fígado foi avaliado pela determinação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e a n-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), 10 h após aplicação de APAP (650mg / kg) e o AC (30mg/kg), ocorreu um aumento nos níveis de MPO, correspondendo a 7791,71 neutrófilos por miligrama de fígado de camundongo para o controle (APAP + veículo), 40% acima da salina, enquanto que com o AC houve redução de 27% em relação ao APAP. No caso da enzima NAG ocorreu um acréscimo correspondente de 996,126 macrófagos por miligrama de fígado que corresponde a 46% acima do normal, enquanto que, com o uso do AC houve um aumento de somente 20% do normal e em relação ao APAP teve uma redução de 33% (**Figura 10**).

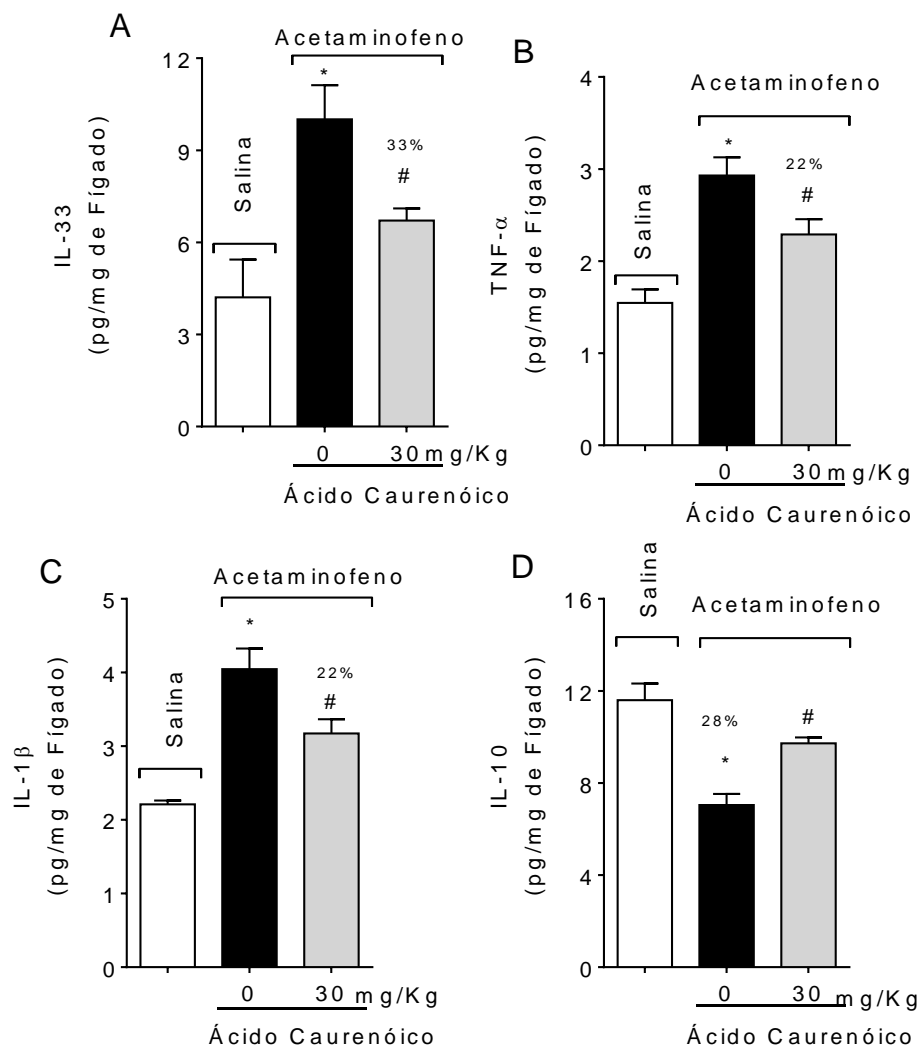
Figura 10 – O recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o fígado foi avaliado pela determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da n-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) em 10 h após APAP (650mg / kg). Ocorreu uma diminuição de 27% da produção de MPO e de 33% de NAG através do uso do AC (30mg/Kg). Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno (ANOVA unidirecional conforme Tukey).



5.5 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS HEPÁTICAS

As citocinas avaliadas foram as IL 1- β , TNF - α , IL -33, IL -10, (**Figura 11**). A Interleucina 1 β (IL 1- β) teve um aumento na produção, com a indução do APAP (650 mg/kg) de 4,04658 pg/mg de fígado, cerca de 45% acima do normal e o AC 22% menor que o controle (APAP). O Fator de Necrose Tumoral (TNF - α) apresentou um aumento na produção de 2,92975 pg/mg de fígado, 47% acima dos valores normais e com o AC uma redução de 22% do controle. Já a interleucina -33 (IL -33) teve um acréscimo de 10,0067 pg/mg de fígado, 58% acima da salina, e com o uso do AC obteve uma redução de 33% na produção em relação ao controle. Estas citocinas observadas anteriormente são pró-inflamatórias e esta última que tem ação anti-inflamatória, ocorreu uma inversão das taxas, o APAP promoveu uma diminuição dos níveis IL -10 cerca de 39% dos valores normais, e sob o efeito do AC teve uma redução de apenas 16% dos valores normais e em relação ao APAP teve uma produção de 28% acima.

Figura11 – Avaliação da indução e a produção de citocinas hepáticas através da determinação dos níveis de (A) IL33 , (B) TNF- α , (C) IL-1 β e (D) IL-10. Onde houve uma redução dos níveis de (A) IL33 (33%), (B) TNF- α (22%) e (C) IL-1 β (22%)e um aumento nos níveis de (D) IL-10 (28%) em comparação com o APAP sem AC.Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,05 em comparação com solução salina, # p <0,05 em comparação com veículo + acetaminofeno (ANOVA unidirecional conforme Tukey).

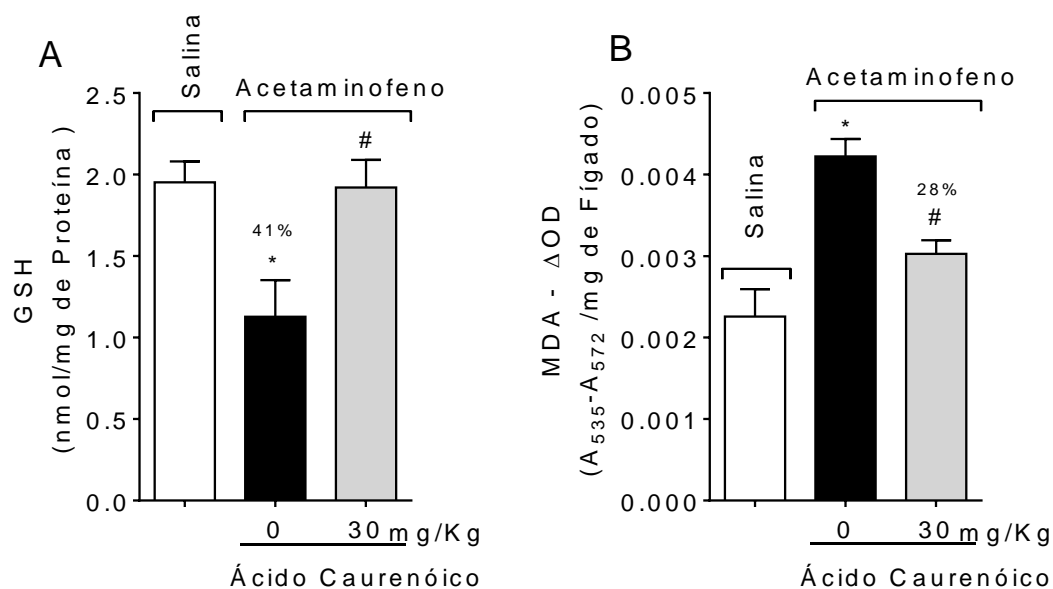


5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: GSH E MDA

O APAP induziu estresse oxidativo e promoveu a depleção dos níveis de GSH, o nível normal para o GSH foi de 1,95208 nmol/mg de proteína hepática, com o uso do APAP houve uma queda nos níveis de GSH de 41% dos valores normais e com a administração do AC, esta queda foi reduzida a 2%. O nível de Malonaldeído (MDA) que representa o grau de peroxidação da membrana celular do hepatócito

apresentou um acréscimo na produção de 47% acima do normal com o uso do APAP, e com o uso do AC teve uma produção 28% menor (**Figura 12**).

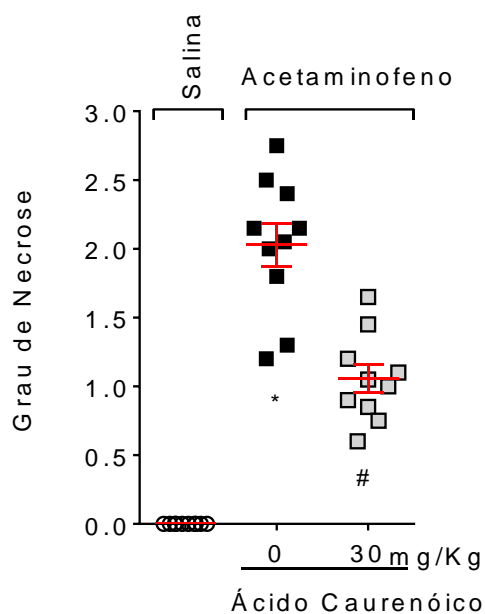
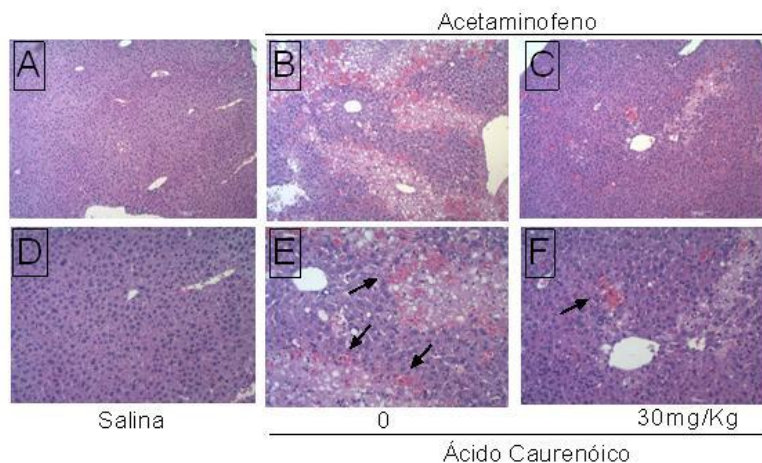
Figura 12 – Avaliação dos níveis de GSH e MDA em camundongos tratados via oral com AC (30 mg / kg), ou veículo (Tween 20%) 30 min antes de se administrar intraperitoneal APAP (600mg / kg), ou solução salina. Após 4 h, houve um aumento na concentração de (A) glutathiona (GSH), cerca de 41% nos animais que fizeram uso do AC em comparação ao APAP sem o AC. O Malondialdeido MDA teve uma redução de cerca de 28% nos camundongos que receberam o AC, em comparação dos que não receberam. Os valores são média + S.E.M., N = 15 por grupo experimental, representativo de duas experiências separadas. * P <0,0001 em comparação com solução salina, # p <0,01 em comparação com veículo + acetaminofeno (ANOVA unidirecional conforme Tukey).



5.7 CORTES HISTOPATOLÓGICOS

Exame histológico de tecido hepático de camundongos Swiss, tratados com APAP, quando comparado ao controle (A), houve uma reação inflamatória difusa com focos necróticos e hemorrágicos (B) e (E). As seções hepáticas de camundongos tratados por via enteral com ácido caurenóico (30 mg / kg) (C) e (G), atenuaram a perturbação morfológica e reduziram o edema mucoso e o foco hemorrágico causado pela administração de APAP (**Figura 13**).

Figura 13 – Exame histológico de tecido hepático de camundongos Swiss, tratados com APAP, quando comparado ao controle (A), houve uma reação inflamatória difusa com focos necróticos e hemorrágicos (B) e (E). As secções hepáticas de camundongos tratados por via enteral com ácido caurenóico (30 mg / kg) (C) e (G), atenuaram a perturbação morfológica e reduziram o edema mucoso e o foco hemorrágico causado pela administração de APAP.



6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que uma dose efetiva do AC, extraída das raízes da *Sphagneticola trilobata*, pode reduzir a hepatotoxicidade e impedir letalidade induzida pelo APAP, através da redução do estresse oxidativo, da produção de citocinas pró-inflamatórias, do recrutamento leucocitário e também dos níveis plasmáticos de ALT e AST, como consequência disso, menor necrose hepática, menor letalidade e melhora da defesa antioxidante do hospedeiro. No teste realizado, os níveis de GSH se mantiveram estáveis e em grau de normalidade sob os efeitos do AC. Dado que o acetaminofeno reduz acentuadamente a defesa antioxidante hepática (HOHMANN et al., 2013, 2015; MITCHELL et al., 1973), o aumento desta defesa antioxidante aqui observado foi promovido pela inibição da depleção de GSH e da peroxidação lipídica, sendo atribuída a via de sinalização Nrf2, constatada pelo índice de MDA e GSH dos testes realizados onde neste caso promoveu tal inibição. O recrutamento de neutrófilos e macrófagos é uma característica da lesão hepática, neste caso induzida pelo acetaminofeno (HOHMANN et al., 2015; MARQUES et al., 2012). Estes leucócitos migram, seguindo um gradiente de quimiocinas, fornecido inicialmente pela lesão celular e por gradiente necrótico fornecido pelo n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), um peptídeo presente, entre outros, derivados de mitocôndrias (MARCH et al., 2011) neste caso, fornecido pelo ataque de metabólitos tóxicos do APAP, responsável pela ativação dos neutrófilos e macrófagos. Estes níveis de alteração foram detectados pelos testes de MPO e NAG, onde o AC reduziu estes níveis. Esta é uma característica importante, considerando que os neutrófilos e macrófagos recrutados contribuem para a lesão hepática, produzindo espécies reativas ao oxigênio (ROS) e citocinas (HOHMANN et al., 2015; MARQUES et al., 2012). A necrose dos hepatócitos provoca a liberação de conteúdos intracelulares, tais como fMLP, enzimas hepáticas ALT e AST, juntamente com a produção de IL-33 (MARQUES et al., 2015), que é uma alarmina, que contribuem para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos produzindo fibrose hepática (HAMMERICH; TACKE, 2014). A sinalização de TLR9-DAMP que seria o reconhecimento dos neutrófilos ao dano ao DNA hepático (MARQUES et al., 2015), estimula a via de NF- κ B e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-33, TNF- α e IL-1 β (HAYDEN; GHOSH, 2008; JAMES, [s.d.]); que contribuem ainda mais para a lesão hepática.

Verificou-se que o AC reduz a resposta inflamatória do inibidor IKB

quinase, conseqüentemente, inibe ativação da via de sinalização de NF- κ B (KUMAR et al., 2014), reduzindo os níveis TNF- α e IL-1 β possivelmente pela inibição da via NF- κ B que causou o bloqueio de infiltração de neutrófilos, evitando a hepatotoxicidade (Marques et al., 2012), abrindo novas vias para o tratamento de insuficiência hepática induzida por fármaco. Observa-se que o AC reduziu a atividade de macrófagos e neutrófilos, observados nos testes MPO e NAG, o que se comprova a relatos anteriores (CHO et al., 2010; CHOI et al., 2011; LIM et al., 2009; MIZOKAMI et al., 2012). A exposição ao APAP está associada a alterações significativas dos marcadores enzimáticos de lesão hepática, por metabólitos tóxicos que atacam a mitocôndria celular, promovendo entre outros, baixa do nível de ATP, resultando em apoptose ou necrose. Os animais que receberam o APAP apresentaram níveis aumentados de marcadores de danos hepáticos, contudo, os que receberam o AC obtiveram redução destes níveis. O AC promoveu uma normalização dos níveis de aminotransferases (aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT)) (BAYNES; DOMINICZAK, 2000), estas enzimas estão envolvidas na interconversão dos aminoácidos à cetoácidos para a produção de energia, portanto, é necessária para o metabolismo hepático do nitrogênio e dos carboidratos, em caso de lesão no hepatócito, a lise celular promove o extravasamento de ALT e AST para a corrente sanguínea, servindo então de marcadores de lesão hepática, sendo assim, com a utilização do AC não houve lesão hepática suficiente para o aumento destas aminotransferases. O AC demonstrou estimular a produção IL-10 (DE OLIVEIRA et al., 2011) um polipeptídeo não glicosilado, sintetizado em células imunológicas que inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados (DE OLIVEIRA et al., 2011), estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Com isso, houve a modulação e normalização das citocinas pró-inflamatórias como a IL-33 (HORIZONTE, 2014), que atua em vários tipos celulares, incluindo células de origem hematopoiéticas, preferencialmente liberadas de células clivadas durante a necrose e ou apoptose (LÜTHI et al., 2009), esta IL-33 é característica no processo inflamatório, pela função de alarminas em sinais de perigo endógeno (LAMKANFI; DIXIT, 2009). O TNF α (DE OLIVEIRA et al., 2011) é uma citocina pró-inflamatória, que desempenha funções importantes como, hiperalgesia e apoptose. Apesar da agressão provocada pelo APAP, os níveis de TNF α foram estabelecidos com a ação do AC juntamente com IL-1 β , responsável pela inflamação sistêmica.

7 CONCLUSÃO

O modelo de lesão hepática induzido pelo APAP e o de proteção hepática promovida pelo Ácido Caurenóico foram padronizados pelo nosso laboratório e se mostram como alternativas viáveis para os modelos pré-existentes de hepatoproteção. O AC é uma molécula hepatoprotetora em potencial, tendo em vista que pode atuar em uma via de ativação muito importante e na transcrição e produção de substâncias antioxidantes, desintoxicantes. Seu alvo molecular é o estímulo do Nrf2 e citocinas IL-10, aumento da atividade da GSH, inibição do recrutamento de neutrófilos e macrófagos; além de possuir baixa toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ALAM J. et al. Nrf2, a Cap' n' Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 37, p. 26071–26078, 1999.
- ANDERBERG, A. A. et al. (Ed.). **The families and Genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 2007.
- ARAKAWA, Nilton Syogo. **Viguiera robusta Gardn. (Asteraceae)**: investigação fitoquímica do extrato de lavagem foliar e ensaios biológicos. 2003 Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. v. 3.
- BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by HPLC of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 119-125, 2005.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2011.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
- BLOCK, L. C. et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 61, n. 1, p. 85-89, 1998.
- BLOOM, D. A.; JAISWAL, A. K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 45, p. 44675-44682, 2003.
- BORGHI, S. M. et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 76, n. 6, p. 1141–1146, 2013.
- BRESCIANI, L. F. et al. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, Berlin, v. 59, n. 3-4, p. 229-232, 2004.
- BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; FAERSTEIN, E.; LATORRE, M. DO R. Técnicas de análise de sobrevivência. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 579–594, 2002.

CASTILLO, G.; MARTINEZ, S. Reversed-phase C18 high-performance liquid chromatography of gibberellins GA 3 and GAI 1. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 137–139, 1997.

CHAN, K.; KAN, Y. W. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 22, p. 12731-12736, 1999.

CHANAS, S. A. et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. **Biochemical Journal**, London, v. 365, n. 2, p. 405-416, 2002.

CHO, J. H. et al. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 23, n. 3, p. 190-199, 2010.

CHOI, R. J. et al. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, Jena, v. 18, n. 8–9, p. 677-682, 2011.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the Antifungal Activity on *Botrytis cinerea* of the Natural Diterpenoids Kaurenoic Acid and 3 β -Hydroxykaurenoic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 10, p. 2821–2826, 2004.

DA COSTA, F.B. et al. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 24, p. 585–587, 1996a.

DE OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciencia**. São Paulo : Ed. UNESP, 1996.

FERNANDES, E. F. A. **Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenoico**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FERNANDES, V. C. et al. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1005-1011, 2013.

CECHINEL FILHO, V. et al. Paludolactone: A new Eudesmanolide Lactone from *Wedelia Paludosa* Dc. (*Acmela Brasiliensis*). **Natural Product Research**, Milton Park, v. 18, n. 5, p. 447-451, 2004.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. Foye's principles of medicinal chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

FUCINA, G. et al. Development and validation of a stability indicative HPLC-PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of *Sphagneticola trilobata* (L.)

GLOIRE, G.; PIETTE, J. Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. **Antioxidants & redox signaling**, Larchmont, NY, v. 11, n. 9, p. 2209–2222, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**. 4th. ed. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAMMERICH, L.; TACKE, F. Interleukins in chronic liver disease: Lessons learned from experimental mouse models. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, New Zealand, v. 7, n. 1, p. 297–306, 2014.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF-kB Signaling. **Cell**, Cambridge, v. 132, n. 3, p. 344-362, 2008.

HEIT, B.; KUBES, P. Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. **Sci STKE**, Washington, v. 18, Feb. 2003.

HOHMANN, M. S. N. et al. 5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity and Lethality. **BioMed Research International**, New York, 2013.

HOHMANN, M. S. N. et al. Hypericum perforatum Reduces Paracetamol- Induced Hepatotoxicity and Lethality in Mice by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. **Phytotherapy Research**, London, v. 29, n. 7, p. 1097-1101, 2015.

ARAÚJO, E. S. **Avaliação da participação da citocina IL-33 e de mastócitos na resposta imune protetora e na evolução das alterações pulmonares e intestinais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2014.

HUANG, H. C.; NGUYEN, T.; PICKETT, C. B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 45, p. 42769-42774, 2002.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; OHSHIMA, T. A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 16, n. 10, p. 1227–1236, 2002.

ITOH, K. et al. An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 236, n. 2, p. 313–322, 1997.

JAESCHKE, H. et al. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: The role of sterile inflammation and innate immunity. **Liver International**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 8–20, 2012.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American journal of physiology. Cell physiology**, Bethesda, v. 295, n. 4, p. C849-868, 2008.

KAPLOWITZ, N. Acetaminophen hepatotoxicity: what do we know, what don't we know, and what do we do next? **Hepatology**, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 23–26, 2004.

KENDE, H.; ZEEVAART, J. The Five “Classical” Plant Hormones. **The Plant cell**, v. 9, n. 7, p. 1197–1210, 1997.

KHLESTKINA, E. K.; KUMAR, U.; RÖDER, M. S. Ent-kaurenoic acid oxidase genes in wheat. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 2, p. 251–258, 2010.

KUMAR, H. et al. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. **Natural product reports**, v. 31, n. 1, p. 109–39, 2014.

KWAK, M.-K. et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 9, p. 2883–92, 2002.

KWAK, M. K. et al. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 135-145, 2001.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. IL-33 Raises Alarm. **Immunity**, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 5-7, 2009.

LIM, H. et al. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 32, n. 9, p. 1237–1243, 2009.

LIU, Z. X. et al. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. **Hepatology**, Baltimore, v. 43, n. 6, p. 1220–1230, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. (Ed.). **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2002.

LÜTHI, A. U. et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. **Immunity**, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 84–98, 2009.

LYU, J. H. et al. Ent-kaur-16-en-19-oic acid, isolated from the roots of *Aralia continentalis*, induces activation of Nrf2. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 137, n. 3, p. 1442–1449, 2011.

MARQUES, P. E. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 1971-1982, 2012.

MARQUES, P. E. et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 348-360, 2015.

MARTINS, P. M. **Influência de parâmetros de secagem e armazenamento sobre princípios ativos de interesse de duas espécies medicinais: guaco (mikania glomerata spreng.) e calêndula (calendula officinalis l.)**. 2005. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Universidade Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2005.

MATALON, Y. **Figura sphagneticola trilobata**. Disponível em: <www.ColorfulNature.com>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MCGILL, M. R. et al. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 122, n. 4, p. 1574–83, 2012.

MICHALAK, E. **Apontamentos fitoterápicos da Irmã Eva Michalak**. Florianópolis: EPAGRI, 2008.

MIRANDA, M. M. et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO Pathway. **Mediators of inflammation**, Sylvania, Ohio, v. 2015, p. 392918, 2015.

MITCHELL, J. R. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. iv. protective role of glutathione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 187, n. 1, p. 211-217, out. 1973.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO – Cyclic GMP – Protein Kinase G – ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 5, p. 896-904, May 2012.

MOLDÉUS, P. Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mouse. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 27, n. 24, p. 2859–2863, 1978.

MOREIRA, M. R. et al. Ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: In vitro activity against bacteria responsible for dental caries. **Fitoterapia**, Milano, v. 112, p. 211-216, 2016.

NAKAMURA, K. et al. Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 111, n. 1, p. 78-84, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach**. 3. ed. United Kingdom: Wiley, 2009.

NUNES, P. P.; MOREIRA, A. L. **Fisiologia hepática**. 2007. Disponível em: <<http://www.doencasdofigado.com.br/fisiologia%20hepatica.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

PAIVA, L. A. F. et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 93, n. 1, p. 51–56, 2004.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, New York, v. 17, n. 11, p. 1381–1390, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M. ; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROBLES-ZEPEDA, R. E. et al. Montanoa tomentosa glandular trichomes containing kaurenoic acids chemical profile and distribution. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, n. 1, p. 12–17, 2009.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae**: caracterização e morfologia floral. Salvador: Edufba, 2008.

SAHIN, H.; TRAUTWEIN, C.; WASMUTH, H. E. Functional role of chemokines in liver disease models. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, London, v. 7, n. 12, p. 682-690, 2010.

TAKASUGI, M.; MASUDA, T. Three 4'-hydroxyacetophenone-related phytoalexins from *Polymnia sonchifolia*. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 5, p. 1019–1021, 1996.

TESK, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium**: compêndio de fitoterapia. 4. ed. Curitiba: Herbarium, 2001.

TUJIOS, S.; FONTANA, R. J. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, London, v. 8, n. 4, p. 202–11, 2011.

TURPAEV, K. T. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. **Biochemistry. Biokhimiia**, New York, v. 78, n. 2, p. 111–126, 2013.

VIDAL-NAQUET, P. **Le monde d'Homère Perrin**. Paris: Perrin, 2000.

WILSON, E. O. **Biodiversity**. Washington, DC: The National Academies Press, 1988.

XU, C.; LI, C. Y.-T.; KONG, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, Korea, v. 28, n. 3, p. 249-268, 2005.

YE, R. D. et al. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. **Pharmacological**, Baltimore, v. 61, n. 2, p. 119-161, 2009.

YOKOI, T. Troglitazone. In: UETRECHT, J. (Ed.). **Adverse drug reactions**. London: Springer, p. 419-436, 2010.