



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



Baccharis trimera protege contra a hepatotoxicidade
induzida pelo etanol em células HepG2 e em ratos

ANA CAROLINA SILVEIRA RABELO

Ouro Preto

2017

ANA CAROLINA SILVEIRA RABELO

Baccharis trimera protege contra a hepatotoxicidade induzida pelo etanol em células HepG2 e em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

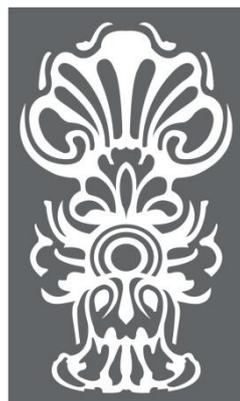
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica

Orientadora: Prof^ª. Dra. Daniela Caldeira Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Ouro Preto

2017



**Universidade Federal
de Ouro Preto**

Reitor

Prof. Dr. Marcone Jamilson Freitas Souza

Vice-Reitor

Prof.^a Dr.^a Célia Maria Fernandes Nunes

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Fábio Faversoni

NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof.^a Dr.^a Renata Nascimento de Freitas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

R114b

Rabelo, Ana Carolina Silveira.

Baccharis trimera protege contra a hepatotoxicidade induzida pelo etanol em células HepG2 e em ratos [manuscrito] / Ana Carolina Silveira Rabelo. - 2017.

130f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Daniela Caldeira Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Alcool. 2. Toxicidade - Testes - Hepáticas. 3. Stress oxidativo. 4. Plantas medicinais - Baccharis trimera. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.12

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“ Baccharis trimera protege contra a hepatotoxicidade induzida pelo etanol em células HEPG2 e em ratos”.

Aos dois dias do mês de fevereiro de 2017, às 13 horas e 30 minutos, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Ana Carolina Silveira Rabello**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

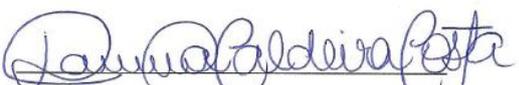
Membros da Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Dênia Antunes Saúde
Guimarães Examinadora (UFOP)



Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva
Examinador(UFOP)



Prof.^a Dr.^a Daniela Caldeira Costa
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **02/02/2017**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol



“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

*Dedico aos meus pais, Carlos e Zina,
com muito amor.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha querida orientadora Daniela, por se dedicar a esse trabalho e contribuir de forma tão grandiosa com seus conhecimentos. Obrigada por sempre ter uma palavra de apoio e as mãos estendidas em todos os momentos que foram necessários, sempre me fazendo acreditar que poderia alcançar os meus objetivos. Obrigada por acolher de forma tão singular cada orientando e saber como incentivar as nossas qualidades e nos ajudar a superar nossas dificuldades. Você é um exemplo profissional e de pessoa, na qual admiro e me espelho. Sou muito grata por todos os anos de convivência e de muito aprendizado, sempre levarei isso comigo. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu **Deus**, por sempre guiar meus passos e permitir que todas as realizações sejam possíveis.

Agradeço aos meus pais, **Carlos e Zina**, por serem exemplos de amor, dedicação, respeito e carinho, devo a vocês tudo do que sei e sou. Obrigada por serem esses pais maravilhosos e terem construído essa família que tanto me orgulho.

Obrigada **Carlos e Flávio**, por serem meus exemplos de sabedoria, conquistas e amor fraterno. Palavras não conseguiriam descrever a admiração e amor que tenho por vocês, sou muito grata por tê-los como irmãos.

Agradeço minha tia **Auxiliadora**, por sempre acreditar em mim e se fazer tão presente na minha vida pessoal e profissional. Obrigada pelos incentivos, carinho e amor incondicional.

Agradeço a equipe maravilhosa do LBM, **Karine, Pedro, Rafaela e Sttefany**, que se tornaram grandes amigos. Vocês fizeram os dias se tornarem mais leves e prazerosos. Muito obrigada por todas as risadas, brincadeiras e ajuda laboratorial, com vocês tudo se tornou mais especial.

Obrigada **Alice**, por ser essa amiga formidável, com você os dias em Ouro Preto foram mais radiantes e felizes. Obrigada por sempre estar do meu lado, por me ouvir, aconselhar e apoiar em todos os momentos que eu precisei. Obrigada por ser tão especial. Tenho certeza que essa amizade será extrapolada para toda a vida.

Obrigada **Nara, Ana Maria, Mayara, Juliana, Joyce, Josy, Renata, Prof^a. Lucinha, Prof. Marcelo**, pelo apoio laboratorial e momentos de confraternização.

Agradeço ao **Sr. Jair e Clodoaldo**, por serem tão solícitos e atenciosos. Sem a ajuda de vocês não seria possível a realização desse trabalho.

Muito obrigada **Ana Cláudia, Letícia, Fernanda e Érica**, por toda ajuda que me deram ao longo desse trabalho.

Agradeço aos professores **Wanderson, Breno, André Talvani, Célia e Jason**, por me fornecerem infraestrutura necessária para o desenvolvimento de algumas metodologias, além do conhecimento para interpretação das mesmas.

Obrigada **Glaucy**, por me acolher de forma tão afetuosa quando cheguei ao laboratório. Serei sempre grata por todos os ensinamentos que me passou com tanta paciência e confiança, além da amizade e disponibilidade que sempre teve comigo.

Obrigada **Carol Moraes**, por ser tão prestativa e ter contribuído com seus ensinamentos.

Agradeço aos técnicos **André e Carol**, pela ajuda necessária.

Agradeço a **Larissa**, por se tornar uma amiga tão querida e especial. Chegar em casa e poder conversar com uma pessoa tão amável fez toda a diferença durante esses anos. Obrigada pelos cafés regados com tanta doçura!

Agradeço as amigas **Adriana, Laura Cotta, Lívia, Carol Araújo, Laís, Larissa, Rafaela, Esther, Tamiris, Iris e Laura Rodrigues**, por serem presentes em minha vida e me proporcionarem momentos tão únicos, onde relembro o significado da palavra amizade.

Obrigada à **Universidade Federal de Ouro Preto**, na qual sou grata pelo acolhimento e conhecimentos adquiridos.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho. A todos vocês, meu muito obrigada!

AGRADECIMENTO AOS COLABORADORES

Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos;

Laboratório de Morfopatologia;

Laboratório de Imunoparasitologia;

Laboratório de Enzimologia e Proteômica;

Laboratório de Farmacognosia;

Laboratório de Síntese Química;

Laboratório de Catálise Homogénea e Química Medicinal;

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação

Muito obrigada pelo suporte necessário!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. O uso de bebidas alcólicas.....	3
2.2. Farmacocinética do etanol.....	4
2.3. O metabolismo do etanol.....	7
2.4. Doença hepática gordurosa alcóolica	10
2.5. Estresse oxidativo.....	15
2.6. Defesa antioxidante	17
2.7. Plantas medicinais	21
2.8. <i>Baccharis trimera</i>	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral:.....	26
3.2. Objetivos específicos:.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Reagentes.....	27
4.2. Coleta do material botânico.....	27
4.3. Preparo dos extratos da planta.....	27
4.4. Ensaios <i>in vitro</i>	28
4.4.1. Cultivo celular	28
4.4.2. Contagem das células com azul de trypan.....	28
4.4.3. Ensaio de citotoxicidade com MTT.....	29
4.4.4. Quantificação de ERO	30
4.4.5. Quantificação de NO	30
4.4.6. Ensaio da luciferase	31
4.5. Ensaios <i>in vivo</i>	32
4.5.1. Animais.....	33

4.5.2.	Padronização do tempo entre a última dose de etanol e a eutanásia	33
4.5.3.	Delineamento do experimento agudo	35
4.5.4.	Delineamento do experimento crônico	36
4.5.5.	Análise dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma	38
4.5.6.	Análise das defesas antioxidantes	38
4.5.6.1.	Superóxido dismutase (SOD)	38
4.5.6.2.	Catalase	39
4.5.6.3.	Glutathiona total, oxidada e reduzida	40
4.5.6.4.	Glutathiona peroxidase (GPx)	41
4.5.6.5.	Glutathiona redutase (GR)	41
4.5.7.	Análise dos marcadores de estresse oxidativo	42
4.5.7.1.	Proteína carbonilada	42
4.5.7.2.	Ácido tiobarbitúrico (TBARS)	43
4.5.8.	Zimografia	44
4.5.9.	Dosagem de proteínas totais pelo método BCA	45
4.5.10.	Dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry	45
4.5.11.	Análise histológica	46
4.5.12.	Análise estatística	46
5.	RESULTADOS	47
5.1.	Rendimento dos extratos	47
5.2.	<i>In vitro</i>	47
5.2.1.	Ensaio com MTT	47
5.2.2.	Quantificação de ERO	50
5.2.3.	Quantificação de NO	51
5.2.4.	Avaliação do fator de transcrição Nrf2	52
5.3.	<i>In vivo</i>	54
5.3.1.	Experimento Agudo	54
5.3.1.1.	Dosagens bioquímicas	54
5.3.1.2.	Defesa antioxidante	57
5.3.1.2.1.	SOD e catalase	57
5.3.1.2.2.	Glutathiona total, oxidada, reduzida, peroxidase e redutase	57
5.3.1.3.	Marcadores de dano oxidativo	60
5.3.1.3.1.	TBARS e proteína carbonilada	60
5.3.1.4.	Atividade da MMP-2	60
5.3.1.5.	Análise histológica	61

5.3.2. Experimento crônico.....	64
5.3.2.1. Dosagens bioquímicas.....	64
5.3.2.2. Defesa antioxidante	66
5.3.2.2.1. SOD e catalase	66
5.3.2.2.2. Glutathiona total, oxidada, reduzida, peroxidase e redutase	66
5.3.2.3. Marcadores de dano oxidativo	68
5.3.2.3.1. TBARS e proteína carbonilada	68
5.3.2.4. Atividade da MMP-2.....	68
5.3.2.5. Análise histológica	69
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	102
A- Mapa genético do vetor pRL-TK.....	102
B- Mapa genético do vetor pGL4.37.....	102
C- Caracterização dos extratos	103
D- Compostos fenólicos	107
E- Submissão do artigo científico.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dosagens séricas do experimento agudo para avaliar as funções renal e hepática, glicemia e perfil lipídico.	56
Tabela 2: Dosagens séricas do experimento crônico para avaliar as funções renal e hepática, glicemia e perfil lipídico	65
Tabela 3: Compostos identificados no extrato hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	104
Tabela 4: Compostos identificados no extrato aquoso de <i>B. trimera</i>	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo do etanol.....	6
Figura 2: Alterações nas vias metabólicas em função da diminuição da razão NAD ⁺ /NADH..	9
Figura 3: Papel da SIRT1 na patogênese da AFLD.....	14
Figura 4: Atuação das enzimas antioxidantes..	18
Figura 5: Mecanismo de atuação do Nrf-2	19
Figura 6: Estrutura da quercetina.....	21
Figura 7: <i>Baccharis trimera</i>	23
Figura 8: Efeitos macro e microscópicos	35
Figura 9: Delineamento do experimento agudo..	36
Figura 10: Delineamento do experimento crônico.	38
Figura 11: Viabilidade celular 12 horas	48
Figura 12: Viabilidade celular 24 horas	50
Figura 13: Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO).	51
Figura 14: Quantificação de óxido nítrico (NO)	52
Figura 15: Avaliação do fator de transcrição Nrf2 pela técnica de luciferase.....	53
Figura 16: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre a atividade da SOD e catalase no experimento agudo	57
Figura 17: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre glutathiona total, glutathiona oxidada, glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, no experimento agudo.	59
Figura 18: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre TBARS e proteína carbonilada.....	60
Figura 19: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre a atividade de MMP-2	61
Figura 20: Secções do fígado de ratos tratados com <i>Baccharis trimera</i>	63

Figura 21: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre a atividade da SOD e catalase, no experimento crônico	66
Figura 22: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre glutathiona total, glutathiona oxidada, glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase, glutathiona reductase.....	67
Figura 23: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre TBARS e proteína carbonilada.....	68
Figura 24: Efeito de <i>Baccharis trimera</i> sobre a atividade de MMP-2	69
Figura 25: Secções do fígado de ratos tratados com <i>Baccharis trimera</i>	70
Figura 26: Resumo dos resultados dos experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	88
Figura 27: Perfil do extrato hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	105
Figura 28: Perfil do extrato hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	107
Figura 29: Avaliação de compostos fenólicos totais.	108

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: enzima acil CoA carboxilase

ACL: enzima ATP citrato liase

ADH: álcool desidrogenase

ALD: doença hepática alcóolica

ALDH: aldeído desidrogenase

AFLD: doença hepática gordurosa alcóolica

Aq: Extrato Aquoso de Baccharis trimera

AMPK: Proteína cinase ativada com monofosfato de 5'-adenosina

APAP: paracetamol

ARE: elemento de resposta antioxidante

ATP: adenosina trifosfato

BSA: Albumina Sérica Bovina

Carboxy-H₂DCFDA: (5-ou-6)-carboxy-2',7' dichlorodihydro fluorescein diacetate

CAT: catalase

CLAE-EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CO₂: Dióxido de Carbono

CPT-I: carnitina palmitoytransferase I

Cul3: culina 3

CYP2E1: citocromo P450 no retículo endoplasmático

DAG: Diacilglicerol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

E: grupo etanol

ECM: componentes da matriz extracelular
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
FAS: enzima ácido graxo sintase
Fe⁺²: Ferro
FoxO1: fator de transcrição O1
GPx: glutaciona peroxidase
GR: glutaciona redutase
GSH: glutaciona reduzida
GSSG: glutaciona oxidada
GST: glutaciona S-transferase
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
He: Extrato Hidroetanólico de *Baccharis trimera*
HepG2: Hepatocarcinoma humano
HO-1: heme oxigenase-1
HSC: células estreladas hepáticas
HT1050: células de fibrosarcoma
NQO1: quinona oxidoreductase-1
IL-6: interleucina 6
iNOS: enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida
KEAP-1: proteína tipo cálice associada-ECH
LPS: lipopolissacarídeo
MAP: proteína cinase ativada por mitógeno
MDA: malondialdeído
m/z: razão massa/carga
MeOH: Metanol

MEOS: sistema microsomal de oxidação do etanol

MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado)

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)

NAPH oxidase: Enzima Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase

NFATc4: células T ativadas com fator nuclear c4

NF-κB: fator de transcrição nuclear κB

NO: óxido nítrico

Nrf2: Fator nuclear-eritróide relacionado ao fator-2

O₂: Oxigênio

O₂⁻: ânion superóxido

OMS: Organização Mundial de Saúde

OH⁻: Radical hidroxila

PA: fosfatidato

PBS: Solução Salina Tamponada

PKC: Proteína Cinase C

Q: Grupo Quercetina

PPARα: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma α

SCD1: estearoil-CoA desaturase-1

SFB: soro fetal bovino

SIRT1: sirtulina-1

SOD: superóxido dismutase

SREBP-1: Proteína-1 de ligação ao elemento regulador do esterol

TAG: triacilglicerídeo

TCA: ciclo do ácido cítrico

TBARS: ácido tiobarbitúrico

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TR (min): tempo de retenção em minutos

UV: ultra violeta

VLDL: lipoproteína de muita baixa densidade

γ -GCS: ligase γ -glutamilcisteína

RESUMO

O etanol é o álcool mais utilizado nas bebidas alcóolicas e sua metabolização ocorre principalmente no fígado, sendo seu consumo abusivo associado à hepatotoxicidade. Um dos principais mecanismos responsáveis pela hepatotoxicidade induzida pelo etanol é o estresse oxidativo. Diante disso, os antioxidantes de origem exógena podem ser vistos como uma alternativa para restabelecer o equilíbrio oxidante/reductor, sendo esses amplamente encontrados nas plantas medicinais. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito protetor dos extratos hidroetanólico e aquoso da espécie vegetal *Baccharis trimera* em modelo de hepatotoxicidade induzida com etanol. Para tal, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo utilizados os compostos quercetina e vitamina C, respectivamente, como controles positivos, já que o potencial antioxidante dos mesmos tem sido bem estabelecido. Os extratos de *B. trimera* foram avaliados quanto à citotoxicidade, sendo que apenas a concentração de 600 µg/mL do extrato hidroetanólico, no tempo de 24 horas, apresentou citotoxicidade. Foi observado que as células tratadas com os extratos de *B. trimera* e estimuladas com etanol apresentaram redução na produção de ERO e de óxido nítrico (NO), mas não apresentaram diferença significativa em relação ao fator de transcrição Nrf2. Os ensaios *in vivo* foram divididos em experimento agudo, onde ratos machos da linhagem Fisher foram pré-tratados com os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera* por dois dias; e experimento crônico, onde os animais foram pré-tratados apenas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* durante 28 dias. No experimento agudo foi observado que os extratos promoveram o aumento na concentração de glutatona oxidada e na atividade de glutatona peroxidase e superóxido dismutase. Também promoveram diminuição nos níveis de TBARS e melhora no perfil histológico, entretanto, não observamos melhora na função hepática e perfil lipídico destes animais. Já no experimento crônico, observamos melhora na função renal e hepática, diminuição nos níveis de triacilgliceróis, da atividade da metaloproteinase 2 e melhora no perfil histológico. Estes resultados analisados em conjunto sugerem que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* melhora a hepatotoxicidade induzida pelo etanol tanto no modelo *in vitro* quanto *in vivo*.

Palavras-chave: Etanol, hepatotoxicidade, estresse oxidativo, plantas medicinais, *Baccharis trimera*.

ABSTRACT

Ethanol is the alcohol most used in alcoholic beverages and it is metabolized at the liver. The abusive consumption of alcohol leads to the hepatotoxicity. Oxidative stress is one of the main mechanisms responsible to the hepatotoxicity caused by ethanol. In this regard, antioxidants from exogenous origin may be an alternative to recovery the oxidant/reducer ratio, and they are widely found on medicinal plants. Thereby, the objective of this study was to investigate the protective effect of hydroethanolic and aqueous extracts from *Baccharis trimera* under a model of hepatotoxicity caused by ethanol. For that, *in vitro* and *in vivo* assays were carried out using respectively quercetin and vitamin C as positive controls, since the antioxidant potential from them has been well-recognized. The *B. trimera* extracts were evaluated regarding its cytotoxicity. Only the hydroethanolic extract from *B. trimera* at 600 µg/mL and after 24 h had cytotoxicity. Cells treated with *B. trimera* extracts and stimulated by ethanol had a reduced production of ERO and nitric oxide (NO). However, cells treated with *B. trimera* extracts and stimulated by ethanol unaffected the Nrf2 transcription factor. The *in vivo* assays were subdivided in experiment 1) acute: male rats (Fisher) were pre-treated with hydroethanolic and aqueous extracts of *B. trimera* for 2 d; and 2) chronic: male rats were pre-treated only with hydroethanolic extracts of *B. trimera* for 28 d. In exp. 1, both hydroethanolic and aqueous extracts of *B. trimera* increased the activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase. Yet, both extracts decreased the TBARS levels and enhanced the histological profile, but without improvements on hepatic function and lipid profile of the rats. In exp. 2, the hydroethanolic extracts improved renal and hepatic functions and histological profile, and also reduced triacylglycerols and metalloproteinase 2 activity. These results, taken together, suggest that the hydroethanol extract of *B. trimera* improves ethanol-induced hepatotoxicity both *in vitro* and *in vivo*.

Key-words: Ethanol, hepatotoxicity, oxidative stress, medicinal plants, *Baccharis trimera*.

1. INTRODUÇÃO

O etanol é metabolizado principalmente no fígado, por ação de enzimas como álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase. Essas enzimas utilizam como cofator NAD^+ e gera NADH , dessa forma ocorre uma diminuição da razão NAD^+/NADH , afetando diversas vias metabólicas (SMITH et al., 2007). Também há formação de aductos de acetaldeído e de espécies reativas de oxigênio (ERO), que promove o quadro de estresse oxidativo (LU e CEDERBAUM, 2008; HAN et al., 2016). Em algumas circunstâncias o sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) pode ser ativado, o que contribui ainda mais para a formação de ERO (SMITH et al., 2007; CENI et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2015).

A doença hepática gordurosa alcóolica (do inglês-AFLD) é a primeira resposta do fígado ao uso de etanol e é caracterizada pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos (CENI et al., 2014). Um tratamento farmacológico ideal para a AFLD reduziria os parâmetros inflamatórios, o estresse oxidativo e o acúmulo de lipídios, além de evitar eventos fibróticos. No entanto, o desenvolvimento de uma droga que seja capaz de agir em tantas vias diferentes é extremamente difícil. Por esta razão, não se desenvolveu uma única terapia com fármacos, mas sim terapias combinadas numa tentativa de reverter a lesão dos hepatócitos (LÍVERO e ACCO, 2016). Devido à grande importância do estresse oxidativo na patogênese da AFLD, vários estudos têm se concentrado no uso de antioxidantes para prevenir o dano oxidativo e melhorar a função hepática (CENI et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2015; LÍVERO e ACCO, 2016).

Antioxidantes naturais podem ser encontrados nas plantas medicinais, sendo que a maioria apresenta em sua composição substâncias fenólicas. Tais compostos são responsáveis pela ação antioxidante, pois podem atuar como sequestradores das espécies reativas e/ou induzir a expressão gênica de enzimas antioxidantes (ARRIGO et al., 2015). O Brasil é o país com maior biodiversidade no mundo, possuindo grande potencial para o desenvolvimento de terapias que auxiliem nas diversas doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Nesse contexto, *Baccharis trimera*, popularmente conhecida como carqueja, é uma planta nativa da América do Sul, amplamente distribuída na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, que possui uma elevada concentração de compostos fenólicos e,

portanto, apresenta potencial antioxidante (MIRABALLES et al., 2013). Diante desses fatos, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial hepatoprotetor de extratos de *B. trimera* frente à intoxicação com etanol.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O uso de bebidas alcólicas

O uso de bebidas alcoólicas é uma prática cultural muito antiga, sendo documentada, no mínimo, desde 10.000 a. C. Esse costume ocupou um lugar privilegiado em diversas culturas como objeto de celebrações, cultos e também na esfera religiosa. Para esses povos, a bebida era o veículo para se obter habilidades visionárias e poéticas, sabedoria e criatividade para se relacionar com suas divindades. Além disso, muitos a utilizavam como forma de pertencer a determinado grupo social (FERNANDES, 2005).

Desde a Idade Média que o álcool fermentado era considerado um dos itens mais importantes para a indústria, sendo que na Idade Moderna, devido às grandes navegações e contato com outros países, as bebidas alcoólicas se consolidaram como mercadorias de primeira importância na economia mundial. Além da importância como gênero básico no comércio, o álcool representou um papel decisivo na organização de um sistema tributário, fornecendo aos Estados da época uma das maiores fontes de renda (CARNEIRO, 2004).

Inicialmente, as bebidas possuíam um teor relativamente baixo de álcool, uma vez que a obtenção dependia quase exclusivamente do processo de fermentação. Porém, com o advento do processo de destilação, introduzido na Europa e espalhado para o mundo, surgiram novos tipos de bebidas com teores alcóolicos mais elevados. Como consequência, houve aumento do número de pessoas que apresentavam algum problema relacionado ao uso excessivo de etanol (CARNEIRO, 2004).

O consumo cada vez mais crescente de bebidas alcoólicas apontava para uma sociedade geradora de adoecimentos, com isso, em 1849, Magnus Huss introduziu o conceito de alcoolismo, no qual pode ser definido como um estado de intoxicação pelo álcool que se apresenta com sintomas físicos, psiquiátricos ou mistos (MEDEIROS, 2011). A partir de então, se deu início a preocupação com o uso de bebidas alcólicas e suas consequências, sendo que de 1997 em diante, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou o termo de dependência ao álcool no sistema classificatório de doenças (BRASIL, 2008a).

As consequências do mau uso do álcool são sérias e de âmbito mundial, promovendo sérios problemas biológicos, psicológicos e sociais (WHO, 2014). Segundo a OMS (2014), no ano de 2012 aproximadamente 6% das mortes em todo mundo foi em decorrência do álcool, o que representa 3,3 milhões de óbitos. Dentre as causas mais comuns, podem ser citadas as doenças cardiovasculares e diabetes, injúrias não intencionais, doenças gastrointestinais (principalmente cirrose hepática), cânceres, dentre outras. Além disso, o abuso do álcool tem sido associado a suicídios, violência doméstica e acidentes de trânsito (GALLASSI et al., 2008).

Diante dos prejuízos acarretados pelo uso de bebidas alcólicas o poder público Brasileiro criou diversas medidas, como a Política de Atenção Integral ao Usuário de Álcool e outras Drogas, que visa garantir o direito assistencial aos usuários, articulando ações de promoção, prevenção e reabilitação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). O Decreto aprova a Política Nacional sobre o Álcool e dispõe sobre as medidas para redução do uso indevido de álcool e sua associação com a violência e criminalidade (BRASIL, 2007). Em 2008, foi criada a “Lei Seca”, que restringe o consumo de bebida alcoólica por condutor de veículo automotor (BRASIL, 2008b).

Apesar de muitos efeitos benéficos terem surtido a partir das medidas adotadas para diminuição do uso de bebidas alcólicas, dados estimam que o Brasil gaste, anualmente, aproximadamente 82 milhões de reais com as consequências dos problemas relacionados ao álcool, que englobam desde o tratamento das condições médicas até a perda da produtividade decorrentes do seu uso (BUARQUE, 2004). Segundo estudo realizado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP), o alcoolismo, se comparado a outros problemas de saúde, é responsável por gerar três vezes mais licenças médicas; aumentar em cinco vezes as chances de acidentes de trabalho; aumentar em oito vezes a utilização de diárias hospitalares e levar as famílias a recorrerem três vezes mais às assistências médica e social (GALLASSI et al., 2008).

2.2. Farmacocinética do etanol

O etanol pertence à classe dos álcoois e possui fórmula molecular C_2H_6O . Por possuir um grupo funcional hidroxila e também uma pequena cadeia carbônica pode ser solubilizado em água e em óleo (MARTINS et al., 2013). Dentre os álcoois, o etanol é

considerado uma das drogas lícitas mais versáteis conhecidas pelos seres humanos e produz diversos efeitos diretos numa grande variedade de sistemas neuroquímicos, sendo considerado depressor do sistema nervoso central (SMITH et al., 2007).

O etanol é quase completo e instantaneamente absorvido por difusão passiva, obtendo o pico de concentração entre 30 e 90 minutos. Sua absorção é mais eficiente no intestino delgado do que no estômago, isso se deve ao fato de que o muco que protege o estômago possui uma resistência maior que a do intestino, que também tem maior absorção devido às vilosidades que aumentam a superfície de contato. Além disso, o peristaltismo é mais intenso no estômago do que no intestino, desempenhando um papel no esvaziamento gástrico e no tempo de trânsito intestinal (LEVITT et al., 1997).

A taxa de absorção do etanol pode ser influenciada por diversos fatores, como a presença e composição de alimentos no estômago; concentração de etanol na bebida ingerida; taxa de ingestão e de esvaziamento gástrico; interação com medicamentos; eficiência do fluxo sanguíneo no local da absorção; permeabilidade dos tecidos de cada indivíduo; além de outros fatores genéticos (GOODMAN e GILMAN, 1996; RAMCHANDANI e LI, 2001; SMITH et al., 2007; CEDERBAUM, 2012; HERNÁNDEZ et al., 2015). Estudos demonstram que alimentos sólidos podem diminuir a absorção em até 30%, ao passo que alimentos líquidos não possuem esse efeito. Provavelmente isso se deve ao fato de que o organismo necessita digerir o alimento antes de absorver o etanol (LEVITT et al., 1997; HERNÁNDEZ, et al., 2015).

Uma vez absorvido, a distribuição do etanol é governada em grande parte pelo conteúdo de água presente nos tecidos e órgãos, uma vez que o etanol é uma molécula pequena e hidrossolúvel, não necessitando de ligação às proteínas plasmáticas (RAMCHANDANI e LI, 2001; HERNÁNDEZ et al., 2015). Existem grandes variações nas proporções de gordura e água no corpo dos indivíduos, dessa forma, as mulheres geralmente têm um menor volume de distribuição de álcool do que os homens, devido à maior porcentagem de gordura corporal. Como consequência, os níveis de álcool no sangue das mulheres tendem a ser mais altos do que nos homens quando administrada a mesma dose de álcool por kg de peso corporal. Além disso, o metabolismo de primeira passagem do álcool no estômago pode ser menor em mulheres alcólatras, o que contribui para os maiores níveis de álcool no sangue (CEDERBAUM, 2012). Parte do etanol absorvido é excretado pelos pulmões, rins e pelo suor (SMITH et al., 2007).

O etanol é metabolizado principalmente no fígado através de reações de oxidação, em que a primeira enzima atuante é a álcool desidrogenase (ADH). Esta enzima converte o etanol em acetaldeído e, para tal, utiliza NAD^+ comoceptor de elétrons, resultando na formação de NADH. Quando em altas concentrações ou diante do uso crônico de etanol, o mesmo pode ser convertido em acetaldeído por ação da catalase ou pelo sistema oxidante microssomal do etanol (MEOS), constituído por enzimas do citocromo P450 no retículo endoplasmático (CYP2E1). Uma vez formado, o acetaldeído é convertido em acetato por ação da aldeído desidrogenase (ALDH), que também utiliza NAD^+ (LI et al. 2001; SETSHEDI et al., 2010; CENI et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2015). O acetaldeído ainda pode ser convertido a acetato por ação da aldeído oxidase, xantina oxidase e por CYP2E1, mas a contribuição dessas vias é insignificante (CEDERBAUM, 2012). O acetato formado é captado e oxidado por outros tecidos, principalmente coração e músculo esquelético, sendo convertido a acetil CoA, que pode entrar diretamente no ciclo do ácido cítrico (TCA) e ser oxidada a CO_2 (SMITH et al., 2007). (Figura 1).

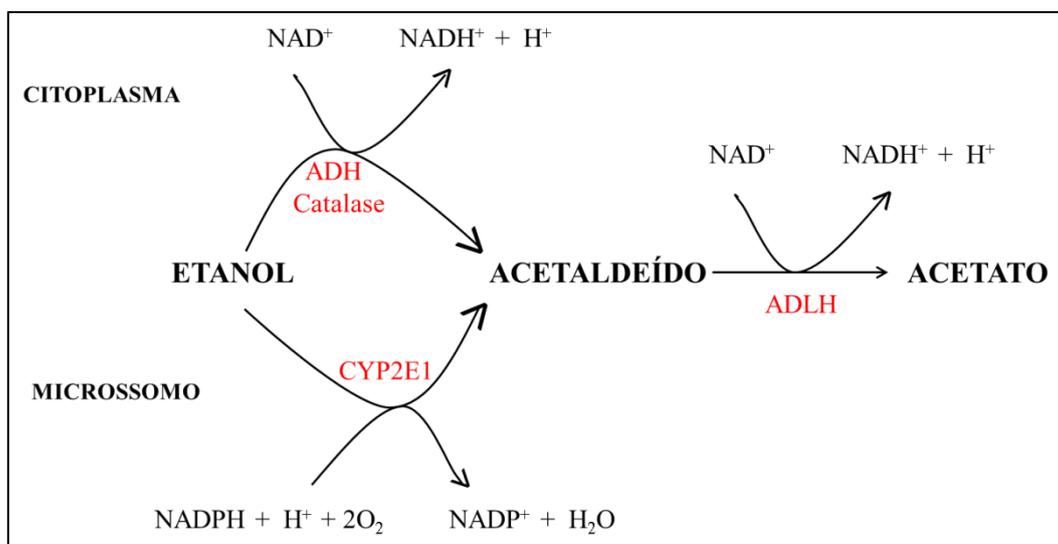


Figura 1: Metabolismo do etanol. A enzima álcool desidrogenase (ADH) é uma das principais responsáveis pela conversão do etanol em acetaldeído, necessitando de NAD^+ comoceptor de elétrons, como resultado, há formação de NADH. Em determinadas circunstâncias, o etanol pode ser convertido em acetaldeído por ação da catalase ou do sistema oxidante microssomal de etanol no retículo endoplasmático (CYP2E1). Uma vez formado, o acetaldeído é convertido em acetato por ação da aldeído desidrogenase (ALDH), que também utiliza NAD^+ .

Fonte: Adaptado de Ceni et al., 2014.

O metabolismo do etanol apresenta um grau de variação considerável entre os indivíduos, isso ocorre devido às diferenças genéticas nas enzimas responsáveis por

esse mecanismo; nas concentrações dos cofatores (NAD^+ e NADH) e na presença de etanol e acetaldeído nos compartimentos celulares (mitocôndria e citosol dos hepatócitos). O acetaldeído exerce efeito inibitório sobre a ADH, além do que, sua eliminação é um fator crítico na oxidação do etanol a uma taxa eficiente, dessa maneira, as concentrações usuais de etanol e acetato na circulação durante a oxidação do etanol são milimolares, enquanto que as do acetaldeído são inferiores a 10 micromolar (BOSRON et al., 1993; LI et al. 2001; CEDERBAUM, 2012). Substâncias como o hormônio do crescimento, epinefrina e estrogênios, exercem efeito estimulatório sobre a ADH; já os hormônios da tireóide e os andrógenos inibem a atividade de ADH (CEDERBAUM, 2012). Embora existam esses mecanismos, não há uma regulação efetiva na oxidação do etanol, por consequência, as formações de NADH no citosol e na mitocôndria tendem a se acumular, aumentando a proporção NADH/NAD^+ a níveis elevados (SMITH et al., 2007).

A eliminação do etanol é dependente da concentração, sendo que concentrações mais elevadas de álcool no sangue são eliminadas a uma taxa mais elevada. Devido a esta dependência da concentração, não é possível estimar uma única taxa de metabolismo do álcool, porém, em média, a capacidade metabólica para removê-lo é de cerca de 170 a 240 g por dia para uma pessoa com um peso corporal de 70 kg (CEDERBAUM, 2012).

2.3. O metabolismo do etanol

Muitos dos efeitos agudos da ingestão do etanol são causados pela diminuição da proporção de NAD^+/NADH no fígado, como consequência, há alteração das vias metabólicas que requerem NAD^+ ou são inibidas por NADH (SMITH et al., 2007). Uma vez que a ADH atua no citosol, a razão redox NAD^+/NADH citosólica será reduzida, refletindo na razão piruvato/lactato; enquanto que, devido à atuação da ALDH na mitocôndria, ocorrerá diminuição da razão NAD^+/NADH mitocondrial, refletindo na razão hidroxibutirato/acetoacetato (CEDERBAUM, 2012).

Quando o piruvato é convertido em lactato, por ação da lactato desidrogenase, há utilização de NADH e formação de NAD^+ . Essa reação é favorecida devido ao déficit de NAD^+ no citosol, promovendo acúmulo de lactato. Esse acúmulo, além de diminuir o

pH sanguíneo, promove a diminuição da excreção urinária de ácido úrico, que contribui ainda mais para a acidose. Também devido ao aumento de NADH, ocorre inibição da enzima xantina desidrogenase e ativação da xantina oxidase, resultando em formação de ácido úrico e moléculas oxidativas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (MIRA e MANSO, 1993; YAMAMOTO et al., 2005). Devido a esses fatores e ao aumento da degradação de purinas, pode ocorrer acúmulo de ácido úrico e formação de cristais de urato, que se precipitam nas articulações promovendo o quadro de gota (SMITH et al., 2007; DALBETH et al., 2014).

A diminuição da proporção $NAD^+/NADH$ pode causar hipoglicemia em indivíduos em jejum que estiverem ingerindo bebidas alcólicas e forem dependentes da gliconeogênese para manter os níveis sanguíneos de glicose. A alanina e o piruvato são os principais precursores gliconeogênicos, porém, como ocorre deslocamento para a formação de lactato, o piruvato proveniente da alanina não fica disponível para ser utilizado na gliconeogênese (KREBS, 1968; STEINER et al., 2015). Além disso, a menor proporção $NAD^+/NADH$ impede que outros precursores gliconeogênicos, como o oxaloacetato e glicerol, entrem na rota gliconeogênica. Em contrapartida, o consumo de etanol, concomitante com uma refeição, pode resultar em hiperglicemia transitória, provavelmente devido à diminuição da razão $NAD^+/NADH$, que inibe a glicólise na etapa da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SMITH et al., 2007).

Outro prejuízo decorrente da baixa taxa de $NAD^+/NADH$ é a inibição da oxidação de ácidos graxos, os quais se acumulam no fígado. Esses ácidos graxos são reesterificados em triacilgliceróis por combinarem-se com o glicerol 3-P. O aumento dessa taxa também aumenta a disponibilidade de glicerol 3-P, por promover sua síntese a partir de intermediários da glicólise. Os triacilgliceróis são incorporados dentro de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que se acumula no fígado promovendo a doença hepática gordurosa alcóolica (KIRPICHI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016); também passa para o sangue, resultando em hiperlipidemia induzida por etanol (SMITH et al., 2007).

Após o consumo de etanol há aumento da lipólise e os ácidos graxos que são oxidados são convertidos em acetil-CoA e, subsequentemente, em acetoacetato e β -hidroxibutirato. Nesse processo de oxidação, concomitante com a oxidação do etanol, é formado NADH suficiente para que não ocorra oxidação de acetil-CoA no TCA. Dessa

forma, o oxaloacetato é direcionado para formação de malato, uma vez que a enzima malato desidrogenase utiliza NADH como cofator. Os baixos níveis de oxaloacetato prejudicam a síntese de citrato pela citrato-sintase, sendo assim, a acetil-CoA passa para a síntese de corpos cetônicos em vez do TCA (SMITH et al., 2007). Todas essas alterações metabólicas estão resumidas na figura 2.

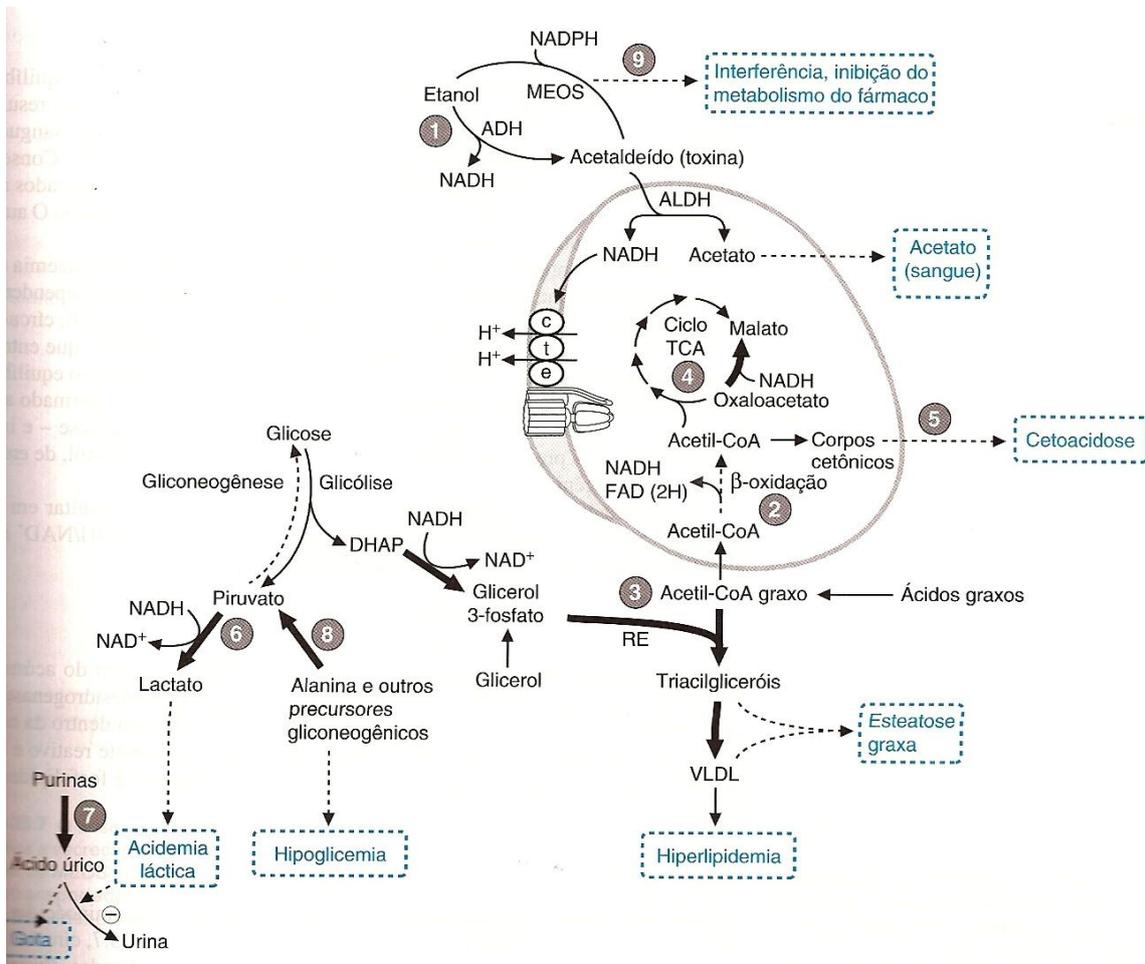


Figura 2: Alterações nas vias metabólicas em função da diminuição da razão $NAD^+/NADH$. Devido à diminuição da proporção de $NAD^+/NADH$ ocorre inibição da glicólise; deslocamento do piruvato para síntese de lactato, com conseqüente inibição da gliconeogênese; acúmulo de lactato e ácido úrico, promovendo acidose; inibição do ciclo do ácido cítrico (TCA) e deslocamento do acetil CoA para a síntese de corpos cetônicos (promovendo cetoacidose) e triacilgliceróis (promovendo esteatose hepática).

Fonte: SMITH et al., 2007.

Muitos dos efeitos tóxicos do consumo crônico do etanol resultam do acúmulo de acetaldeído em decorrência da diminuição da sua oxidação, por um mecanismo de adaptação metabólica (CEDERBAUM, 2012). Após altas doses de etanol, o acetaldeído acumulado no fígado passa para a corrente sanguínea onde se liga covalentemente a

grupos aminos, sulfidrilas, nucleotídeos e fosfolípidos, formando aductos (SORRELL et al., 1985; SMITH et al., 2007; SETSHEDI et al., 2010; CEDERBAUM, 2012). Esses aductos são amplamente patogênicos, já que alteram a homeostasia da célula, podendo promover mutações no DNA (BROOKS e THERUVATHU, 2005; CENI et al., 2014).

Uma das consequências da formação de aductos de acetaldeído com aminoácidos é a diminuição geral na síntese de proteínas, além da diminuição da secreção de proteínas plasmáticas, como albumina, fatores de coagulação e proteínas transportadoras para vitaminas, esteroides e ferro. O resultado disso é um acúmulo proteico com afluência de água para dentro dos hepatócitos e inchaço do fígado, contribuindo para a distorção da arquitetura hepática (TUMA et al., 2003; SMITH et al. 2007).

Durante a intoxicação por etanol há aumento do estresse oxidativo, uma vez que espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas, principalmente pela CYP2E1 e NADPH oxidase nas células de Kupffer. Essas ERO juntamente com os aductos de acetaldeído, promovem peroxidação lipídica, formação de proteína carbonilada, de radicais lipídicos e radical 1-hidroxietilo, além de se ligarem à antioxidantes, principalmente à glutatona, diminuindo a proteção das células (LU e CEDERBAUM, 2008; HAN et al., 2016). Com o consumo crônico de etanol a mitocôndria danifica-se e a taxa de transporte de elétrons é inibida, dessa forma, a fosforilação oxidativa tende a se tornar desacoplada, diminuindo a oxidação do acetaldeído e, também, dos ácidos graxos, que acentua o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos e contribui para a doença hepática gordurosa alcóolica (SMITH et al, 2007; LÍVERO e ACCO, 2016).

2.4. Doença hepática gordurosa alcóolica

Doença hepática alcóolica (do inglês- *Alcoholic Liver Disease (ALD)*) é um termo genérico para as doenças hepáticas induzidas pelo álcool, incluindo a doença hepática gordurosa alcóolica, esteatohepatite e cirrose, que podem progredir para carcinoma hepatocelular (UDOH et al., 2015; KIRPICH et al., 2016). Sabe-se que aproximadamente 90% dos bebedores pesados desenvolvem esteatose, mas apenas alguns deles (~35%) desenvolvem ALD avançada (LÍVERO e ACCO, 2016). Isso mostra que embora se tenha acreditado que a evolução dessas doenças fosse dependente

da dose e da duração do consumo de álcool, já é sabido que se trata de múltiplas interações, como sexo, idade, obesidade, padrões de consumo, fatores dietéticos e genéticos, tabagismo, processo inflamatório, dentre outros (CENI et al., 2014; UDOH et al., 2015; KIRPICHI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016).

A doença hepática gordurosa alcóolica (do inglês- *Alcoholic Fatty Liver Disease* (AFLD)), também chamada apenas de esteatose, é a primeira e mais comum resposta do fígado a doses moderadas ou grandes de álcool, incluindo o consumo excessivo e crônico (CENI et al., 2014; BI et al., 2015; ANSARI et al., 2016). Geralmente apresenta-se de forma assintomática, exceto pela hepatomegalia (LÍVERO e ACCO, 2016). É patologicamente caracterizada por acúmulo de lipídios micro e macrovesiculares nos hepatócitos e ausência de fibrose hepática (MACSWEEN e BURT, 1986; BI et al., 2015). A patogênese da AFLD é complexa e envolve diversos mecanismos, sendo alguns explicados adiante.

A Proteína Cinase Ativada por Monofosfato de 5'-adenosina (AMPK) hepática é uma enzima importante na regulação da biossíntese de ácidos graxos, triacilgliceróis (TAG) e colesterol. Essa enzima regula os fatores de transcrição Proteína-1 de ligação ao elemento regulador do esteroide (SREBP-1) e Receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR α). Após consumo agudo e crônico de etanol a atividade de AMPK é diminuída, como consequência, a atividade transcricional de SREBP-1 fica elevada e a de PPAR α diminuída (BI et al., 2015; ANSARI et al., 2016). Como resposta, há aumento na atividade das enzimas ácido graxo sintase (FAS), acil CoA carboxilase (ACC), ATP citrato liase (ACL), estearil CoA dessaturase e enzimas málicas, uma vez que elas são reguladas pelo fator SREBP-1. Além disso, a diminuição da atividade de PPAR α promove a supressão da carnitina palmitoytransferase I (CPT-I), uma enzima chave na transferência de acil-CoA de cadeia longa para dentro da mitocôndria para que sejam oxidados. O somatório de todos esses efeitos é um aumento na síntese de ácidos graxos com diminuição da sua oxidação (YOU et al., 2014; LOUVET e MATHURIN, 2015; UDOH et al., 2015).

O fígado é um dos órgãos-chave onde SIRT1, uma nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺)- dependente, desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico e da inflamação através da modificação do estado de acetilação de várias moléculas alvo, incluindo histonas, reguladores da transcrição e seus co-

reguladores (AMPK, SREBP-1, PPAR α , co-ativador PPAR γ -1 α (PGC-1 α), lipina-1, fator de transcrição O1 (FoxO1), β -catenina, fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e células T ativadas com fator nuclear c4 (NFATc4)) (CENI et al., 2014; YOU et al., 2014; BI et al., 2015; LÍVERO e ACCO, 2016), além de auxiliar no controle do estresse oxidativo celular (CHUNG et al., 2010; YOU et al., 2014; LOUVET e MATHURIN, 2015; ANSARI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016).

Evidências sugerem que SIRT1 e AMPK se regulam mutuamente, compartilham caminhos de sinalização semelhantes e modulam objetivos comuns (como SREBP-1, PPAR α) (RUDERMAN et al., 2010), dessa forma, a desregulação do eixo SIRT1-AMPK pelo etanol representa uma hipótese para o sistema de sinalização central prejudicado na AFLD (YOU et al., 2014). SIRT1 também interage e regula o PGC-1 α , um importante fator que junto com PPAR α induzem a expressão de enzimas de oxidação de ácidos graxos mitocondriais (RODGERS et al., 2008). Diante o uso de etanol, esse eixo SIRT1-PGC-1 α /PPAR α fica prejudicado contribuindo para a diminuição da oxidação de ácidos graxos (YOU et al., 2014). Além disso, o etanol diminui os níveis de adiponectina, que é um hormônio que ativa SIRT1, isso contribui para a AFLD (YOU et al., 2014).

Lipina-1 é uma proteína que possui diferentes isoformas, sendo a α presente no núcleo e a β no citoplasma. No citoplasma, ela medeia a conversão de fosfatidato (PA) à diacilglicerol (DAG), que serve como substrato para a síntese de TAG, que, em seguida, é transportada para outros tecidos por associação com VLDL. Já no núcleo, interage com receptores como PGC-1 α , PPAR α e SREBP-1, estimulando os genes mitocondriais envolvidos na oxidação de ácidos graxos e suprimindo os genes lipogênicos (YOU et al., 2014; BI et al., 2015). O etanol eleva a razão Lipina-1 β/α , promovendo inibição da secreção de VLDL-TAG, aumento da lipogênese de novo, diminuição da oxidação de ácidos graxos, conduzindo finalmente ao desenvolvimento de esteatose no fígado (CENI et al., 2014; YOU et al., 2014; BI et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que tanto lipina-1 quanto SIRT1 possuem papel anti-inflamatório, uma vez que reprimem a atividade transcricional de NF- κ B e NFATc4 (YIN et al., 2014; YOU et al., 2014; BI et al., 2015). O uso de etanol leva a diminuição de lipina-1 e de SIRT1, promovendo o acúmulo e ativação de NFATc4 no núcleo, com consequente aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral

α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (YIN et al., 2014; YOU et al., 2014); além de aumentar a atividade de NF- κ B, exacerbando a inflamação na AFLD (CENI et al., 2014; ANSARI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016).

O processo inflamatório promovido pelo etanol também envolve o aumento de lipopolissacarídeo (LPS) na circulação porta-hepática, uma vez que há aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e promoção de disbiose entérica com supercrescimento bacteriano (CENI et al., 2014; HARTMAMM et al., 2015; LOUVET e MATHURIN, 2015; HAN et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016). O LPS ativa células de Kupffer, que passam a produzir ERO, moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias, além de ativar NF- κ B (LOUVET e MATHURIN, 2015; HAN et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016). Em resposta ao aumento de LPS há recrutamento de leucócitos que contribui ainda mais para o processo inflamatório (LOUVET e MATHURIN, 2015; HAN et al., 2016).

Outra via afetada pelo etanol é a autofagia, que é um processo responsável por degradar moléculas maiores, como proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono complexos, TAG e organelas disfuncionais, em moléculas menores, que são ainda discriminadas para gerar ATP (CZAJA, 2011; DONOHUE e THOMES, 2014). Dessa forma, esse processo atenua o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, conferindo proteção ao fígado (LÍVERO e ACCO, 2016). Esse mecanismo pode ser controlado por FoxO3a (que promove a autofagia hepática) (YOU et al., 2014) que é regulado por SIRT1 (NI et al., 2013). O consumo agudo de etanol diminui SIRT1, que conseqüentemente aumenta a atividade de FoxO3a, promovendo a autofagia (NI et al., 2013). Esse dado indica que pode haver um mecanismo compensatório nos estágios iniciais da AFLD (CENI et al., 2014; LÍVERO e ACCO, 2016). Por outro lado, o uso crônico de etanol diminui esse processo (CENI et al., 2014; LÍVERO e ACCO, 2016).

Como mostrado, durante o metabolismo do etanol ocorre um aumento do estresse oxidativo, já que ERO são produzidas em resposta ao metabolismo propriamente dito e também pelas células de Kupffer, em resposta ao LPS. Essas ERO, juntamente com a diminuição da razão NAD⁺/NADH, formação de acetaldeído e acetato, inibem SIRT1, promovendo o aumento da lipogênese e da inflamação, concomitante com a diminuição da oxidação de ácidos graxos (YOU et al., 2014). Nesse sentido, o estresse oxidativo pode ser considerado como um dos fatores centrais para a AFLD (Figura 3) (CHUNG et

al., 2010; CENI et al., 2014; YOU et al., 2014; LOUVET e MATHURIN, 2015; ANSARI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016).

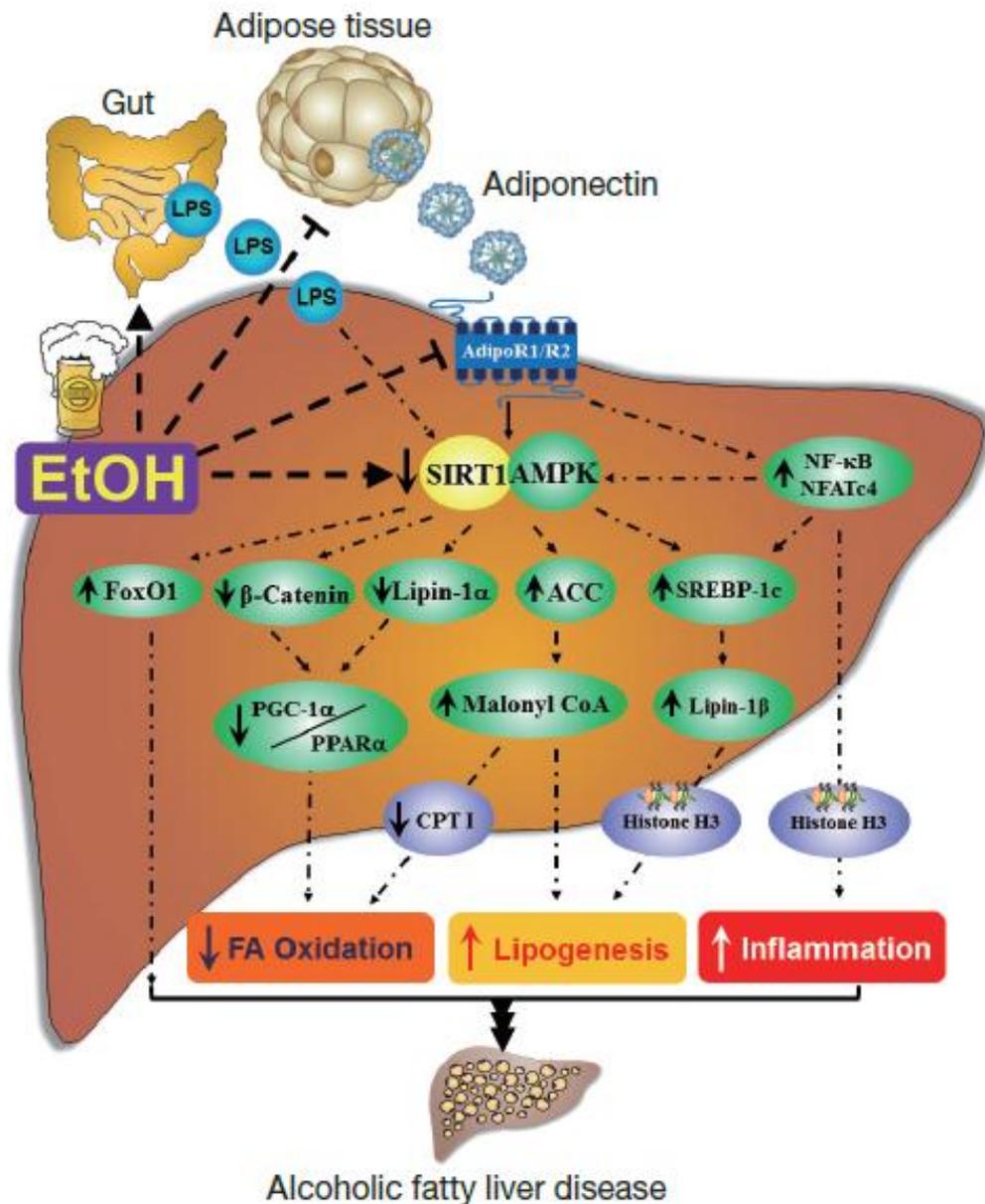


Figura 3: Papel da SIRT1 na patogênese da AFLD. O etanol inibe SIRT1, alterando as vias AMPK, SREBP-1, lipina-1, PGC-1 α , PPAR α , FoxO1, NF- κ B e NFATc4, no fígado. Os efeitos finais são a ativação da lipogênese, inibição da oxidação de ácidos graxos, redução da mobilização de lipídios e indução de inflamação, promovendo a AFLD. AMPK: Proteína cinase ativada com monofosfato de 5'-adenosina; SREBP-1: Proteína-1 de ligação ao elemento regulador do esterol; PPAR α : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma α ; PGC-1 α : co-ativador PPAR γ -1 α ; FoxO1: fator de transcrição O1; NF- κ B: fator de transcrição nuclear κ B; NFATc4: células T ativadas com fator nuclear c4; CPT I: carnitina palmitoytransferase I; SIRT1: sirtuin 1.

Fonte: YOU et al., 2014.

2.5. Estresse oxidativo

Estresse oxidativo pode ser definido como um estado em que as espécies oxidantes excedem o sistema antioxidante, perdendo o equilíbrio entre elas (YOSHIKAWA e NAITO, 2002; KATAKWAR et al., 2016). Esse quadro pode ser desencadeado por um aumento dos compostos endógenos e/ou exógenos que estão entrando na auto-oxidação acoplada com a produção de ERO; diminuição da reserva de antioxidantes de baixa massa molecular; inativação de enzimas antioxidantes; diminuição da síntese de enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixa massa molecular; ou ainda a combinação de dois ou mais desses fatores (LUSHCHAK, 2014).

Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que possuem número de elétrons desemparelhados na última camada de valência, implicando em alta instabilidade e reatividade (YOSHIKAWA e NAITO, 2002). Esses radicais podem atacar moléculas próximas para se tornarem estáveis, enquanto isso, a molécula atacada pode se tornar um radical livre ao perder seu elétron e iniciar uma cascata de reações, causando danos para as células (ARULSELVAN et al., 2016). Adicionalmente existem outros agentes reativos que não possuem elétrons desemparelhados e que também são prejudiciais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), portanto, a denominação espécies reativas de oxigênio (ERO) se torna mais abrangente (KATAKWAR et al., 2016).

As ERO podem ser classificadas em radicalares, pertencendo a esse grupo o radical hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet), alcóxila (RO^\bullet), óxido nítrico (NO^\bullet), dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) e peroxinitrito (ONOO^\bullet). Já o oxigênio singlete (O_2), o ozônio (O_3), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o cloreto de nitrila (NO_2Cl), são classificados como não radicalares (VASCONCELOS et al, 2007).

Em baixos níveis, as ERO desempenham papel fundamental no organismo, podendo atuar como moléculas sinalizadoras durante a ativação de proteínas cinases, como a proteína cinase C (PKC) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAP), que participam de diversas funções celulares (YOSHIKAWA e NAITO, 2002); são produzidas por neutrófilos auxiliando na proteção do organismo contra microrganismos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997); participa da homeostasia vascular (CHEN et al., 2015); regula muitos processos metabólicos e celulares incluindo proliferação, migração e expressão gênica (NOORI, 2012); dentre outras funções. No entanto, quando em

níveis mais elevados pode desencadear o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; YOSHIKAWA e NAITO, 2002; KATAKWAR et al., 2016).

Segundo Lushchak (2014) o estresse oxidativo pode ser dividido em basal (BOS), de intensidade baixa (LOS), intermediária (IOS) e alta (HOS). Na BOS a quantidade de estresse é mínima, já que se trata das ERO produzidas em condições fisiológicas, exemplificada pela enzima NADPH oxidase (BORDT e POLSTER, 2014); pela xantina oxidase (YAMAMOTO et al., 2005); pelo citocromo P450 oxidase (RIBEIRO et al., 2005); pela óxido nítrico sintase (SILVA et al., 2011); pela lipoxigenase e cicloxigenase (HALLIWEL, 2009) e pela cadeia transportadora de elétrons (DAY, 2014).

Altos níveis de ERO podem induzir a LOS, que é caracterizada por inativação das enzimas antioxidantes e enzimas associadas, e até mesmo inibição da síntese dessas enzimas. Essas alterações podem ser detectadas por técnicas laboratoriais rotineiras. Já na IOS, o nível de componentes oxidativamente modificados é bastante elevado, enquanto os componentes induzidos e sensíveis por ERO estão diminuídos. Na HOS ambas as funções são atingidas, isto é, virtualmente todos os substratos potenciais disponíveis são oxidados nesta situação o que resulta no desenvolvimento de uma resposta quase máxima (LUSHCHAK, 2014).

Esses prejuízos podem ser exemplificados pelo radical hidroxila, que ganha destaque devido a sua alta reatividade, podendo provocar lesões direta ou indiretamente. De forma direta, há peroxidação lipídica, alteração da permeabilidade vascular, alteração da estrutura de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos, alterações oxidativas em moléculas de longa duração, tais como o colágeno e a elastina, degradação oxidativa de glicosaminoglicanos. Por outro lado, as lesões indiretas estão relacionadas com o cálcio intracelular, que devido à perda na sua homeostase encontra-se elevado, provocando ativação da fosfolipase A2 (envolvida com a cascata do ácido araquidônico) e da xantina oxidase (que ativa a cascata da hipoxantina) (RODRIGUES, 1998). Além disso, o organismo não possui mecanismo de defesa enzimática que neutralize esse radical (VASCONCELOS et al, 2007; KATAKWAR et al., 2016).

Devido a perda do equilíbrio redox várias condições patológicas têm sido descritas na literatura, como a associação entre o estresse oxidativo e câncer, malária, infecção pelo HIV, doenças cardíacas, aterosclerose, isquemia (PANTH et al., 2016), diabetes, úlcera gástrica (ELMASTAS et al., 2006; LÍVERO et al., 2016-a), obesidade,

transtornos neurodegenerativos (BARBOSA et al., 2008), doenças renais, lesões de pele, disfunção pulmonar, catarata (GIADA e MANCINI FILHO, 2006), processos inflamatórios (BORDT e POLSTER, 2014), doença hepática gordurosa alcóolica (LÍVERO et al., 2016-b), entre outras.

2.6. Defesa antioxidante

Devido à exposição do organismo as ERO foram desenvolvidos mecanismos de defesa, sendo estes representados pelos antioxidantes. Entende-se como antioxidante qualquer substância que possa sequestrar as ERO, ou ainda que sejam capazes de inibir ou retardar a oxidação de substratos oxidáveis (DAY, 2014), podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos (AITKEN e ROMAN, 2008). Como defesa enzimática podem ser citadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (NOORI, 2012). A defesa não enzimática engloba a vitamina C e E, o tripeptídeo redox glutaciona reduzida (GSH), carotenoides, compostos fenólicos, dentre outros (CHEN et al., 2015; HAN et al., 2016).

A SOD é uma enzima que pode se apresentar de três formas, mas todas catalisam a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 . A forma SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD) está presente principalmente no citoplasma e nos fluidos extracelulares; a forma SOD-manganês (Mn-SOD) está localizada principalmente nas mitocôndrias; enquanto a forma SOD extracelular é exclusiva dos fluidos extracelulares (MARKLUND et al., 1982). Uma vez formado, o H_2O_2 pode ser convertido em água por ação da CAT ou da GPx (NAUDI et al., 2011).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que atua principalmente nos peroxissomos, catalisando a conversão do H_2O_2 em água, e possui atividade dependente de NADPH. É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Geralmente atua de forma mais ativa à medida que a concentração de H_2O_2 aumenta no interior da célula, isso ocorre porque a afinidade da GPx por esse composto é cerca de 10 vezes maior que o da CAT (POWERS et al., 1999).

A GSH é o tiol de baixa massa molecular mais abundante, possuindo papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Esse peptídeo é oxidado a glutatona oxidada (GSSG) em duas situações: 1- quando a GPx converte o H_2O_2 em água; e 2- quando a glutatona oxidase catalisa a conversão de O_2 em H_2O_2 . Para que o sistema continue operante é necessário que a GSSG seja reduzida novamente, quem promove essa redução é a GR (Figura 4) (HUBER e ALMEIDA, 2008).

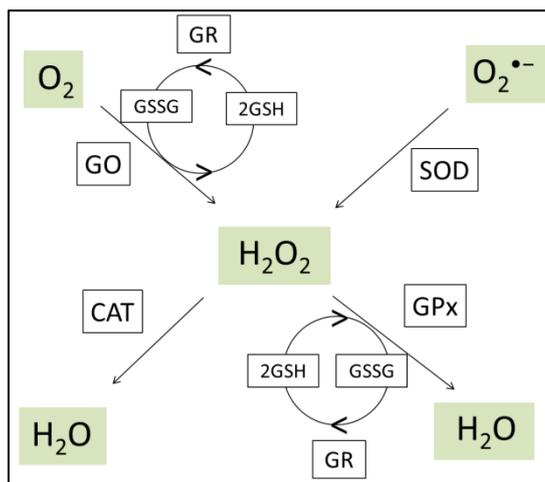


Figura 4: Atuação das enzimas antioxidantes. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Enquanto a glutatona oxidase (GO) converte o oxigênio em H_2O_2 . O H_2O_2 formado pode ser neutralizado à água (H_2O) por ação da catalase (CAT) ou da glutatona peroxidase (GPx). Tanto GPx, quanto GO utilizam glutatona reduzida (GSH) durante suas catálises, promovendo sua oxidação e formação de glutatona oxidada (GSSG). Para que o sistema continue operante é necessária a redução da GSSG em GSH, quem catalisa essa reação é a glutatona redutase (GR).

As enzimas antioxidantes são reguladas principalmente pelo Fator nuclear-eritróide relacionado ao fator-2 (Nrf-2) (LUSHCHAK, 2014; CHEN et al., 2015; GONZÁLES et al., 2015). Normalmente, esse fator encontra-se no citoplasma celular associado à proteína tipo cálice associada-ECH (Keap-1), que atua como um “adaptador” para a ubiquitinação e degradação proteossomal de Nrf2, mediada por Cul3 (CHEN et al., 2015). No entanto, na presença de estresse oxidativo são promovidas alterações conformacionais na proteína Keap1, bloqueando a ubiquitinação e a degradação de Nrf-2 (GONZÁLES et al., 2015). Em seguida, ocorre uma separação entre Keap1 e Nrf-2, que se transloca para o núcleo e liga-se às pequenas proteínas Maf, que juntamente se ligam ao elemento de resposta antioxidante (ARE), promovendo a transcrição de genes alvo, incluindo genes que codificam enzimas antioxidantes,

enzimas de detoxificação, proteínas antiapoptóticas e enzimas anti-inflamatórias (Figura 5) (LUSHCHAK, 2014; CHEN et al., 2015; GONZÁLES et al., 2015; KIM e KEUM, 2016).

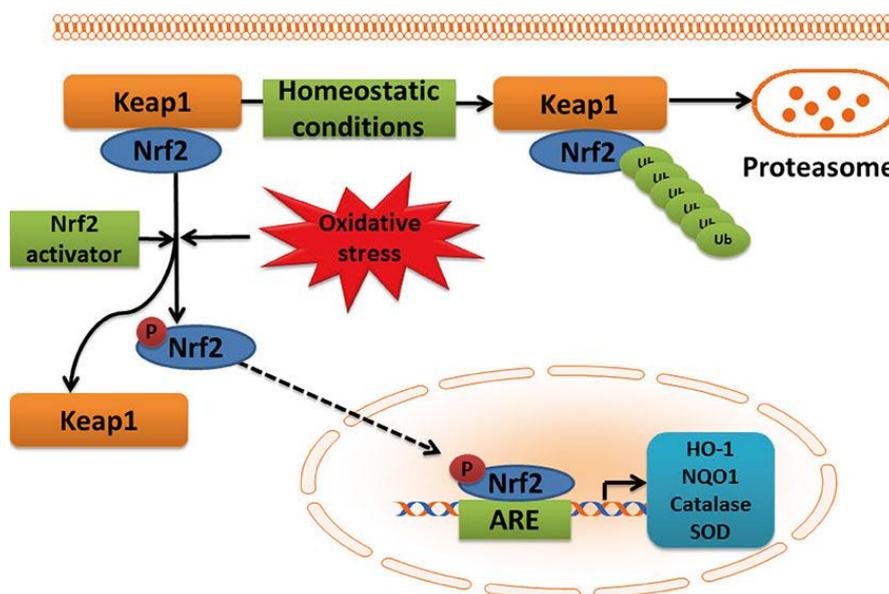


Figura 5: Mecanismo de atuação do Fator nuclear-eritróide relacionado ao fator-2 (Nrf-2). Em condições normais, Nrf2 encontra-se no citoplasma celular associado à proteína tipo cálice associada-ECH (Keap-1), que permite que Nrf2 seja marcado com ubiquitina para sofrer degradação proteossomal. Na presença de estresse oxidativo, há dissociação de Keap-1 e Nrf-2, que migra para o núcleo e se liga a ao elemento de resposta antioxidante (ARE), promovendo a transcrição de genes alvo, como enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase (SOD)).

Fonte: CHEN et al., 2014.

Além dos antioxidantes enzimáticos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres, já que nesses alimentos podem ser encontradas substâncias que atuam em sinergismo na proteção das células e tecidos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Dentre os compostos mais encontrados podem ser citadas as vitaminas C e E, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010; ARRIGO et al., 2015).

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é um antioxidante hidrofílico, podendo neutralizar diretamente as ERO (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Geralmente é consumido em grandes doses pelos seres humanos e é absorvido de forma

rápida e eficiente por um processo dependente de energia (BIANCHI e ANTUNES, 1999). No entanto, essa vitamina pode não ser capaz de inibir os radicais livres que propagam as reações de peroxidação lipídica em meios lipofílicos (BARBOSA et al., 2010).

A vitamina E pode ser encontrada na natureza em quatro formas diferentes α , β , γ e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma. A vitamina E dietética é absorvida sob a forma não esterificada no intestino delgado, incorporada a quilomícrons e secretada na circulação intestinal (JORDÃO et al., 1998). Essa vitamina é considerada um dos micronutrientes mais importantes que inibem ERO, promovendo proteção às células contra os danos oxidativos. Além disso, existe uma interação entre a vitamina E e a vitamina C, que cria uma "reciclagem da vitamina E", pela qual a função antioxidante da vitamina E oxidada é continuamente restaurada por outros antioxidantes (ARRIGO et al., 2015).

Minerais como selênio, cobre, zinco, manganês e ferro, também desempenham um importante papel na proteção antioxidante, já que podem atuar como cofatores das enzimas antioxidantes (BJØRKLUND E CHIRUMBOLO, 2016). O selênio, por exemplo, age como cofator da GPx e tem um papel protetor contra lesões peroxidativas e disfunção mitocondrial. Já o magnésio está envolvido em reações mediadas por ATP, sendo que sua deficiência na dieta reduz a atividade da GR e resulta na geração de ERO e aumento da susceptibilidade à peroxidação lipídica (ARRIGO et al., 2015).

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas envolvidos no sistema de defesa, incluindo a proteção contra radiações ultravioletas (UV) e agentes patogênicos. Até à data, mais de 8000 compostos fenólicos já foram identificados nas plantas (HUSSAIN et al., 2016). Tipicamente, os polifenóis são ingeridos e depois desglicosilados e absorvidos através do epitélio intestinal, podendo atuar no organismo (SARIC e SIVAMANI, 2016). Os polifenóis têm sido descritos com propriedades antioxidantes (NOORI, 2012; HUSSAIN et al., 2016), sendo que os mecanismos envolvidos incluem a supressão da formação de ERO por inibição de enzimas envolvidas na sua produção, eliminação de ERO e proteção de defesas antioxidantes, como a ativação do fator de transcrição Nrf2, que desempenha um papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo (HUSSAIN et al., 2016).

Dentre os polifenóis, os flavonoides são os mais estudados como antioxidantes (CERQUEIRA et al., 2007), sendo exemplificados pelos flavonóis, flavonas, isoflavonas, entre outros (NOORI, 2012). Esses compostos apresentam um núcleo fundamental de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis em sua estrutura, sendo dois anéis fenólicos substituídos e um pirano acoplado a um dos anéis fenólicos. Esta estrutura química os permite doar hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, o que os confere a característica antioxidante (PIETTA, 2000). Dentre os flavonoides mais estudados podemos destacar a quercetina, que é encontrada abundantemente em frutos, folhas de vegetais, chás, vinho tinto, dentre outros (CERMAK et al. 1998). A quercetina possui efeito antioxidante, propriedade esta bastante difundida na literatura (Figura 6) (KESSLER et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2007; SAK, 2014; JIMENEZ et al., 2015; ALMAGHRABI, 2015; de ARAUJO et al., 2016), por apresentar capacidade de diminuir a produção de ERO (de ARAUJO et al., 2016) e aumentar os níveis de Nrf2 (KIM et al., 2015).

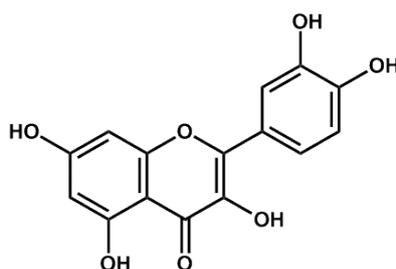


Figura 6: Estrutura da quercetina

Fonte: <http://www.infoescola.com/farmacologia/quercetina/>

2.7. Plantas medicinais

Plantas medicinais são definidas como aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Para usá-las, deve-se conhecer a planta e saber onde colher e como prepará-la. Quando qualquer parte dessas plantas passa por um processo de industrialização para formação de um medicamento passa a ser denominado fitoterápico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, 2004).

A utilização de plantas medicinais constitui uma das práticas mais antigas para tratamento, cura e prevenção de doenças (RODRIGUES et al., 2011), sendo que alguns registros apontam que o início da sua utilização foi em 2800 a.C (FIRMO et al., 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), até o ano de 2006 aproximadamente 85% da população de países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos para a atenção primária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Mesmo nos dias atuais, o interesse do público nas terapias complementares tem aumentado enormemente nos países em desenvolvimento, isso pode ser atribuído aos obstáculos enfrentados pela população para obtenção de medicamentos convencionais e também pela facilidade na obtenção de plantas medicinais (JUNIOR e PINTO, 2005). Além disso, sabe-se que estas desempenham um papel importante para a pesquisa farmacológica, não só quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (FILHO, 1998). Na medicina Ocidental já existem mais de 120 moléculas derivadas de plantas, tais como a forscolina, o taxol, a emetina, a colchicina, a codeína, dentre outras, reforçando a importância das mesmas como possibilidades de tratamento (CALIXTO, 2000).

Diante a importância dessas plantas e também como forma de incentivo para a utilização segura das mesmas, em 1978 a OMS reconheceu oficialmente o uso dos fitoterápicos (ANVISA, 2010). Já em 2006, o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS (PNPIC) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que garante à população o acesso a plantas medicinais e fitoterápicas de forma segura e eficaz, ampliando as opções terapêuticas e fortalecendo o complexo produtivo e o uso sustentável da biodiversidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial (ALMEIDA, 2011). Além disso, é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos tradicionais, passados de geração a geração, destacando-se os conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Diante o arsenal de plantas no país, a maioria das espécies possui utilização apenas de forma empírica, existindo poucos estudos que permitem a elaboração de monografias completas e modernas. Existem cerca de 50.000 espécies vegetais superiores catalogadas (BRASIL, 2016), mas apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 2% das espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA et al., 2001). Dessa forma, há uma lacuna entre a oferta de plantas e as pesquisas de validação, necessitando, portanto, de respaldo científico que comprove a eficácia e segurança terapêuticas (FOGLIO et al., 2006).

2.8. *Baccharis trimera*

Baccharis trimera é uma planta amplamente distribuída na América do Sul, pertencente à família Asteraceae, e popularmente conhecida como carqueja (Figura 7) (BONA et al., 2005). Essa planta é utilizada popularmente como hipoglicemiante, protetora gástrica, vasorelaxante da musculatura lisa, hepatoprotetora, anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (BORELLA et al., 2006; KARAM et al., 2013).



Figura 7: *Baccharis trimera*.

Fonte: http://www.wikiwand.com/es/Baccharis_trimera

Os compostos mais frequentemente encontrados na *B. trimera* são os flavonóides, como rutina, hispidulina, eupatorina, quercetina, luteolina, nepetina, apigenina, kaempferol, cirsimarina, cirsiol, eriodictiol, 5-hidroxi-3', 4',6,7-tetrametoxiflavona, 3-o-metilquercetina, genkwanina, 7,4'-di-o-metilapigenina e os terpenóides, como

monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos. Contudo, os flavonoides estão entre os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade e que apresentam maior atividade terapêutica (VERDI et al., 2005).

Algumas das propriedades dessa espécie já foram comprovadas cientificamente, como nos estudos realizados por Dias et al. (2009), que demonstraram redução da área total de lesão ulcerativa quando ratos Wistar foram tratados com extrato bruto liofilizado de *B. trimera*. Milanesi et al. (2009) demonstraram a inibição parcial no crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* quando estes foram expostos ao extrato aquoso de *B. trimera*. Também foi encontrado efeito anti-inflamatório do extrato aquoso de *B. trimera* num modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos (PAUL et al., 2009).

Em 2012, Oliveira et al. observaram que no extrato etanólico de *B. trimera* foi encontrado uma grande quantidade de compostos fenólicos e atividade anti-inflamatória. De Oliveira et al. (2012) observaram que o óleo essencial da carqueja possui atividade contra *Shistosoma mansoni*, causando a destruição do tegumento nos ovos das fêmeas. Foi demonstrado por Lívero et al. (2016-a) que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* possui efeito gastroprotetor em modelo de úlcera induzida por etanol e ácido acético. Ainda foi demonstrado por Lívero et al. (2016-b) que o mesmo extrato melhora a doença hepática gordurosa alcóolica.

A investigação das propriedades terapêuticas de *B. trimera* no nosso laboratório iniciou-se em 2010, quando Pádua et al. trataram com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* ratos Fisher intoxicados com paracetamol (APAP). Foi observado que houve redução na produção de espécies reativas de oxigênio nos neutrófilos desses animais (PÁDUA et al., 2010).

Em 2013, foi demonstrado efeito antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera* em um modelo de inflamação induzido por APAP. Nesse estudo, a carqueja inibiu a expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase (gp91^{phox} e p47^{phox}) e da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), o que poderia justificar a redução na produção de ERO e óxido nítrico nos neutrófilos desses animais (PÁDUA et al., 2013).

No ano seguinte, Pádua et al. (2014) confirmaram o efeito hepatoprotetor de *B. trimera* em um modelo de inflamação induzido por APAP, onde foi observado no fígado desses animais um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, como SOD,

CAT e GR, e uma diminuição nos biomarcadores de dano oxidativo, como TBARS e proteína carbonilada.

de Araújo et al. (2016) caracterizaram o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, onde foram identificados nove ácidos fenólicos e cinco flavonoides. Ainda nesse trabalho, foi investigado o efeito do extrato hidroetanólico de *B. trimera* na via PKC/NADPH oxidase, sendo observada uma diminuição tanto na atividade quanto na expressão da PKC. Além disso, houve diminuição da fosforilação da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase em células SK Hep-1.

Analisando os estudos científicos anteriores, onde são identificados vários flavonoides nos extratos de *B. trimera* e, sabendo-se que estes compostos possuem diferentes atividades biológicas em organismos vivos, dentre elas atividade antioxidante, o presente estudo iniciou-se em 2015, com o intuito de avaliar o efeito dos extratos aquoso e hidroetanólico de *B. trimera* em um modelo de hepatotoxicidade induzida com etanol.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito protetor de *Baccharis trimera* em modelo de hepatotoxicidade induzida com etanol.

3.2. Objetivos específicos:

- Em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) avaliar:

A citotoxicidade dos extratos aquoso e hidroetanólico de *Baccharis trimera*;

A produção de ERO e NO;

A atividade do fator de transcrição Nrf2.

- Em soro e fígado de ratos intoxicados com etanol submetidos ou não ao tratamento avaliar:

A função hepática e renal;

O perfil lipídico e glicemia;

A defesa antioxidante (SOD, CAT, GSH, GPx, GR);

Os marcadores de dano oxidativo (TBARS e proteína carbonilada);

A atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2);

A presença de esteatose hepática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

O meio de cultura DMEM, os reagentes dimetil sulfoxido (DMSO), 3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), a solução de antibióticos (composto por penicilina, estreptomicina e anfotericina B), a gelatina, a vitamina C, o kit para dosagem de glutatona redutase, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O soro fetal bovino (SFB), o kit para quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species) e para quantificação de óxido nítrico (NO) (DAF-FM diacetato-4-amino), a lipofectamina, além dos kits para as dosagens de colesterol total, triacilglicerídeos, albumina, glicose, creatinina, ureia, HDL e proteínas totais foram adquiridos da Invitrogen. Os kits para dosagem de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram adquiridos da Bioclin. O plasmídeo pRL-TK e o kit Dual Luciferase assay System foram adquiridos da Promega.

4.2. Coleta do material botânico

As partes aéreas da planta *Baccharis trimera* foram coletadas na cidade de Ouro Preto e identificadas pela professora Viviane R. Scanlon, sendo a espécime armazenada no Herbarium José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com a excicata número OUPR 22.127. Após a identificação, as partes aéreas foram secas em estufa ventilada (30° C) por cinco dias e, em seguida, pulverizadas em moinho mecânico e armazenadas em frascos plásticos.

4.3. Preparo dos extratos da planta

Para o preparo do extrato aquoso 100 g da planta foram maceradas com água durante 24 horas. Já para a obtenção do extrato hidroetanólico 100 g da planta foram maceradas com etanol 70% e água (na proporção de 1:1) durante 24 horas. O recipiente contendo a planta com o solvente (aquoso ou hidroetanólico) foi agitado manualmente duas vezes e, em seguida, realizada filtração a vácuo e evaporação do solvente em

rotavapor (37° C). O extrato bruto foi diluído em meio de cultura DMEM, para obtenção das concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL, que foram utilizadas nos ensaios *in vitro*. Para os ensaios *in vivo*, os extratos foram diluídos em água, obtendo-se a dose de 600 mg/Kg de peso (PÁDUA et al., 2010; PÁDUA et al., 2013; PÁDUA et al., 2014; de ARAUJO et al., 2016).

4.4. Ensaios *in vitro*

Além dos extratos de *Baccharis trimera* utilizados nos ensaios *in vitro*, também utilizamos a quercetina como controle positivo, por ser um flavonoide com efeito antioxidante bastante difundido na literatura (KESSLER et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2007; SAK, 2014; JIMENEZ et al., 2015; ALMAGHRABI, 2015; de ARAUJO et al., 2016). As doses de 10 e 50 µM foram selecionadas tanto pelos resultados encontrados no ensaio com MTT quanto por serem concentrações já trabalhadas em estudos prévios do nosso laboratório (Laboratório de Bioquímica Metabólica) (de ARAUJO et al., 2016).

4.4.1. Cultivo celular

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) foi adquirida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e, para seu cultivo, foram colocadas em frascos estéreis de crescimento de 75 cm² contendo o meio DMEM, que é composto por uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular, além de antibiótico (10 mL/L). Ao meio de cultura previamente preparado foram adicionados 10% (v/v) de SFB. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C umidificada com 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular, e os subcultivos (passagens) foram realizados quando as células apresentaram 100% de confluência.

4.4.2. Contagem das células com azul de trypan

O fundamento desse método baseia-se na observação microscópica de que células viáveis são impermeáveis ao corante, enquanto que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, isso permite a penetração do corante azul (KONOPKA et al., 1996).

Quando as garrafas atingiram 80% de confluência o meio foi aspirado e a monocamada celular lavada com PBS. Posteriormente, para o descolamento da monocamada celular, foram utilizados 4 mL de solução de Tripsina (solução de tripsina 0,20% e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02%). Após o descolamento, as células foram retiradas do frasco e colocadas em tubo tipo Falcon, completando o volume com 5mL de DMEM e centrifugadas em 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o *pellet* ressuscitado em 1mL de meio DMEM. Em seguida, foram utilizados 10 µL da suspensão celular e 90 µL de azul de trypan (0,3%), sendo uma gota colocada na câmara de Neubauer e levada ao microscópio para realizar a contagem.

4.4.3. Ensaio de citotoxicidade com MTT

A técnica de MTT é um ensaio quantitativo, colorimétrico e de fácil execução. O método baseia-se na redução do tetrazolio MTT à cristais de formazana, através da ação de enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase, fornecendo então uma medida da função mitocondrial. A quantidade de cristais de formazana formadas é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas (1×10^5 células) em microplacas de 96 poços com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, totalizando volume final de 160 µL e incubadas por 24 horas em estufa umidificada com CO₂ 5% a 37°C, para adesão das células. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio DMEM e os compostos de interesse em diferentes concentrações (extratos hidroetanólico e aquoso, quercetina e etanol), sendo que os controles receberam apenas meio. Uma nova incubação foi realizada nos tempos de 12 ou 24 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Posteriormente, foram adicionados 200 µL por poço de uma solução contendo 5 mg/mL de MTT em DMEM e incubadas por 1 h a 37 °C. A solução de MTT foi então removida

e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida em leitor de ELISA a 570 nm.

Para avaliar a porcentagem de viabilidade celular foi utilizada a fórmula abaixo, no qual se atribuiu 100% de viabilidade ao controle.

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \left(\frac{\text{absorbância das células tratadas}}{\text{absorbância do controle}} \right) * 100$$

4.4.4. Quantificação de ERO

Para a quantificação de ERO nas células HepG2 foi utilizado o kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®), que baseia-se no uso de um marcador fluorogênico não fluorescente 5-(e-6)-carboxi-2',7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína (carboxi-H2DCFDA), que é convertido em uma forma verde fluorescente quando os grupos acetilados são removidos por esterases intracelulares não específicas ou oxidados pela ação das ERO.

O ensaio foi realizado em placa branca de 96 poços, onde $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas com meio DMEN sem soro fetal bovino, perfazendo um volume final de 200 µL. A placa foi incubada em estufa umidificada com CO₂, por 1 hora e, em seguida, o meio foi descartado e os poços lavados com solução de HANKS 1x. Os extratos hidroetanólico e aquoso, assim como a quercetina, foram adicionados nos seus respectivos poços, de modo a obter as concentrações de 10 e 50 µg.mL⁻¹ e 10 e 50 mM, respectivamente. A placa foi incubada em estufa por 3 horas e, em seguida, o meio foi descartado e os poços lavados novamente com solução de HANKS 1x. Foram adicionados 100 µL de etanol 200 mM e 100 µL do marcador carboxi-H2DCFDA 50 µM, perfazendo um volume final de 200 µL. A placa foi incubada em estufa por 24 horas e, decorrido o tempo, o meio foi retirado e os poços lavados com HANKS 1x. Em seguida, foram adicionados 100 µL de HANKS 1x em todos os poços e, após 30 minutos, foi realizada a leitura no leitor de placas Victor, utilizando o coeficiente de excitação de 485 nm e o coeficiente de emissão de 535 nm.

4.4.5. Quantificação de NO

Para a quantificação de óxido nítrico (NO) foi utilizado o marcador DAF-FM diacetato-4-amino (Life-technologies®) que, ao ser clivado por esterases intracelulares, é convertido na forma fluorescente sendo, portanto, detectado.

Para a realização do teste foi utilizada placa branca de 96 poços, onde $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas com meio DMEN sem soro fetal bovino, perfazendo um volume final de 160 μL . A placa foi incubada em estufa umidificada com CO_2 , por 1 hora e, em seguida, o meio foi descartado e os poços lavados com solução de HANKS 1x. Os extratos hidroetanólico e aquoso, assim como a quercetina, foram adicionados nos seus respectivos poços, de modo a obter as concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 e 50 mM, respectivamente. A placa foi incubada em estufa por 3 horas e, em seguida, o meio foi descartado e os poços lavados novamente com solução de HANKS 1x. Foram adicionados 100 μL de etanol 200 mM e 100 μL do marcador DAF-FM 10 μM , perfazendo um volume final de 200 μL . A placa foi incubada em estufa por 24 horas e, decorrido o tempo, o meio foi retirado e os poços lavados com HANKS 1x. Logo após, foram adicionados 100 μL de HANKS 1x em todos os poços e, decorridos 30 minutos, foi realizada a leitura no leitor de placas Victor, utilizando o coeficiente de excitação de 485 nm e o coeficiente de emissão de 535 nm.

4.4.6. Ensaio da luciferase

Nesse ensaio é empregado o sistema de gene repórter, que codifica proteínas que são facilmente detectadas, quantificadas e diferenciadas das proteínas endógenas. Para tal, emprega-se um plasmídeo que contenha o gene para luciferase e a sequência promotora para o fator de transcrição de interesse, no caso o Nrf2. Dessa forma, a quantidade de enzima expressa, assim como sua atividade, mostra o quão ativo está o promotor. A detecção da expressão enzimática é possível devido à enzima repórter, que catalisa a reação de transferência de energia do ATP para o substrato luciferina, formando oxiluciferina com liberação de ATP, CO_2 e luz. A reação é detectada em luminômetro a 580 nm e a atividade enzimática é medida pela quantidade de luz emitida em RLU (unidade relativa de luz). Portanto, quanto maior a produção de enzimas repórter (maior RLU), maior será a atividade do fator de transcrição (LIN e BARBOSA, 2002).

Resumidamente, 1.5×10^5 de células HepG2 foram plaqueadas em placa de 24 poços, perfazendo volume final de 500 μL . A placa foi incubada por 24 horas e em seguida lavada com PBS 1x. O sobrenadante foi descartado e adicionado meio DMEM High Glicose (HG) sem SFB e incubada por mais 24 horas. Decorrido o tempo, foi realizada a transfecção com lipofectamina e a co-transfecção com o plasmídeo pRL-TK (expressa a *Renilla* luciferase, servindo como um controle interno de promotor constitutivo) (Anexo A) e o plasmídeo pGL37 (contem o gene para a luciferase e para o promotor ARE) (Anexo B). Para esse processo de transfecção foram colocados num tubo (A) 38 μL de pRL-TK, 332 μL de pGL37 e 2130 μL de meio HG. Em outro tubo (B) foram adicionados 104 μL de lipofectimaina e 2395 μL de meio HG. Após 5 minutos, os tubos A e B foram misturados e esperados 20 minutos. Após esse tempo, 100 μL do mix foram gotejados em cada poço da placa. Foi realizada uma incubação de 6 horas e, em seguida, o sobrenadante descartado e adicionados 500 μL de meio com 5% de SFB. Após 1 hora, o meio foi retirado e foram adicionados 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de extrato hidroetanólico e aquoso de *B. trimera*, ou 10 e 50 μM de quercetina. Houve uma nova incubação de 3 horas e, logo após, o meio foi descartado e adicionado 200 mM de etanol. Foi realizada uma nova incubação por 12 ou 24 horas. Decorrido o tempo, foi realizada a lise celular, onde o meio foi retirado e feito uma lavagem com PBS 1x. Em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão de lise (fornecido pelo kit) por poço, ficando por 15 min sob agitação, e com o auxílio de uma ponteira dobrada foi realizada a lise mecânica das células. Em seguida, o conteúdo de cada pocinho foi passado para um eppendorff e centrifugado por 4 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi coletado e a leitura realizada no luminômetro. Para tal, foram adicionados 15 μL do sobrenadante e 35 μL de reagente de luciferase II (LAR II), que gera um sinal luminescente (Net A). Logo após, foram adicionados 50 μL de Reagente Stop & Glo[®], onde a primeira reação é finalizada e a reação da luciferase de *Renilla* é iniciada, fornecendo a segunda leitura (Net B). Os cálculos foram realizados com a razão Net A/Net B dividido pela média do grupo etanol, já que queríamos comparar os grupos controle e tratados com o grupo etanol.

4.5. Ensaios *in vivo*

Nos ensaios *in vivo* utilizamos a vitamina C como controle positivo, por ser um composto hidrossolúvel e com efeito antioxidante (CHEN et al., 2001; HIPÓLITO et al., 2015). A dose de 250 mg/Kg foi baseada nos estudos de Çetin et al. (2008).

4.5.1. Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos machos, da linhagem Fisher, pesando aproximadamente 250 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, que foram dispostas em ambiente com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Além disso, foi fornecido ração comercial de rato (Labina) e água *ad libbitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de proteção ao animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (nº. 2016/01).

4.5.2. Padronização do tempo entre a última dose de etanol e a eutanásia

Existem vários delineamentos descritos na literatura para o modelo de hepatotoxicidade e esteatose induzida pelo etanol, inclusive tempos distintos entre a última dose de etanol e a eutanásia. El-Naga (2015) realizou a eutanásia dos animais 1 h após a última dose de etanol; Tang et al. (2012) realizaram a eutanásia após 4 horas; Han et al. (2015) eutanasiaram 9 h após a última dose; já Lívero et al. (2016) fizeram após 12 h; alguns autores realizaram a eutanásia após 24 horas (WIESER et al., 2016; SONG et al., 2016; POURBAKHSI et al., 2014). Com base nessas diferenças, escolhemos eutanasiar os animais do experimento agudo 24 horas após a última gavagem com etanol.

Embora o foco do trabalho tenha sido avaliar os efeitos promovidos pelo etanol e os tratamentos com *B. trimera* no fígado, tínhamos interesse em futuramente analisar o estômago. Dessa forma, durante a eutanásia dos animais avaliamos macroscopicamente o estômago, já que os relatos da literatura evidenciam a presença de úlcera hemorrágica (BOLIGON et al., 2014; EL-NAGA; 2015; RIBEIRO et al., 2016). Porém, quando o órgão foi aberto e limpo com solução salina, não observamos diferenças visíveis entre esse grupo e o controle (Figura 10-Painel B). Além disso, durante os dois dias de

tratamento aproximadamente 50% dos animais do grupo etanol foram a óbito, mostrando a “agressividade” do modelo, que não foi observada na mesma intensidade nos parâmetros avaliados (Figura 10-Painel A).

Diante disso, nos surgiu o questionamento de como poderia ocorrer uma “recuperação” de forma efetiva o suficiente para minimizar os danos macroscópicos e ainda assim manter a alta taxa de mortalidade. Isso nos levou a imaginar que a eutanásia deveria ser antecipada, para que os efeitos promovidos pelo etanol pudessem ser observados com mais intensidade. Sendo assim, um novo grupo foi tratado com etanol por dois dias e a eutanásia realizada 8 horas após a última dose de etanol. Quando os órgãos foram retirados, foi possível observar que o estômago apresentava intensa hemorragia (Figura 10-Painel B).

Lâminas histológicas do fígado foram realizadas para os animais do grupo controle, etanol 24 h e 8 h, para que fossem observadas a integridade do tecido e a presença de esteatose. Como pode ser observado na figura 10 (Painel C), ambos os grupos tratados com etanol apresentaram esteatose quando comparados ao grupo controle. Porém, é evidente que os animais do grupo etanol com a eutanásia de 8 h tiveram uma perda da integridade tecidual maior e apresentaram mais vesículas esteatósicas (grau 3), quando comparados ao grupo etanol 24 horas (maior percentual de grau 1 e 3).

Frente aos achados, optamos por realizar a eutanásia dos animais do experimento crônico 12 horas após a última dose de etanol, uma vez que os danos seriam intermediários. Além disso, como seriam realizadas dosagens para observar o perfil lipídico, era necessário que os animais estivessem de jejum por aproximadamente esse tempo.

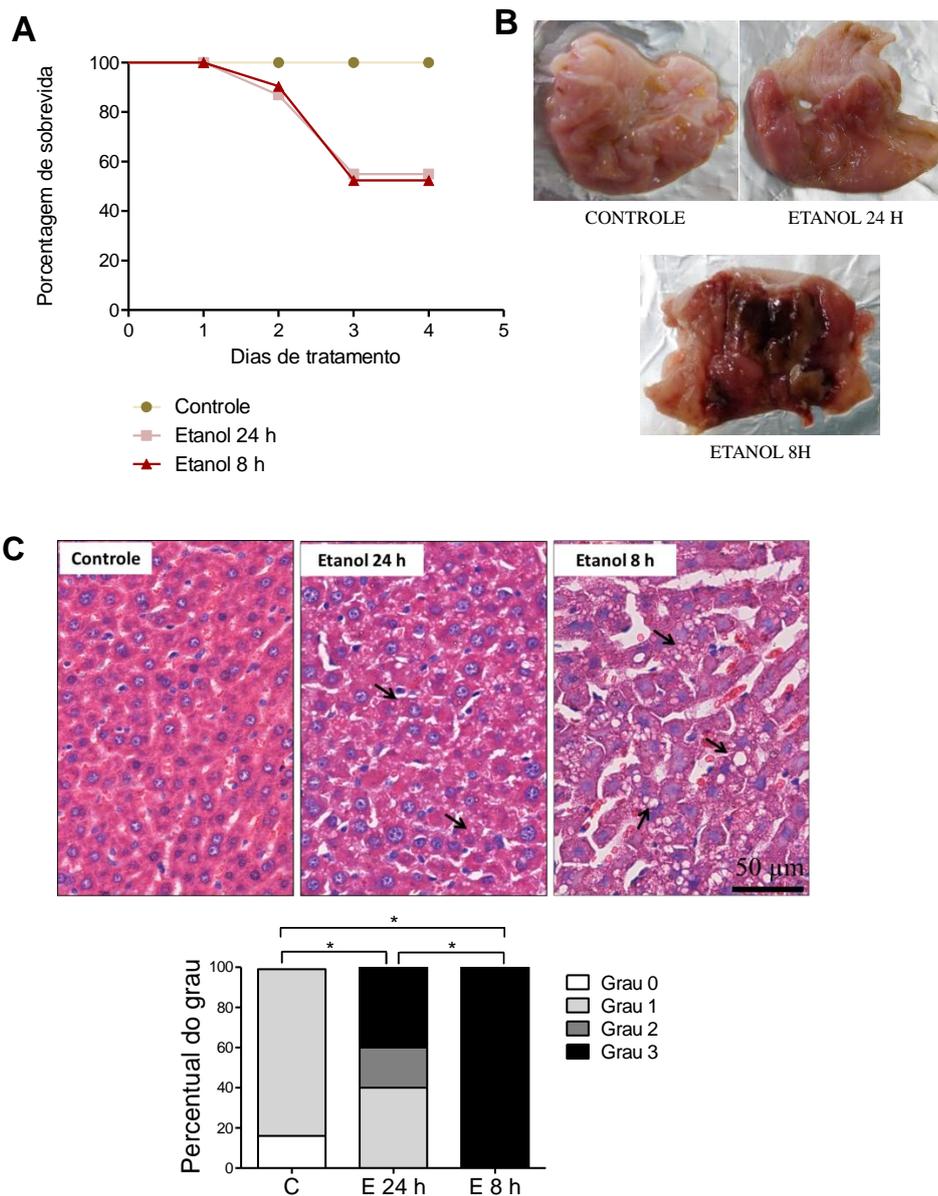


Figura 8: Efeitos macro e microscópicos observados em animais 8 e 24 h após dois dias recebendo etanol absoluto (5 mL/Kg). A: Curva de sobrevivência, onde pode ser observado que aproximadamente 50% dos animais dos grupos etanol (8 e 24 h) foram a óbito. B: Imagens demonstrativas do estômago, ressaltando a presença de úlcera hemorrágica no grupo etanol 8 h. C: Análise histológica do fígado, onde o grupo etanol 8 h apresentou maior perda da arquitetura hepática e maior grau de esteatose, quando comparado ao grupo etanol 24 h.

4.5.3. Delineamento do experimento agudo

No experimento agudo, 32 animais foram divididos em seis grupos, de acordo com o tratamento recebido, sendo administrados por gavagem:

Grupo 1: controle (C), no qual recebeu apenas água;

Grupo 2: etanol (E), que recebeu água e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol P.A (EL-NAGA et al., 2014);

Grupo 3: extrato hidroetanólico de *B. trimera* (He), que recebeu uma dose de 600 mg/Kg de peso de extrato hidroetanólico (PÁDUA et al., 2010) e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol P.A;

Grupo 4: extrato aquoso de *B. trimera* (Aq), que recebeu uma dose de 600 mg/Kg de peso de extrato aquoso (PÁDUA et al., 2010) e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol P.A;

Grupo 5: vitamina C (Vit C), que recebeu uma dose de 250 mg/Kg de peso de vitamina C (CETIN et al., 2008) e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol P.A;

Os tratamentos foram administrados durante 2 dias consecutivos e a eutanásia foi realizada 24 horas após a última dose (Figura 11). Os animais ficaram em jejum por 12 h e anestesiados com isoflurano. O sangue foi coletado através da veia localizada no plexo braquial até sangria total. O plasma e o soro, assim como o fígado, foram armazenados em freezer -80°C, ou em formol 10%, para as análises posteriores.

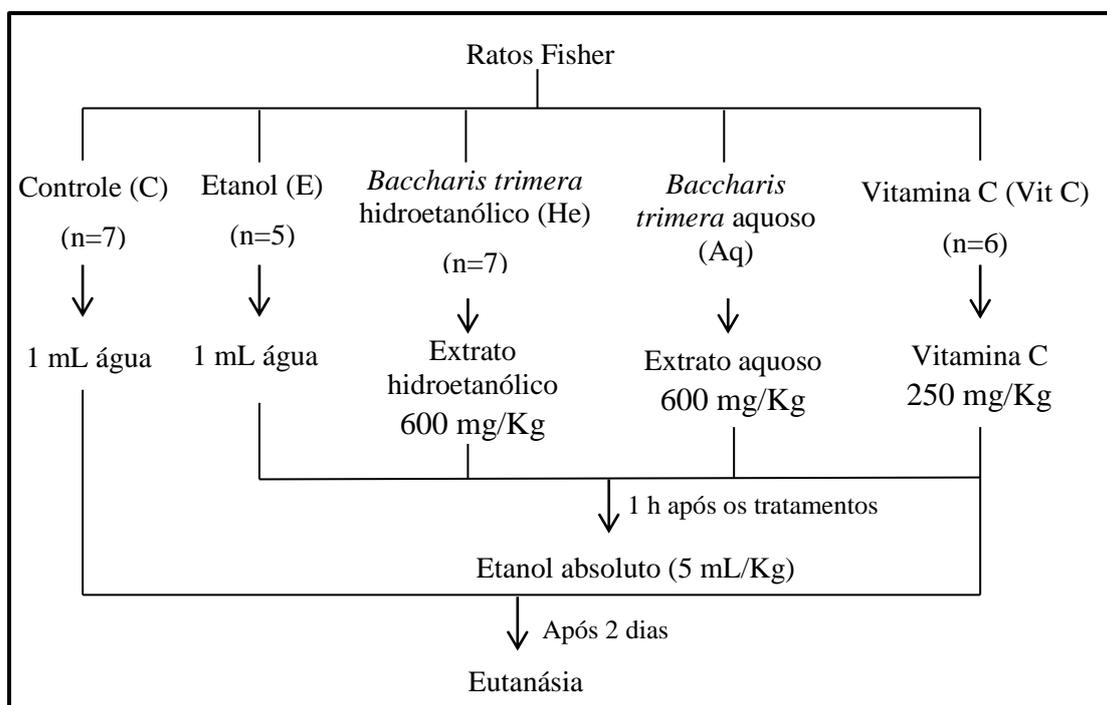


Figura 9: Delineamento do experimento agudo. Ratos machos Fisher foram divididos em 5 grupos experimentais, sendo: C: controle; E: etanol; He: *B. trimera* hidroetanólico; Aq: *B. trimera* aquoso; Vit C: vitamina C.

Como pode ser observado na figura 12, no experimento crônico 28 animais foram divididos em seis grupos, de acordo com os tratamentos recebidos, sendo administrados por gavagem:

Grupo 1: controle (C), no qual recebeu apenas água;

Grupo 2: etanol (E), que recebeu água e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído em água;

Grupo 3: extrato hidroetanólico de *B. trimera* (He), que recebeu uma dose de 600 mg/Kg de peso de extrato hidroetanólico e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído em água;

Grupo 4: vitamina C (Vit C), que recebeu uma dose de 250 mg/Kg de peso de vitamina C e, 1 hora após, uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído em água.

A diluição do etanol foi realizada de modo a obter concentrações de 20%, 40% e 60% de etanol em água (v/v), sendo que, a concentração aumentava a cada semana de tratamento. Portanto, na primeira semana os animais receberam 20%, na segunda semana 40%, e na terceira e quarta semana 60%.

Os animais foram tratados por 28 dias e a eutanásia ocorreu 12 horas após a última dose. Para tal, foram deixados em jejum e anestesiados com isoflurano. Os materiais de interesse foram retirados e armazenados em freezer -80°C, ou em formol 10%, para as análises posteriores.

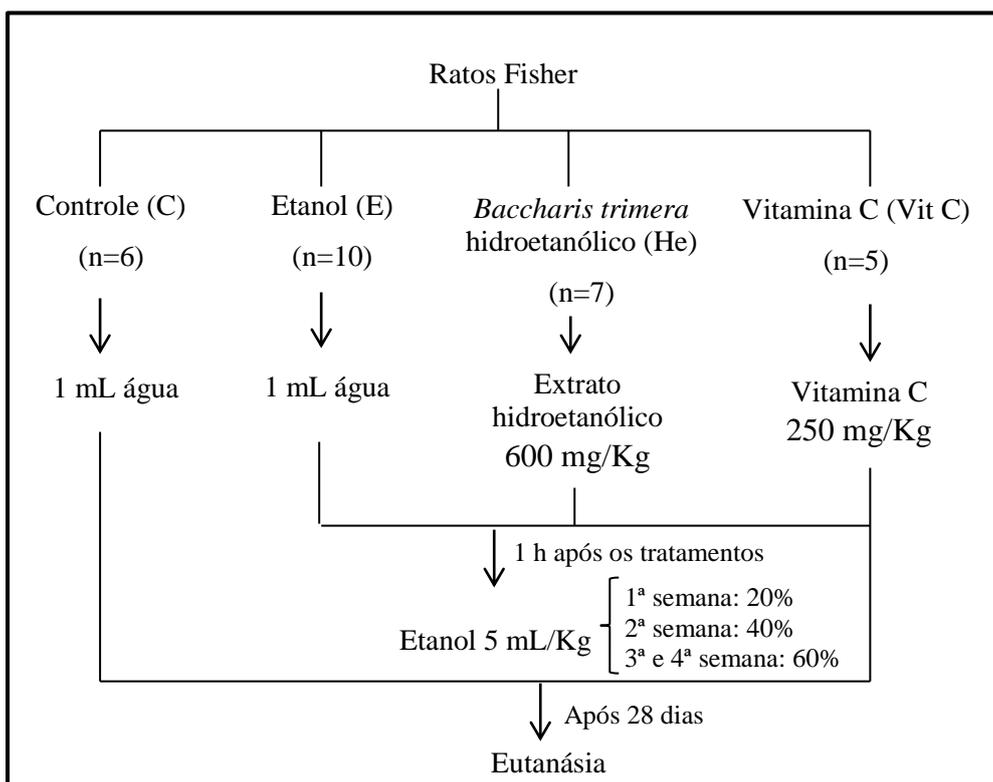


Figura 10: Delineamento do experimento crônico. Ratos machos Fisher foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo: C: controle; E: etanol; He: *B. trimera* hidroetanólico; Vit C: vitamina C.

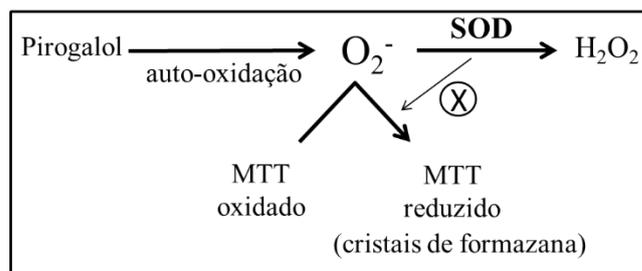
4.5.5. Análise dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma

O plasma foi utilizado para a dosagem de glicose e o soro para as dosagens de colesterol total, HDL, triacilgliceróis, creatinina, albumina, proteínas totais, ureia, ALT e AST. Todas as dosagens foram realizadas por kits comerciais dos laboratórios LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil) e BIOCLIN® (Belo Horizonte, MG, Brasil), sendo os protocolos disponibilizados pelos fornecedores.

4.5.6. Análise das defesas antioxidantes

4.5.6.1. Superóxido dismutase (SOD)

Nesse método a enzima SOD compete com o radical superóxido, formado pela auto-oxidação do pirogalol, que é responsável pela redução do MTT à cristais de formazana, como observado abaixo. Dessa forma, não tem como avaliar diretamente a atividade ou a concentração da enzima, sendo utilizada a quantificação em unidades relativas (MARKLUND and MARKLUND, 1974).



Resumidamente, 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e utilizado para a dosagem.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, onde 30 μ L da amostra (diluída 20 vezes) foram utilizados. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato (0,1M, pH 7,2), MTT (1,25 mM) e pirogalol (1000 μ M), conforme tabela abaixo:

	Amostra (μL)	Tampão (μL)	MTT (μL)	Pirogalol (μL)
Branco	-	144	6	-
Padrão	-	129	6	15
Amostra	30 (já diluída)	99	6	15

A placa foi incubada em estufa a 37°C, por 5 minutos, e a reação foi interrompida após adição de 150 μ L de DMSO. A leitura foi realizada a 570 nm, em leitor de ELISA.

Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do MTT.

4.5.6.2. Catalase

A técnica baseia-se na capacidade da catalase converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, fornecendo, assim, a atividade enzimática. Para tal, 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado.

Em um tubo de polipropileno foram adicionados 990 μL do mix de peróxido de hidrogênio (25 μL do peróxido 6% e 4975 μL de tampão fosfato), em seguida, a reação foi iniciada com a adição de 10 μL do sobrenadante. As absorvâncias foram determinadas a cada 30 segundos, durante 3 minutos, a 240 nm, tendo como branco o tampão fosfato.

Para os cálculos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Catalase (U/mg de proteína)} = \frac{\Delta A * \text{diluição}}{V * \epsilon * \text{mg de proteína}}$$

Onde:

ΔA : variação da absorvância

ϵ : Coeficiente de extinção molar ($0,071\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1} / 1\text{U}$)

V: volume da amostra (mL)

4.5.6.3. Glutathiona total, oxidada e reduzida

Resumidamente, 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de tampão de ácido sulfossalicílico (SSA) 5%. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a dosagem.

Para a dosagem da glutathiona total foi utilizada placa de 96 poços, onde 150 μL de mistura de trabalho [glutathiona redutase (6 unidades/mL), DTNB (1,5 mg/mL) e tampão de SSA (5%)] foram adicionados em 10 μL de amostra. A placa foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e, logo em seguida, a reação foi iniciada com a adição de 50 μL de solução de NADPH (0,16 mg/mL). As leituras das absorvâncias foram realizadas a cada minuto, durante 5 minutos, a 405 nm, em leitor de placa de ELISA.

O procedimento para a dosagem da glutathiona oxidada é o mesmo da glutathiona total, porém a amostra biológica passa por uma etapa de derivatização antes da dosagem. Nesse processo, 100 μL do homogenato são utilizados e neles adicionados 2 μL de vinilpiridina e 5 μL de TEA, para que o pH fique entre 6 e 7. Após esse período,

10 µL dessa amostra foram utilizados para reagir com a mistura de trabalho, como descrito anteriormente.

As concentrações da glutathiona total e oxidada foram obtidas a partir da equação da reta gerada, onde foram utilizados padrões com concentração de 10 mM e suas diluições. A concentração da glutathiona reduzida foi obtida pela subtração da concentração da glutathiona total pela oxidada.

4.5.6.4. Glutathiona peroxidase (GPx)

Para essa dosagem foi utilizado o kit da ABCAM, onde 100 mg de tecido foram homogeneizados em 200 µL de tampão (proveniente do kit). Logo após, houve centrifugação a 10000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a dosagem.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, onde foram utilizados 50 µL de amostra e 40 µL de mix de reação (tampão, glutathiona, glutathiona redutase e NADPH), por poço. A placa foi incubada por 15 minutos e, em seguida, foram adicionados 10 µL de hidróxido de cumeno, iniciando a reação. As absorbâncias foram mensuradas durante cinco minutos, com intervalos de um minuto, em leitor de placa de ELISA, a 340 nm.

Para os cálculos foi utilizada uma curva padrão, onde a concentração foi obtida e gerou o valor de “B”. Em seguida esse valor foi aplicado à fórmula:

$$\text{Atividade de GPx (nmol/min/mL)} = \frac{B}{(T1-T5)*V} * \text{Diluição da amostra}$$

Onde:

T1: tempo da primeira leitura (A1) (min).

T5: tempo da quinta leitura (A5) (min).

V: volume da amostra adicionada ao poço (ml).

4.5.6.5. Glutathiona redutase (GR)

A atividade da enzima glutathiona redutase foi determinada utilizando o kit “*Glutathione Reductase Assay kit*” (Sigma, Missouri, EUA). Resumidamente, 50 mg de tecido foram homogeneizados em 500 µL de tampão proveniente do kit. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Para a realização do ensaio foi utilizado placa de 96 poços, sendo que cada poço recebeu 125 µL de 2 mM glutathiona oxidada, 40 µL de tampão de ensaio proveniente do kit, 10 µL de amostra para os testes, padrão de glutathiona redutase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. Em seguida, foram adicionados 62,5 µL de 3 mM DTNB e a reação foi iniciada ao adicionar 12,5 µL de 2 mM NADPH em todos os poços. As absorbâncias foram imediatamente detectadas em leitor de placa de ELISA a 412 nm, sendo realizadas 11 leituras com intervalos de 10 segundos.

Para o cálculo da atividade de glutathiona redutase na amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade de GR (U/mL)} = \frac{(\Delta A \text{ amostra} - \Delta A \text{ branco}) * \text{diluição}}{14,15 * V}$$

Onde:

Δ: diferença das leituras 1 e 11

V: volume da amostra (mL)

4.5.7. Análise dos marcadores de estresse oxidativo

4.5.7.1. Proteína carbonilada

O método permite a detecção de derivados carbonílicos formados em decorrência da oxidação de proteínas por ERO. Para tal, emprega-se a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que reage com os grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser detectada espectrofotometricamente (LEVINE et al., 1994).

Para a dosagem, 200 mg de tecido foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão KPE (0,1 M de tampão fosfato de potássio e 5 mM de sal dissódico EDTA, pH 7,5). Em

seguida, o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante coletado e utilizado como amostra biológica.

Em um tubo de polietileno, 500 µL de amostra e 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% foram agitados e, em seguida, centrifugados a 500 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, no precipitado, foram adicionados 500 µL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM e 2M de ácido clorídrico (HCl). Os tubos foram incubados no escuro por uma hora, sendo que, a cada 15 minutos foram agitados. Decorrido o tempo, foram adicionados 500 µL de TCA 10% e centrifugados a 500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1 v/v), em seguida, centrifugados por 10 minutos, a 500 rpm, a 4°C. Essa última etapa foi realizada novamente e, logo após, o precipitado foi dissolvido em 1 mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 6%. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm, a 4°C. As absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm, utilizando SDS como branco.

Para os cálculos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína carbonilada (nmol/mL)} = \frac{(\text{absorbância}/\epsilon) * (1000000/\text{VA})}{\text{proteína total (mg/mL)}}$$

Onde:

ϵ : Coeficiente de extinção molar 22000 M.L⁻¹.cm⁻¹

VA: volume da amostra

4.5.7.2. Ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ácido tiobarbitúrico (TBA) é capaz de se ligar a lipídios oxidados, permitindo a quantificação de TBARS por método espectrofotométrico (BUEG e AUST, 1978). Resumidamente, 100 mg tecido foram homogeneizados em 1ml de tampão Tris HCl (pH 7,4) e centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Em um tubo de polietileno foram adicionados 500 μL de amostra, 250 μL de TCA, 250 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 125 μL de butil hidroxitolueno (BHT). Os tubos foram agitados e incubados por 15 minutos em termobloco, a 95°C. Em seguida, foram colocados por 5 minutos em banho de gelo e centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm, a 4°C. Foram retirados 200 μL do sobrenadante e colocados em placa de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de placa de ELISA, a 535 nm.

A concentração de TBARS foi determinada baseada na equação da reta, segundo a lei de Lambert Beer, onde foi utilizado 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina (TMP) como padrão.

4.5.8. Zimografia

No ensaio, 50 mg de tecido foram homogeneizados em 200 μL de tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1% IGEPAL, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inibidor de protease em pH 8,0). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. As concentrações de proteínas totais foram dosadas pelo método de BCA, descrito adiante, fornecendo a quantidade necessária de cada amostra para que fossem obtidos 30 μg de proteína por canaleta. A essa quantidade, ainda foram adicionados tampão RIPA (sem inibidor de protease) e tampão de amostra para SDS-PAGE. Posteriormente, as amostras foram colocadas no banho-maria a 37°C por 2 minutos e, em seguida, aplicadas no gel, sendo que, o gel de largada continha poliacrilamida 5% (w/v) e o gel de corrida poliacrilamida SDS-PAGE a 8% contendo gelatina de pele suína na concentração de 2 mg/mL. A corrida de eletroforese foi realizada durante 120 minutos a 100 V.

Após a corrida, os géis foram lavados três vezes em solução de 2.5% Triton X-100, por 20 minutos. Foi realizada uma incubação, a 37°C, de 36 horas com o substrato contendo 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05% NaN_3 (pH 7,5). Em seguida, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant blue 0.05% G-250 por 3 horas e descorados com solução descorante (4% metanol, 8% ácido acético e água). Os géis foram escaneados e as bandas quantificadas com o auxílio do software *Quantity One* (BioRad) utilizando uma estação de captura de imagem (*Carestream 4000 MM Pro Image Station*) e do software *ImageJ*.

4.5.9. Dosagem de proteínas totais pelo método BCA

A dosagem foi realizada no mesmo homogenato da zimografia, como descrito anteriormente. Para tal, foi utilizada placa de 96 poços, onde cada poço recebeu 10 µL de amostra e 200 µL do mix de reação (196 µL de BCA (reagente A) e 4 µL de sulfato de cobre (reagente B)). A placa foi incubada a 37°C, por 30 minutos e, em seguida, a absorbância foi detectada em leitor de placa de ELISA, em 562 nm.

Para os cálculos foi utilizada a curva de calibração, onde foi utilizado como padrão uma solução estoque de 1 mg/mL, com sucessivas diluições.

4.5.10. Dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry

O método foi aplicado para a obtenção de proteínas totais nos homogenatos utilizados para a dosagem de SOD, catalase, proteína carbonilada e TBARS, para fornecer os dados necessários para os cálculos. Portanto, as quantidades de tecido e de tampão que foram utilizados estão representadas nos respectivos tópicos das dosagens.

Inicialmente são preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: dissolve-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução deve ser armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

- Reagente B: dissolve-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Deve ser armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: adiciona-se 1 mL do reagente A em 50mL do reagente B. Deve ser preparado na hora do teste.

- Reagente D: dissolve-se 1 mL de Folin-Ciocalteu em 1mL de água destilada. Deve ser preparado na hora do teste.

Resumidamente, em um tubo de polietileno foram adicionados 100 µL de amostra acrescida de 1 mL de reagente C. Os tubos foram incubados por 15 minutos e,

posteriormente, adicionados 100 μ L de reagente D. Uma nova incubação foi realizada, por 30 minutos no escuro, e as absorbâncias foram detectadas em 660 nm.

Os cálculos basearam-se na equação da reta obtida, onde uma solução de albumina 2 mg/mL, e as respectivas diluições, forneceram os pontos da curva.

4.5.11. Análise histológica

Ao término dos experimentos agudo e crônico o fígado foi processado, parafinado e secções de 4 μ m foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Foram obtidas 11 imagens de cada lâmina, utilizando o aumento de 40x, em microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital DM5000, com o software de análises Leica Application Suite. Para a semi-quantificação, dez campos foram examinados em cada uma das imagens e o grau de infiltração de lipídios refletiu a percentagem de hepatócitos contendo gotículas lipídicas. Foram atribuídos os graus 0-3, onde: 0: nenhum; 1: 1-33%; 2: 33-66%; 3: > 66%, como descrito por Brunt et al. (1999).

4.5.12. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Todos os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados através da análise de variância univariada *One-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no software *GraphPad Prism 5.0* para Windows.

5. RESULTADOS

5.1. Rendimento dos extratos

Após o preparo dos extratos foi realizada a pesagem dos mesmos para determinar o rendimento. O extrato aquoso obteve rendimento de 11,92%, enquanto o extrato hidroetanólico obteve rendimento de 17,65%.

5.2. *In vitro*

5.2.1. Ensaio com MTT

Para avaliarmos a citotoxicidade dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera*, assim como da quercetina (usada como controle positivo) e do etanol, foi utilizado o teste de viabilidade com MTT, nos tempos de 12 e 24 horas, e os resultados foram expressos como % de células vivas. Como pode ser observado na figura 11 (painel A e B), quando as células da linhagem HepG2 foram incubadas por 12 horas com as concentrações de 10; 25; 50; 100; 200; 400 e 600 µg/mL do extrato hidroetanólico e 5; 10; 25; 50; 100; 200; 400 e 600 µg/mL do extrato aquoso de *B. trimera* a viabilidade celular foi diminuída significativamente, quando comparada ao grupo controle (C). Porém, segundo a ISO2009-10993-5, um extrato é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é menor ou igual a 70%. Sendo assim, podemos inferir que nenhuma das concentrações avaliadas apresentou citotoxicidade, uma vez que a viabilidade celular foi superior a 70% tanto para o extrato hidroetanólico quanto para o extrato aquoso.

Na figura 11 (painel C), podemos observar que houve diminuição da viabilidade quando as células foram incubadas com as concentrações de 50; 100; 200; 400 e 600 µM de quercetina, em relação ao controle. No entanto, essa diminuição foi mais acentuada a partir da concentração de 200 µM. Como a quercetina foi diluída em 0,6% de DMSO, também foi testada a viabilidade das células na presença desse solvente. Após 12 horas de incubação com DMSO, houve diminuição da viabilidade celular quando comparada ao controle, no entanto a viabilidade manteve-se superior a 88%, mostrando que o solvente não é responsável pela citotoxicidade da quercetina.

É possível observar que houve diminuição da viabilidade quando as células foram incubadas com etanol nas concentrações de 10; 50; 100; 200; 400; 600 e 800 mM, quando comparadas ao controle, por 12 horas. Porém, a viabilidade foi inferior a 70% apenas a partir de 100 mM (Figura 11-painel D).

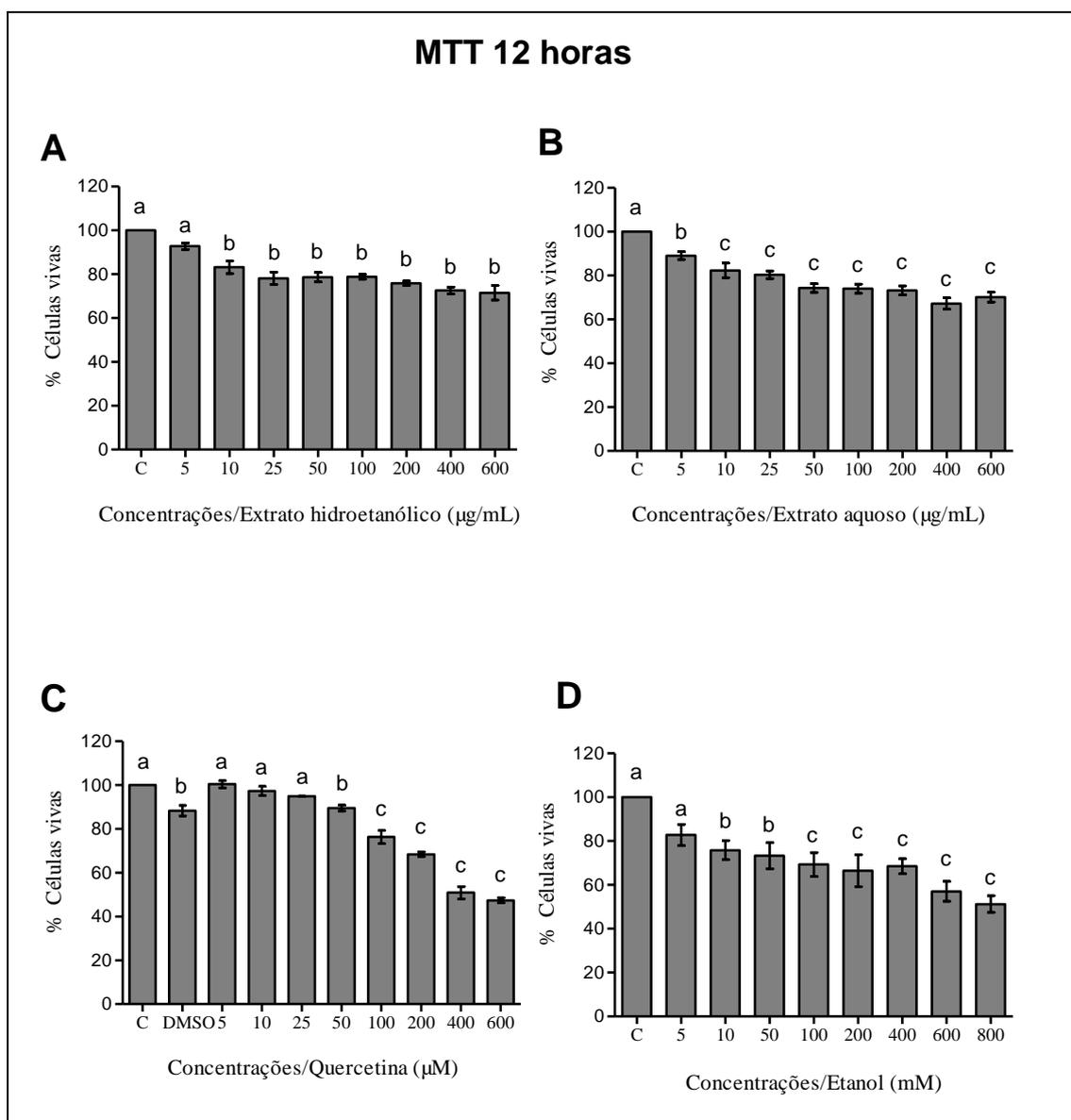
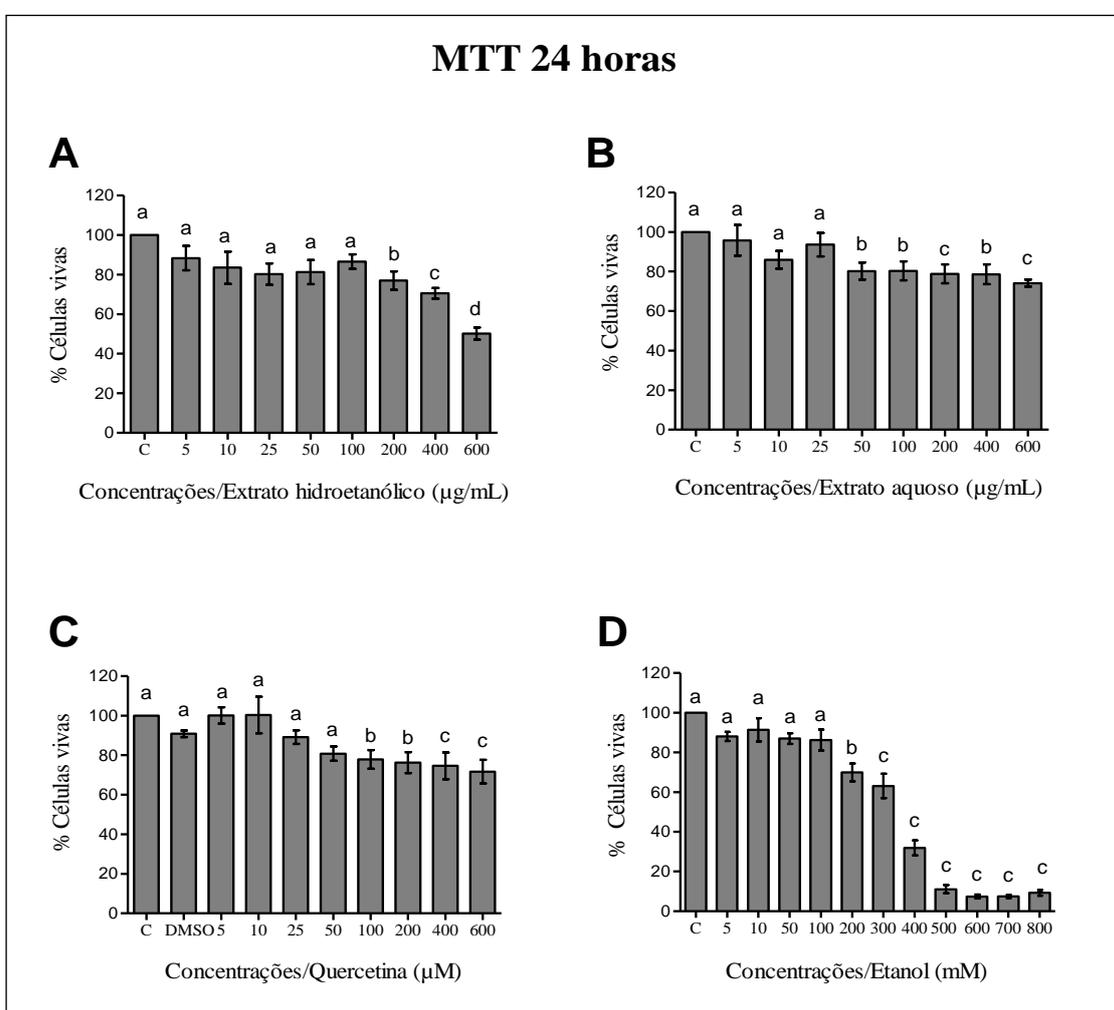


Figura 11: Viabilidade celular 12 horas. Células HepG2 foram incubadas por 12 horas com extrato hidroetanólico (A) e aquoso de *Baccharis trimera* (B), quercetina (C) e etanol (D), utilizando o teste de MTT. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que para cada composto foi realizado um controle (C) (células não tratadas) e para este atribuído 100% de viabilidade celular. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde diferenças foram consideradas quando $p < 0.05$.

Na figura 12 (painel A) é possível observar que quando as células HepG2 foram incubadas por 24 horas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, nas concentrações

de 200; 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$, houve diminuição significativa na viabilidade celular. Porém, a viabilidade foi inferior a 70% apenas na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, inferindo que apenas nessa concentração houve citotoxicidade. Já no painel B (figura 12), pode ser observado que houve diminuição na viabilidade quando as células foram incubadas com 50; 100; 200; 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$ do extrato aquoso de *B. trimera*. Porém, nenhuma viabilidade foi inferior a 70%, sugerindo que nenhuma concentração foi citotóxica. Já na figura 12 (painel C), notamos que quando as células foram incubadas com 100; 200; 400 e 600 μM de quercetina houve diminuição da viabilidade celular, quando comparada ao controle. No entanto, as viabilidades se mantiveram acima de 70% em todas as concentrações. Além disso, quando as células foram incubadas com DMSO a



viabilidade se manteve acima de 90%, mostrando que não há citotoxicidade decorrente do solvente. Pode ser observado no painel D, que houve diminuição da viabilidade quando as células foram incubadas por 24 horas com etanol nas concentrações de 200; 300; 400; 500; 600; 700 e 800 mM, sendo que nessas concentrações as viabilidades se mantiveram abaixo de 70%.

Figura 12: Viabilidade celular 24 horas. Células HepG2 foram incubadas por 24 horas com extrato hidroetanólico (A) e aquoso de *Baccharis trimera* (B), quercetina (C) e etanol (D), utilizando o teste de MTT. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que para cada composto foi realizado um controle (C) (células não tratadas) e para este atribuído 100% de viabilidade celular. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde diferenças foram consideradas quando $p < 0.05$.

5.2.2. Quantificação de ERO

Após o ensaio com MTT foram definidas as concentrações dos compostos para serem utilizados na quantificação de ERO, dessa forma, para os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera* foram escolhidas as concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que não apresentaram citotoxicidade, além de serem concentrações já utilizadas em ensaios prévios do laboratório. Para a quercetina foram escolhidas as concentrações de 10 e 50 μM , também por não apresentar citotoxicidade. Em relação ao etanol, foi selecionada a concentração de 200 mM, uma vez que essa foi a primeira concentração a ter diferença significativa, quando comparada ao controle, no tempo de 24 horas.

Para o ensaio de quantificação de ERO foi utilizado o marcador carboxi-H2DCFDA, onde as células foram incubadas com os extratos de *B. trimera* ou quercetina, por 3 horas e, em seguida, foram estimuladas com etanol por 24 horas. Os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF). Como pode ser observado na figura 13, houve aumento de ERO no grupo estimulado apenas com etanol, quando comparado ao grupo controle. Em relação aos tratamentos, podemos observar que os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera* nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ promoveram diminuição nos níveis de ERO. A quercetina também promoveu diminuição significativa nos níveis de ERO, tanto na concentração de 10 quanto de 50 μM .

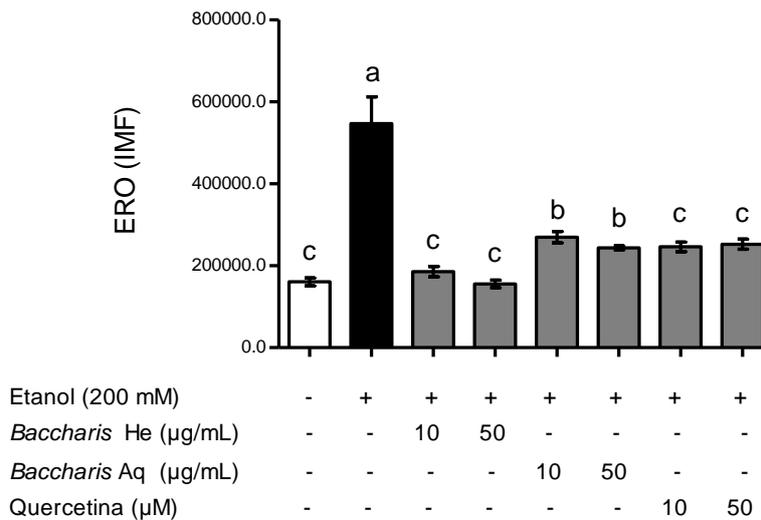


Figura 13: Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO), utilizando o marcador carboxi-H2DCFDA. Células HepG2 foram incubadas com o extrato hidroetanólico (He) e aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* nas concentrações de 10 e 50 µg/mL ou com quercetina nas concentrações de 10 e 50 µM, por 3 horas. Em seguida, foram estimuladas com etanol 200 mM por 24 horas. Os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF). Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.2.3. Quantificação de NO

Para a quantificação de NO foi utilizado o marcador DAF-FM, onde as células foram incubadas com os extratos de *B. trimera* nas concentrações de 10 e 50 µg/mL ou quercetina 10 e 50 µM, por 3 horas e, em seguida, foram estimuladas com etanol 200 mM por 24 horas. Os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF). Na figura 14 pode ser observado que o grupo que foi estimulado apenas com etanol apresentou aumento de NO, quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum estímulo (controle). Os extratos hidroetanólico e aquoso nas concentrações de 10 e 50 µg/mL foram capazes de diminuir esse parâmetro, assim como o controle positivo (quercetina) nas concentrações de 10 e 50 µM.

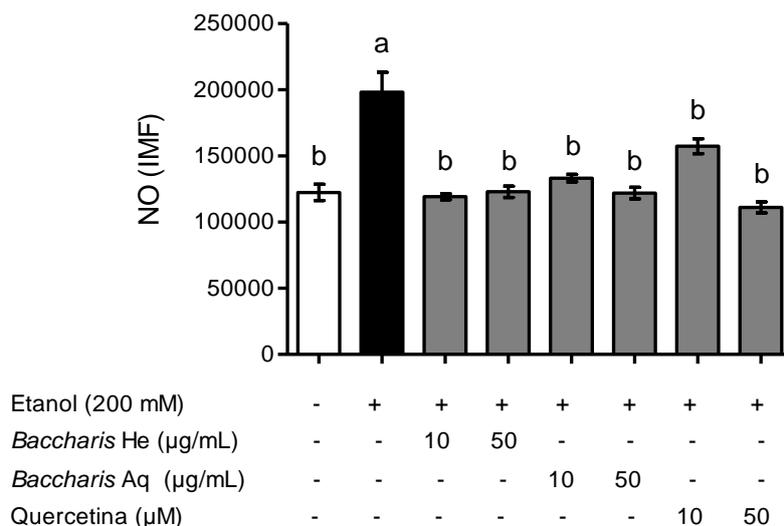


Figura 14: Quantificação de óxido nítrico (NO), utilizando o marcador DAF-FM. Células HepG2 foram incubadas com o extrato hidroetanólico (He) e aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* nas concentrações de 10 e 50 µg/mL ou com quercetina nas concentrações de 10 e 50 µM, por 3 horas. Em seguida, foram estimuladas com etanol 200 mM por 24 horas. Os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF). Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.2.4. Avaliação do fator de transcrição Nrf2

Para a avaliação do efeito dos extratos de *B. trimera* sob o fator de transcrição Nrf2, foi utilizada a técnica de luciferase. Para tal, células HepG2 foram incubadas durante 3 horas com os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera* nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, ou quercetina 10 e 50 µM e, em seguida, com 200 mM de etanol por 12 ou 24 horas. Como pode ser observado na figura 15 (Painel A), no tempo de 12 horas houve um aumento na atividade transcricional de Nrf2 do grupo etanol, quando comparado ao grupo controle. Os grupos tratados com os extratos e com a quercetina, em ambas as concentrações, não tiveram diferença significativa na atividade transcricional de Nrf2 em relação ao grupo etanol. Já no tempo de 24 horas, podemos observar que não houve diferença significativa na atividade transcricional de Nrf2 no grupo etanol, quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado com quercetina na concentração de 10 µM apresentou aumento significativo na atividade de Nrf2, quando comparado ao grupo etanol, enquanto os outros tratamentos não promoveram nenhum efeito (Figura 15- Painel B).

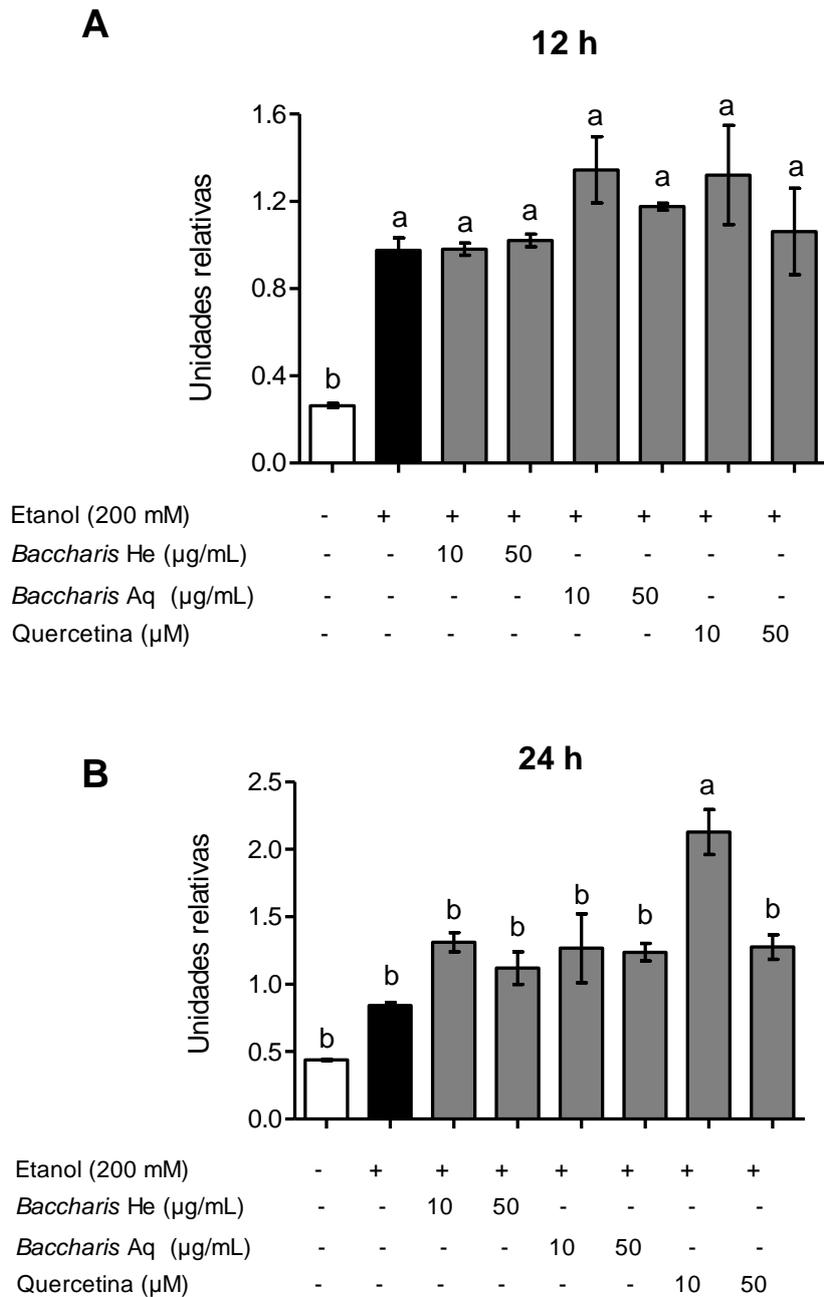


Figura 15: Avaliação do fator de transcrição Nrf2 pela técnica de luciferase. Células HepG2 foram incubadas com o extrato hidroetanólico (He) e aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ou com quercetina nas concentrações de 10 e 50 μM , por 3 horas. Em seguida, foram estimuladas com etanol 200 mM por 12 horas (Painel A) ou 24 horas (Painel B). Os resultados foram expressos como unidades relativas. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3. *In vivo*

5.3.1. Experimento Agudo

5.3.1.1. Dosagens bioquímicas

Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados e foram avaliadas as funções renal e hepática, glicemia e perfil lipídico.

Na tabela 1 pode ser observado que os parâmetros ureia e creatinina foram utilizados para avaliar a função renal. Em relação à creatinina, podemos observar que os animais do grupo etanol apresentaram aumento significativo, quando comparados ao grupo controle. Os tratamentos com extrato hidroetanólico e aquoso, assim como vitamina C não modificaram esse parâmetro, quando comparados ao grupo etanol. Em relação à dosagem de ureia, não foi observada diferença significativa em nenhum dos grupos.

Para a avaliação da função hepática foram utilizadas as dosagens de ALT, AST e proteínas totais. Como pode ser observada na tabela 1, não houve diferença significativa na dosagem de ALT entre o grupo etanol e grupo controle; mas foi observada uma diminuição desse parâmetro nos grupos tratados com o extrato aquoso de *B. trimera* e vitamina C. Nenhuma diferença foi notada entre os grupos quando o parâmetro avaliado foi AST. As proteínas totais foram reduzidas no grupo etanol quando comparadas ao grupo controle, e não houve diferença entre os grupos He, Aq e Vit C em relação ao grupo etanol. Não foi observada diferença significativa entre os grupos quando avaliada a glicemia.

O perfil lipídico foi avaliado utilizando as dosagens de colesterol total, HDL, fração não HDL e triacilgliceróis. O grupo etanol apresentou um aumento de colesterol total, quando comparado ao grupo controle, mas nenhum tratamento (He, Aq e Vit C) diminuiu esse parâmetro, em relação ao grupo etanol. O extrato hidroetanólico

promoveu um aumento nos níveis de HDL, quando comparado ao grupo etanol, mas não houve diferença significativa entre os outros grupos. Em relação à fração não HDL foi observado um aumento desse parâmetro no grupo etanol quando comparado ao grupo controle; porém, não houve diferença entre os tratamentos e o grupo etanol. Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação aos triacilgliceróis.

Tabela 1: Dosagens séricas do experimento agudo para avaliar as funções renal e hepática, glicemia e perfil lipídico. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais (AGUDO)				
	C	E	He	Aq	Vit C
Ureia (mg/dL)	63.5 ± 4.17	71.8 ± 5.53	72.5 ± 4.26	70.9 ± 6.11	68.0 ± 8.36
Creatinina (mg/dL)	0.375 ± 0.090 ^b	0.736 ± 0.086 ^a	0.618 ± 0.050 ^a	0.572 ± 0.080 ^a	0.731 ± 0.079 ^a
ALT (U/mL)	19.0 ± 1.40 ^a	21.8 ± 2.02 ^a	17.0 ± 2.67 ^a	12.0 ± 0.654 ^b	11.5 ± 1.08 ^b
AST (U/mL)	37.0 ± 3.85	37.8 ± 3.52	27.2 ± 2.46	27.5 ± 2.68	25.8 ± 3.43
Proteínas totais (mg/dL)	5.98 ± 0.651 ^a	4.11 ± 0.171 ^b	3.63 ± 0.139 ^b	4.62 ± 0.40 ^b	3.72 ± 0.207 ^b
Glicose (mg/dL)	100.6 ± 5.78	108.5 ± 6.70	112.2 ± 8.40	110.2 ± 11.1	102.0 ± 7.30
Colesterol total (mg/dL)	97.2 ± 2.67 ^b	202.8 ± 35.0 ^a	196.3 ± 9.17 ^a	170.1 ± 15.2 ^a	153.2 ± 13.2 ^a
HDL (mg/dL)	43.8 ± 4.05 ^b	35.8 ± 0.306 ^b	59.9 ± 5.70 ^a	42.9 ± 1.18 ^b	41.5 ± 4.59 ^b
Fração não HDL (mg/dL)	58.8 ± 10.6 ^b	162.9 ± 30.8 ^a	134.0 ± 13.3 ^a	100.0 ± 25.8 ^a	115.0 ± 16.1 ^a
Triacilgliceróis (mg/dL)	63.9 ± 12.7	53.9 ± 6.50	67.3 ± 11.5	53.2 ± 12.8	62.9 ± 7.14

5.3.1.2. Defesa antioxidante

5.3.1.2.1. SOD e catalase

É possível observar na figura 16 (painel A) que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* promoveu um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD), quando comparada ao grupo etanol; ao passo que não houve diferença entre os outros grupos. Já no painel B, percebemos que houve diminuição na atividade da catalase no grupo vitamina C quando comparada ao grupo etanol, e não houve diferença entre os outros grupos.

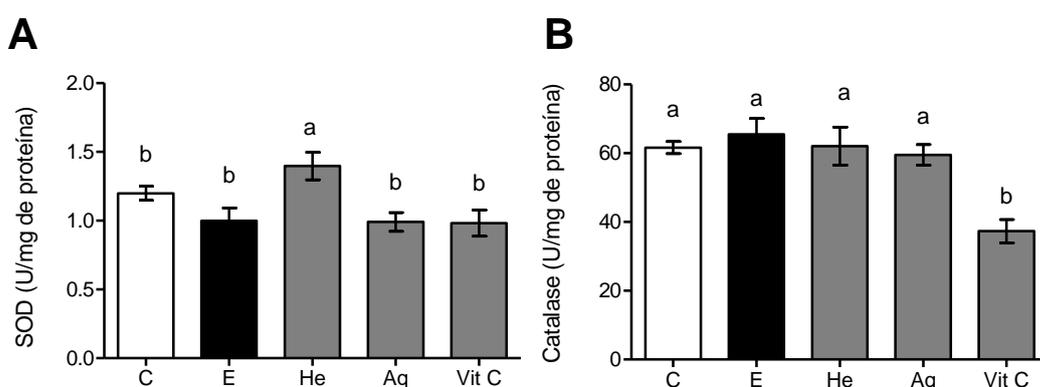


Figura 166: Efeito de *Baccharis trimera* sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (B), no experimento agudo. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.1.2.2. Glutathiona total, oxidada, reduzida, peroxidase e redutase

Na figura 17 (painel A), pode ser observada uma diminuição na concentração de glutathiona total no grupo etanol quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença entre nenhum dos tratamentos quando comparados ao grupo etanol. No painel B, é possível observar que houve uma diminuição de glutathiona oxidada no grupo etanol, quando comparado ao grupo controle, e todos os tratamentos (He, Aq e Vit C) promoveram aumento desse parâmetro, quando comparado ao grupo etanol. Em relação à glutathiona reduzida não foi observada nenhuma diferença entre os grupos (Painel C). Já em relação à atividade da glutathiona peroxidase podemos observar que houve

diminuição da sua atividade no grupo etanol quando comparado ao grupo controle, e um aumento na sua atividade nos grupos He, Aq e Vit C, quando comparados ao grupo etanol (Painel D). Já no painel E, podemos observar que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos.

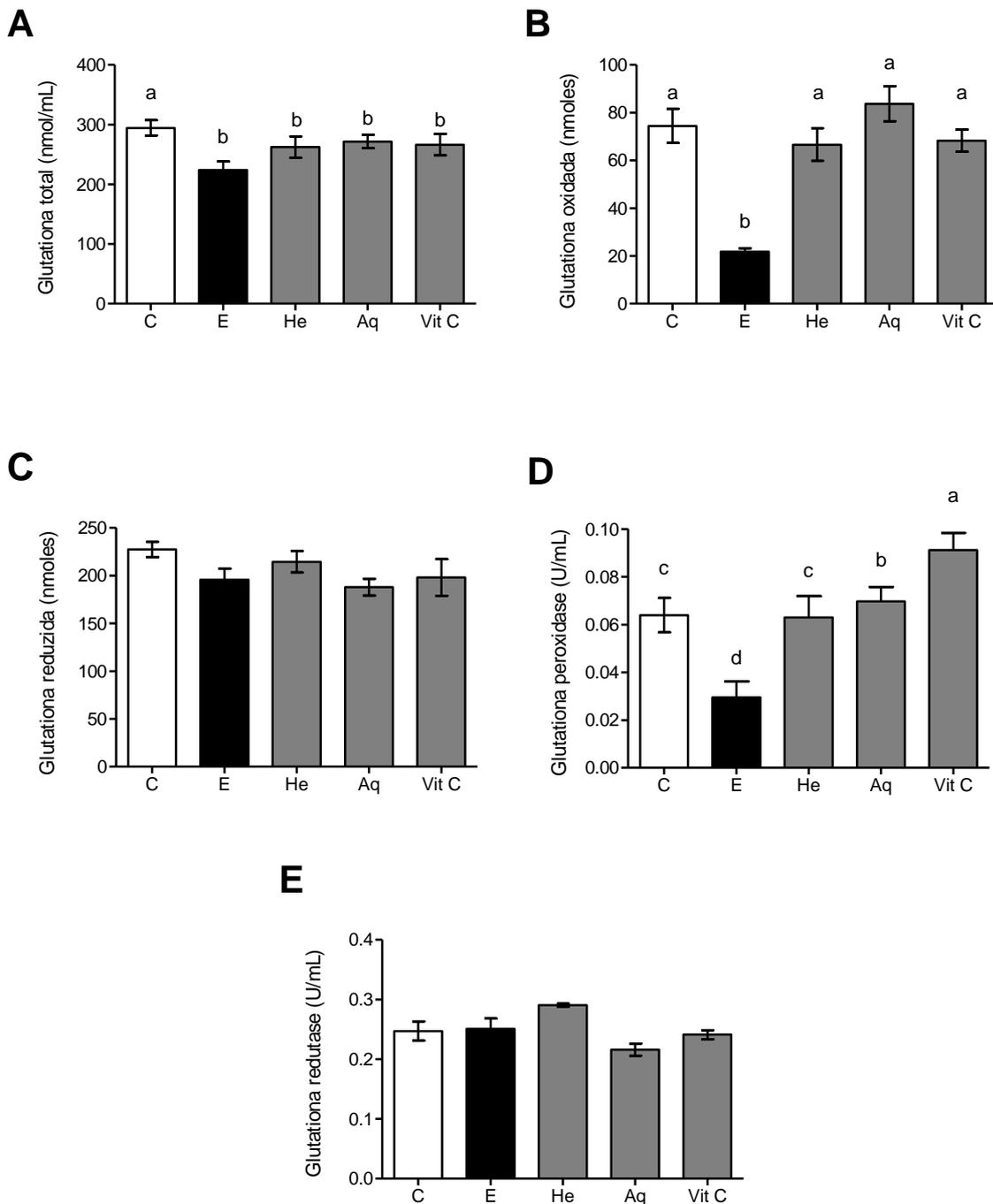


Figura 1717: Efeito de *Baccharis trimera* sobre glutathione total (A), glutathione oxidada (B), glutathione reduzida (C), glutathione peroxidase (D), glutathione redutase (E), no experimento agudo. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.1.3. Marcadores de dano oxidativo

5.3.1.3.1. TBARS e proteína carbonilada

Podemos observar na figura 18 (Painel A), que houve aumento significativo de TBARS no grupo etanol, quando comparado ao grupo controle, e os grupos tratados com os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimer*a, assim como a vitamina C, promoveram a diminuição desse parâmetro. Em relação à proteína carbonilada, é possível observar que houve aumento no grupo etanol, quando comparada ao grupo controle, e apenas o grupo tratado com vitamina C teve diminuição desse parâmetro, quando comparada ao grupo etanol (Figura 18-Painel B).

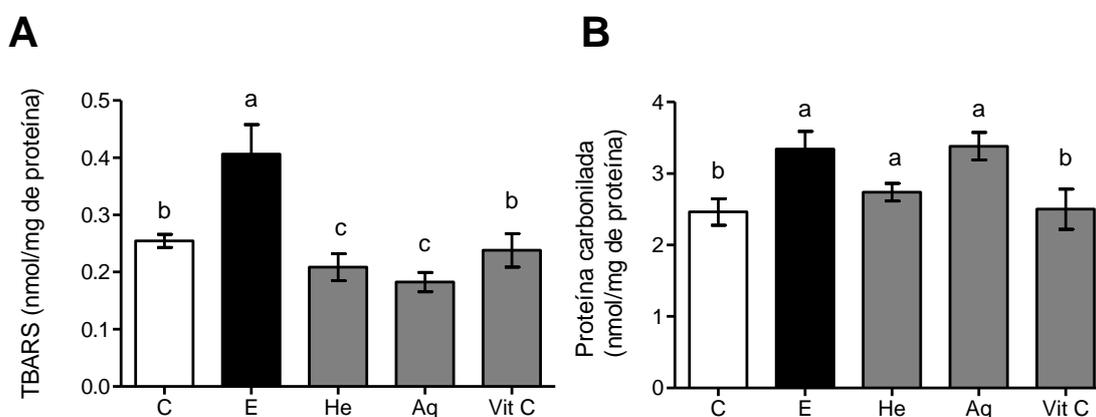


Figura 1818: Efeito de *Baccharis trimer*a sobre TBARS (A) e proteína carbonilada (B). Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimer*a na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.1.4. Atividade da MMP-2

A atividade da MMP-2 foi avaliada pela técnica de zimografia, onde podemos observar no painel A (Figura 21) a imagem representativa do gel contendo as bandas (em branco) de metaloproteínase 2 (MMP-2). Nesse ensaio, células de fibrosarcoma humano (HT1080) foram utilizadas como controle positivo, uma vez que possuem uma atividade alta de MMP-2, que é uma gelatinase responsável por degradar a matriz

extracelular durante o processo de invasão tumoral (BAE et al., 2015). No painel B da figura 19, podemos observar o gráfico quantitativo da atividade MMP-2, onde houve um aumento da sua atividade no grupo etanol, quando comparado ao grupo controle. Em relação aos tratamentos, apenas a vitamina C promoveu diminuição da atividade desta metaloproteinase quando comparada ao grupo etanol.

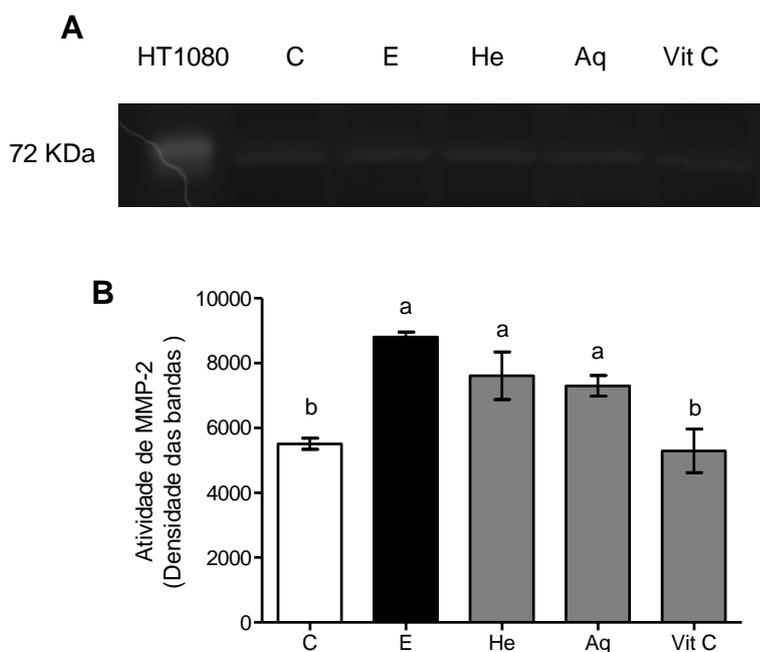


Figura 19: Efeito de *Baccharis trimera* sobre a atividade de MMP-2, pela técnica de zimografia. A: figura representativa do gel, onde células HT1080 foram utilizadas como controle positivo. B: gráfico quantitativo da atividade de MMP-2. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.1.5. Análise histológica

A análise histológica do fígado pode ser observada na figura 20 (painel A), onde as imagens representativas de cada grupo experimental nos mostra a presença de microesteatose no grupo etanol (E), quando comparada ao grupo controle (C). Os animais tratados com os extratos hidroetanólico (He) e aquoso (Aq) de *B. trimera* e com

vitamina C (Vit C) tiveram uma redução dessas microvesículas de gordura, quando comparadas ao grupo etanol. No painel B está representada a semi-quantificação dessas vesículas, sendo possível observar que o grupo etanol teve prevalência de microesteatose grau 1 e 3, enquanto que nos animais do grupo controle prevaleceu microesteatose grau 1. Os animais tratados com os extratos He e Aq, assim como com a Vit C tiveram maior percentual de microesteatose grau 1, sendo eficazes, portanto, em diminuir o grau de esteatose microvesicular.

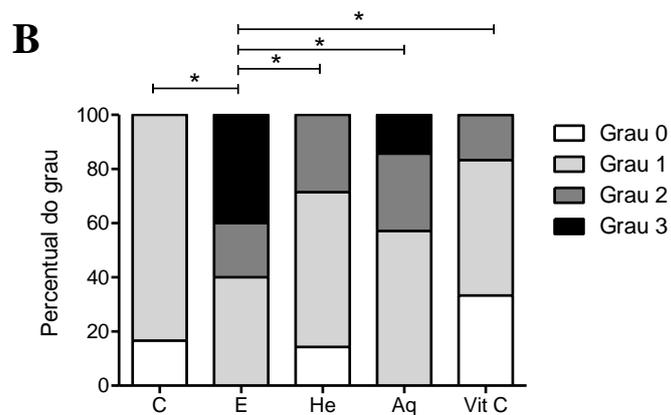
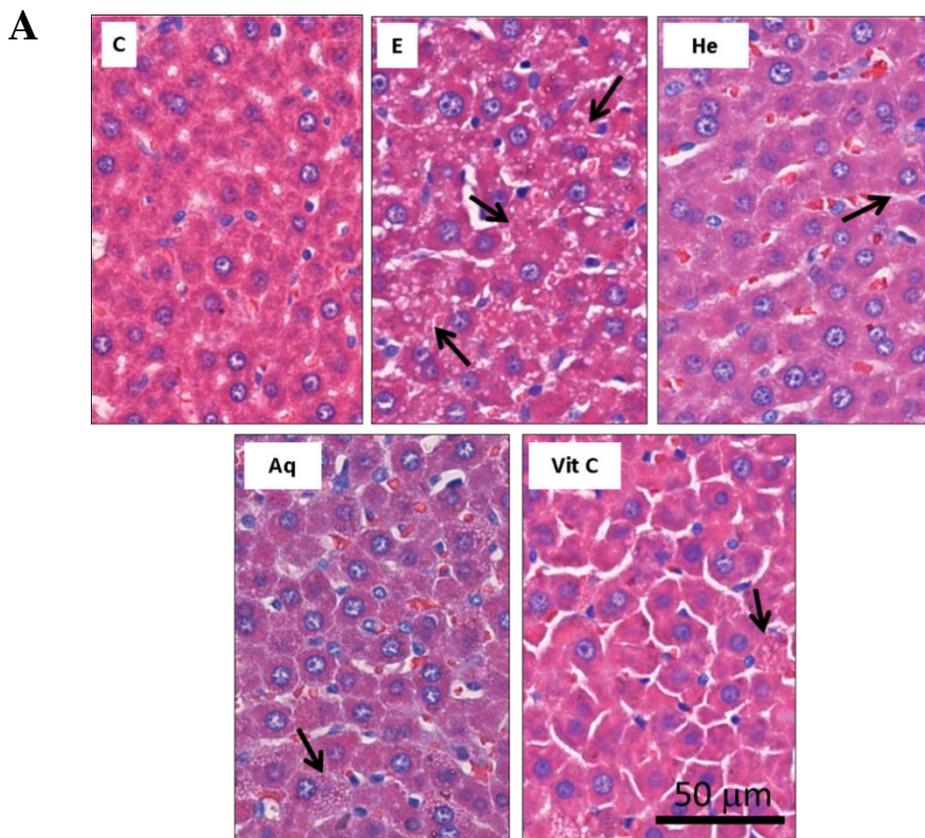


Figura 20: Secções do fígado de ratos tratados com *Baccharis trimera*. Foram atribuídos os graus de 0-3, onde: 0: nenhum; 1: 1-33%; 2: 33-66%; 3: > 66%. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol absoluto. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol absoluto (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após dois dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.2. Experimento crônico

5.3.2.1. Dosagens bioquímicas

Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico (He) de *Baccharis trimera* na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após vinte e oito dias de tratamento os animais foram eutanasiados e foram avaliadas as funções renal e hepática, glicemia e perfil lipídico.

Podemos observar na tabela 2 que houve um aumento de ureia e creatinina no grupo etanol, quando comparados ao grupo controle. Os grupos tratados com extrato hidroetanólico de *B. trimera* e com vitamina C tiveram uma diminuição de ambos os parâmetros, quando comparados ao grupo etanol. Em relação à função hepática, podemos observar que houve aumento na atividade de ALT no grupo etanol, quando comparado ao grupo controle, e ambos os tratamentos (He e Vit C) promoveram diminuição da sua atividade, quando comparado ao grupo etanol. Não houve diferença significativa na atividade de AST do grupo etanol e do controle, mas tanto o grupo tratado com o extrato He, quanto à vitamina C, promoveram diminuição da sua atividade. É possível observar que houve diminuição de albumina no grupo etanol, em relação ao controle, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo etanol. As proteínas totais estão diminuídas no grupo etanol, em relação ao grupo controle, mas ambos os tratamentos (He e Vit C) promoveram aumento nesse parâmetro. No grupo etanol houve uma diminuição de HDL, quando comparado ao grupo controle, porém nenhuma diferença foi observada nos tratamentos, em relação ao grupo etanol. Houve um aumento de triglicérides no grupo etanol, em relação ao grupo controle, e diminuição desse parâmetro apenas no grupo tratado com o extrato hidroetanólico. Não foi observada diferença significativa em nenhum dos grupos em relação à glicose, colesterol total e fração não HDL.

Tabela 2: Dosagens séricas do experimento crônico para avaliar as funções renal e hepática, glicemia e perfil lipídico. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (He) na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais (CRÔNICO)			
	C	E	He	Vit C
Ureia (mg/dL)	52.76 ± 1.23 ^b	61.5 ± 3.22 ^a	45.6 ± 1.90 ^c	44.6 ± 1.01 ^c
Creatinina (mg/dL)	0.435 ± 0.024 ^b	0.822 ± 0.109 ^a	0.202 ± 0.016 ^c	0.493 ± 0.039 ^b
ALT (U/mL)	16.37 ± 1.25 ^c	20.2 ± 0.571 ^a	17.3 ± 0.614 ^b	11.5 ± 0.70 ^d
AST (U/mL)	32.41 ± 1.10 ^a	39.6 ± 4.61 ^a	27.9 ± 2.26 ^b	19.7 ± 0.810 ^c
Albumina (mg/dL)	2.76 ± 0.063 ^a	2.52 ± 0.052 ^b	2.62 ± 0.021 ^b	2.65 ± 0.054 ^b
Proteínas totais (mg/dL)	6.49 ± 0.117 ^a	6.01 ± 0.035 ^b	6.5 ± 0.107 ^a	6.51 ± 0.11 ^a
Glicose (mg/dL)	128.0 ± 9.93	156.1 ± 13.2	114.0 ± 14.7	147.2 ± 12.2
Colesterol total (mg/dL)	78.1 ± 4.18	71.6 ± 2.64	82.6 ± 5.01	76.1 ± 4.33
HDL (mg/dL)	35.5 ± 2.30 ^a	28.6 ± 0.950 ^b	32.0 ± 1.85 ^b	31.8 ± 2.37 ^b
Fração não HDL (mg/dL)	44.0 ± 2.43	42.3 ± 0.805	47.6 ± 3.05	44.3 ± 3.56
Triacilgliceróis (mg/dL)	89.2 ± 18.1 ^b	131.0 ± 9.75 ^a	71.3 ± 10.3 ^c	94.3 ± 4.28 ^a

5.3.2.2. Defesa antioxidante

5.3.2.2.1. SOD e catalase

Podemos observar na figura 21 (painel A), que não houve diferença significativa na atividade de SOD entre os grupos experimentais. Já no painel B (figura 21), houve uma diminuição da atividade de catalase no grupo etanol, quando comparada ao grupo controle, e não houve diferença entre os grupos tratados com o extrato de *B. trimera* e vitamina C, quando comparada ao grupo etanol.

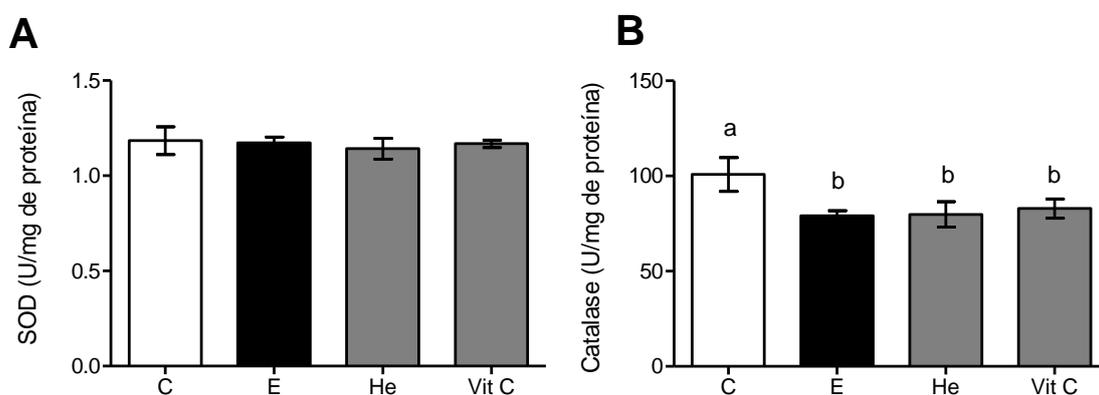


Figura 21: Efeito de *Baccharis trimera* sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (B), no experimento crônico. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (He) na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.2.2.2. Glutaciona total, oxidada, reduzida, peroxidase e redutase

Podemos observar que houve diminuição de glutaciona oxidada no grupo etanol, quando comparada ao grupo controle. Porém, não foi observada diferença significativa nos grupos tratados (He e Vit C) em relação ao grupo etanol (Figura 22- painel B). Na figura 22, painéis A, C, D e E, observamos que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais em relação aos parâmetros glutaciona total, glutaciona reduzida, atividade de glutaciona peroxidase e glutaciona redutase, respectivamente.

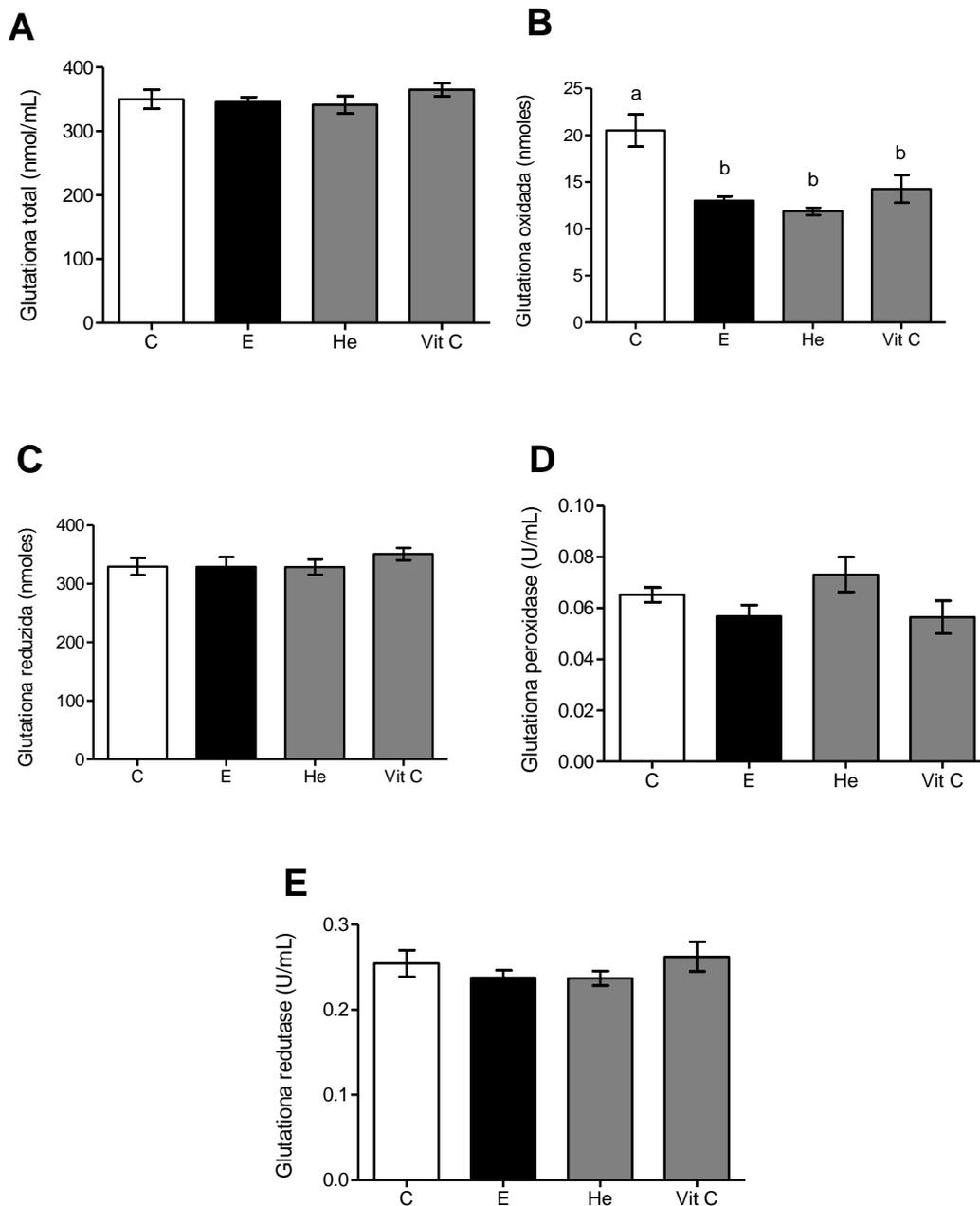


Figura 22: Efeito de *Baccharis trimera* sobre glutathiona total (A), glutathiona oxidada (B), glutathiona reduzida (C), glutathiona peroxidase (D), glutathiona redutase (E), no experimento crônico. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (He) na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.2.3. Marcadores de dano oxidativo

5.3.2.3.1. TBARS e proteína carbonilada

Na figura 23 (painel A) pode ser observado que não houve diferença significativa no parâmetro TBARS entre os grupos experimentais. Também podemos perceber que houve aumento de proteína carbonilada no grupo etanol, quando comparada ao grupo controle, e não houve diferença nos grupos que receberam os tratamentos He e Vit C, em relação ao grupo etanol (Figura 23-painel B).

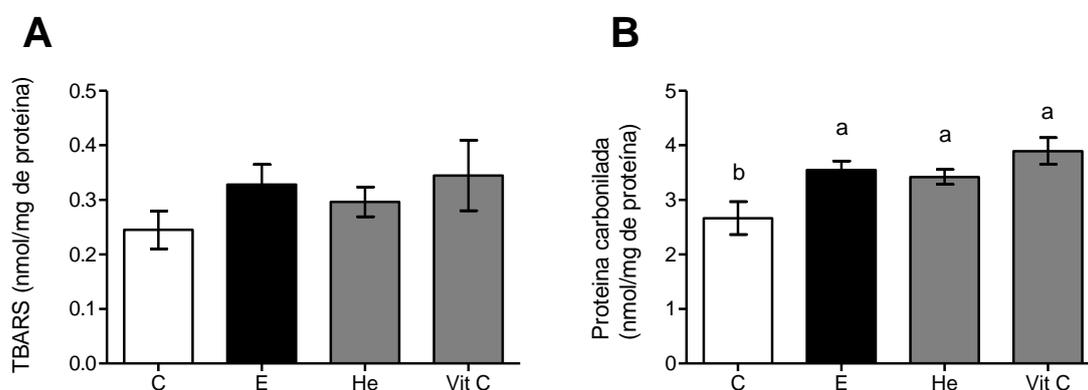


Figura 23: Efeito de *Baccharis trimera* sobre TBARS (A) e proteína carbonilada (B). Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (He) na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.2.4. Atividade da MMP-2

Pode ser observado no painel A (Figura 24) uma imagem representativa do gel com as bandas de MMP-2, sendo utilizadas como controle positivo células HT1080. O gráfico do painel B (figura 24) mostra a atividade da MMP-2, onde pode ser notado que houve aumento da atividade no grupo etanol em relação ao grupo controle, e ambos os tratamentos (He e Vit C) promoveram diminuição dessa atividade.

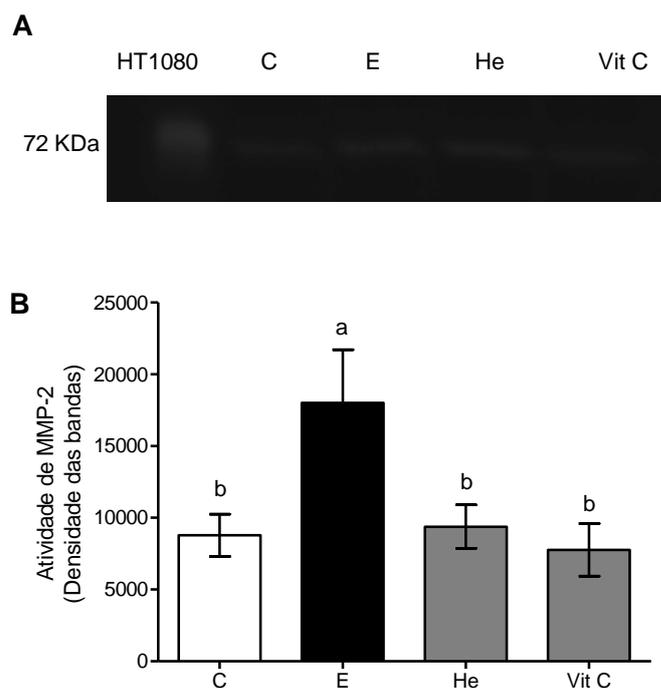


Figura 24: Efeito de *Baccharis trimera* sobre a atividade de MMP-2, pela técnica de zimografia. A: figura representativa do gel, onde células HT1080 foram utilizadas como controle positivo. B: gráfico quantitativo da atividade de MMP-2. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (He) na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.3.2.5. Análise histológica

Na figura 25 (painel A) pode ser observada a análise histológica do fígado, onde as imagens representativas de cada grupo experimental nos mostra a presença de microesteatose no grupo etanol (E), quando comparada ao grupo controle (C). Já nos animais tratados com os extratos hidroetanólico (He) de *B. trimera* e com vitamina C (Vit C) houve redução dessas microvesículas de gordura quando comparada ao grupo etanol. A semi-quantificação dessas vesículas pode ser observada na figura 25 (painel B), sendo que o grupo etanol apresentou um maior percentual de microesteatose grau 1 e 2, além disto aproximadamente 20% das microvesículas observadas neste grupo foi de

grau 3, enquanto que nos animais do grupo controle prevaleceu microesteatose grau 0. Os animais tratados com os extratos He e Aq, assim como com a Vit C tiveram maior percentual de microesteatose grau 0 e 1 e nenhuma microesteatose grau 3 foi observada, promovendo, assim, a diminuição do grau de esteatose microvesicular.

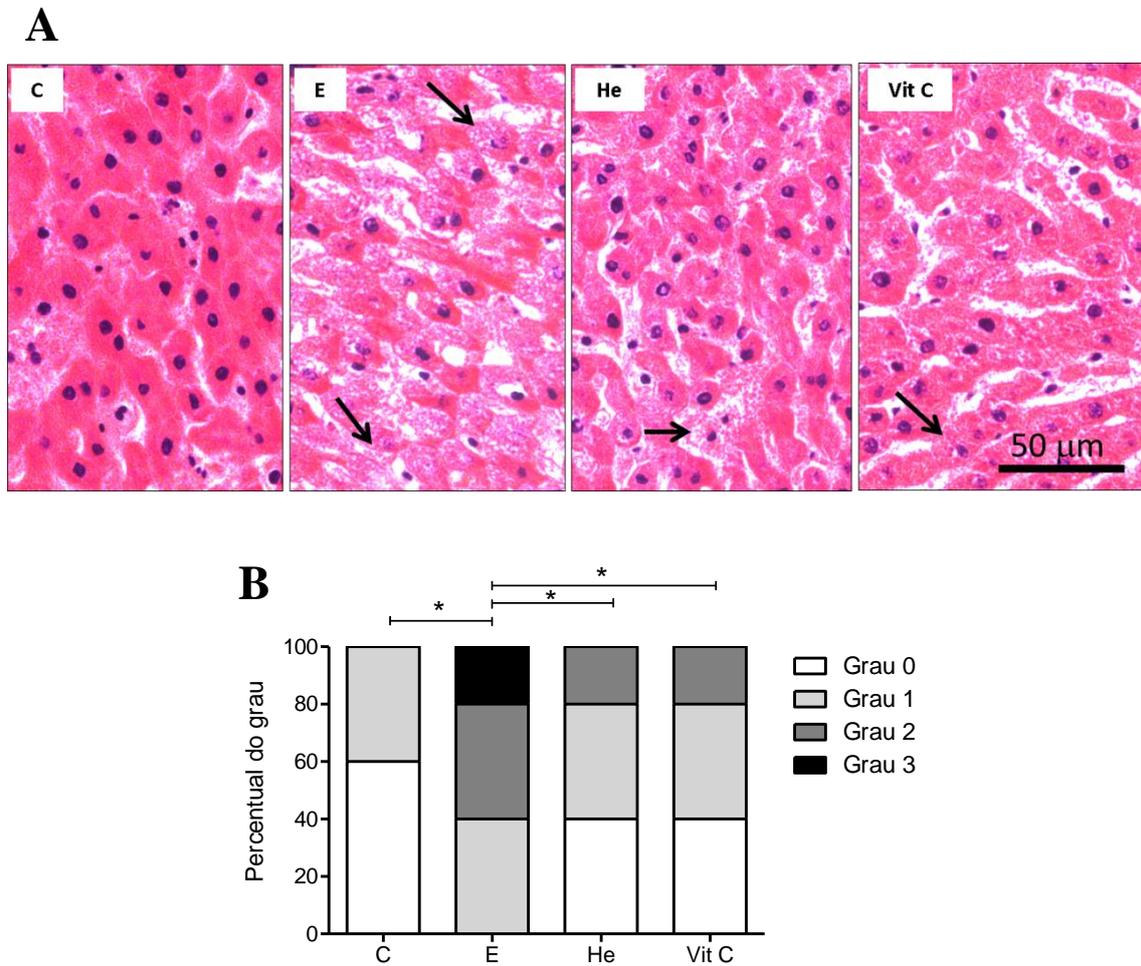


Figura 25: Secções do fígado de ratos tratados com *Baccharis trimera*. Foram atribuídos os graus de 0-3, onde: 0: nenhum; 1: 1-33%; 2: 33-66%; 3: > 66%. Ratos machos foram pré-tratados com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (He) na concentração de 600 mg/Kg de peso; ou com vitamina C (Vit C) na concentração de 250 mg/Kg de peso. Uma hora após, receberam uma dose de 5 mL/Kg de peso de etanol diluído. A diluição foi realizada em água, de modo que a concentração de etanol fosse aumentando ao longo do experimento, sendo assim, na primeira semana os animais receberam 20% (v/v); na segunda 40% e na terceira e quarta 60%. O grupo etanol (E) recebeu água e uma hora após etanol diluído (5 mL/Kg), enquanto que o grupo controle (C) recebeu apenas água. Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos foram comparados ao grupo etanol. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Inicialmente, os sintomas de doenças hepáticas decorrentes da ingestão abusiva de bebidas alcóolicas eram atribuídos exclusivamente a deficiências nutricionais. No entanto, os estudos começaram a apontar a ação pró-oxidativa do etanol nas células hepáticas, sugerindo que além da indução de deficiência nutricional também havia mecanismos direto de injúria celular (LIEBER, 1993). Hoje em dia, sabemos que, de fato, o consumo de álcool pode ser diretamente responsável pelo desenvolvimento de doenças ou contribuir de forma indireta para o aparecimento e progressão de outros distúrbios, sendo que mais de 200 condições de saúde têm sido associadas ao consumo de álcool, dentre elas, a doença hepática gordurosa alcoólica (AFLD) (LÍVERO e ACCO, 2016).

Com o passar do tempo muitos dos efeitos envolvidos com os prejuízos celulares e teciduais decorrentes do metabolismo do etanol começaram a ser esclarecidos (CEDERBAUM, 2012). Atualmente, sabemos que o estresse oxidativo induzido pelo metabolismo do etanol parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento e na progressão da AFLD (LU e CEDERBAUM, 2008; CENI et al., 2014; HAN et al., 2015; LÍVERO e ACCO, 2016). Nesse sentido, muitos estudos têm se concentrado no uso de antioxidantes para prevenir o dano oxidativo e melhorar a função hepática (HAN et al., 2015; LÍVERO e ACCO, 2016).

Desde os tempos mais remotos que as plantas são utilizadas por diferentes civilizações para aliviar os males da humanidade. A utilização de plantas com fins medicinais foi influenciada pela cultura indígena, africana e europeia, constituindo a base da medicina popular que vem sendo retomada (ERAS et al., 1998). *Baccharis trimera*, popularmente conhecida como carqueja, é uma planta amplamente distribuída na América do Sul e apresenta vários componentes bioativos, como flavonoides, que são capazes de sequestrar os radicais livres, exercendo, assim, uma função antioxidante (PÁDUA et al., 2010; PAIVA et al., 2015; de ARAÚJO et al., 2016; LÍVERO et al., 2016). Nesse contexto, o nosso trabalho se propôs a avaliar o efeito protetor dos extratos aquoso e hidroetanólico de *B. trimera* em um modelo de hepatotoxicidade induzida pelo etanol.

A quercetina é um flavonoide amplamente encontrado em legumes, frutas, ervas, folhas, sementes, vinhos, chás e café. Estudos relatam que esse flavonol apresenta ação antioxidante (ALAM et al., 2014; EL-SHAFFEY et al., 2015; de ARAUJO et al., 2016). Baseado nisso, utilizamos esse composto como controle positivo para os ensaios *in vitro*, que foram realizados com células de hepatocarcinoma humano (HepG2).

A ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos indivíduos com garantia de acesso a plantas medicinais é uma importante estratégia com vistas à melhoria da atenção à saúde da população. Porém, muitas pessoas acreditam que por se tratar de substâncias naturais, estas não fazem mal algum e as utilizam de forma indiscriminada, mas algumas substâncias podem oferecer ação tóxica, mutagênica e até carcinogênica (SCHENKEL et al., 1985). Dessa forma, se torna necessário avaliar a toxicidade das plantas para estabelecer seu uso seguro. Além disso, o conhecimento das plantas, geralmente transmitido pela cultura oral, corre o risco de se perder caso não seja sistematizado em estudos acadêmicos.

Baseado nessas informações, o nosso primeiro passo foi avaliar a citotoxicidade dos extratos aquoso e hidroetanólico de *B. trimera*, da quercetina e do etanol. Para tal, células HepG2 foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos por 12 e 24 horas. Nossos resultados demonstraram que o extrato hidroetanólico e aquoso de *B. trimera*, no tempo de 12 horas, não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Já no tempo de 24 horas, o extrato hidroetanólico na concentração de 600 µg/mL foi citotóxico (50% de viabilidade), enquanto o extrato aquoso não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações. de Araújo et al. (2016) encontraram uma diminuição da viabilidade quando células SK Hep-1 foram incubadas por 12 horas com 100 µg/mL do extrato hidroetanólico de *B. trimera*, no entanto, nenhuma concentração apresentou citotoxicidade. Ainda nesse estudo, foi observado que as células quando expostas ao extrato hidroetanólico por 24 horas, em concentrações acima de 25 µg/mL, foi capaz de reduzir a viabilidade das células SK Hep-1 para valores abaixo de 65% (de ARAÚJO et al., 2016). Pádua et al. (2014), não observaram redução da viabilidade em células HepG2 incubadas por 24 horas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, no entanto, a concentração utilizada foi menor do que nos nossos estudos. O extrato aquoso de *B. trimera* não foi citotóxico para células da medula óssea em nenhuma das concentrações testadas (500-2000 µg/mL) (RODRIGUES et al., 2009). Dados ainda não publicados do nosso laboratório também

demonstraram que células SK Hep-1 incubadas com o extrato aquoso de *B. trimera*, por 12 e 24 horas, não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, o que está de acordo com os nossos resultados. Muita das diferenças encontradas em relação à citotoxicidade se deve ao modo de preparo dos extratos e das características da planta, que podem sofrer influência da época da colheita, do ritmo circadiano, da temperatura, da disponibilidade hídrica, da altitude, da radiação ultravioleta, de nutrientes, dentre outros fatores (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Além disso, a resposta pode ser tecido, tempo e dose-dependente (NOGUEIRA et al., 2011).

Ainda em relação à citotoxicidade, observamos que quando as células foram incubadas com altas concentrações de quercetina a viabilidade celular foi reduzida, especialmente no tempo de 12 horas. de Araújo et al. (2016) demonstraram que células SK Hep-1 expostas a quercetina por 12 horas apresentaram viabilidade superior a 80%, ao passo que em 24 horas a viabilidade celular diminuiu em altas concentrações do composto. Fernandez-Blanco et al. (2016) não encontraram diminuição da viabilidade de células Caco-2 incubadas com quercetina por 24 horas, no entanto em 48 horas houve redução significativa nas concentrações mais elevadas (100 µg/mL). Esses dados sugerem que a diminuição da viabilidade celular é dependente do tempo de exposição e da concentração utilizada. Nossos dados mostraram que a partir de 100 mM de etanol houve redução da viabilidade celular para menos de 70%, no tempo de 12 horas. Já em 24 horas, o etanol a partir de 200 mM promoveu uma diminuição da viabilidade de maneira dose-dependente. Kumar et al. (2012) encontraram uma redução da viabilidade quando células HepG2 foram expostas ao etanol a partir de 100 mM, por 24 horas.

A viabilidade celular dos extratos aquoso e hidroetanólico de *B. trimera*, da quercetina e do etanol foi realizada para melhor determinar a concentração ideal destes compostos para a utilização nos ensaios subsequentes. Sendo assim, selecionamos concentrações que não foram citotóxicas para os extratos (10 e 50 µg/mL) e para a quercetina (10 e 50 µM). Já para o etanol selecionamos a primeira concentração que apresentou diminuição da viabilidade celular (200 mM).

Três mecanismos têm sido propostos para as injúrias hepáticas promovidas pelo etanol: 1- O acetaldeído, que é um subproduto altamente reativo e tóxico para os hepatócitos que pode contribuir para lesões teciduais (NASSIR e IBDAH, 2014); 2- Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou exposição ao estresse oxidativo; 3-

Indução da resposta imune que causa estresse oxidativo nos hepatócitos (HAN et al., 2016).

Diante disso, avaliamos a produção de ERO e de óxido nítrico (NO). Para isso, células HepG2 foram incubadas com etanol ou pré-tratadas com os extratos de *B. trimera* e quercetina. Nossos resultados demonstraram que o grupo estimulado com etanol teve uma produção de ERO e NO maior que o grupo controle. Haorah et al. (2011) também encontraram aumento de ERO e NO em células endoteliais tratadas com etanol. Esse aumento pode ser explicado pelo fato de que o principal metabólito do etanol, o acetaldeído, ativa NADPH oxidase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), isso leva a um aumento na produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (RNS), causando danos oxidativos (HAORAH et al., 2008; RUMP et al., 2010; ALIKUNJU et al., 2011).

As células pré-tratadas com os extratos de *B. trimera* e com a quercetina, em ambas as concentrações, promoveram uma diminuição na produção de ERO e NO. Pádua et al. (2013) encontraram diminuição de NO quando neutrófilos intoxicados com paracetamol foram incubados com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Oliveira et al. (2012) também demonstraram uma diminuição na produção de NO, quando ratos Wistar foram pré-tratados com *B. trimera*, num modelo de inflamação. de Araujo et al. (2016) encontraram diminuição de ERO em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Os antioxidantes podem atuar de forma direta, através da eliminação de ERO e ERN, ou de forma indireta, através da modulação de vias de sinalização (PAIVA et al., 2015). Estudos demonstram que *Baccharis trimera* possui capacidade de sequestrar radicais (OLIVEIRA et al., 2012; PÁDUA et al., 2013; LÍVERO et al., 2016), sendo assim, podemos inferir que a diminuição de ERO e NO se deve, ao menos em parte, à neutralização de forma direta promovida pela carqueja. Além disso, também inferimos que essa diminuição pode ser atribuída à atuação indireta de *B. trimera*, uma vez que já foi demonstrado que ela é capaz de diminuir a fosforilação da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase (de ARAUJO et al., 2016) e diminuir a expressão de iNOS (PÁDUA et al., 2013). Estes resultados sugerem que os extratos possuem potencial antioxidante e podem ser eficazes na prevenção da hepatotoxicidade induzida pelo etanol. Em relação à quercetina também já foi demonstrado que ela é capaz de diminuir a ativação de NADPH oxidase (de ARAUJO et al., 2016), além de promover aumento da atividade das enzimas SOD, catalase e GPx

em animais intoxicados com etanol, contribuindo para a diminuição de ERO (MOLINA et al., 2003).

Visto que a produção de ERO é um processo natural e persistente, vários sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos foram desenvolvidos pelo organismo para proteger as células e tecidos (LÍVERO e ACCO, 2016). A remoção de ERO intracelular é realizada, pelo menos em parte, por várias enzimas citoprotetoras de fase II, incluindo heme oxigenase-1 (HO-1), NAD[P]H: quinona oxidoreductase-1 (NQO1), glutathione S-transferase (GST) e ligase γ -glutamilcisteína (γ -GCS). É amplamente aceito que a transcrição destas enzimas é regulada pelo elemento de resposta antioxidante (ARE), uma sequência de DNA presente no promotor dos genes que codificam essas enzimas (KIM e KEUM, 2016). O Fator de transcrição Nrf2 encontra-se ligado à proteína citosólica Keap1, no qual é ubiquitinado para sua degradação por proteasomas. Por outro lado, quando há um aumento de ERO ocorrem mudanças conformacionais na proteína Keap1, bloqueando a ubiquitinação e a degradação proteossômica de Nrf-2. Em seguida, Nrf-2 se transloca para o núcleo e liga-se a região ARE, promovendo a transcrição de enzimas antioxidantes (como catalase e SOD) e enzimas de detoxificação de fase II (MORALES-GONZÁLEZ et al., 2015).

Fundamentado nessas informações, nosso próximo passo foi avaliar o papel de *Baccharis trimera* na modulação do fator de transcrição Nrf2. Para isso, células HepG2 foram pré-tratadas com os extratos de *B. trimera* ou com a quercetina e, em seguida, estimuladas com etanol por 12 ou 24 horas. Nossos resultados mostraram que quando as células foram estimuladas com etanol durante 12 horas houve aumento na atividade transcricional de Nrf2 no grupo etanol. No entanto, no tempo de 24 horas não houve diferença, sugerindo que a indução de Nrf2 é um mecanismo compensatório nas primeiras horas, porém é perdido ao longo do tempo. Gong e Cederbaum (2005) observaram que em hepatócitos isolados de ratos houve um aumento de Nrf2, provavelmente isso se deve à indução de CYP2E1 promovida pelo etanol, que leva ao aumento na produção de ERO, com consequente ativação de Nrf2.

Em relação ao tratamento com os extratos de *B. trimera* não observamos diferença na atividade transcricional de Nrf2 em relação ao grupo etanol em nenhum dos tempos avaliados. Lívero et al. (2016) demonstraram que o extrato hidroetamólico de *B. trimera* promoveu aumento de Nrf2 na AFLD, no entanto, esse experimento foi

conduzido em animais que receberam tratamento durante duas semanas. Sabe-se que os processos fisiológicos sofrem influência de vários fatores que estão envolvidos na indução de uma resposta adaptativa, como a dose, o tempo, o composto envolvido e o momento da exposição (STHIJNS et al., 2016). Isso pode explicar o fato de que o tratamento com os extratos de *Baccharis*, nesse caso, não ter promovido diferenças em relação ao grupo etanol. Estes resultados reforçam ainda mais a nossa hipótese de que o extrato de *B. trimera* exerce um efeito inibitório sobre a produção de espécies reativas através da modulação de enzimas responsáveis pela produção destas espécies, tais como NADPH oxidase e óxido nítrico sintase e não pela regulação transcricional de enzimas antioxidantes.

Nossos resultados ainda mostraram que no tempo de 12 horas não houve aumento na atividade transcricional de Nrf2 quando as células foram expostas à quercetina. Já em 24 horas, houve aumento de Nrf2 quando as células foram pré-tratadas com baixa dose de quercetina, ao passo que isso não foi observado na dose mais elevada. Li et al. (2016) encontraram aumento na atividade de Nrf2 quando ratos foram tratados com quercetina. Arredondo et al. (2010) também encontraram aumento de Nrf2 quando células neuronais foram tratadas com quercetina. De fato, a quercetina tem demonstrado proteção contra o estresse oxidativo através da ativação da via Nrf2-ARE (COSTA et al., 2016). O termo “hormesis” é utilizado quando uma célula ou organismo responde a uma baixa dose de um composto, gerando uma resposta adaptativa que induz mecanismos de proteção (STHIJNS et al., 2016). Esse mecanismo pode ter ocorrido no nosso experimento, justificando o aumento de Nrf2 apenas em baixa concentração.

Os estudos *in vitro* são, obviamente, de grande importância e auxiliam de forma significativa nas pesquisas científicas. No entanto, apresentam limitações, já que em um organismo vivo ocorrem inúmeros outros processos que podem interferir na ação de determinada substância, tais como absorção, metabolismo e biodisponibilidade. Dessa forma, nosso próximo passo foi confirmar o efeito protetor dos extratos de *B. trimera* em animais. Para tal, ratos machos da linhagem Fisher foram pré-tratados com *B. trimera* durante 2 dias (experimento agudo) ou 28 dias (experimento crônico).

A vitamina C, assim como a quercetina, tem sido descrita como antioxidante (CHEN et al., 2001; HIPÓLITO et al., 2015; HANACHI e NAGHAVI, 2016). Portanto, optamos por utilizar a vitamina C como controle positivo nos ensaios *in vivo*, uma vez

que se trata de um composto hidrossolúvel, de fácil e rápida absorção (BIANCHI e ANTUNES, 1999). O que difere da quercetina, que possui baixa biodisponibilidade oral, dificultando sua aplicação em experimentos com animais (MORENO et al., 2017).

Uma pequena parcela do etanol é metabolizada nos rins, no entanto, esse órgão contribui de forma significativa para a eliminação de metabólitos (SÖNMEZ et al., 2012). Sendo assim, avaliamos a função renal através das dosagens de ureia e creatinina. No experimento agudo, nossos resultados demonstraram um aumento de creatinina no grupo intoxicado com etanol, mas não houve diferença na ureia. A ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, no entanto, é um fraco preditor da taxa de filtração glomerular, pois 40%-70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva, que é dependente do fluxo urinário. Sua determinação parece ter mais valor clínico quando associada à creatinina (SODRÉ et al., 2007). Em roedores, a creatinina é mais sensível e específica para avaliar o funcionamento renal (GONZÁLEZ e SILVA, 2003). Nossos resultados sugerem que a exposição aguda ao etanol tem potencial para prejudicar a função renal, no entanto apenas com a alteração de um parâmetro não podemos fazer essa afirmação. Os tratamentos com os extratos de *B. trimera* e com a vitamina C não alteraram esses parâmetros. Lívero et al. (2016) também não encontraram diferença nesses parâmetros quando ratos foram tratados com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Çetim et al. (2008) também não encontraram diferença nos níveis de ureia e creatinina em animais tratados com vitamina C. Esses resultados demonstram que na intoxicação aguda esses compostos não são eficazes na proteção renal.

O metabolismo do etanol ocorre principalmente no fígado e induz danos aos hepatócitos (LÍVERO e ACCO, 2016). Dessa forma, avaliamos a função hepática a partir da dosagem das enzimas séricas ALT, AST e proteínas totais. Nossos resultados mostraram que o grupo tratado com etanol apresentou diminuição nas proteínas totais, no entanto não houve diferença entre ALT e AST. Na prática clínica, a liberação de enzimas hepáticas pode ser indicativa de lesão hepática, mesmo que as atividades dessas enzimas permaneçam normais, pois a liberação dessas enzimas depende, em grande parte, das alterações hemodinâmicas no fígado. Além disso, um aumento drástico nas atividades séricas desses marcadores hepáticos não reflete necessariamente na morte das células do fígado (CONTRERAS-ZENTELLA e HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2016). O acetaldeído formado durante o metabolismo do etanol pode formar aductos com

aminoácidos, refletindo na diminuição geral da síntese de proteínas e na diminuição da secreção de proteínas plasmáticas (SMITH et al. 2007). Esse fato pode explicar a diminuição de proteínas totais no grupo tratado com etanol. Os tratamentos com o extrato aquoso de *B. trimera* e com a vitamina C promoveram uma diminuição na atividade de ALT, mas não alteraram outros marcadores bioquímicos, assim como o extrato hidroetanólico. Já foi demonstrado que os ácidos clorogênicos possuem efeito hepatoprotetor (JHO et al., 2013; YILMAZ et al., 2016). Como na caracterização do extrato aquoso (ANEXO C) houve uma maior diversidade de ácidos clorogênicos do que o extrato hidroetanólico talvez isso possa justificar a diminuição de ALT apenas no grupo aquoso exposto de forma aguda ao etanol.

Em relação à glicose, notamos que não houve diferença entre os grupos experimentais. Estudos indicam que a administração aguda de álcool pode levar a uma redução ou não alterar a concentração de glicose. Essa diferença pode ser explicada pelo estado nutricional no momento em que o álcool é administrado. Por exemplo, em seres humanos em jejum durante a noite o álcool não altera a concentração de glicose sanguínea. Do mesmo modo, a euglicemia é mantida em ratos e camundongos em jejum durante a noite após intoxicação aguda por álcool. Além disso, há pouca evidência de hipoglicemia aguda induzida por álcool quando a nutrição está adequada (STEINER et al., 2015).

Durante o metabolismo do etanol ocorre uma diminuição da taxa de NAD^+/NADH , o que pode acarretar em inibição da oxidação de ácidos graxos, os quais se acumulam no fígado. Esses ácidos graxos podem ser reesterificados em triacilgliceróis (TAG), que são incorporados dentro de VLDL, que podem se acumular no fígado e promover a doença hepática gordurosa alcóolica (AFLD), e/ou passar para a corrente sanguínea resultando em hiperlipidemia induzida pelo etanol (SMITH et al., 2007; KIRPICHI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016).

Fundamentado nisso, nosso próximo objetivo foi avaliar o perfil lipídico através dos marcadores bioquímicos colesterol total, HDL, fração não HDL e TAG, além de avaliar a histologia hepática. Nossos resultados mostraram um aumento de colesterol total e da fração não HDL no grupo etanol, indicando hiperlipidemia nesses animais. A hiperlipidemia pode ser produzida por uma produção/liberação excessiva de lipídeos para circulação; por remoção deficiente no sangue; ou por combinação destes

mecanismos. Uma das maneiras de retirar o colesterol da corrente sanguínea é encaminhando-o para a síntese de sais biliares, no entanto após a administração aguda de etanol pode ocorrer diminuição na síntese desses sais, muito provavelmente por inibição da 7- α -hidroxilase (BARAONA e LIEBER, 1979). Esse fato pode estar contribuindo para o aumento de colesterol nos animais tratados com etanol do nosso experimento. Após consumo agudo de altas doses de etanol os níveis séricos de TAG podem aumentar, diminuir ou permanecer normal, no entanto, o fluxo total que é absorvido pelo fígado é aumentado devido aos efeitos estimuladores do etanol sobre o fluxo sanguíneo hepático (BARAONA e LIEBER, 1979). Além disso, o etanol pode promover o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, principalmente TAG, na forma de micro e/ou macrovesículas (BARAONA e LIEBER, 1979; LÍVERO e ACCO, 2016). Esses dados estão de acordo com os nossos resultados do experimento agudo, onde o grupo tratado com etanol não apresentou alterações nos níveis séricos de TAG, além de apresentarem microvesículas de lipídios nos hepatócitos.

As vesículas de lipídeos podem ser convertidas em mediadores potencialmente tóxicos que desempenham um papel importante no dano hepático. Assim, a eliminação destas gotículas é uma forma crucial de preservar a integridade do tecido (SCHWABE e MAHER, 2012). No nosso estudo, os tratamentos com os extratos de *B. trimera* e com a vitamina C promoveram a diminuição das microvesículas de gordura, conferindo proteção hepática. Além disso, o extrato hidroetanólico de *B. trimera* promoveu aumento de HDL, uma lipoproteína importante que promove o efluxo celular e o transporte reverso do colesterol, além de exercer funções protetoras como atividade antioxidante, devido à sua ligação e remoção de moléculas oxidativas (LORE SCHRUTKA et al., 2016). Um dos mecanismos que pode estar envolvido com o efeito protetor do extrato hidroetanólico de *B. trimera* é o fato dele diminuir a expressão do gene *Scd1* (Lívero et al., 2016). Esse gene codifica a enzima estearoil-CoA desaturase-1, importante na biossíntese de gorduras monoinsaturadas. Essa enzima introduz uma ligação dupla em seus substratos palmítico e ácido esteárico para gerar os produtos palmitoleico e ácido oleico, que são os ácidos graxos mais abundantes encontrados nos TAG, ésteres de colesterol e fosfolipídios (COHEN et al., 2003). Já foi demonstrado que peixes alimentados com uma dieta rica em vitamina C tiveram um aumento de carnitina palmitoiltransferase com conseqüente aumento na oxidação de ácidos graxos, diminuindo o acúmulo de lipídeos hepáticos (NAKAGAWA et al., 2000). Podemos

inferir, assim, que a oxidação dos lipídeos pode estar contribuindo para a diminuição das microvesículas promovidas pela vitamina C.

A maioria do álcool ingerido é absorvido e transportado para o fígado para sua metabolização, no entanto esse processo provoca estresse oxidativo com consequente aumento nos níveis de ERO. Diante disso, a defesa antioxidante atuando de forma integrada na neutralização dessas espécies é de grande importância para a proteção do organismo. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio; a glutathione peroxidase (GPx) é responsável pela conversão do peróxido em água; a glutathione reductase (GR) reduz a glutathione oxidada em reduzida; a catalase (CAT) também pode converter o peróxido em água. (LÍVERO e ACCO, 2016). Dessa forma, nosso próximo objetivo foi avaliar a defesa antioxidante representada pela SOD, CAT, GPx, GR e glutathione reduzida/oxidada.

Nossos resultados do experimento agudo demonstraram que as alterações no sistema glutathione foram mais significativas em relação à SOD e CAT. Como a conversão de H_2O_2 à água é dependente da ação da CAT e da GPx, e o grupo tratado com etanol teve uma diminuição na atividade de GPx, podemos inferir que nesses animais provavelmente houve acúmulo de H_2O_2 , contribuindo para o estresse oxidativo. Pinto et al. (2014) encontraram aumento de H_2O_2 em animais tratados por 7 dias com etanol. Durante o metabolismo do etanol, além do aumento de ERO, pode ocorrer diminuição dos reservatórios antioxidantes nos hepatócitos (PARK et al. 2013), o que vai de acordo com a diminuição de GPx encontrada no nosso estudo. A diminuição na atividade de GPx frente a intoxicação com etanol também foi demonstrada em outros estudos (PARK et al. 2013; LI et al., 2014; YAN et al., 2014). Hipólito et al (2015) também não encontraram diferença na atividade de SOD e CAT nos animais tratados com etanol.

É relatado que a restauração nos níveis de glutathione poderia melhorar a hepatotoxicidade induzida pelo álcool através da redução do estresse oxidativo (YAN et al., 2014). O tratamento com os extratos aquoso e hidroetanólico de *B. trimera* promoveu aumento da atividade de GPx, favorecendo uma resposta adaptativa ao estresse. Pádua et al. (2014) não encontraram diferença na atividade de GPx em animais pré-tratados com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e intoxicados com APAP, no entanto, *Baccharis* promoveu aumento na atividade de CAT, contribuindo para a

proteção antioxidante. Muito provavelmente o mecanismo de atuação dos extratos de *B. trimera* depende do tipo de injúria ao qual o animal foi exposto. Concomitante com o aumento de GPx, o extrato hidroetanólico promoveu o aumento na atividade de SOD, diferente do extrato aquoso que não alterou esse parâmetro. Provavelmente essa diferença se deve a composição dos extratos, já que o hidroetanólico possui mais compostos fenólicos do que o aquoso (ANEXO D). De fato, os mecanismos envolvidos na capacidade antioxidante dos polifenóis incluem a supressão da formação de ERO por inibição de enzimas envolvidas na sua produção; eliminação direta de ERO; ou regulação positiva na defesa antioxidante (HUSSAIN et al., 2016). Esse resultado está de acordo com os estudos conduzidos por Lívero et al. (2016), que também encontraram aumento na atividade de SOD, quando os animais foram pré-tratados com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*. A vitamina C promoveu diminuição na atividade de CAT, no entanto, houve aumento na atividade de GPx, mantendo a proteção antioxidante.

Embora todas as organelas e compartimentos da célula produzam ERO, a geração mitocondrial de H_2O_2 é geralmente considerada como a principal fonte de oxidantes. Na presença de ferro o H_2O_2 sofre a reação de Fenton e produz radical hidroxila, que é altamente reativo e rapidamente abstrai átomos de hidrogênio de biomoléculas ao seu redor. Os fosfolipídios de membrana e os triacilgliceróis são os principais alvos para o ataque desses radicais e formação de radicais lipídicos. Tais radicais são oxidados rapidamente levando à peroxidação lipídica. Em condições normais, existem várias classes de enzimas metabolizadoras que auxiliam na remoção dos aldeídos lipídicos antes que eles promovam danos oxidativos às células. No entanto, em condições elevadas de estresse oxidativo eles podem se acumular. Nesse sentido, as enzimas antioxidantes, como a GPx, que desintoxicam hidroperóxidos e aldeídos lipídicos são criticamente importantes para a regulação da carbonilação e prevenção de danos oxidativos à célula (HAUCK e BERNLOHR, 2016). O fato dos animais tratados de forma aguda com o etanol terem uma diminuição na atividade de GPx e, provavelmente acúmulo de H_2O_2 , pode explicar o aumento de TBARS e proteína carbonilada. Outros estudos também encontraram aumento desses marcadores em animais tratados com etanol (YANARDAG e OZSOY-SACAN, 2007; LI et al., 2014; PINTO et al., 2014). Os tratamentos com os extratos de *B. trimera* e com a vitamina C foram eficazes na diminuição de TBARS, muito provavelmente porque elevaram a atividade de GPx, promovendo proteção antioxidante. Esse dado está de acordo com os estudos de Lívero

et al. (2016) que também demonstraram que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* diminui a peroxidação lipídica. No entanto, apenas a vitamina C foi capaz de diminuir proteína carbonilada, muito provavelmente porque cada antioxidante tem um mecanismo de ação diferente (KURUTAS, 2016).

A fibrose hepática é uma importante característica histológica associada à progressão da doença hepática alcoólica, sendo caracterizada pelo aumento da deposição de componentes da matriz extracelular (ECM). O evento chave na fibrogênese hepática é a ativação das células estreladas hepáticas (HSC), que são uma das principais fontes de ECM no fígado (CENI et al., 2014; LASEK, 2016). O acetaldeído é um dos principais mediadores da fibrogênese induzida pelo álcool, já que pode estimular a síntese de colágenos fibrilares e glicoproteínas estruturais de ECM. O acetaldeído ainda pode promover a remodelação da ECM por regulação positiva da metaloproteinase (MMP) -2 (CENI et al., 2014). Além disso, o H₂O₂ decorrente do estresse oxidativo pode ativar MMP-2 (HOPPS et al., 2015). Esse fato explica o aumento na atividade de MMP-2 encontrado nos animais tratados com etanol no nosso experimento. O tratamento com a vitamina C promoveu a diminuição da atividade de MMP-2, no entanto os extratos de *B. trimera* não tiveram o mesmo efeito. Possivelmente não houve tempo suficiente para o extrato de *B. trimera* modular este parâmetro, já que no experimento crônico o extrato foi capaz de diminuir a atividade de MMP-2. Tao-Shang et al. (2014) encontraram diminuição tanto da atividade de MMP-2 quanto no mRNA, quando animais foram tratados com vitamina C num experimento de aneurisma da aorta abdominal induzido por elastase.

Nossos resultados demonstraram um perfil de ação do extrato diferente no experimento crônico. Quando os animais foram expostos ao etanol por 28 dias o dano renal foi maior, uma vez que houve aumento tanto de creatinina quanto de ureia. A exposição crônica ao etanol pode resultar em doença renal aguda e crônica, muito provavelmente por indução de estresse oxidativo e inflamação (PINTO et al., 2014). Shirpoor et al. (2016) também encontraram aumento de ureia e creatinina em ratos tratados por 6 semanas com etanol. Visto que o estresse oxidativo pode estar envolvido nesse processo, a terapia com antioxidantes pode trazer efeitos benéficos aos rins, fígado e outros tecidos (PINTO et al., 2014). Os tratamentos com o extrato de *B. trimera* e vitamina C diminuíram esses marcadores, melhorando a função renal.

A exposição crônica dos animais ao etanol promoveu aumento de ALT, mas não alterou AST. ALT é originada principalmente dos hepatócitos, enquanto AST também é abundante no coração, tecido muscular esquelético, rins e cérebro. Assim, a ALT sérica tem sido considerada um marcador mais específico de afecção hepática, enquanto que a AST apresenta frequentemente atividades aumentadas devido a razões extra-hepáticas (NIEMELÄ, 2016). Como o metabolismo do etanol ocorre principalmente no fígado, provavelmente o dano também é maior nesse órgão, o que pode justificar o aumento apenas de ALT nos animais do grupo etanol. Nos animais do grupo etanol crônico do nosso experimento ainda foi encontrado diminuição de proteínas totais e de albumina. Sabe-se que após ingestão crônica de etanol pode ocorrer restauração ou até mesmo aumento na síntese proteica, mas a liberação para a corrente sanguínea pode estar prejudicada (BARAONA e LIEBER, 1979). Concomitante com isso pode ocorrer aumento da degradação das proteínas com consequente aumento de ureia (YANARDAG, R. e OZSOY-SACAN, 2007). Os tratamentos com o extrato de *B. trimera* e vitamina C promoveram melhora na função hepática, uma vez que diminuíram ALT e AST e aumentaram proteínas totais. Nossos resultados concordam com Lívero et al. (2016) que também encontraram diminuição de ALT e AST em animais tratados com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*.

Nossos resultados também demonstraram que a glicose não se alterou entre os grupos experimentais crônico. Cha et al. (2000) demonstraram que animais que receberam uma dieta com quantidade suficiente de proteína e uso crônico de etanol não tiveram alteração na glicose plasmática, ao passo que animais que receberam dieta pobre em proteína tiveram uma diminuição na glicose, mostrando que a ingestão crônica de álcool influencia o metabolismo da glicose de acordo com o estado nutricional. Sendo assim, podemos inferir que os animais tratados com etanol não tiveram diferença na glicose porque o estado nutricional provavelmente estava normal, uma vez que os animais foram alimentados com ração padrão nutricionalmente equilibrada durante todo o experimento. Após consumo crônico de etanol pode ocorrer diminuição de lipoproteínas na corrente sanguínea, não devido à síntese, mas sim por uma deficiência na secreção. Além disso, após consumo crônico de etanol o fluxo biliar fica inalterado (BORENA et al., 1979). Isso pode explicar, ao menos em parte, o fato de termos encontrado diminuição de HDL e inalteração no colesterol. Sabemos que durante o metabolismo do etanol ocorre uma diminuição da taxa de NAD^+/NADH , o que pode

acarretar em inibição da oxidação de ácidos graxos. Esses ácidos graxos podem ser reesterificados em TAG e incorporados dentro de VLDL, que se acumulam no fígado e/ou passam para a corrente sanguínea resultando em hiperlipidemia induzida pelo etanol (SMITH et al., 2007; KIRPICH I et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016). Provavelmente por isso os animais tratados com etanol tiveram aumento nos níveis séricos de TAG e aumento de microvesículas lipídicas nos hepatócitos. Lu e Cederbaum (2008) também relataram um aumento nos níveis de TAG e acúmulo de gordura hepática quando animais foram expostos ao etanol por 4 semanas. O tratamento com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* promoveu diminuição nos níveis séricos de TAG, além de diminuir as microvesículas de gordura hepática. Segundo Shao et al. (2016) os compostos fenólicos têm sido descritos para diminuir TAG, o que corrobora com nossos achados. Lívero et al. (2016) também encontraram esse resultado quando animais com AFLD foram tratados com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*. A vitamina C não diminuiu TAG, no entanto diminuiu as vesículas gordurosas no fígado, conferindo proteção hepática.

O uso crônico de etanol alterou de forma mais proeminente a atividade de CAT do que o sistema glutathiona. Como encontramos diminuição na atividade de CAT, podemos inferir que nesses animais pode ter ocorrido um aumento de H₂O₂, contribuindo para o estresse oxidativo nesses animais. Sabe-se que o etanol pode ser oxidado a acetaldeído pela catalase nos peroxissomos e que o uso crônico pode inibir essa enzima (DAS e MUKHERJEE, 2010), o que justificaria a diminuição de CAT encontrada nos animais tratados com etanol em nosso experimento. Lívero et al. (2016) também encontraram uma diminuição na atividade de CAT em animais tratados com etanol. Nossos resultados demonstraram que a exposição crônica ao etanol não alterou a atividade de GPx nem de GR, nem os níveis de glutathiona reduzida (GSH), no entanto promoveu a diminuição de glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona oxidada pode ser formada em decorrência da ação da GPx ou da glutathiona oxidase (GO) (HUBER et al., 2007). Dessa forma, podemos inferir que a diminuição de GSSG pode ser em decorrência da diminuição da atividade de GO, no entanto teríamos que fazer essa dosagem para confirmar nossa hipótese. Os tratamentos com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e com a vitamina C não promoveram nenhuma alteração nesses parâmetros.

No experimento crônico observamos um aumento de proteína carbonilada no grupo tratado com etanol. No entanto não houve diferença nos níveis de TBARS nos

animais tratados com etanol, indicando que provavelmente não houve peroxidação lipídica no fígado, possivelmente devido à inalteração de praticamente todas as enzimas antioxidantes. Corroborando com isso, já foi demonstrado que a peroxidação lipídica é dependente da dose, do tempo e do local analisado (SCHLORFF et al., 1999). Muniz et al. (2015) demonstraram que não houve aumento de TBARS no corpo cavernoso de animais após o consumo de etanol 20% por 7 semanas, no entanto no plasma TBARS manteve-se elevado. Isso ocorreria porque o tecido analisado teria capacidade de “expulsar” o malondialdeído (MDA) para a corrente sanguínea, como uma forma de proteção adaptativa. Talvez o fígado possa ter essa capacidade, o que poderia contribuir para os níveis de TBARS nos animais tratados de forma crônica com etanol fosse semelhante ao do grupo controle. Porém, teríamos que dosar TBARS no plasma para verificar essa hipótese. Os tratamentos com o extrato de *B. trimera* e vitamina C não alteraram os níveis de proteína carbonilada e TBARS, nos fazendo inferir que esses compostos não foram eficazes na proteção contra os danos oxidativos crônicos.

Nossos resultados do experimento crônico, assim como no agudo, demonstraram um aumento na atividade de MMP-2 nos animais tratados com etanol. Isso porque o acetaldeído pode promover a remodelação da ECM por regulação positiva da metaloproteinase (MMP) -2 (CENI et al., 2014), além do H₂O₂ que também poder ativar MMP-2 (HOPPS et al., 2015). Os tratamentos com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e com a vitamina C promoveram diminuição na atividade dessa gelatinase. Já foi demonstrado que os ácidos cafeoilquínicos têm atividade inibidora de MMP-2 (BENEDEK et al., 2007). A caracterização do extrato hidroetanólico de *B. trimera* demonstrou a presença de ácidos cafeoilquínicos, o que poderia explicar a diminuição de MMP-2.

Como podemos observar, o perfil encontrado no experimento agudo e no crônico foi bem diferente. As principais alterações agudas foram em relação à GPx e aos marcadores de dano oxidativo, sendo que os tratamentos com os extratos de *B. trimera* e com a vitamina C promoveram melhora nesses parâmetros. Já no experimento crônico as principais alterações foram em relação às dosagens séricas, onde observamos que o etanol promoveu maior dano hepático e renal. Os tratamentos com o extrato de *B. trimera* e vitamina C promoveram melhora nesses parâmetros. Tanto no experimento agudo quanto no crônico observamos aumento de MMP-2, de microvesículas hepáticas e hiperlipidemia nos animais intoxicados com etanol. Os tratamentos com o extrato de

B. trimera e vitamina C promoveram diminuição das microvesículas tanto no experimento agudo quanto no crônico, no entanto o extrato de *Baccharis* diminuiu a atividade de MMP-2 apenas no experimento crônico.

Durante os estágios iniciais de lesão hepática a hiperlipidemia alcoólica envolve maior liberação de lipoproteínas séricas, como uma forma de evitar o acúmulo de lipídeos no fígado. No entanto, a retenção de lipoproteínas pode resultar se o aumento da produção não for acompanhado por secreção eficiente (BARAONA e LIEBER, 1979). Por outro lado, a baixa taxa de NAD^+/NADH inibe a oxidação de ácidos graxos, os quais se acumulam no fígado e/ou no sangue (KIRPICHI et al., 2016; LÍVERO e ACCO, 2016). Isso pode explicar o fato da hiperlipidemia nos animais do grupo etanol agudo ter sido observada pelo aumento de colesterol, enquanto no crônico ter sido pelo aumento de TAG.

Sabe-se que a ureia sanguínea elevada está correlacionada com um aumento do catabolismo proteico em mamíferos e/ou a conversão de amônia em ureia como resultado de uma síntese aumentada da enzima arginase envolvida na produção de ureia (YANARDAG, R. e OZSOY-SACAN, 2007). Verificamos que no nosso experimento agudo não houve aumento de ureia, no entanto houve diminuição de proteínas totais. Podemos inferir que na exposição aguda a diminuição de proteínas está mais relacionada com a deficiência na secreção dessas proteínas pelo fígado, do que pelo catabolismo. O perfil no experimento crônico foi diferente, pois observamos aumento de ureia e diminuição de proteínas totais. Talvez na exposição crônica a diminuição das proteínas esteja relacionada com sua maior degradação. No entanto a diminuição da secreção hepática como um possível mecanismo não está excluída, pelo contrário, pode estar corroborando para esse resultado.

É importante salientar que a atividade de enzimas antioxidantes na intoxicação induzida pelo etanol pode variar dependendo do tempo de exposição e do tecido analisado (HAORAH et al., 2011). De fato percebemos no nosso trabalho que a exposição aguda ao etanol foi capaz de alterar a GPx, que está envolvida não só com o sistema antioxidante, mas também com a proteção aos danos oxidativos (KURUTAS, 2016). Muito provavelmente isso fez com que os danos oxidativos fossem mais acentuados nesses animais do que nos animais do experimento crônico, que tiveram alteração apenas na CAT.

Também observamos as diferenças dos animais tratados no experimento agudo e crônico com os extratos de *B. trimera*. No experimento agudo os extratos de *B. trimera* foram mais efetivos na proteção contra os danos oxidativos e também no restabelecimento da GPx, conferindo proteção antioxidante. Já no experimento crônico o extrato de *B. trimera* estava mais envolvido com o restabelecimento dos marcadores séricos, além da diminuição de MMP-2. Esses resultados nos mostram o quão complexo são os efeitos promovidos tanto pelo etanol quanto pelos extratos de *B. trimera*, permitindo a inferência da multifatorialidade envolvida, como dose, tempo e compostos utilizados.

7. CONCLUSÕES

Analisando os resultados (resumidos na figura 28) podemos perceber que o tratamento com os extratos de *Baccharis trimera* teve um potencial antioxidante mais proeminente nos ensaios *in vitro* do que *in vivo*. Ainda podemos observar que os extratos de *B. trimera* possuem um mecanismo de proteção dependente do tempo, da intensidade e do tipo de dano promovido pelo etanol. Tudo isso em conjunto com os experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa nos faz acreditar que os extratos de *Baccharis trimera* atuam principalmente através da inibição das espécies reativas de oxigênio e pela inibição das fontes de formação de ERO (como NADPH oxidase e iNOS) do que pela modulação das enzimas antioxidantes.

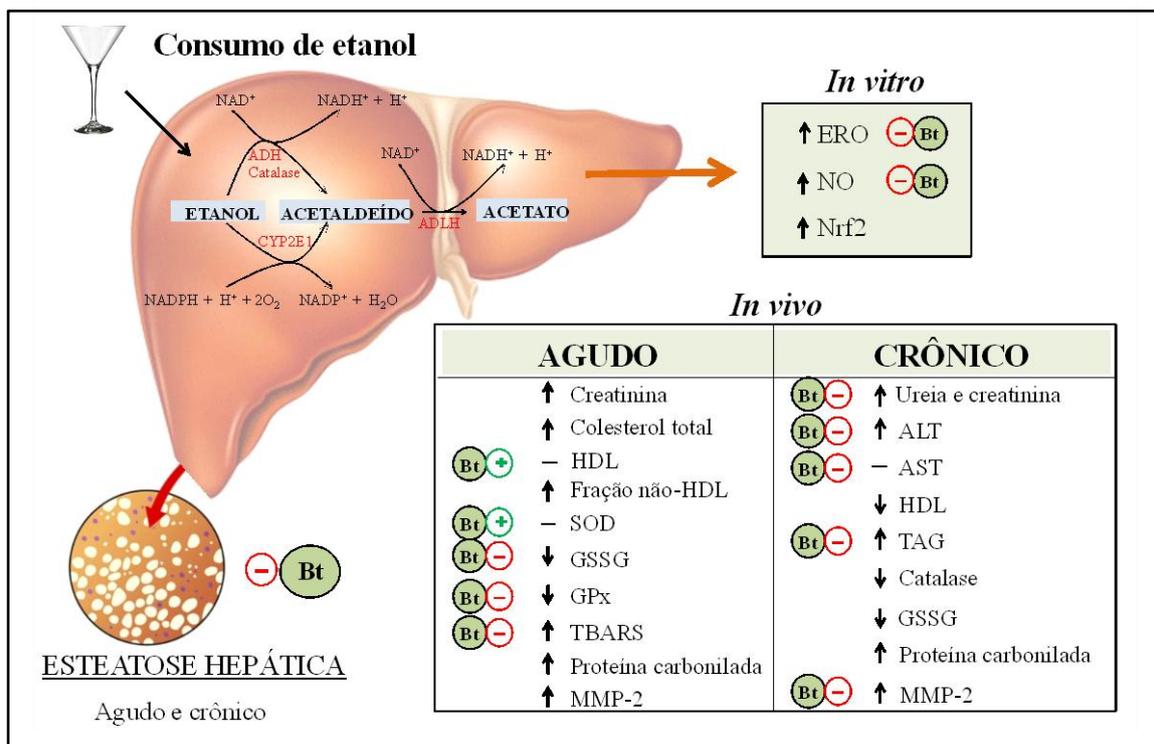


Figura 26: Resumo dos resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. O etanol *in vitro* promoveu aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO) e do fator de transcrição Nrf2. O tratamento com *Baccharis trimera* (Bt) promoveu diminuição de ERO e NO. No experimento *in vivo* AGUDO o etanol promoveu aumento de creatinina, colesterol total, fração não-HDL, TBARS, proteína carbonilada e MMP-2, além de diminuir a atividade de glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione oxidada (GSSG). *B. trimera* promoveu aumento de HDL, SOD, GPx, GSSG e diminuiu TBARS. No experimento crônico o etanol promoveu aumento de ureia, creatinina, ALT, triacilgliceróis (TAG), proteína carbonilada e MMP-2, também diminuiu HDL, catalase e GSSG. *B. trimera* foi capaz de diminuir ureia, creatinina, ALT, AST, TAG e MMP-2.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Fitoterápicos, 2004. 1 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 15/12/2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA “Farmacopeia Homeopática Brasileira, 5ª edição Brasília. 2010. 546 p.

AITKEN, R. J. e ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15-24, 2008.

ALMAGHRABI, O. A. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 227-31, 2015.

ALIKUNJU, S. et al. The inflammatory footprints of alcohol-induced oxidative damage in neurovascular components. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 25, p. 129–136, 2011.

ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais (online), 221 p. ISBN 978-85-232-1216-2, 2011.

ANSARI, R. A. et al. Role of Transcription Factors in Steatohepatitis and Hypertension after Ethanol: The Epicenter of Metabolism. **Biomolecules**, v. 6, n. 29, 2016.

ARREDONDO, F. et al. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 738-47, 2010.

ARRIGO, T. et al. Role of the diet as a link between oxidative stress and liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 2, p. 384-395, 2015.

ARULSELVAN, P. et al. Review Article Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 15 p., 2016.

BAE, M. J. et al. Evaluation of Effective MMP Inhibitors from Eight Different Brown Algae in Human Fibrosarcoma HT1080 Cells. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 20, n. 3, p. 153-161, 2015.

BARAONA, E. e LIEBER, C. S. Effects of ethanol on lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 20, p. 289-315, 1979.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Journal of Brazilian Society of Food Nutrire**, São Paulo, SP, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BENEDEK, B. et al. Achillea millefolium s.l. is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 312-7, 2007.

- BLOOMGARDEN Z. T. (2006). *Development in diabetes and insulin resistance*. *Diabetes Care* **29**: 161:167.
- BI, L. et al. The Role of Lipin-1 in the Pathogenesis of Alcoholic Fatty Liver. **Alcohol and Alcoholism**, v. 50, n. 2, p. 146–151, 2015.
- BIANCHI, M. L. P e ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BJØRKLUND, G. e CHIRUMBOLO, S. Role of oxidative stress and anti-oxidants in daily nutrition and human health. Which suggestion may come from current literature? *Nutrition*, v. 16, p. 30161-30167, 2016.
- BOLIGON, A. A. et al. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats, **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 5, p. 358–367, 2014.
- BONA, C. M. et al. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 223-226, 2005.
- BORDT, E. A. e POLSTER, B. M. NADPH Oxidase- and Mitochondria-derived Reactive Oxygen Species in Proinflammatory Microglial Activation: A Bipartisan Affair? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, 2014.
- BORELLA, J. C. et al. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.
- BOSRON, W. F., et al. Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. **Seminars in liver disease**, v. 13, p. 126 –135, 1993.
- BRASIL. DECRETO Nº 6.117, DE 22 DE MAIO DE 2007. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6117.htm. Acesso em: 18/11/2016.
- BRASIL. Departamento de Informática do SUS. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde: décima revisão. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/cid10.htm>. Acesso em: 17/11/2016.
- BRASIL. LEI Nº 11.705, DE 19 DE JUNHO DE 2008. 2008b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111705.htm. Acesso em: 18/11/2016.
- BRASIL. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 23 Dez. 2016.
- BROOKS, P. J. e THERUVATHU, J. A. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol**, v. 35, p. 187–193, 2005.
- BRUNT, E. M. et al., Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging histological lesions. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 94, p. 2467-2474, 1999.

BUARQUE, D. Prejuízo: o preço da droga e a ressaca social, Folha de São Paulo. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/treinamento/vicios/te1706200417.shtml>.> Acesso em: 17/11/2016.

BUEG, J. A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BYUN, H. G. e LEE, J. K. Chlorella Ethanol Extract Induced Phase II Enzyme Through NFE2L2 (Nuclear Factor [Erythroid-Derived] 2-Like 2, NRF2) Activation and Protected Ethanol-Induced Hepatotoxicity. **Jouranal of Medicinal Food**, v. 18, n. 2, p. 182–189, 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33 n. 2, p. 179-189, 2000.

CARNEIRO, H. S. Bebidas alcoólicas e outras drogas na época moderna. Economia e embriaguez do século XVI ao XVIII. USP, Historiador eletrônico, 2004. Disponível em: < http://www.neip.info/downloads/t_henrique_historia.pdf>. Acesso em: 17/11/2016.

CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. **Clinical Liver Disease**, v. 16, n. 4, p. 667–685, 2012.

CENI, E. et al. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. **World Journal Gastroenterology**, v. 20, n. 47, p. 17756-17772, 2014.

CERMAK, R.; FÖLMEER, U.; WOLFFRAM, S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, v. 275, p. 1166-1172, 1998.

CERQUEIRA, F. M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CETIN, M. et al. Ionic high-osmolar contrast medium causes oxidant stress in kidney tissue: partial protective role of ascorbic acid, *Renal Failure*, v. 30, p. 567–572, 2008.

CHA, B. S. et al. Chronic Alcohol Intake Differently Influences Glucose Metabolism According to Nutritional Status. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 10, p. 3646-3652, 2010.

CHEN, B. et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. **Journal of Endocrinology**, v. 225, n. 3, p. 83-99, 2015.

CHEN, J. et al. Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 38, n. 5, p. 337-345, 2014.

CHEN, X. et al. Antioxidante Effects os Vitamins C and E are Associated with altered activation os vascular NADPH Oxidase and Superoxide Dismutase in Stroke-Prone SHR. **Hypertension**, v. 38, p. 606-611, 2001.

CHUNG, S. et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 79–90, 2010.

- COHEN, P. et al. Stearoyl-CoA Desaturase-1 and the Metabolic Syndrome. *Current Drug Targets- Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, v. 3, p. 271-280, 2003.
- CONTRERAS-ZENTELLA, M. L. e HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R., 2016. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3529149>.
- COSTA, L. G. et al. Review Article Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 10 p., 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2986796>
- CZAJA, M. J. Functions of Autophagy in Hepatic and Pancreatic Physiology and Disease. *Gastroenterology*, v. 140, n. 7, p. 1895-1908, 2011.
- ÇETIN, M. Ionic High-Osmolar Contrast Medium Causes Oxidant Stress in Kidney Tissue: Partial Protective Role of Ascorbic Acid. *Renal Failure*, v. 30, p. 567–572, 2008.
- DALBETH, N. et al. Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clinical Therapeutics*, v. 36, n. 10, 2014.
- DAS, S. K. e MUKHERJEE, S. Long-term ethanol consumption leads to lung tissue oxidative stress and injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 3, p. 414–420, 2010.
- DAY, B. K. Antioxidant therapeutics: Pandora's box. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 66, p. 58–64, 2014.
- de ARAÚJO, G. R. et al. *Baccharis trimera* inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47phox phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. *Experimental Biology and Medicine*, v. 0, p. 1–11, 2016.
- de OLIVEIRA, R. N. et al. Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Exerimental Parasitology*, v. 132, n. 2, p. 135-43, 2012.
- DIAS, L. F. T. et al. Atividade antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.
- DONOHUE, T. M e THOMES, P. G. Ethanol-induced oxidant stress modulates hepatic autophagy and proteasome activity. *Redox Biology*, n. 3, p. 29–39, 2014.
- ELMASTAS, M. et al. Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 3, n. 3, p. 258-266, 2006.
- EL-NAGA, R. N. Apocynin protects against ethanol-induced gastric ulcer in rats by attenuating the upregulation of NADPH oxidases 1 and 4. *Chemico-Biological Interactions*, v. 242, p. 317-326, 2015.
- ERAS, B.; SLOWING, K.; TOLEDO, C.; IGLESIAS, I.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in tradicional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 61, p. 161-166, 1998.

- FERNANDES, J. A. Sobre civilizados e bárbaros: o álcool e as trocas culturais na antiguidade européia. **Revista Cantareira**, Niterói, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2005.
- FERNÁNDEZ-BLANCO, C. et al. Role of quercetin on Caco-2 cells against cytotoxic effects of alternariol and alternariol monomethyl ether. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 60-66, 2016.
- FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FILHO, V. Cechinel. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**; v. 21, n. 1, 1998.
- FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. Cadernos de Pesquisa, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), v. 18, n. especial, 2011.
- FOGLIO, M. A., et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar, **Multiciência**, 2006.
- GALLASSI, A. D., et al. Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool, **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 1; p. 25-30, 2008.
- GEORGE, S. et al. Rapid determination of Polyphenols and Vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370 – 1373, 2005.
- GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.
- GILMAN, A. G. et al. Goodman Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 edição Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996, p. 1436.
- GOBBO-NETO, L. e LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GONZÁLEZ, F. H. D. e SILVA, S. C. Introdução à bioquímica Clínica Veterinária, 2003. 3ª Edição.
- 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.
- HALLIWEL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 531–542, 2009.
- HAN, J. Y. et al. Korean Red Ginseng attenuates ethanol-induced steatosis and oxidative stress via AMPK/Sirt1 activation. **Journal of Ginseng Research**, v. 39, p. 105-115, 2015.

- HAN, K. H. et al. Relationships among alcoholic liver disease, antioxidants, and antioxidant enzymes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 7, n. 22, p. 37-49, 2016.
- HANACHI, P. e NAGHAVI, F. S. Evaluation of Antioxidant Activity of *R. Slooffiae*, *R. Mucilaginosa* Extracts. **Electronic Physician**, v. 8, n. 10, p. 3110-3115, 2016.
- HAORAH, J. et al. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. **Free Radical Biology Medicine**, v. 45, n. 11, p. 1542–1550, 2008.
- HAORAH, J. et al. Stabilization of superoxide dismutase by acetylLcarnitine in human brain endothelium during alcohol exposure: Novel protective approach. **Free Radical Biology Medicine**, v. 51, n. 8, p. 1601–1609, 2011.
- HAUCK, A. K. e BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and lipotoxicity. **Journal of Lipid Research** Volume 57, p. 1976 -1986, 2016.
- HERNÁNDEZ, J. A., et al. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 15 pages, 2015.
- HIPÓLITO, U. V. et al. Vitamin C prevents the endothelial dysfunction induced by acute ethanol intake. **Life Sciences**, v. 141, p. 99–107, 2015.
- HOPPS, E. et al. Analysis of the correlations between oxidative stress, gelatinases and their tissue inhibitors in the human subjects with obstructive sleep apnea syndrome. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 803-810, 2015.
- HUBER, P. C. e ALMEIDA, W. P. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 9 p., 2016.
- JHO, E. H. et al. Gymnaster koraiensis and its major components, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid and gymnasterkoreayne B, reduce oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide or acetaminophen in HepG2 cells. **BMB Reporters**, v. 46, n. 10, p. 513-518, 2013.
- JIMENEZ, R. et al. Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Food and Function**, v. 6, n. 2, p. 409-14, 2015.
- JORDÃO, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutaciona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.
- JUNIOR, V. F. V. e PINTO, A. C. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.
- KATAKWAR, P. Oxidative stress marker in oral cancer: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, 2016.

- KESSLER, M. et al. Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 131-142, 2003.
- KIM, C. S. et al. Quercetin reduces obesity-induced hepatosteatosis by enhancing mitochondrial oxidative metabolism via heme oxygenase-1. **Nutrition & Metabolism**, p. 12-33, 2015.
- KIM, J. e KEUM, Y-S. NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 7 p., 2016.
- KIRPICHI, I. A. et al. Alcoholic Liver Disease: Update on the Role of Dietary Fat. **Biomolecules**, v. 6, n. 1, 2016.
- KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1312, p. 186-196, 1996.
- KREBS, H. A. The effects of ethanol on the metabolic activities of the liver. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 6, p. 467-480, 1968.
- KUMAR, K. J. S. et al. H Hepatoprotective effect of lucidone against alcohol-induced oxidative stress in human hepatic HepG2 cells through the up-regulation of HO-1/Nrf-2 antioxidant genes. **Toxicology In Vitro**, v. 26, p. 700-708, 2012.
- KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, p. 71-93, 2016.
- LASEK, A. W. Effects of Ethanol on Brain Extracellular Matrix: Implications for Alcohol Use Disorder. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 40, p. 2030-2042, 2016.
- LEVINE et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-357, 1994.
- LEVITT, M. D. et al. "Use of measurements of ethanol absorption from stomach and intestine to assess human ethanol metabolism," **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 273, n. 4, p. G951-G957, 1997.
- LI, M. et al. Salvianolic acid B protects against acute ethanol-induced liver injury through SIRT1-mediated deacetylation of p53 in rats. **Toxicology Letters**, v. 228, p. 67-74, 2014.
- LI, X. Protective Effects of Quercetin on Mitochondrial Biogenesis in Experimental Traumatic Brain Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. **Plos One**, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0164237.
- LIEBER, C. S. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v. 7, n. 3, 1993.
- LIN, C. J. e BARSOSA, A. S. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 46, n. 4, 2002.

- LÍVERO, F. A. R. et al. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, p. 985–998, 2016-a.
- LÍVERO, F. A. R. et al. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* ameliorates alcoholic fatty liver disease in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 22–32, 2016-b.
- LORE SCHRUTKA, M. D. Impaired High-Density Lipoprotein Anti-Oxidative Function Is Associated With Outcome in Patients With Chronic Heart Failure. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 12, pii: e004169. doi: 10.1161/JAHA.116.004169.
- LOUVET, A. e MATHURIN, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature Reviews*, **Gastroenterology & Hepatology**, 2015.
- LU, Y. e CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 and Oxidative Liver Injury by Alcohol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 5, p. 723–738, 2008.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MACSWEEN, R. N. e BURT, A. D. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 6:221–32. Orman ES, Odena G, Bataller R. (2013) Alcoholic, 1986.
- MARKLUND, S. e MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.
- MARKLUND, S. L., HOLME, E., HELLNER, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. **Clinica Chimica Acta**, v. 126, p. 41-51, 1982.
- MARTINS, C. R., et al. Solubilidade das substâncias orgânicas, **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.
- MEDEIROS, A. C. L. V. O consumo de bebidas alcoólicas e o trabalho no povo indígena Xukuru do Ororubá. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências, 165 p., Recife, 2011.
- MILANESI, P. M. et al. Ação fungitóxica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *colletotrichum gloeosporioides*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia (FZVA)**, v.16, n.1, p. 01-13, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes para a Política de Atenção Integral aos usuários de álcool e outras drogas, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006.
- MIRA, M. L. e MANSO, C. F. Álcool e radicais livres de oxigenio. **Acta Médica Portuguesa**, v. 6, p. 193-198, 1993.

MIRABALLES, M. et al. Sensory characteristics of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: influence of deodorization by steam distillation. *Food Science and Technology International*, v. 19, n. 6, p. 485-92, 2013.

MOLINA, M. F. et al. Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Prevents and Protects against Ethanol-Induced Oxidative Stress in Mouse Liver. ***Biological and Pharmaceutical Bulletin***, v. 26, n. 10, p. 1398-1402, 2003.

MORALES-GONZÁLEZ, J. A. et al. What is Known Regarding the Participation of Factor Nrf-2 in Liver Regeneration? ***Cells***, v. 4, p. 169-177, 2015.

MORENO, L. C. G. et al. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 517, p. 50-57, 2017.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. ***Journal of Immunological Methods***, p. 55-63, 1983.

MUNIZ, J. J. et al. Chronic ethanol consumption induces erectile dysfunction: Role of oxidative stress. ***Life Science***, v. 141, p. 44-53, 2015.

NAKAGAWA, H. Effects of dietary catechin and Spirulina on vitamin C metabolism in red sea bream. ***Fisheries Science***, v. 66, p. 321-326, 200.

NAUDI, A. et al. Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress. ***Experimental Diabetes Research***, v. 1, n. 14, 2011.

NASSIR, F. e IBDAH, J. A. Role of mitochondria in alcoholic liver disease. ***World Journal of Gastroenterology***, v. 20, n. 9, p. 2136-2142, 2014.

NI, H. M. et al. Critical Role of FoxO3a in Alcohol-Induced Autophagy and Hepatotoxicity. ***The American Journal of Pathology***, v. 183, n. 6, 2013.

NIEMELÄ, O. Biomarker-Based Approaches for Assessing Alcohol Use Disorders. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, p. 166-185, 2016.

NOGUEIRA, N. P. A. et al. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 138, p. 513-522, 2011.

NOORI, S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. ***Open Access Scientific Reports***, v. 1, n. 8, 2012.

OLIVEIRA, D. W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. ***Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada***, v. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. ***Química Nova***, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, C. B. et al. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. ***Molecules***, v. 17, n. 1, p. 1113-1123, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health 2014, 379 p.

PÁDUA, B. C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 381-386, 2010.

PÁDUA, B. C. et al. *Baccharis trimera* improves the antioxidant defense system and inhibits iNOS and NADPH oxidase expression in a rat model of inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 975-84, 2013.

PÁDUA, B. C. et al. Protective Effect of *Baccharis trimera* Extract on Acute Hepatic Injury in a Model of Inflammation Induced by Acetaminophen. **Mediators of Inflammation**, 14 p., 2014.

PAIVA, F. A. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/740162>.

PANTH, N. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in Medicine**, 12 p., 2016.

PARK, H. Y. et al. Enzymatic modification enhances the protective activity of citrus flavonoids against alcohol-induced liver disease. **Food Chemistry**, v. 139, p. 231-240, 2013.

PAUL, E. L. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, v. 32, p. 419-425, 2009.

PIETTA G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63. p. 1035-1042, 2000.

PINTO, C. et al. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.), protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. **Toxicology Reports**, v.1, p. 726-733, 2014.

POURBAKSH, H. et al. Effect of *Nigella sativa* fixed oil on ethanol toxicity in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, p. 1020-1031, 2014.

POWERS, S. K. et al. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 31, n. 7, p. 987-997, 1999.

PRANCE, G. T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 64, p. 559-684, 1977.

RAMCHANDANI, V. A. e LI, W. F. B. Research advances in ethanol metabolism. **Pathologie Biologie**, v. 49, p. 676-82, 2001.

RIBEIRO, A. R. S., et al. The effects of baicalein on gastric mucosal ulcerations in mice: Protective pathways and anti-secretory mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 33-41, 2016.

- RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.
- RODGERS, J. T. et al. Metabolic Adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 Pathways. **FEBS Lett.** v. 582, n. 1, p. 46–53, 2008.
- RODRIGUES, F. P. M. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. **Jornal de Pediatria**, v. 74, n. 2, p. 91-8, 1998.
- RODRIGUES, C. R. F. et al. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 97–101, 2009.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.
- RUDERMAN, N. B et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 298, p. E751–E760, 2010.
- RUMP, T. J. et al. Acetyl-L-carnitine protects neuronal function from alcohol-induced oxidative damage in the brain. **Free Radical Biology Medicine**, v. 49, n. 10, p. 1494–1504, 2010.
- SAK, K. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 494-504, 2014.
- SARIC, S. e SIVAMANI, R. K. Polyphenols and Sunburn. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1521-1543, 2016.
- SCHENKEL E. P. et al. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v. 1. n. 2, p. 65-72, 1985.
- SCHLORFF, E. C. et al. Dose and Time Dependent Effects of Ethanol on Antioxidant System in Rat Testes. **Alcohol**, v. 18, p. 203–214, 1999.
- SCHWABE, R. F. S. e MAHER, J. J. Lipids in Liver Disease: Looking Beyond Steatosis. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 8–11, 2012.
- SETSHEDI, M. et al. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n.3, p. 178-185; 2010.
- SHAO, F. et al. Comparison of Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Aqueous and Ethanol Extracts of *Crataegus pinnatifida* Fruit in High-Fat Emulsion-Induced Hyperlipidemia Rats. **Pharmacognosy Magazine**, v.12, n. 45, p 64–69, 2015.
- SHIRPOOR, A. et al. Ginger extract protects rat's kidneys against oxidative damage after chronic ethanol administration. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 698–704, 2016.
- SILVA, D. C. S. e CERCHIARO, G. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.
- SMITH, C. et al. Bioquímica Médica Básica de Marks, 2ª Edição, p. 458-471, 2007.

- SODRÉ, F. L. et al. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.
- SONG, M. et al. Chronic Alcohol Consumption Causes Liver Injury in High-Fructose-Fed Male Mice Through Enhanced Hepatic Inflammatory Response. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, p. 1–11, 2016.
- SÖNMEZ, M. F. et al. Melatonin and Vitamin C Ameliorate Alcohol-Induced Oxidative Stress and e NOS Expression in Rat Kidney. **Renal Failure**, v. 34, n. 4, p. 480–486, 2012.
- SORRELL, M. F. e TUMA, D. J. Hypothesis: alcoholic liver injury and the covalent binding of acetaldehyde. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 9, p. 306–309, 1989.
- STEINER, J.L. et al. Impact of Alcohol on Glycemic Control and Insulin Action. **Biomolecules**, v. 5, p. 2223-2246, 2015.
- STHIJNS, M. M. et al. Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, pii: E1649, 2016.
- TANG, Y. et al. Quercetin attenuates ethanol-derived microsomal oxidative stress: Implication of haem oxygenase-1 induction. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1769–1774, 2012.
- TAO-SHANG, M. D. et al. Antioxidant Vitamin C attenuates experimental abdominal aortic aneurysm development in an elastase-induced rat model. **Journal of Surgical Research**, v. 188, p. 316-325, 2014.
- TUMA, D. J. et al. Dangerous Byproducts of Alcohol Breakdown—Focus on Adducts. **Alcohol Research & Health**, v. 27, n. 4, 2003.
- UDOH, U. S. et al. The Molecular Circadian Clock and Alcohol-Induced Liver Injury. **Biomolecules**, v. 5, p. 2504-2537, 2015.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, Campinas, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
- WIESER, V. et al. Reversal of murine alcoholic steatohepatitis by pepducin-based functional blockade of interleukin-8 receptors. **Hepatology**, v. 0, p. 1–9, 2016.
- YAMAMOTO, T. et al. Effect of ethanol on metabolism of purine bases (hypoxanthine, xanthine, and uric acid). **Clinica Chimica Acta**, v. 356, p. 35–57, 2005.
- YAN, S. L. et al. Protective effects of maslinic acid against alcohol-induced acute liver injury in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 149-155, 2014.

YANARDAG, R. e OZSOY-SACAN, O. Combined Effects of Vitamin C, Vitamin E, and Sodium Selenate Supplementation on Absolute Ethanol-Induced Injury in Various Organs of Rats. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p.513–523, 2007.

YILMAZ, A. et al. Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Fluoxetine-Induced Hepatotoxicity: An Experimental Study. **BioMed Research International** <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1247191>, 2016

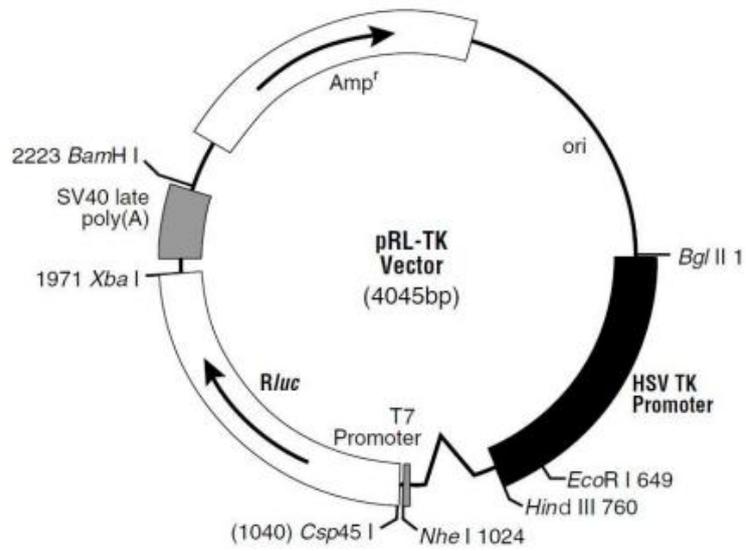
YIN, H. et al. Deletion of SIRT1 From Hepatocytes in Mice Disrupts Lipin-1 Signaling and Aggravates Alcoholic Fatty Liver. **Gastroenterology**, v. 146, p. 801–811, 2014.

YOU, M. et al. Sirtuin 1 signaling and alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 88-100, 2015.

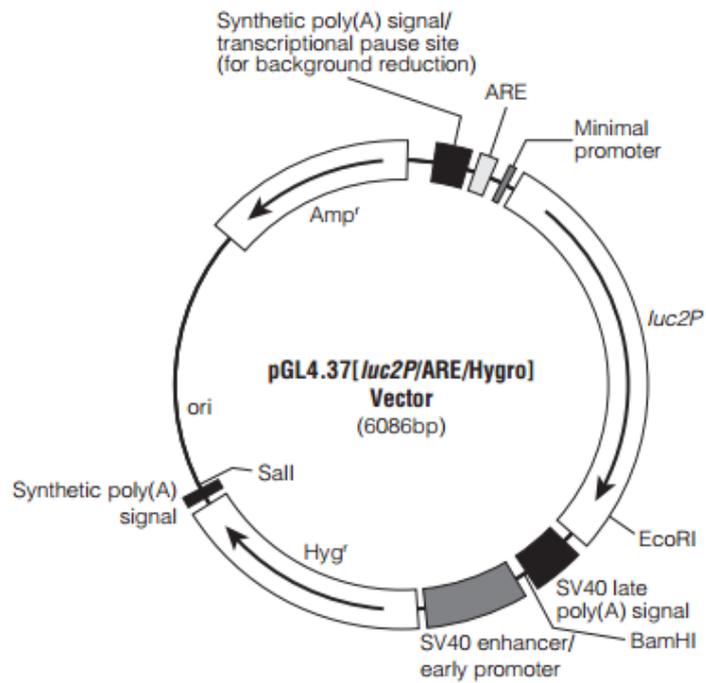
YOSHIKAWA, T. e NAITO, Y. What Is Oxidative Stress? **JMAJ**, v. 45, n. 7, p. 271–276, 2002.

ANEXOS

A- Mapa genético do vetor pRL-TK



B- Mapa genético do vetor pGL4.37 (Repórter da via Nrf2)



C- Caracterização dos extratos

Os extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera* foram previamente caracterizados e os resultados publicados em um estudo anterior do laboratório (de ARAUJO et al., 2016). No entanto, achamos plausível apresentá-los a fim de facilitar a visualização do leitor, já que durante a discussão dos resultados foram abordadas as diferenças dos compostos encontrados. Para a caracterização, os extratos foram submetidos a tratamento em cartuchos de extração em fase sólida (EFS C-18), onde foram eluídos com MeOH/H₂O (9:1). Para a análise em CLAE-DAD-EM foram injetados 20,0 µL da amostra (2 mg/mL), sendo utilizada como fase móvel água (A) e acetonitrila (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas com gradiente linear de 5 a 95% de B em 11 minutos. A faixa de massa analisada foi de 100 a 1500 *m/z* para o modo positivo e negativo.

No extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* foram identificados nove ácidos fenólicos e cinco flavonoides, como mostrado na tabela 3 e figura 27. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os resultados descritos na literatura. As buscas foram realizadas nas bases de dados disponíveis pela razão massa/carga (*m/z*) obtida nos espectros.

Tabela 3: Compostos identificados no extrato hidroetanólico de *B. trimera*

Pico	Compostos	RT (min)	UV (nm)	LC-MS [M - H] ⁻ (m/z) (Fragmentação m/m)
1	Ácido Cumaroilquinico	1.39	315	337.51 (191.3; 173.1; 163.3; 118.9)
2	Ácido Cumaroilquinico	1.41	316	337.82 (191.2; 173.2; 136.8; 118.9)
3	5- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.95	322	367.37 (192.9; 173.4; 149.3; 133.9; 117.1)
4	3- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.03	323	367.42 (193.1; 173.1; 136.8; 133.9)
5	Ácido Cumaroilquinico	2.04	314	337.56 (191.1; 173.2; 163.1; 118.9)
6	5- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.43	321	367.52 (191.3; 176.5; 155.4; 133.5; 127.2)
7	6(8)- <i>C</i> -furanosil-8(6)- <i>C</i> -hexosil-flavona	2.60	274; 331	563.37 (545.0; 503.0; 472.9; 453.9; 383.2; 359.9; 323.3; 295.9)
8	6(8)- <i>C</i> -hexosil-8(6)- <i>C</i> -furanosil-flavona	2.74	273; 326	563.31 (473.1; 442.7; 383.2; 353.1; 325.0; 282.0)
9	3,4-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.81	324	515.26 (353.2; 191.1; 178.9; 172.8; 161.1; 154.8; 136.0)
10	3,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.93	323	515.0 (323.2; 190.7; 178.6; 172.8; 161.1; 154.7; 135.0)
11	4,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	3.20	325	515.07 (352.9; 191.1; 178.8; 173.1; 135.1)
12	Quercetina	3.82	255; 369	301.23 (283.0; 255.3; 227.3; 191.4; 183.3; 181.1; 174.2; 150.7; 143.0; 120.8)
13	3',5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona	5.32	282; 329	313.09 (298.0; 282.7; 270.6; 254.7; 183.0; 129.1; 99.2)
14	3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona	5.50	275; 340	343.31 (328.1; 313.2; 297.9; 285.0; 269.8; 255.0)

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]⁻(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, razão massa/carga.

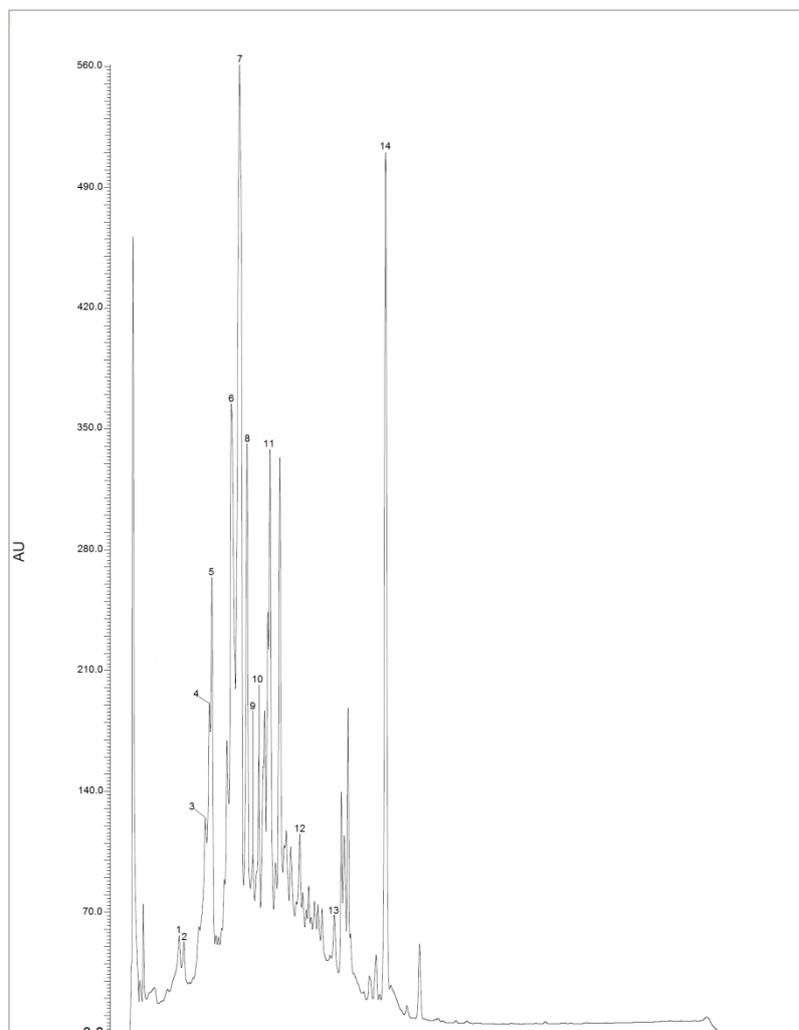


Figura 27: Perfil do extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1,7 mm, 50 x 3 mm) id. A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 3.50kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Usou-se nitrogênio como gás de bainha com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. Análise de massa foi realizada no modo de varrimento total 100-1,500 amu, tanto no modo positivo e negativo.

No extrato aquoso foram identificados doze ácidos fenólicos e três flavonoides, por CLAE-EM (Tabela 4 – Figura 28).

Tabela 4: Compostos identificados no extrato aquoso de *B. trimera*

Pico	Compostos	RT (min)	UV (nm)	LC-MS [M - H] ⁻ (m/z) (Fragmentação m/m)
1	3- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.73	321.1	367.29 (193.0; 155.2; 148.9; 134.0)
2	4- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	1.74	320.1	353.38 (191.0; 178.9; 135.1)
3	5- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	1.75	323.1	353.38 (191.2; 179.1; 135.1)
4	3- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	1.86	323.1	353.38 (190.8; 179.0; 137.0)
5	4- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.88	323.1	367.36 (193.2; 172.8; 149.1; 134.0)
6	5- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.96	320.1	367.38 (192.7; 172.7; 149.2; 134.2)
7	Apigenina-6,8-di- <i>C</i> - glucopiranosidio	2.12	269.1; 321.0	593.42 (547.1; 503.0; 472.9; 431.1)
8	3- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.25	318.1	367.59 (193.1; 172.8; 149.1; 133.8)
9	5- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.47	323.1	367.17 (191.2; 172.8; 149.1; 134.1)
10	6(8)- <i>C</i> -furanosil-8(6)- <i>C</i> - hexosil-flavona	2.36	271.1; 331.1	563.48 (515.1; 473.1; 443.0; 383.1)
11	6(8)- <i>C</i> -hexosyl-8(6)- <i>C</i> - furanosil-flavona	2.50	271.3; 333.2	563.20 (515.1; 472.9; 442.9; 383.2)
12	3,4-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.81	282.1; 320.5	515.20 (190.0; 162.9; 134.7)
13	3,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.93	283.1; 321.2	515.17 (191.0; 163.0; 135.0)
14	4,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.95	286.1; 320.3	515.40 (190.7; 163.0; 143.2; 127.0)
15	4- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	3.46	322.1	367.22 (190.6; 163.0; 148.0)

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]⁻(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, razão massa/carga.

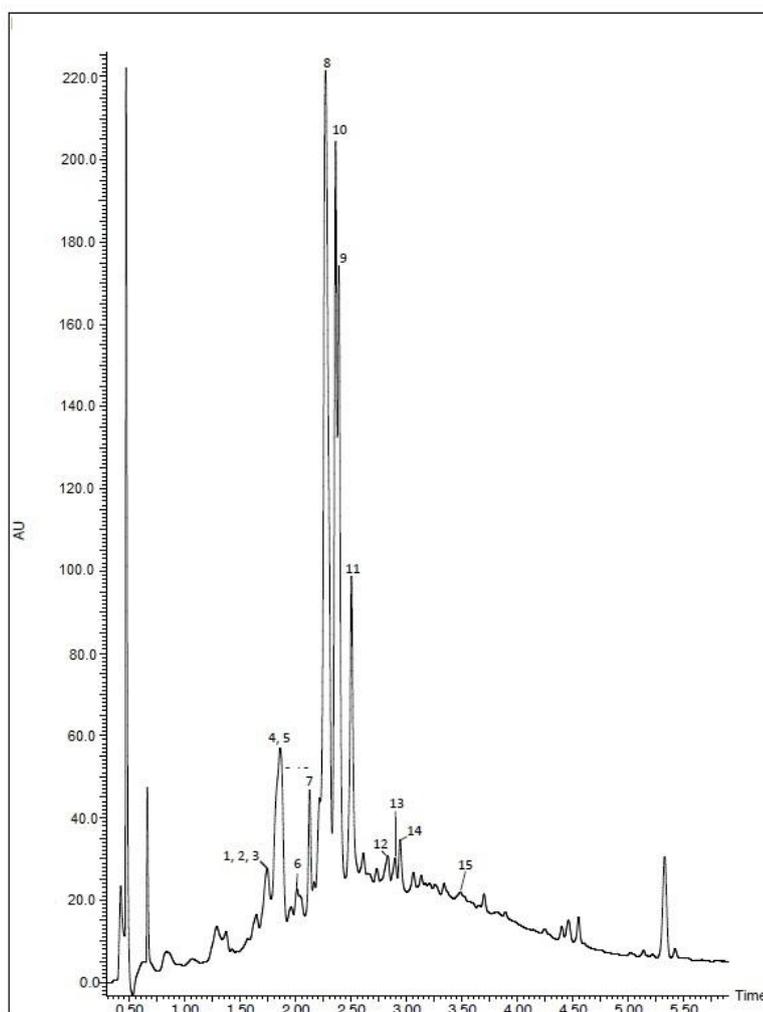


Figura 28: Perfil do extrato aquoso de *B. trimera*. Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1,7 mm, 50 x 3 mm) id. A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 3.50kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Usou-se nitrogênio como gás de bainha com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. Análise de massa foi realizada no modo de varrimento total 100-1,500 amu, tanto no modo positivo e negativo.

D- Compostos fenólicos

Também foi realizado em estudo prévio do laboratório a quantificação dos compostos fenólicos. A quantificação foi realizada segundo o método proposto por George et al. (2005). Em suma, 2,5 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* foram adicionados a 500 µL de amostra, ácido gálico (nas concentrações para a curva padrão) e água (branco). Após 2 minutos, 2mL de carbonato de sódio (7,5%) foram adicionados. Em seguida, as amostras foram incubadas a 50°C em banho maria por 15 minutos e

posteriormente alocadas em um banho de gelo. A absorbância foi quantificada a 760nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/grama da amostra em base seca.

Na figura 29 observamos que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* possui quantidades significativamente maiores de compostos fenólicos em relação ao extrato aquoso, sugerindo diferença entre os compostos que são extraídos durante a obtenção dos extratos.

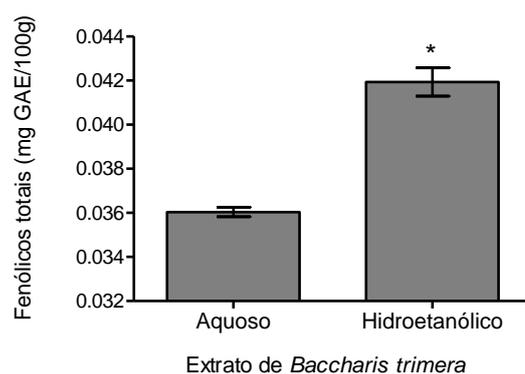


Figura 27: Avaliação de compostos fenólicos totais. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão, $p < 0.0010$ comparando os dois grupos entre si. O total de compostos fenólicos é expresso como equivalente de ácido gálico (mg) por 100 g dos extratos de *B. trimera*. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão, foram analisados por teste T.

E- Submissão do artigo científico



Due to iThenticate maintenance work, plagiarism check reports may become available with a slight delay on Saturday January 7, 2017 between 15:00 and 23:00 GMT. 

[My Reviewer Tasks](#)

[My Author Tasks](#)

[Start New Submission](#)

[Click here to view your submissions with a final decision](#)

My Submissions with Journal (1)

[BACCHARIS TRIMERA PROTECTS AGAINST ETHANOL INDUCED
HEPATOTOXICITY IN VITRO AND IN VIVO](#)

Current status: With Editor (04/Jan/2017)

JEP_2017_21

Editor-in-Chief: Alvaro Viljoen

Article Type: Research Paper

Initial submission : 03/Jan/2017