

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Iuri de França Bonilha

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Baccharis trimera* (Less)
DC. (Asteraceae) SOBRE O DANO HEPÁTICO INDUZIDO POR
TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS**

Santa Maria, RS
2017

Iuri de França Bonilha

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Baccharis trimera* (Less) DC.
(Asteraceae) SOBRE O DANO HEPÁTICO INDUZIDO POR TETRACLORETO DE
CARBONO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bonilha, Iuri de França

Avaliação do efeito protetor da *Baccharis trimera* (Less) DC. Asteraceae sobre o dano hepático induzido por tetracloreto de carbono em ratos / Iuri de França Bonilha.- 2017.

64 p.; 30 cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Fígado 2. *Baccharis trimera* 3. Hepatoprotetor 4. Tetracloreto de Carbono 5. Dano Hepático I. Manfron, Melânia Palermo II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Iuri de França Bonilha. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: iurifbonilha@gmail.com

Iuri de França Bonilha

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Baccharis trimera* (Less) DC.
(Asteraceae) SOBRE O DANO HEPÁTICO INDUZIDO POR TETRACLORETO DE
CARBONO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 28 de agosto de 2017:

Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)

Ricardo Bizogne Souto, Dr. (URI)

Santa Maria, RS
2017

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae) SOBRE O DANO HEPÁTICO INDUZIDO POR TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS

AUTOR: Iuri de França Bonilha
ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato bruto hidroetanólico 70% de carqueja (*Baccharis trimera*) (EBt) sobre o dano hepático induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos Wistar. O fígado é o principal órgão de metabolismo e excreção do corpo humano, e está continuamente exposto aos xenobióticos por causa da sua função anatômica estratégica. As doenças hepáticas representam um significativo problema de saúde devido às suas complicações e possibilidades de tratamento limitadas. As pesquisas de fitoterápicos para o tratamento de desordens hepáticas geralmente utilizam modelos animais de indução de hepatotoxicidade, sendo que o dano hepático promovido pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) é um dos mais aceitos e difundidos. Diversas espécies de *Baccharis* são amplamente utilizadas na medicina popular principalmente na forma de infusões, para tratar diversos distúrbios, como problemas hepáticos e gastrintestinais. O EBt apresentou altos teores de polifenóis (0,152 g EAG/100 g PS), flavonoides (19,07 g EC/100 g PS) e taninos (20,165 g EC/100 g PS) e uma alta capacidade antioxidante, principalmente por substratos lipofílicos (59,23% de inibição da peroxidação do ácido linoleico). O extrato promoveu uma leve síntese de colágeno no fígado, em comparação com o grupo controle, sendo que o CCl₄ não promoveu uma fibrose significativa. Na avaliação do estresse oxidativo no tecido hepático, o extrato protegeu o fígado da lipoperoxidação (300 mg/kg) e carbonilação de proteínas (300 e 600 mg/kg) ($p < 0.05$). O extrato também demonstrou efeito hepatoprotetor através da redução a atividade da enzima alanina aminotransferase no soro e não alteração das proteínas séricas. Para o estudo de um possível efeito antifibrótico, é necessária uma melhor adaptação do modelo animal experimental, pois neste estudo não foi possível detectar o efeito fibrótico do CCl₄ e um possível efeito antifibrótico do EBt.

Palavras-chave: Fígado. *Baccharis trimera*. Hepatoprotetor. Tetracloreto de carbono. Dano hepático.

ABSTRACT

EVALUATION OF *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae) PROTECTIVE EFFECT ON LIVER DAMAGE INDUCED BY CARBON TETRACHLORIDE IN RATS

AUTHOR: Iuri de França Bonilha
ADVISOR: Melânia Palermo Manfron

The objective of this study was to evaluate the effect of *Baccharis trimera* hydroethanolic crude extract (BtHE), popularly known as carqueja, on CCl₄ induced hepatic injury in Wistar rats. The liver is the main organ of metabolism and excretion of the human body, and is continually exposed to xenobiotics because of its strategic anatomical function. Liver diseases represent a significant health problem due to their limited complications and treatment possibilities. The phytotherapeutic researches for the treatment of hepatic disorders generally use animal models for the induction of hepatotoxicity, and the hepatic damage promoted by the administration of carbon tetrachloride (CCl₄) is one of the most accepted and widespread models. Several species of *Baccharis* are widely used in folk medicine, mainly in the form of infusions, to treat various disorders, such as liver and gastrointestinal problems. The BtHE presented high levels of polyphenols (0.152 g GAE/100 g DW), flavonoids (19.07 g CE/100 g DW) and tannins (20.165 g CE/100 g DW) and a high antioxidant capacity, mainly for lipophilic substrates (59.23% inhibition of linoleic acid peroxidation). The extract promoted a slight synthesis of collagen in the liver, in agreement with the control group, and CCl₄ did not promote significant fibrosis. In the evaluation of oxidative stress in hepatic tissue, the extract protected the liver from lipoperoxidation (300 mg/kg) and carbonylation of proteins (300 and 600 mg/kg) ($p < 0.05$). The extract also demonstrated a hepatoprotective effect by reducing the activity of the enzyme alanine aminotransferase in serum and no alteration of serum proteins. For the study of a possible antifibrotic effect, a better adaptation of the experimental animal model is necessary, because in this study it was not possible to detect the fibrotic effect of CCl₄ and a possible antifibrotic effect of BtHE.

Keywords: Liver. *Baccharis trimera*. Hepatoprotective. Carbon tetrachloride. Liver damage.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CCl₄ – Tetracloreto de carbono
- CEHs – Células estreladas hepáticas
- RL – Radicais livres
- SOD – Superóxido dismutase
- CAT – Catalase
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- ALT – Alanina aminotransferase
- AST – Aspartato aminotransferase
- LDH – Lactato desidrogenase
- ALP – Fosfatase alcalina
- GLDH – Glutamato desidrogenase
- GGT – Gama glutamil transferase
- APAP - Acetaminofeno
- EBt – Extrato hidroetanólico 70% de *Baccharis trimera*
- BtHE – *Baccharis trimera* hydroethanolic extract
- TBARS - Thiobarbituric acid-reactive species
- PS – Peso seco
- EAG – Equivalentes de ácido gálico
- EC – Equivalentes de catequina
- GAE – Gallic acid equivalent
- CE – Catechin equivalent
- DW – Dry weight

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	08
1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 POLÍTICA NACIONAL DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL.....	11
2.2 <i>Baccharis trimera</i>	12
2.3 ASPECTOS GERAIS DA ANATOMIA E FISIOLOGIA DO FÍGADO.....	16
2.4 DISTÚRBIOS HEPÁTICOS.....	18
2.5 TETRACLORETO DE CARBONO COMO AGENTE ESTRESSOR HEPÁTICO.....	20
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
2.6.1 Estresse oxidativo no organismo.....	22
2.6.2 Estresse oxidativo e hepatotoxicidade.....	23
3 MANUSCRITO	25
4 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM	62
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	64

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação de mestrado estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações contidas nos itens **INTRODUÇÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do manuscrito estão mencionadas no próprio.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae e compreende mais de 500 espécies distribuídas exclusivamente no continente americano, sendo que a maior concentração destas encontra-se no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). No Brasil estão descritas 120 espécies, sendo que, no Rio Grande do Sul, há relatos de setenta espécies distribuídas desde a região serrana até o litoral (BARROSO; BUENO, 2002; GIULIANO, 2001).

Diversas espécies de *Baccharis*, como *B. trimera*, *B. articulata*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, são amplamente utilizadas na medicina popular principalmente na forma de infusões, para tratar diversos distúrbios, como problemas hepáticos e gastrintestinais, malária, diabetes, úlceras, amidalite, angina, anemia, diarréia, inflamação das vias urinárias, alergias, gases, doenças venéreas, desordens renais, lepra e distúrbios circulatórios (CAMPOS et al., 2016).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos buscando comprovar as ações farmacológicas de extratos de *Baccharis*, como a atividade anti-reumática (SIMÕES et al., 1998), anti-viral (ZANON et al., 1999), anti-HIV (SANCHEZ-PALOMINO et al., 2002), espasmolítica (WEIMANN et al., 2002), antidiabética (JANUÁRIO et al., 2004), antioxidante (DE OLIVEIRA et al., 2004), anti-inflamatória (LEITE et al., 2007), gastroprotetora, antidiarréica (RUIZ et al., 2008) e antimicrobiana (SCHIMIDT et al., 2008).

Quanto à atividade hepatoprotetora, há na literatura apenas dois estudos com a espécie *Baccharis trimera* (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987; PÁDUA et al., 2014) e um estudo com a *Baccharis dracunculifolia* (REZENDE et al., 2014). No entanto, não há na literatura estudos com o gênero *Baccharis* utilizando o CCl₄ como modelo de indução de hepatotoxicidade.

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, superado apenas pela pele, sendo o principal órgão de metabolismo e excreção, e continuamente exposto aos xenobióticos por causa da sua função de manter a homeostase metabólica. Este órgão regula várias funções metabólicas importantes (GHAFFARI; GHASSAM; PRAKASH, 2012), como metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, atua na secreção da bile e sais minerais, e na eliminação de metabólitos dos fármacos e toxinas, entre outras funções (SILVERTHORN, 2010).

Localizado como um filtro entre o sistema digestivo e o resto do organismo, o fígado recebe diariamente um fluxo de nutrientes e de substâncias potencialmente tóxicas, que chegam ao órgão pela circulação sanguínea. Além do sangue arterial, rico em oxigênio, que chega ao fígado pela artéria hepática, o fígado recebe a maior parte do seu sangue por uma segunda via: a veia porta. Através da veia porta, o sangue proveniente do intestino, baço e pâncreas chega ao fígado e, depois de passar pelos sinusóides hepáticos, escoam para as veias hepáticas e volta à circulação sistêmica pela veia cava (MUKAZAYIRE et al., 2011).

As doenças hepáticas representam um grande problema de saúde devido às suas complicações e possibilidades de tratamento limitadas (MUKAZAYIRE et al., 2011). Além disso, os fármacos convencionais utilizados no seu tratamento são por vezes inadequados e podem ter efeitos adversos. Assim, há uma tendência mundial para a pesquisa das plantas medicinais tradicionais, sendo que muitos produtos naturais de origem vegetal estão em uso para a prevenção e o tratamento de doenças do fígado (DONG et al., 2013; YANG et al., 2013; ZHAO et al., 2015). As pesquisas de fitoterápicos para o tratamento de desordens hepáticas geralmente utilizam modelos animais de indução de hepatotoxicidade, sendo que o dano hepático promovido pela administração de tetracloreto de carbono (CCl_4) é um dos mais aceitos e difundidos (KARKAMPOUNA et al., 2016).

Devido na literatura possuir apenas dois estudos sobre o efeito hepatoprotetor com a espécie *B. trimera*, sendo que nenhum deles utilizou o CCl_4 como indutor de hepatotoxicidade, faz-se necessário estudos com esta espécie, considerando o tradicional uso das espécies do gênero *Baccharis* em enfermidades hepáticas.

Além disso, o presente estudo torna-se relevante, visto que a espécie *Baccharis trimera* está incluída na Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (2006) e na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS) (2009), que garante à população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato bruto hidroetanólico 70% de *Baccharis trimera* sobre o dano hepático induzido por tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos Wistar, através da análise histológica do fígado dos animais para detectar a presença de colágeno (fibrose hepática); análise bioquímica das enzimas hepáticas no sangue e análise do efeito protetor da *B. trimera* frente ao dano oxidativo causado pelo CCl_4 .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLÍTICA NACIONAL DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL

No Brasil, a fitoterapia foi institucionalizada nacionalmente no Sistema de Saúde Pública (SUS) com a publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) em 2006, documento norteador do desenvolvimento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Desde sua implementação, novas diretrizes para inserção e regulamentação da utilização de fitoterápicos no SUS vem sendo desenvolvidas. As políticas instituídas são importantes para possibilitar o acesso de toda a população brasileira às práticas fitoterápicas e a padronização da mesma. Ainda assim, algumas espécies vegetais não possuem estudos clínicos para comprovação de segurança e eficácia. Neste contexto, a Resolução nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro/notificação de produto tradicional fitoterápico, reforça o tripé segurança, eficácia e qualidade dos fitoterápicos, no qual a PNPIC se sustenta.

A reconhecida variabilidade da vegetação brasileira disponibiliza, gratuitamente, plantas com potencial terapêutico em várias enfermidades. Esse fato, atrelado à herança cultural, principalmente indígena, de uso de ervas para curar doenças, e ao problema econômico, em que parcela considerável da população não tem fácil acesso a profissionais de saúde, acarreta o uso de plantas visando tratar, curar, ou mesmo impedir o desenvolvimento de várias doenças (SOUSA et al., 2008). A população leiga, não raro, acredita ser a capacidade curativa das plantas isenta de malefícios, como toxicidade e interação com outros fármacos ou plantas (NICOLETTI et al., 2007, SOUSA et al., 2008), usando-as, assim, muitas vezes, descontroladamente, com o intuito de curar seus males, colocando a saúde em risco, sem o saber.

Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde disponibilizou uma lista com 71 plantas medicinais contemplando, então, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), visando ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos para o uso no Sistema Único de Saúde (SUS). Dentre estas plantas medicinais, está incluída a *Baccharis trimera*, planta objeto deste

estudo e amplamente utilizada na medicina popular em enfermidades gástricas e hepáticas.

A criação dessa lista é uma iniciativa importante, pois direciona a pesquisa clínica e o ensino para este conjunto de plantas. A utilização de plantas medicinais é uma prática importante na área da saúde. A disponibilização de plantas medicinais e de fitoterápicos pelo SUS tem alavancado a utilização da fitoterapia de base científica extraída do conjunto de plantas utilizadas por gerações sucessivas de uma população que tinha como única opção para o tratamento de seus males, o uso empírico das plantas medicinais de fácil acesso em cada região do país (LORENZI; MATOS, 2002).

2.2 *Baccharis trimera*

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae e compreende mais de 500 espécies distribuídas exclusivamente no continente americano, sendo que a maior concentração destas encontra-se no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). No Brasil estão descritas 120 espécies, conhecidas popularmente como carquejas, sendo que, no Rio Grande do Sul, há relatos de 70 espécies distribuídas desde a região serrana até o litoral (ABAD; BERMEJO, 2006; BARROSO, BUENO, 2002; GIULIANO, 2001). Dentre estas espécies, encontra-se a *Baccharis trimera* (Figura 3), objeto deste estudo.

As espécies do gênero *Baccharis* apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. São utilizadas na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças, consumidas principalmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças da próstata, sendo também descritas como remédio para o processo de desintoxicação do organismo (VERDI; BRIGHENT; PIZZOLATTI, 2005).

Entre os compostos de maior ocorrência nas espécies do gênero *Baccharis* destacam-se os flavonoides, diterpenos e triperpenos (DE OLIVEIRA et al., 2006; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Nos estudos de atividades biológicas são destacados os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos, antiinflamatórios e antioxidantes, sendo que algumas atividades relatadas para as espécies de *Baccharis* estão relacionadas com a presença dos flavonoides, que apresentam-se

normalmente como agliconas livres e muito raramente na forma glicosilada, o que é uma característica da família Asteraceae (BORGIO et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2004; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Figura 1 – *Baccharis trimera*



Fonte: Autor

Muitas pesquisas já foram realizadas a fim de investigar a composição química da *B. trimera*. Os principais compostos identificados nos extratos de diferentes polaridades incluem: derivados do ácido quínico como, ácido 5-O-[E]-cafeoilquínico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-dicafeoilquínico e ácido tricafeoilquínico, além de lactonas diterpenos, sesquiterpenos, saponinas, taninos, polifenóis e flavonoides. Os flavonoides relatados até agora foram apigenina, 7,4'-di-O metilapigenina, cirsimarina, eupatorina, genkwanina,

hispidulina, isoquercetina, luteolina, nepetina, quercetina, 3-O-metilquercetina, 5,6-dihidroxi-7,3',4' trimetoxiflavona e rutina (SIMÕES-PIRES et al., 2005).

A infusão das partes aéreas de *B. trimera* é vastamente usada na medicina popular no tratamento de doenças gastrintestinais, disfunções hepáticas, processos inflamatórios e diabetes. O uso popular de *B. trimera* consiste em beber 50-200 mL/dia de uma infusão aquosa (4-5 g) da erva seca (VERDI; BRIGHENT; PIZZOLATTI, 2005).

A atividade hepatoprotetora da carqueja foi confirmada recentemente por Pádua e colaboradores (2014), através das análises histopatológicas do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em um modelo de rato cujo dano hepático foi induzido pelo acetaminofeno (APAP).

Além das propriedades citadas acima, o potencial antioxidante de diferentes extratos de *B. trimera* foram avaliados *in vitro* e *in vivo*.

Os extratos aquosos, alcoólicos, hidroalcoólico e fenólicos de *B. trimera* foram ativos contra o radical DPPH· (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) (OLIVEIRA et al., 2012; DIAS et al., 2009; CZYEWski et al., 2008; SIMÕES-PIRES et al., 2005). O extrato aquoso também mostrou atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio da xantina oxidase (RODRIGUES et al., 2009). Extratos aquoso e etanólico de *B. trimera* inibiram a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil e peroxinitrito em microsomas de fígado de rato e lipossomas de soja. Os extratos foram também considerados potentes eliminadores de radicais hidroxilas, formados a partir das reações de Haber-Weiss e de Fenton (VIEIRA et al., 2011). Pádua e colaboradores (2014) observaram efeitos antioxidantes *in vitro*. O tratamento de neutrófilos de ratos Fisher com extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na concentração de 5 µg/mL inibiu a liberação de EROs em 85% e manteve a viabilidade celular de 93%.

Em relação aos efeitos antioxidantes *in vivo*, os autores observaram o efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na modulação de EROs em neutrófilos de ratos tratados com acetaminofeno (APAP). Animais pré-tratados com *B. trimera* ou quercetina e depois expostos ao APAP tiveram uma redução significativa na produção de EROs quando comparados com neutrófilos de ratos que receberam somente o APAP. Nos animais tratados somente com *B. trimera* não se observou redução na produção de EROs. Entretanto, animais tratados somente com quercetina mostraram uma redução sinificativa na produção de EROs (PÁDUA et al., 2014). Pádua e colaboradores (2014) observaram que *B. trimera* foi capaz de reduzir

o estresse oxidativo causado por dano hepático induzido pelo APAP em ratos. O pré-tratamento com o extrato diminuiu a atividade da enzima SOD e aumentou a atividade da CAT e a concentração de glutathiona total

2.3 ASPECTOS GERAIS DA ANATOMIA E FISIOLOGIA DO FÍGADO

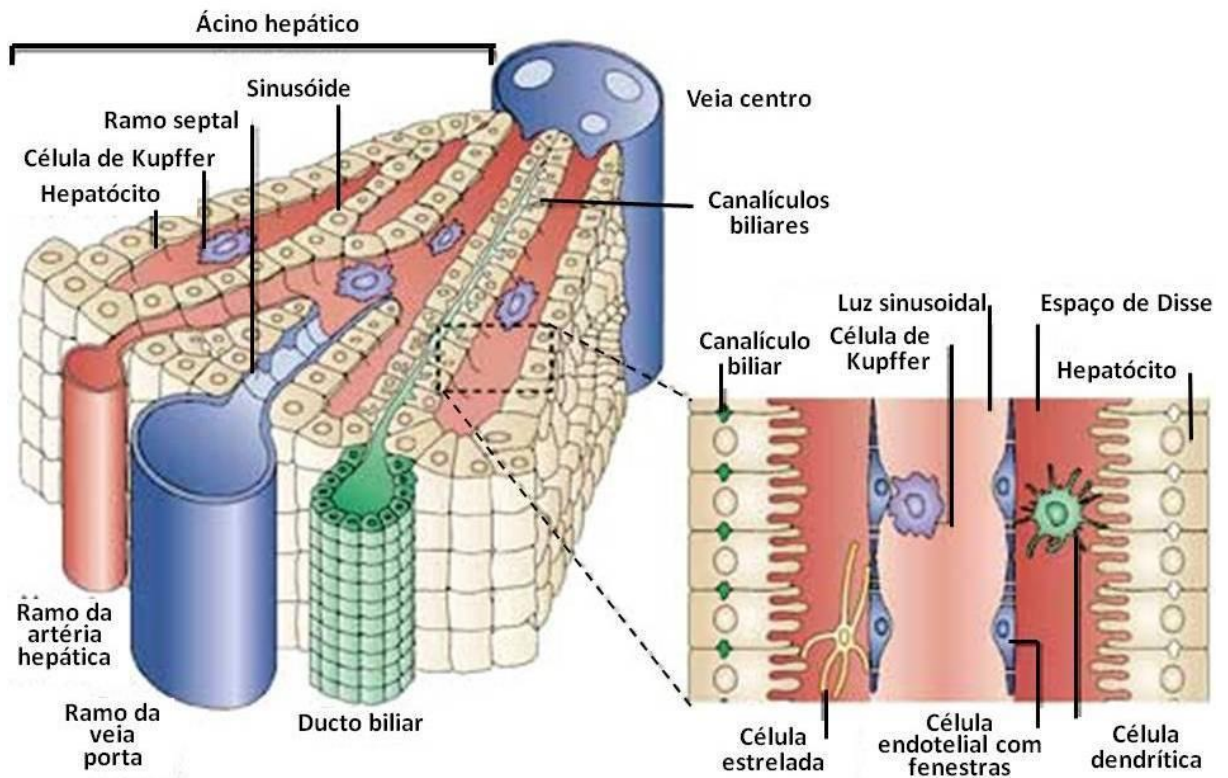
O fígado é o maior órgão visceral em todos os vertebrados, está localizado na parte mais alta da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma. Tem formato de prisma, com ângulos arredondados, dando-lhe aparência ovalizada. Sua coloração é vermelho-escuro, tendendo ao marrom arroxeadado. É formado por três superfícies: superior ou diafragmática, inferior ou visceral e posterior (ALDABA-MURATO et al., 2012). Um tecido fibroso divide o órgão em unidades funcionais, chamadas lóbulos, os quais são compostos por hepatócitos (MAHER, 1997). Microscopicamente, cada lóbulo é nutrido pelo sangue que entra pelas veias periféricas. Essas veias incluem pequenas ramificações das artérias hepáticas e ramificações da veia portal, que trazem nutrientes e outras substâncias do intestino. O sangue entra em canais chamados sinusóides, onde se encontram todas as células do lóbulo. Cerca de 70% da área de superfície de cada hepatócito está voltada para os sinusóides, maximizando a troca entre o sangue e as células. Os capilares sinusóides desembocam em uma veia localizada no centro do lóbulo chamada veia centrolobular a qual é o ramo inicial da veia hepática. A veia centrolobular encontra-se no centro do lóbulo, sua parede é muito delgada, sendo constituída praticamente apenas por endotélio apoiado em fibras reticulares (ALDABA-MURATO et al., 2012).

O fígado é um órgão de imensa complexidade, essencial para a sobrevivência do homem. Nenhum outro órgão pode compensar a sua multiplicidade de funções. Vários tipos de células fenotipicamente distintas compõem o fígado (Figura 1). A célula hepática predominante é o hepatócito, uma célula epitelial responsável por regular o metabolismo intermediário, desintoxicar endo e xenobióticos, sintetizar proteínas e lipídeos, além de produzir e excretar a bile. O outro tipo de célula do fígado é o colangiócito, célula epitelial dos dutos biliares que modula o fluxo biliar (SIRICA et al., 2008).

Os hepatócitos encontram-se rodeados de capilares sinusóides e de vasos linfáticos. Isto faz com que o sangue flua livremente para as células e que os produtos celulares secretados no espaço perisinusoidal de Disse possam ser liberados de volta no sangue ou nos vasos linfáticos. As células de Kupffer são macrófagos fixos nas membranas dos sinusóides e podem ser encontradas em todo

o fígado. À medida que o sangue vai atravessando o fígado, os eritrócitos envelhecidos ou danificados são fagocitados pelas células de Kupffer. Os hepatócitos metabolizam hormônios e drogas e removem o “lixo”, detoxificando o sangue. Os hepatócitos produzem também a bile e eletrólitos que drenam nos canálculos biliares, os quais levam ao ducto biliar (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

Figura 2 - Estrutura tridimensional do lóbulo hepático, formado por células hepáticas (hepatócitos) agrupadas em torno de uma veia central.



Fonte: (ADAMS; EKSTEEN, 2006)

Os sinusóides são condutos de sangue, que não possuem parede estruturada e são revestidos por dois tipos celulares: a) células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e b) macrófagos que no fígado são denominados como células de Kupffer. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontra-se um espaço estreito, denominado espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas hepáticas (CEHs) (FRIEDMAN; ARTHUR, 2002; FRIEDMAN, 2003, 2008).

As células de Kupffer são macrófagos altamente móveis inseridos no revestimento do sinusóide, sobretudo na área periportal. Apresentam intensa atividade fagocitária como a fagocitose de hemácias em via de desintegração, e a consequente digestão de hemoglobina e produção de bilirrubina. Como todos os macrófagos, apresentam grande quantidade de lisossomos, que em seu interior contém enzimas necessárias para a digestão intracelular das substâncias fagocitadas, remoção por endocitose de bactérias vírus, parasitas e células tumorais (TOTH; THOMAS, 1992).

As células estreladas hepáticas (CEHs), também chamadas de células de Ito, estão localizadas no espaço de Disse. Possuem forma estrelada e são constituídas por longas extensões citoplasmáticas, onde podem regular o fluxo sanguíneo e a hipertensão portal. Essas células hepáticas possuem propriedades contráteis e fibrogênicas e representam o principal local de produção de matriz extracelular (MEC) (FRIEDMAN, 2008). Constituem uma população celular heterogênea que difere na capacidade de armazenamento de lipídeos, na expressão e organização de filamentos do citoesqueleto e no potencial para a produção de MEC. Este aspecto reflete a capacidade de apresentar dois fenótipos: quiescente e ativado. (FRIEDMAN; ARTHUR, 2002; FRIEDMAN, 2003, 2008).

Atualmente é bem conhecido o papel das CEHs como as principais células produtoras de colágeno em casos de lesão hepática crônica (entre outros tipos celulares como fibrócitos derivados da medula óssea e fibroblastos portais e septais), o que permite relacioná-las estritamente ao aparecimento da fibrose hepática (LI et al., 2008).

2.4 DISTÚRBIOS HEPÁTICOS

O fígado é um importante órgão alvo da toxicidade de fármacos e xenobióticos, os quais são absorvidos diretamente pelo intestino e transportados através do sangue portal para o fígado na forma concentrada. Nos últimos anos, o risco de intoxicação hepática tem aumentado pela alta exposição a toxinas ambientais, pesticidas e uso frequente de quimioterápicos (MIHAILOVIC et al., 2013).

Os danos ao fígado ocorrem principalmente devido ao consumo excessivo de álcool, infecções virais, e como consequência de efeitos adversos de medicamentos. As hepatites de etiologia viral são uns dos maiores problemas de saúde pública. A infecção pelo vírus da hepatite B é endêmica em muitas partes do mundo, estimando-se que existam, aproximadamente, 300 milhões de portadores crônicos deste vírus, cerca de 5% da população mundial. No mundo o número de infectados pelo vírus da hepatite C é de 185 milhões de indivíduos e no Brasil a prevalência estimada é de 2,3 milhões de infectados (HANAFIAH et al., 2013).

A lesão hepática envolve processos de peroxidação lipídica, de alteração da permeabilidade das membranas celulares, modificação das atividades das enzimas ligadas às membranas e às proteínas de transporte, além de estar envolvida com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial (JAESCHKE et al., 2002). Geralmente a doença hepática inicia-se com a hepatite e evolui para esteatose, fibrose, cirrose até o carcinoma hepatocelular (VITAGLIONE et al., 2004).

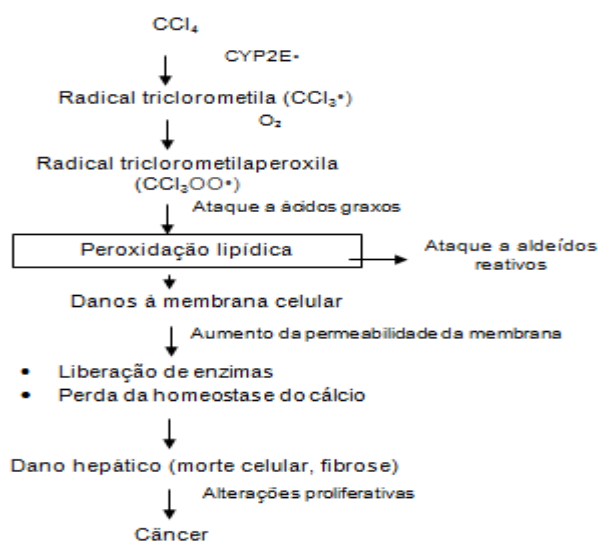
Para o estudo das patologias hepáticas e respectivas terapias são utilizados alguns modelos animais de indução de hepatotoxicidade. Os protocolos experimentais mais conhecidos empregam tetracloreto de carbono (SINGH et al., 2008; FENG et al., 2011), paracetamol (KUMAR et al., 2010; XU-YING et al., 2009), tiocetamida (GALISTEO et al., 2000; AHMAD et al., 2002) ou galactosamina (KOIZUMI et al., 2002; NAN et al., 2004; XING et al., 2011). Dentre estes, o tetracloreto de carbono (CCl_4) destaca-se por ser usado tanto para a indução de dano agudo, bem como de fibrose, esteatose, cirrose e carcinogênese, dependendo da rota de exposição escolhida (WEBER et al., 2003; LIMA et al., 2007). A administração aguda de CCl_4 causa necrose e esteatose centrolobular. Na administração crônica, a repetida exposição promove a degeneração dos hepatócitos, ativando os mecanismos que culminam em fibrose e, posteriormente, em cirrose e carcinogênese (RECKNAGEL et al., 1989; JIMENEZ et al., 1992). Além disso, os danos causados pelo CCl_4 são considerados análogos às lesões hepáticas causada por uma variedade de hepatotoxinas em seres humanos (ZHU; FUNG, 2000) e o mesmo também induz alterações histológicas muito semelhantes às observadas em uma hepatite viral (WEBER et al., 2003), assim seu uso como indutor de hepatite também está bem estabelecido (JANAKAT; AL-MERIE, 2002).

2.5 TETRACLORETO DE CARBONO COMO AGENTE ESTRESSOR HEPÁTICO

O CCl_4 constitui um agente estressor hepático muito utilizado para investigação de hepatotoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo, tanto para estudos *in vivo* quanto *in vitro* (KANTER et al., 2005; HUANG et al., 2011; LIU et al., 2011; PINTO et al., 2012; CHENG et al., 2013). Testes *in vivo* para investigar o potencial hepatoprotetor, utilizando o CCl_4 como agente estressor, são amplamente utilizados, com ênfase na presença de componentes com possível atividade antioxidante.

Este composto é estudado como substância hepatotóxica desde a década de 1930. Seu metabolismo se inicia no fígado onde a enzima citocromo P-450, subunidade 2E1 (CYP2E1), o transforma no radical livre triclorometila ($\text{CCl}_3\bullet$). Na presença do oxigênio, este radical é convertido no radical triclorometila peroxila ($\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$), que se liga a lipídeos da membrana celular dos hepatócitos, provocando peroxidação e lise celular. O rompimento da membrana leva a liberação de enzimas hepáticas e íons cálcio (Ca^{2+}) no meio extracelular. Alterações proliferativas no órgão resultam em esteatose hepática, necrose celular, fibrose e cirrose, podendo levar ao câncer (Figura 2) (WEBER; BOLL; STAMPLL, 2003; MANIBUSAN; ODIN; EASTMOND, 2007; PORUBSKY; MENEELY; SCOTT, 2008). A quantidade de CCl_4 metabolizado em determinado órgão está relacionada com a expressão de CYP2E1 no tecido. No fígado, os metabólitos do CCl_4 acumulam-se em uma concentração maior na região centrilobular, que possui altos níveis de expressão desta enzima (BERGMAN, 1983).

Figura 3 – Mecanismo de toxicidade do CCl_4 no organismo.



Fonte: (MANIBUSAN et al., 2010).

O CCl_4 é absorvido rapidamente por qualquer rota de administração, seja oral, subcutânea ou intraperitoneal, atingindo seu pico de concentração em uma a seis horas, dependendo da concentração e da dose administrada (MANIBUSAN et al., 2010). O dano hepático agudo por CCl_4 se caracteriza histologicamente por marcada necrose de região centrilobular, esteatose microvesicular e forte presença de infiltrado inflamatório no tecido hepático (RAHMAN; HODGSON, 2000). Estudos demonstram que esta substância pode induzir morte celular não somente por necrose, mas também por apoptose (SHI et al., 1998).

O radical triclorometilperoxila ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$) pode causar auto-oxidação dos ácidos graxos poliênicos presentes dentro dos fosfolípidos de membrana, onde a decomposição oxidativa do lípido é iniciada, e peróxidos orgânicos são formados após reagirem com o oxigênio, processo este denominado peroxidação lipídica. Essa reação é auto catalítica, pois novos radicais são formados a partir dos próprios radicais peróxido. Assim, a degradação rápida da estrutura e da função do retículo endoplasmático decorre da decomposição do lípido. A principal consequência da toxicidade da peroxidação lipídica está relacionada ao rompimento da membrana celular, resultando na perda da sua integridade (KUMAR et al., 2010; MANIBUSAN; ODIN; EASTMOND, 2007).

Estudos mostraram que após tratamento com CCl_4 observaram-se mudanças extensivas na morfologia do fígado, incluindo esteatose, inflamação, balonização dos hepatócitos, dilatação dos sinusóides e da veia centrolobular do fígado e necrose, além de infiltração celular (ROY et al., 2011; KEPEKÇI et al., 2013).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

2.6.1 Estresse oxidativo no organismo

Todas as moléculas apresentam os elétrons como componentes periféricos, sendo estas características determinantes para o comportamento molecular. A estabilidade de uma molécula depende do emparelhamento de seus elétrons, portanto, qualquer situação na qual espécies sejam geradas com par eletrônico desemparelhado poderá resultar em moléculas altamente reativas, denominadas radicais livres (RL) (GALICIA-MORENO; GUTIERREZ-REYES, 2014). Essas espécies são formadas em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Contudo, os RL possuem um papel importante em condições fisiológicas normais, e somente seus altos níveis causam danos à célula. As mitocôndrias são as maiores fontes intracelulares destas espécies, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Encontram-se envolvidos em diversas funções no organismo, como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como peroxidação dos lipídios, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos, DNA e RNA (CHO et al., 2011), levando ao estresse oxidativo no ambiente celular. Dentre os RL geradas na célula, podem ser citados o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e os radicais hidroxila (HO^{\bullet}), peroxila (RO_2^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}) (DUH; LIN; WU, 2011).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de RL e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático e não-enzimático. Citam-se as

principais enzimas do sistema de defesa enzimático: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. A associação entre o desenvolvimento de doenças tais como câncer, doenças pulmonares, doenças inflamatórias e hepatopatias, e o excesso da geração de RL no organismo, tem despertado crescente interesse no meio científico (ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010).

2.6.2 Estresse oxidativo e hepatotoxicidade

Um exemplo da influência do estresse oxidativo nos mecanismos fisiopatológicos de uma doença é observado nas doenças hepáticas decorrentes da exposição do fígado a substâncias tóxicas (VOICAN; PERLEMUTER; NAVEAU, 2011). Os RL são gerados no fígado quando xenobióticos são metabolizados pelas mitocôndrias e por enzimas do citocromo P-450, uma superfamília de enzimas presentes no retículo endoplasmático das células hepáticas. Este complexo enzimático realiza a mono-oxigenação de substâncias endógenas e exógenas e é diretamente responsável pela ativação dessas substâncias. Em menor escala, essas espécies são produzidas pelas células de Kupfer e pelos neutrófilos, em resposta à inflamação gerada no órgão após a exposição a substâncias tóxicas (MANIBUSAN; ODIN; EASTMOND, 2007).

Quando a ação tóxica de uma substância é suficiente para provocar alterações metabólicas no fígado, o estresse oxidativo se estabelece, comprometendo as funções celulares hepáticas. Nesse processo, as enzimas do ciclo redox da glutathione celular (GSH) são oxidadas e suas funções de proteção celular, manutenção do status redox celular normal e intermediação na função do citocromo P-450 e das mitocôndrias, são prejudicadas. A atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR também são reduzidas. Este processo contribui para a susceptibilidade dos alvos biológicos à ação dos RL e difusão do processo de estresse oxidativo por todo o órgão (MATÉS, 2000). Em decorrência da produção excessiva de EROs no fígado, ocorrerá o comprometimento funcional progressivo do parênquima hepático. Alterações patológicas como coagulopatias, icterícia,

encefalopatia hepática e aumento da pressão intracraniana sucederão devido a interrupção das funções coordenadas normalmente pelo fígado (JALAN, 2005). Estas alterações fisiológicas levam ao aumento da permeabilidade da membrana celular, promovendo a liberação de enzimas citosólicas na corrente sanguínea, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glutamato desidrogenase (GLDH), lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (ALP) e gama glutamiltransferase (GGT). A quantificação destes biomarcadores fornece subsídios para avaliar a extensão do acometimento hepático e assim estabelecer um diagnóstico adequado (AMACHER, 2002).

O estresse oxidativo está envolvido na hepatotoxicidade provocada pelo CCl_4 , na qual as espécies reativas de oxigênio têm importante papel. Hsu e colaboradores (2009) observaram, em modelo animal, que o CCl_4 induziu uma diminuição da atividade antioxidante de algumas enzimas, como a SOD, a CAT, GPx e a glutatona redutase (GR), além de um aumento nos níveis de malondealdeído (MDA), biomarcador de liperoxidação, e depleção dos níveis de glutatona (GSH) (SASHREEN et al., 2011).

O manejo das hepatopatias é um dos principais desafios da medicina e o desenvolvimento de terapias alternativas, com ênfase na investigação do potencial hepatoprotetor de produtos naturais, é de suma importância (ADESANOYE; FAROMBI, 2010; AFZAL et al., 2013; CHENG et al., 2013; CHO et al., 2011; SARADA et al., 2010). Nesse sentido, o uso de modelos animais é essencial para a evolução do conhecimento neste tema (TUNON et al., 2009; WANG et al., 2014).

3 MANUSCRITO**Protective effect of *Baccharis trimera* extract on liver damage induced by carbon tetrachloride in rats**

Iuri F. Bonilha^{a,*}, Camila H. F. Cuelho^a, Pedro H. Doleski^b, Paulo G. Schimites^b, Fernanda L. Cabral^b, Karen Luise dos S. Moreira^c, Yãnaí S. Bollick^d, Lara P. Da Cas^a, Maria Izabel U. M. da Rocha^c, Marcelo L. da Veiga^c, Daniela B. R. Leal^b, Rafael N. Moresco^d, Melânia P. Manfron^a

Protective effect of *Baccharis trimera* extract on liver damage induced by carbon tetrachloride in rats

Iuri F. Bonilha^{a,*}, Camila H. F. Cuelho^a, Pedro H. Doleski^b, Paulo G. Schimites^b, Fernanda L. Cabral^b, Karen Luise dos S. Moreira^c, Yãnaí S. Bollick^d, Lara P. Da Cas^a, Maria Izabel U. M. da Rocha^c, Marcelo L. da Veiga^c, Daniela B. R. Leal^b, Rafael N. Moresco^d, Melânia P. Manfron^a

^aPhytochemical Research Laboratory, Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bMicrobiology and Parasitology Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

^cExperimental and Comparative Morphology Laboratory, Morphology Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

^dClinical and Toxicological Analysis Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding author.**

Iuri de França Bonilha, Pharm.

Phytochemical Research Laboratory

Industrial Pharmacy Department

Federal University of Santa Maria

Avenida Roraima, 1000, Prédio 26, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel: +55 55 9-9994-5484

E-mail: iurifbonilha@gmail.com

Abstract:

Ethnopharmacological relevance: *Baccharis trimera* (Less.) (Asteraceae) is a native plant of Brazil. Also known as “carqueja”, it has been popularly used to treat liver diseases, diabetes, as well as digestive disorders. Other studies have described the hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activities of the species.

Aim of the study: Evaluate the potential of a *Baccharis trimera* hydroalcoholic extract (BtHE) to prevent the damage caused by carbon tetrachloride (CCl₄) exposure in rats.

Materials and methods: The dried aerial parts of *B. trimera* was extracted by maceration with EtOH:H₂O (70:30, v/v) at room temperature and lyophilized, obtained the BtHE. In this extract was performed the total phenolic, flavonoid and tannin content. Antioxidant activity was performed by DPPH and β-carotene assay. Rats were submitted of treatment with BtHE by 15 days and CCl₄-induced hepatotoxicity. In liver, was determined the collagen deposition by Picrosirius Red staining, catalase activity, lipid and protein peroxidation. The serum determinations was performed by analysis of ALT activity and albumin and total proteins.

Results: BtHE showed high content of polyphenols (15.117 g GAE/100 g DW), flavonoids (19.07 g CE/100 g DW) and tannins (20.165 g CE/100 g DW). The extract presented high antioxidant activity, mainly for the lipophilic substrates. In the liver, BtHE promoted small increase of collagen, but without developing significant fibrosis. However, BtHE showed significant hepatoprotective effect from CCl₄-induced damage. This extract increase the CAT activity in the high concentration (600 mg/kg), protect the liver from lipid peroxidation in the low concentration (300 mg/kg) and reduce the protein carbonylation in both concentrations. In the serum parameters, BtHE 300 mg/kg showed a significant decrease of the activity of ALT,

similar to rats induced with CCl₄ and treated with silymarin. However, no significant difference was observed in the TP and ALB values between groups of rats treated with CCl₄ and control groups. Although, the hepatoprotective effect of BtHE was comparable to silymarin, specifically in lower concentration (300 mg/kg), showing dose-dependent effect.

Conclusion: The results indicate that the BtHE has a potential hepatoprotective effect on the damage induced by carbon tetrachloride in rats. However, this effect was shown to be dose-dependent. Further studies are needed to evaluate a possible antifibrotic effect, since in the present study the experimental animal model was not sufficient to show consistent fibrosis in the histological analysis.

Keywords: *Baccharis trimera*; Hepatoprotective; Carbon tetrachloride; Liver damage.

1. Introduction

Plants have been investigated for their medicinal properties throughout the world, mainly due to their potent pharmacological activities, low toxicity and economic viability (Haripyaree *et al.*, 2013). In the last decade the hunt for naturally occurring antioxidants has grown tremendously since free radicals are known to quench various ailments that affect human health. Consumption of herbal antioxidants improves health (Tian *et al.*, 2011). This necessitates the search for natural plant products which could effectively intervene in the onset and morbidity of the disorders and diseases. It was well reported that expression of many disorders or ailments/diseases is associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) or free radicals.

The liver is the largest exocrine gland in our body. It is the vital organ undertaking wide range of functions, such as detoxification, Protein – Fat – Carbohydrate metabolism, storage of iron and vitamins. The liver also plays major role in decomposition of red blood cells (RBCs), hormone production, plasma protein synthesis, glycogen storage and synthesis of urea. The organ liver is inevitable for survival and one cannot live without it for long period. The liver acts as the chief site for intense metabolism and excretion (Wang, 2014). The liver is the key organ of metabolism and detoxification. Regular exposure to a variety of abusive measures adds on to hepatic injury.

During liver injury, the liver marker enzymes like Alanine amino transaminase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Bilirubin are present in blood serum in very high concentration and thus provide us indications on hepatic health. Liver diseases were among the first disorders to which serums test were applied and have proved to be useful in diagnostic purposes (Wang, 2014). Free radicals or Reactive oxygen species (ROS) are often produced as byproducts of biological reactions or as a result of intake of exogenous elements

which foster oxidative damage, leading to a wide range of biological malfunctions prompting DNA damage, carcinoma, cardiovascular, metabolic and neuro degenerative disorders, as well as acceleration of senescence (Palanisamy, 2011).

The lack of effective modern medications to treat acute and chronic liver injury (Subramoniam *et al.*, 1999) has led to research into the hepatoprotective activity of numerous medicinal plants using various experimental models. Carbon tetrachloride (CCl₄) is a potent, lipid-soluble hepatotoxic agent, which is widely used as a model for screening hepatoprotectors (Wang *et al.*, 2008). The administration of CCl₄ to rats is an accepted experimental model to produce damage to the liver (Janakat and Al-Merie, 2002). Liver injuries induced by CCl₄ are mediated through the formation of reactive intermediates such as trichloromethyl radical (CCl₃•) and its derivative trichloromethyl peroxy radical (CCl₃OO•) generated by cytochrome P-450 of liver microsomes. These free radicals are thought to react with membrane lipids leading to their peroxidation (Recknagel *et al.*, 1989).

A vast field of research on the development of pharmacological agents involves medicinal plant extracts that have been used for health-related purposes for more than 5,000 years (Stickel and Shouval, 2015). The popularity and use of natural products have grown exponentially over recent decades, including their use as curative and preventive medicine and as healthy tonics. However, scientific evidence of the beneficial effects of many medicinal plants is lacking (Stickel and Shouval, 2015). One natural product that is used in folk medicine is *Baccharis trimera* (Less.) DC (*B. trimera*), which is a plant with a wide distribution in South America (Paul *et al.*, 2009). In Brazil, it is popularly known as “carqueja.” Its aerial parts are used in the form of tea for the treatment of diabetes, inflammatory processes, and gastrointestinal and liver disease (Stickel and Shouval, 2015). Some biological effects of *B. trimera* compounds include relaxant effects on vascular smooth muscle, the blockade of voltage-dependent calcium channels, and hepatoprotective,

hypoglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory effects (Paul *et al.*, 2009; Biondo *et al.*, 2011; Soicke and Leng-Peschlow, 1987; Oliveira *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2000). However, no studies have been conducted to evaluate the effects of extracts of this plant on the hepatotoxicity model with CCl₄. We evaluated the hepatoprotective effect of a hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* (HEBt) on hepatotoxicity induced by CCl₄ in rats.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extraction procedure

Aerial parts of *B. trimera* were collected in Santa Maria, RS, Brazil (29°42'29.9''S 53°52'07.5''W) in December 2015. The plant identification was performed by Prof. Dr. Renato Zachia and voucher specimen (SMDB 16.047) was deposited in the Botany Department Herbarium of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. The dried aerial parts of *B. trimera* was extracted by maceration with EtOH:H₂O (70:30, v/v) at room temperature. After filtration, the extract was concentrated under reduced pressure by rotary evaporation (~45°C). The EtOH extract was lyophilized, getting the *Baccharis trimera* hydroalcoholic extract (BtHE), and used in the analysis.

2.3. Total Phenolic Content

The determination of total phenolic content (TPC) was according to the method of Chandra and Mejia (2004), using the Folin Ciocalteu reagent. Absorbance was measured at 730 nm,

in triplicate. The results were expressed as gallic acid equivalents (g) per 100 g of dry weight extract (GAE g/100 g DW).

2.4. Total Flavonoid Content

The total flavonoid content (TFC) was performed according to Zhishen *et al.* (1999). The extract was diluted in methanol and catechin was used as a standard. Absorbance was measured at 510 nm, in triplicate. The results were expressed as rutin equivalents (g) per 100 g of dry weight extract (RE g/100 g DW).

2.5. Total Tannins Content

Total tannins content (TTC) was evaluated according to Vanillin assay (Agostini-Costa *et al.*, 1999) with modifications. Standard used was catechin and absorbance was measured at 490 nm. Results were expressed as catechin equivalents (g) per 100 g of dry weight extract (CE g/100 g DW).

2.6. DPPH Assay

The antioxidant activity of YME was evaluated by monitoring their ability to quench the stable free radical DPPH. The first assay was performed by the method described by Choi *et al.* (2002) with brief modifications. YME and the ascorbic acid standard solutions were prepared at concentrations of 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 1.5625 and 3.125 mg / mL in ethanol. In test tubes were added 2.5 ml of each solution with 1 ml of 0.3 mM DPPH solution in ethanol, leaving to react at room temperature in the dark. After 30 minutes the reading was

taken at 518 nm. The control (blank) was used EXB without adding the DPPH. As negative control was used 1 ml of DPPH 2.5 ml of ethanol in a test tube. The test will be performed in triplicate and calculated the antioxidant activity (% inhibition of DPPH radical) as the following equation: % inhibition = $100 - [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100 / A_{\text{negative control}}]$. The antioxidant concentration required to reduce the initial concentration of DPPH by 50% (IC₅₀) was used for comparison of YME and ascorbic acid antioxidant activity.

2.7. β -Carotene Linoleate Assay

Antioxidant activity was measured using the methods of Mokbel and Hashinaga (2006) with slight modification. A 3.34 mg β -carotene solution in chloroform (1 mL), 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween-20 were mixed well. Chloroform was removed at 40°C under vacuum using a rotary evaporator. The resulting mixture was at once diluted with 5–10 ml of triple distilled water and was mixed well. The emulsion was further made up to 100 ml with 0.01 M H₂O₂. Aliquots (2 mL) of this emulsion were transferred into different test tubes containing 0.1 ml of test samples (50, 25 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in methanol. In this experiment, BHT was used for comparative purposes, in the same concentrations. A control containing 0.2 mL of methanol and 4 ml of the above emulsion was prepared. The tubes were placed at 50°C in a water bath. Absorbances of all the samples at 470 nm were taken at zero time and every 15 min until 120 min, observing the color of β -carotene disappeared in the control reaction. A blank mixture was prepared as above, but without β -carotene. The results were expressed as % inhibition, according to the equation: % inhibition = $[1 - (A_{S(0)} - A_{S(120)} / A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$, where $A_{S(0)}$ and $A_{S(120)}$ are the absorbance values at 0 and 120 minutes of the incubation for sample. $A_{C(0)}$ and $A_{C(120)}$ are the absorbance measured in the control at 0 and 120 minutes of the incubation.

2.8. Animal protocol

Animal experiments was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Adult male Wistar rats (280–320 g) from Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM) were used. The animals were housed in cages and kept on a 12 h light/dark cycle, at room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water for 1 month before and during the experiments. All experiments were conducted following National Institutes of Health guidelines for the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (registered under the number CEUA 8027060316).

The animals were randomly divided into eight groups of 4–10 rats each. Group I (CTRL, n=5) served as normal control and received orally vehicle (water) daily for a period of 15 days. Group V (CCl₄, n=10) served as CCl₄ control and also received orally vehicle daily for a period of 15 days. Group II (CTRL SIL, n=4), the hepatoprotective control, and Group VI (CCl₄ SIL, n=8) received orally silymarin (100 mg/kg) daily for a period of 15 days. Groups III (CTRL Bt 300, n=4) and VII (CCl₄ Bt 300, n=8) received, orally, the BtHE powder dissolved in water at dose of 300 mg/kg, daily for a period of 15 days. Groups IV (CTRL Bt 600, n=4) and VIII (CCl₄ Bt 600, n=9) received, orally, the BtHE powder dissolved in water at dose of 600 mg/kg, daily for a period of 15 days. On day 16, approximately 18 hours after euthanasia, animals of groups V, VI, VII and VIII were injected with a single intraperitoneally (i.p.) dose of carbon tetrachloride (1 ml/kg, 50% CCl₄ in corn oil) to induce hepatotoxicity. This methodology was carried out as previously described (Porchezian *et al.*, 2005) with slight modifications.

2.9. Collagen deposition

For the evaluation of collagen deposition in liver tissues it was used the method Picrosirius Red staining (Junqueira *et al.*, 1979). Samples of liver was fixed in a solution of 10% formaldehyde and submitted to histologic routine processes for embedded in paraffin. Next, 6mm thick histological section were cut and stained with picrosirius red stain. The slides were regularly assessed by three observers under the polarizing and light microscope to judge and the birefringence pattern of collagen fibers were studied. Thus, Type I collagen - thick fibers, strongly birefringent, yellowish or red fibers; Type III collagen - network of thin fibers, weakly birefringent, greenish fibers.

2.10 Oxidative stress analysis in liver

2.10.1 Liver preparation

Liver collected were homogenized (1:10 w v⁻¹) in a medium containing 120 mM potassium chloride and 30 mM buffer phosphate (pH 7.4), and the supernatant fraction obtained was frozen at 80°C for measurements.

2.10.2 Analysis of prooxidants in liver

The supernatants were used for estimation of the lipid peroxidation (LP), estimated by thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) production, performed by malondialdehyde reaction with 2-thiobarbituric acid, which was optically measured according to Buege and Aust (1978) at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA mg protein⁻¹. Protein

carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. (1995), with some modifications. The carbonyl content was then measured spectrophotometrically at 370 nm and was expressed as nmol carbonyl mg protein⁻¹. The protein concentration was determined by the Coomassie Blue method following Bradford's (1976) method using bovine serum albumin as a standard.

2.10.3 Enzymatic antioxidant activity

Catalase (CAT) Activity was measured using the method described by Nelson & Kiesow (1972). Change of H₂O₂ absorbance after 60 s was measured at 240 nm in ultraviolet spectrophotometry. Catalase activity was calculated and expressed in mol.min⁻¹ mg protein⁻¹).

2.11 Serum biochemical determinations

Commercial test (Bioclin Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brazil) were used to estimate albumin (ALB), alanine aminotransferase (ALT) and total protein (TP). These parameters were determined using the automated biochemical multi-item analyzer (BS-380; Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China).

2.12. Statistical Analysis

The bars in the figures show the mean values ± standard error of the mean (SEM). For comparisons between groups on tests was used two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test. The results were analyzed using GraphPad Prism software v. 6.4

(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. BtHE showed high content of polyphenols, flavonoids and tannins

The data showed a high content of polyphenols (15.117 ± 3.023 g GAE/100 g DW) in BtHE. This amount was higher than that found in other study with *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. crude extract (0.152 g GAE/100 g DW) (Kappel *et al.*, 2012). Oliveira *et al.* (2012) found in crude ethanol extract of *B. trimera* an amount of polyphenols of 26.159 g GAE/100 g DW. Also, was similar than found in green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) aqueous extract (14.877 g GAE/100 g DW), one of the plants with the highest levels of polyphenols (Chandra and Mejia, 2004). TFC found in BtHE was 19.07 ± 0.225 g CE/100 g DW, higher than found in *Baccharis articulata* crude extract (0.039 g RE/100 g DW) (Kappel *et al.*, 2012). TTC found in BtHE was 20.165 ± 12.7 g CE/100 g DW. Therefore, the high TPC, TFC and TTC indicated that BtHE is an excellent source of polyphenols. It is believed that the extraction method and the solvent used influences the high polyphenol content found in YME.

3.2. BtHE had high antioxidant activity

In the DPPH assay, it can be seen that at a concentration of BtHE 200 $\mu\text{g/mL}$ inhibited 81.95% of DPPH radical, while ascorbic acid inhibited 93.26%. The BtHE had a good inhibitory activity of DPPH radical compared to standard. With respect to the IC_{50} , there was a significant difference between the BtHE (116.63 $\mu\text{g/mL}$) and ascorbic acid (5.79 $\mu\text{g/mL}$).

Rodrigues *et al.* (2009) found in aqueous extract of *B. trimera*, which was prepared by infusion, the IC₅₀ of 92.39 µg/mL. In other study, crude ethanol and aqueous extract of *B. trimera* prepared by maceration had IC₅₀ of 15.49 and 50.87 µg/mL, respectively (Oliveira *et al.*, 2012).

Antioxidant analysis by β-carotene linoleate assay showed the percentage of inhibition of linoleic acid peroxidation and IC₅₀. The found values for the BtHE were 59.23% and 42.2 µg/mL. For the BHT, the values were 77.87% and 32.1 µg/mL. The values showed significant difference, although the BtHE has shown good inhibition potential. Sobrinho *et al.* (2016) found in *Baccharis trinervis* essential oil the IC₅₀ of 28.87 µg/mL. The better result of this test can be explained by the fact that the genus *Baccharis* is used especially for investigation of lipophilic antioxidants (Alves *et al.*, 2010; Kulisic *et al.*, 2004).

These results of antioxidant effect indicated by two different methods for the BtHE corroborate other findings in the literature that point to antioxidant potential of the genus *Baccharis* (Asteraceae), with numerous species having activity. For *B. articulata* (Lam.) Pers. there are reports of antioxidant activity of the ethylacetate extract of the leaves (Borgo *et al.*, 2010) and isolated phenolic compounds (Oliveira *et al.*, 2003). Also, the antioxidant potential of the genus has been observed in other species, such as *B. chilco* Kunth (Argoti *et al.*, 2011) and *B. coridifolia* DC. (Mongelli *et al.*, 1997).

3.3. BtHE causes small increase in collagen synthesis in the liver

Carbon tetrachloride did not cause massive morphological damage in hepatocytes (Fig. 1B), but the presence of collagen fibers around the vessels and in the sinusoid structure was observed in comparison with the control animals (Fig. 1A). Observations of livers of the

animals treated with BtHE (Fig. 1C) and BtHE + CCl₄ (Fig. 1D) showed a slight increase in collagen synthesis in the vessel wall and in the sinusoidal structure.

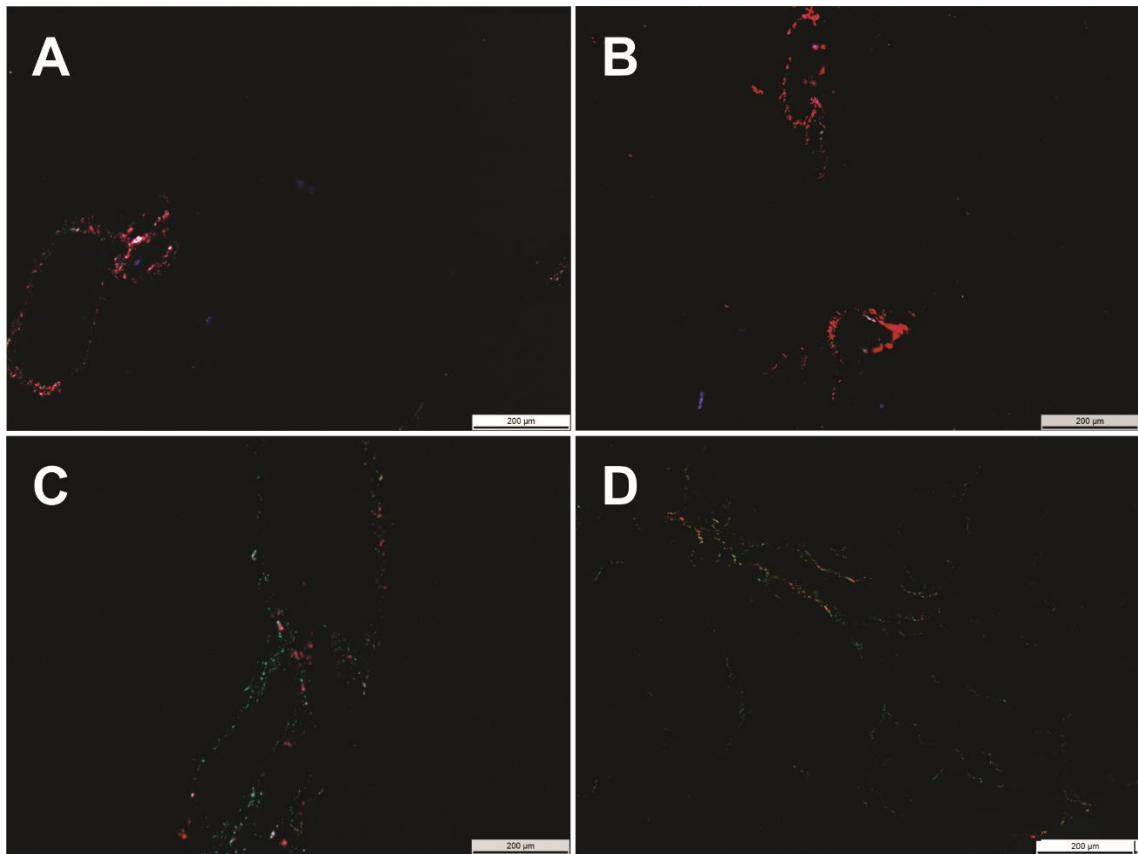


Fig. 1 - Photomicrographs showing samples of liver stained by Picrosirius red under polarization. A) Control; B) CCl₄; C) BtHE; D) BtHE + CCl₄.

Other plant extracts showed the reduction of CCl₄-induced liver fibrosis and collagen deposition in rat liver. Hafez et al. (2017) evaluated the *Panax ginseng* extract on the model of hepatotoxicity induced by CCl₄ in rat livers. The authors showed that ginseng extract lowered hepatic reticular fiber accumulation compared with CCl₄ group.

In other study, Ding et al. (2005) evaluated the hepatoprotective effect of *Ginkgo biloba* extract in CCl₄-induced liver injury in rats. The results showed that *G. biloba* can partially protect rat liver from the fibrogenesis induced by CCl₄. Masson's trichrome stainings and

electron microscope study showed liver fibrosis in rats was greatly alleviated when treated with *G. biloba* extract.

3.4. BtHE protects the liver from CCl₄-induced lipid peroxidation, oxidative stress and protein carbonylation

Data in Fig. 2 show that BtHE increase the CAT activity in the high concentration (600 mg/kg), protect the liver from lipid peroxidation in the low concentration (300 mg/kg) and reduce the protein carbonylation in both concentrations. Lipid peroxidation is a marker of oxidative stress that relies on the evaluation of damage induced on membrane lipids (Zhao et al., 2014), whereas protein carbonylation was used as a marker of oxidative modifications caused on proteins.

The protective action of several herbal medicines and their active constituents occurs through antioxidant enzymes (e.g., SOD, CAT, GPx, and GR), which maintain the prooxidant/antioxidant balance in the body. To eliminate ROS from the cellular system, SOD and CAT function coordinately to remove superoxide radicals (Kumari and Kakkar, 2012).

Our results showed that the liver of animals intoxicated with CCl₄ presented lower expression of CAT. However, *B. trimera* treatment was able to regulate this expression to values similar to those of the livers of control animals. This result was similar to that found by Pádua et al. (2014). In this study, the authors investigate the protective effect of *B. trimera* against APAP-induced hepatic damage in rats. The pretreatment with the extract was able to decrease the activity of the enzyme SOD and increase the activity of catalase and the concentration of total glutathione (Pádua et al., 2014).

BtHE also was able to reduce the protein carbonylation and lipid peroxidation caused by CCl₄. Our results are consistent with those described by Mongelli et al. (1997). This study

showed that *B. coridifolia* aqueous extract was able to inhibit the production of TBARS in a dose dependent manner.

Vieira et al. (2011) showed that *B. trimera*, *B. articulata* and *B. usterii* extracts reduced the protein carbonylation and lipid peroxidation *in vitro*. From the lipid peroxidation, all extracts protected against the action of reactive species on two kinds of lipid membrane preparation. Aqueous extract of *B. usterii* showed a tendency to be more potent again protecting microsomes and liposomes against peroxidation. In the protein carbonylation assay, the results showed higher inhibition potential of carbonyl protein formation for extracts of *B. usterii* in comparison with the extracts of other *Baccharis* species.

In summary, our results further support the view that extracts of *B. trimera* are promising sources of potential antioxidants.

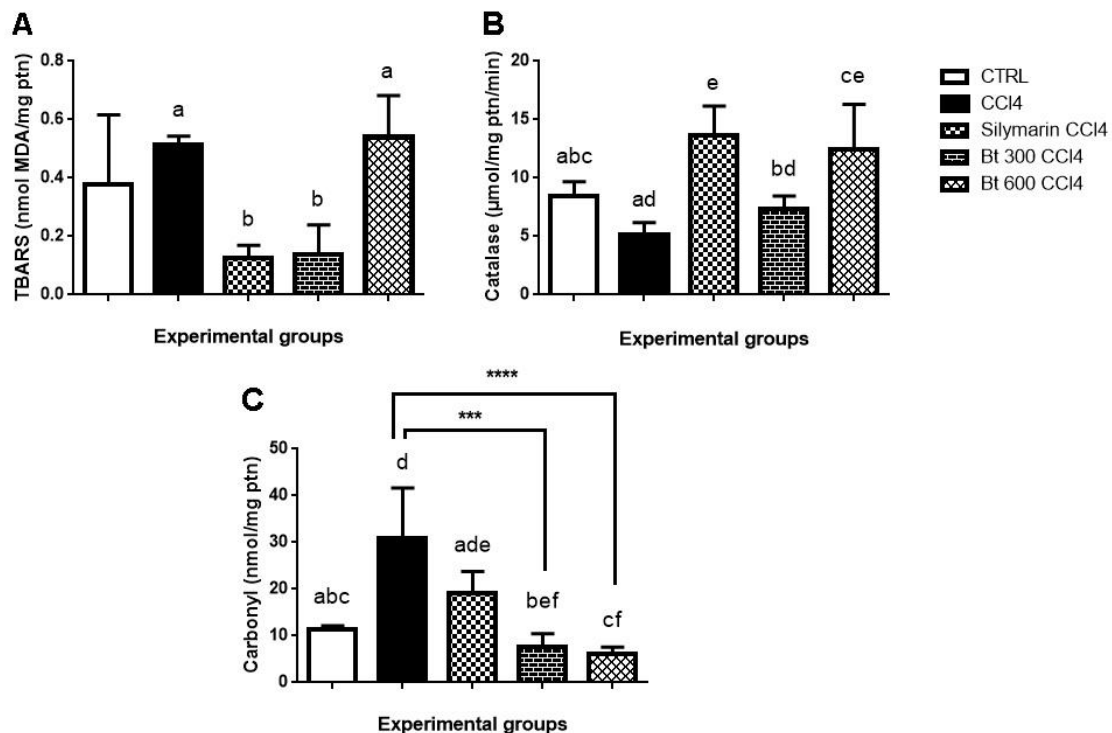


Fig. 2. Effect of BtHE on lipid peroxidation (A) and protein carbonylation (C) induced by CCl_4 , and CAT activity (B) in rat liver. Data are expressed as mean \pm S.D. One way ANOVA

followed by Tukey test, when appropriate ($n = 4$). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3.5. BtHE protect the rat liver from damage induced by CCl₄ in serum parameters

Table 1 shows the effect of *B. trimera* on CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. Rats induced with CCl₄ and treated with BtHE 300 mg/kg showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the levels of the activity of ALT, similar to rats induced with CCl₄ and treated with silymarin. However, no significant difference ($p > 0.05$) was observed in the total protein (TP) and albumin (ALB) values between groups of rats treated with CCl₄ and control groups. Although, this results showed that hepatoprotective effect of BtHE was comparable to silymarin, specifically in lower concentration (300 mg/kg), showing dose-dependent effect.

Table 1. Effect of BtHE on serum albumin (ALB), total protein (TP) and alanine aminotransferase (ALT) in CCl₄ intoxicated and non-intoxicated rats.

Groups	CTRL	CTRL SIL	CTRL Bt 300	CTRL Bt 600	CCl ₄	CCl ₄ SIL	CCl ₄ Bt 300	CCl ₄ Bt 600
ALB (g/L)	3.3±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	2.9±0.2 ^b	3.0±0.1 ^b	3.1±0.2 ^b	2.8±0.1 ^b
TP (g/dL)	7.6±0.1 ^a	7.8±0.3 ^a	7.5±0.3 ^a	7.6±0.3 ^a	6.6±0.3 ^b	7.0±0.3 ^b	6.9±0.4 ^b	6.7±0.2 ^b
ALT (U/L)	54.0±7.9 ^{bd}	81.3±5.5 ^{bd}	68.7±13.1 ^{bd}	66.0±7.5 ^{bd}	953.3±69.0 ^a	137.3±18.9 ^d	123.3±6.5 ^d	306.6±76.6 ^c

Values are mean ± SD; Values followed by same superscript are not significant at $p < 0.05$; (One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test).

Other studies evaluated the hepatoprotective effect of *Baccharis* species in other models of hepatotoxicity. Pádua et al. (2014) evaluated the protective effect of *B. trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen (APAP). This study showed that treatment with *B. trimera* significantly inhibited the elevation of the activity of serum transaminases ALT and AST, which was found to be 5.0- and 3.6-fold lower than that in the APAP intoxicated animals, respectively.

4. Conclusions

The results indicate that the BtHE has a potential hepatoprotective effect on the damage induced by carbon tetrachloride in rats. However, this effect was shown to be dose-dependent. Further studies are needed to evaluate a possible antifibrotic effect, since in the present study the experimental animal model was not sufficient to show consistent fibrosis in the histological analysis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian grants from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES). We thank Prof. Dr. Roselei Fachinetto, Prof. Dr. Sara Marchesan de Oliveira, Prof. Dr. Renato Zachia and Alcindo Busanello for technical assistance.

References

- Agostini-Costa, T.D.A.S., Garriti, D.D.O.S.S., Lima, L., Freire, S., Abreu, Pinto, F.A., Feitosa, T., 1999. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. *Bol. do Cent. Pesqui. Process. Aliment.* 17.
- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M. V., Aguiar, R.M., 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim. Nova* 33, 2202–2210.
- Argoti, J.C., Salido, S., Linares-Palomino, P.J., Ramírez, B., Insuasty, B., Altarejos, J., 2011. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2399–2406.
- Biondo, T.M.A., Tanae, M.M., Coletta, E. Della, Lima-Landman, M.T.R., Lapa, A.J., Souccar, C., 2011. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. *J. Ethnopharmacol.* 136, 368–373.
- Borgo, J., Xavier, C.A.G., Moura, D.J., Richter, M.F., Suyenaga, E.S., 2010. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) pers., asteraceae. *Brazilian J. Pharmacogn.* 20, 12–17.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.

- Chandra, S., De Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3583–3589.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161–1168.
- de Oliveira Garcia, F.A., Tanae, M.M., Torres, L.M.B., Lapa, A.J., de Lima-Landman, M.T.R., Souccar, C., 2014. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *Phytomedicine* 21, 1021–1025.
- De Oliveira, C.B., Comunello, L.N., Lunardelli, A., Amaral, R.H., Pires, M.G.S., Da Silva, G.L., Manfredini, V., Vargas, C.R., Gnoatto, S.C.B., De Oliveira, J.R., Gosmann, G., 2012. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules* 17, 1113–1123.
- Ding, J., Yu, J., Wang, C., Hu, W., Li, D., Luo, Y., Luo, H., Yu, H., 2005. Ginkgo biloba extract alleviates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Liver Int.* 25, 1224–32.
- Hafez, M.M., Hamed, S.S., El-Khadragy, M.F., Hassan, Z.K., Al Rejaie, S.S., Sayed-Ahmed, M.M., Al-Harbi, N.O., Al-Hosaini, K.A., Al-Harbi, M.M., Alhoshani, A.R., Al-Shabanah, O.A., Alsharari, S.D., 2017. Effect of ginseng extract on the TGF-beta1 signaling pathway in CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 17, 45.
- Hariyaree, A., Guneshwor, K., Damayanti, M., 2013. Antifungal and Cytotoxic Activities of Five Traditionally used Indian Medicinal Plants. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2, 2272.

- HR, M.H.R., Sudha, P.N., Sudhakar, K., n.d. A study on the hepatoprotective activities of Methanol Extract of *Spinacia oleracea* (Linn.) to the Induced Hepatotoxicity in wistar rat models.
- Janakat, S., Al-Merie, H., 2002. Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 48, 41–44.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R.R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11, 447–455.
- Kappel, V.D., Pereira, D.F., Cazarolli, L.H., Guesser, S.M., da Silva, C.H.B., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H., Silva, F.R.M.B., 2012. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. *Molecules* 17, 6754–6768.
- Kuliscic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85, 633–640.
- Kumari, A., Kakkar, P., 2012. Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sci.* 90, 561–570.
- Mokbel, M.S., Hashinaga, F., 2006. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chem.* 94, 529–534.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Talou, J.R., Coussio, J., Ciccia, G., 1997. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharmacol.* 58, 157–163.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474–478.

- Oliveira, A.C.P., Endringer, D.C., Amorim, L.A.S., Brandão, M.D.G.L., Coelho, M.M., 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* 102, 465–469.
- Oliveira, S.Q. de, Dal-Pizzol, F., Gosmann, G., Guillaume, D., Moreira, J.C.F., Schenkel, E.P., 2003. Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. *Free Radic. Res.* 37, 555–559.
- Pádua, B.D.C., Rossoni Júnior, J.V., de Brito Magalhães, C.L., Chaves, M.M., Silva, M.E., Pedrosa, M.L., Souza, G.H.B. De, Brandão, G.C., Rodrigues, I.V., Lima, W.G., Costa, D.C., 2014. Protective Effect of *Baccharis trimera* Extract on Acute Hepatic Injury in a Model of Inflammation Induced by Acetaminophen. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–14.
- Palanisamy, U.D., Ling, L.T., Manaharan, T., Appleton, D., 2011. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chem.* 127, 21–27.
- Paul, E.L., Lunardelli, A., Caberlon, E., de Oliveira, C.B., Santos, R.C.V., Biolchi, V., Bastos, C.M.A., Moreira, K.B., Nunes, F.B., Gosmann, G., 2009. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation* 32, 419.
- Porchezian, E., Ansari, S.H., 2005. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. *Phytomedicine* 12, 62–64.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Dolak, J.A., Waller, R.L., 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.* 43, 139–154.
- Rodrigues, C.R.F., Dias, J.H., de Mello, R.N., Richter, M.F., Picada, J.N., Ferraz, A.B.F., 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 125, 97–101.

- Sobrinho, A.C.N., de Souza, E.B., Rocha, M.F.G., Albuquerque, M.R.J.R., Bandeira, P.N., dos Santos, H.S., de Paula Cavalcante, C.S., Oliveira, S.S., Aragão, P.R., de Morais, S.M., dos Santos Fontenelle, R.O., 2016. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). *Ind. Crops Prod.* 84, 108–115.
- Soicke, H., Leng-Peschlow, E., 1987. Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Med.* 53, 37–39.
- Stickel, F., Shouval, D., 2015. Hepatotoxicity of herbal and dietary supplements: an update. *Arch. Toxicol.*
- Subramoniam, A., Pushpangadan, P., 1999. Development of phytomedicines for liver diseases. *Indian J. Pharmacol.* 31, 166–175.
- Tian, S., Shi, Y., Zhou, X., Ge, L., Upur, H., 2011. Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different *Ziziphora clinopodioides* Lam. extracts. *Pharmacogn. Mag.* 7, 65.
- Torres, L.M.B., Gamberini, M.T., Roque, N.F., Lima-Landman, M.T., Souccar, C., Lapa, A.J., 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* 55, 617–619.
- Vieira, T.O., Seifriz, I., Charão, C.C.T., de Oliveira, S.Q., Creczynski-Pasa, T.B., 2011. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: Inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Brazilian J. Pharmacogn.* 21, 601–607.
- Wang, J., Tang, L., White, J., Fang, J., 2014. Inhibitory Effect of Gallic Acid on CCl₄-Mediated Liver Fibrosis in Mice. *Cell Biochem. Biophys.* 69, 21–26.

- Wang, T., Sun, N.L., Zhang, W.D., Li, H.L., Lu, G.C., Yuan, B.J., Jiang, H., She, J.H., Zhang, C., 2008. Protective effects of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.* 117, 300–308.
- Yan, L.-J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.
- Zhao, Y., Miriyala, S., Miao, L., Mitov, M., Schnell, D., Dhar, S.K., Cai, J., Klein, J.B., Sultana, R., Butterfield, D.A., Vore, M., Batinic-Haberle, I., Bondada, S., St. Clair, D.K., 2014. Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 55–65.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559.

4 CONCLUSÕES

- O extrato hidroalcoólico 70% de *B. trimera* (EBt) apresentou alto teor de polifenóis, flavonoides e taninos, sendo possível que o solvente utilizado tenha contribuído para a extração destes componentes;
- O EBt apresentou alto poder antioxidante, principalmente pelo método do β -caroteno, justificando o uso da carqueja para a investigação de antioxidantes lipofílicos e sua afinidade por substratos lipofílicos;
- No fígado de ratos, o EBt não mostrou um efeito antifibrótico, sendo que o CCl_4 também não foi capaz de promover uma fibrose efetiva. Isto pode ser justificado provavelmente devido ao pouco tempo entre a indução da hepatotoxicidade e a eutanásia dos animais (18 h).
- No entanto, o EBt promoveu uma leve síntese de colágeno na parede vascular e na estrutura sinusoidal, não mostrando ser prejudicial ao fígado;
- O EBt protegeu o fígado da lipoperoxidação e da carbonilação de proteínas, justificando seu uso popular como hepatoprotetor.
- Na lipoperoxidação, o efeito hepatoprotetor da carqueja foi dose-dependente, impedindo a oxidação pelo CCl_4 na dose de 300 mg/kg, similar ao efeito protetor promovido pela silimarina;
- O EBt foi capaz de regular a atividade da enzima antioxidante catalase, similar aos níveis dos grupos controle. O efeito também foi dose-dependente, mas na dose de 600 mg/kg;
- O EBt foi capaz de reduzir o aumento sérico da enzima alanina aminotransferase (ALT), sendo similar ao efeito da silimarina e dos grupos controle. O EBt mostrou também um efeito-dose dependente, sendo, neste caso, na dose de 300 mg/kg;

- Com relação às proteínas totais e albumina séricas, não houve diferença na comparação entre os valores dos grupos induzidos pelo CCl₄ e entre os grupos controle.
- No geral, o efeito hepatoprotetor do EBt mostrou-se dose-dependente, mostrando que esta planta também pode possuir um efeito tóxico, sendo necessário mais estudos de toxicidade com a mesma;
- Para o estudo de um possível efeito antifibrótico, é necessária uma melhor adaptação do modelo animal experimental, sendo que neste estudo não foi possível detectar o efeito fibrótico do CCl₄ e um possível efeito antifibrótico do EBt.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **ARKIVOC**, Zurich, v. 2007, n. 7, p. 76-96, Sept. 2006.

ADAMS, David H.; EKSTEEN, Bertus. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 244, 2006.

ADESANOYE, O. A.; FAROMBI, E. O. Hepatoprotective effects of vernonia amygdalina (astereaceae) in rats treated with carbon tetrachloride. **Experimental and toxicologic pathology**, 2010. v. 62, n. 2, p. 197–206.

AFZAL, M.; KHAN, R.; KAZMI, I.; ANWAR, F. Hepatoprotective potential of new steroid against tetrachloride-induced hepatic injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 378, n. 1-2, p. 275-281, 2013.

AHMAD, A. et al. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamine induced hepatic damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p.35-41, 2002.

ALDABA-MURATO, L. R.; MORENO, M. G.; SHIBAYAMA, M.; TSUTSUMI, V.; MURIEL, P. Protective effects of allupurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: modulation NF-KB, cytokine production and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1820, n. 2, p. 65-75, 2012.

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química nova**, 2010. v. 33, n. 10, p. 2202–2210.

AMACHER, D. E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Human & experimental toxicology**, 2002. v. 21, n. 5, p. 253–262.

ARGOTI, J. C. *et al.* Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing colombian plants. **Journal of the science of food and agriculture**, 2011. v. 91, n. 13, p. 2399–2406.

BARROSO, G. M.; BUENO, O. L. **Compostas**: subtribo baccharidinae. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2002. 301 p.

BERGMAN, K. Application and results of whole-body autoradiography in distribution studies of organic solvents. **Crit rev toxicol**, 1983. v. 12, n. 1, p. 59–118.

BIONDO, T. M. A. *et al.* Antisecretory actions of baccharis trimera (less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. **Journal of ethnopharmacology**, 2011. v. 136, n. 2, p. 368–373.

BORGO, J. *et al.* Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (lam.) pers., asteraceae. **Brazilian journal of pharmacognosy**, 2010. v. 20, n. 1, p. 12–17.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 1976. v. 72, n. 1–2, p. 248–254.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, 1978. v. 52, n. C, p. 302–310.

CAMPOS, F. R. *et al.* *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemistry & biodiversity**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2016.

CHENG, N. *et al.* Antioxidant and hepatoprotective effects of schisandra chinensis pollen extract on ccl4-induced acute liver damage in mice. **Food and chemical toxicology**, 2013. v. 55, p. 234–240.

CHO, B. O. *et al.* Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2011. v. 59, n. 21, p. 11442–11448.

CZYEWSKI, E.; BARBISAN, E.M.; ROSA, R.L.D. *et al.* Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de *B. trimera* (*Baccharis trimera*) e *Vassoura* (*Baccharis dracunculifolia*). **XVI Encontro de Química da Região Sul**. FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

DE OLIVEIRA, S. Q. *et al.* Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 365-368, July/Sept. 2004.

DE OLIVEIRA, S. Q. *et al.* Differentiation of south brazilian *Baccharis* species by TLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Monticello, v. 29, n. 17, p. 2603–2609, 2006.

DIAS, L.F.T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E.M. Antiulcerogenic and antioxidant activities of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 309-314, 2009.

DING, J. *et al.* Ginkgo biloba extract alleviates liver fibrosis induced by ccl in rats. **Liver international**, 2005. v. 25, n. 6, p. 1224–32.

DONG, D. *et al.* Protective effects of the total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 120-130, 2013.

DUH, P. Der; LIN, S. L.; WU, S. C. Hepatoprotection of *graptopetalum paraguayense* e. walther on ccl 4-induced liver damage and inflammation. **Journal of ethnopharmacology**, 2011. v. 134, n. 2, p. 379–385.

FENG, Y. et al. Hepatoprotective effect and its possible mechanism of *Coptidis rhizome* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced chronic liver hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n.3, p. 683-690, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, 1997. v. 43, n. 1, p. 61–68.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis—from bench to bedside. **Journal of hepatology**, v. 38, p. 38-53, 2003.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008.

FRIEDMAN, S. L.; ARTHUR, M. J. Reversing hepatic fibrosis. **Scientia Medica**, 2002. v. 8, n. 4, p. 194–205.

GALICIA-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-REYES, G. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. **Revista de gastroenterología de México**, 2014. v. 79, n. 2, p. 135–144.

GALISTEO, M. et al. Antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus* in a model of acute hepatic damage induced by thioacetamine. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 522-526, 2000.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKASH, H. S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by ccl4 and h2o2. **Asian pacific journal of tropical medicine**, 2012. v. 5, n. 11, p. 868–874.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKASH, H. S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by ccl4 and h2o2. **Asian pacific journal of tropical medicine**, 2012. v. 5, n. 11, p. 868–874.

GIULIANO, D. A. Clasificación intragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana**, San Isidro, v. 39, n. 1/2, p. 131-154, enero/jun. 2001.

HAFEZ, M. M. *et al.* Effect of ginseng extract on the tgf-beta1 signaling pathway in ccl4-induced liver fibrosis in rats. **Bmc complementary and alternative medicine**, 2017. v. 17, n. 1, p. 45.

HANAFIAH, K. M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of agespecific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333-1342, 2013.

HARIPYAREE, A.; GUNESHWOR, K.; DAMAYANTI, M. Antifungal and cytotoxic activities of five traditionally used indian medicinal plants. **The journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, 2013. v. 2, n. 4, p. 2272.

HUANG, C. C. *et al.* Phytocompounds from vitis kelungensis stem prevent carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food chemistry**, 2011. v. 125, n. 2, p. 726–731.

JAESCHKE, H. *et al.* Forum - Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 166-176, 2002

JALAN, R. Acute liver failure: current management and future prospects. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 42, Supl. 1, p. s115-s123, 2005.

JANAKAT, S.; AL-MERIE, H. Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, 2002. v. 48, n. 1, p. 41–44.

JANUÁRIO, A. H. *et al.* Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from baccharis trimera (asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-biological interactions**, 2004. v. 150, n. 3, p. 243–251.

JIMÉNEZ, W. *et al.* Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 1992. v. 7, n. 1, p. 90–97.

KANTER, M.; COSKUN, O.; BUDANCAMANAK, M. Hepatoprotective effects of nigella sativa l and urtica dioica l on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. **World journal of gastroenterology**, 2005. v. 11, n. 42, p. 6684–6688.

KAPPEL, V. D. *et al.* Short and long-term effects of baccharis articulata on glucose homeostasis. **Molecules**, 2012. v. 17, n. 6, p. 6754–6768.

KARKAMPOUNA, S. *et al.* Inhibition of TGF β type I receptor activity facilitates liver regeneration upon acute CCl₄ intoxication in mice. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 2, p. 347-357, 2016.

KEPEKÇI, R. A. *et al.* Protective effect of spirulina platensis enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by ccl₄. **Food chemistry**, 2013. v. 141, n. 3, p. 1972–1979.

KOIZUMI, S. I. *et al.* Mechanisms of the proctetive effect of L-Alanine to D-galactosamineinduced hepatocellular injury: comparative studies of L-alanine and Pyruvates. **Biochemical and Biophysical Research Comunications**, v. 91, p. 99-104, 2002.

KULISIC, T. *et al.* Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food chemistry**, 2004. v. 85, n. 4, p. 633–640.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; SATER, J. **Robins & Cotran pathologic basis of disease**. 8. ed. Philadelphia: Elsevier, 2010. cap. 1, p. 3-42

KUMARI, A.; KAKKAR, P. Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the bax/bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. **Life sciences**, 2012. v. 90, n. 15, p. 561–570.

LEITE, E. C. et al. Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia* sp. (Saturniidae). **Revista Brasileira Análises Clínicas**, n. 1, v. 39, p. 29-32, 2007.

LI, J.-T. et al. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. **Journal of gastroenterology**, v. 43, n. 6, p. 419-428, 2008.

LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; WILSON, C.P. Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 456-464, 2007.

LIU, Q. *et al.* Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. **Food and chemical toxicology**, 2011. v. 49, n. 6, p. 1316–21.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002, 544p.

MAHER, J. J. Exploring alcohol's effects on liver function. **Alcohol Health & Research World**, Bethesda, v. 21, n.1, p. 5-12, 1997.

MANIBUSAN, M. K.; ODIN, M.; EASTMOND, D. A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. **Journal of Environmental Science and Health**, (Part C), New York, v. 25, n. 3, p. 185-209, 2007.

MANIBUSAN, M.; JINOT, J.; KOPYLEV, L.; WHITE, P.; SCHLOSSER, P. **Toxicological review of carbon tetrachloride**. Washington: United States Environmental Protection Agency (EPA), 2010.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, 2000. v. 153, n. 1–3, p. 83–104.

MATTOS, A.A.; DANTAS-CORRÊA; E.B. **Tratado de hepatologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MIHAILOVIĆ, Vladimir et al. Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 52, p. 83-90, 2013.

MONGELLI, E. *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *baccharis coridifolia* dc. **Journal of ethnopharmacology**, 1997. v. 58, n. 3, p. 157–163.

MUKAZAYIRE, M. J. *et al.* Traditional phytotherapy remedies used in southern rrwanda for the treatment of liver diseases. **Journal of ethnopharmacology**, 2011. v. 138, n. 2, p. 415–431.

NAN, J. X. *et al.* Effect of *Acanthopanax koreanum* Nakai (Araliaceae) and d-galactosanine and lipopolysaccharide fulminant hepatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 71-77, 2004.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical biochemistry**, 1972. v. 49, n. 2, p. 474–478.

NICOLETTI, M. A. *et al.* Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 32-40, 2007.

OLIVEIRA, A. C. P. *et al.* Effect of the extracts and fractions of baccharis trimera and syzygium cumini on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of ethnopharmacology**, 2005. v. 102, n. 3, p. 465–469.

OLIVEIRA, S. Q. De *et al.* Antioxidant activity of baccharis articulata extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free radical research**, 2003. v. 37, n. 5, p. 555–559.

OLIVEIRA GARCIA, F. A. DE *et al.* A comparative study of two clerodane diterpenes from baccharis trimera (less.) dc. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8, p. 1021–1025, 2014.

OLIVEIRA, C. B. DE *et al.* Phenolic enriched extract of baccharis trimera presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1113–1123, 2012.

PÁDUA, B. D. C. *et al.* Protective effect of *baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

PALANISAMY, U. D. *et al.* Rapid isolation of geraniin from nephelium lappaceum rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food chemistry**, v. 127, n. 1, p. 21–27, 2011.

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, n. 6, p. 419, 2009.

PINTO, C. *et al.* Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3405–3412, 2012.

PORCHEZHIAN, E.; ANSARI, S. H. Hepatoprotective activity of abutilon indicum on experimental liver damage in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1–2, p. 62–64, 2005.

PORUBSKY, P. R.; MENEELY, K. M.; SCOTT, E. E. Structures of human cytochrome p-450 2e1: insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33698–33707, 2008.

RAHMAN, T. M.; HODGSON, H. J. Animal models of acute hepatic failure. **International journal of experimental pathology**, v. 81, n. 2, p. 145–57, 2000.

RECKNAGEL, R. O. *et al.* Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 139–154, 1989.

REZENDE, T. P. *et al.* Protective effects of baccharis dracunculifolia leaves extract against carbon tetrachloride-and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9257–9272, 2014.

RODRIGUES, C. R. F. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic properties of baccharis trimera in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 97–101, 2009.

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814–821, 2010.

ROY, S.; SANNIGRAHI, S.; MAJUMDAR, S.; GHOSH, B.; SARKAR, B. Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

RUIZ, A. L. G. *et al.* Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

SAHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, R. A. Hepatoprotective effects of methanol extract of carissa opaca leaves on ccl4-induced damage in rat. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 48, 2011.

SANCHEZ PALOMINO, S. *et al.* Screening of south american plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from baccharis trinervis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1147–1150, 2002.

SARADA, K.; JOTHIBAI, R. M.; MOHAN, V. R. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extracts of naringi crenulata (roxb) nicolson against ccl4 induced hepatotoxicity in rats. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 3, n. 3, p. 874–880, 2012.

SCHIMIDT, F. B.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Efeito da sazonalidade sobre o potencial antibacteriano de extratos etanólicos de *B. trimera* (Less) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 1-5, 2008.

SHI, J. *et al.* Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. **The american journal of pathology**, v. 153, n. 2, p. 515–25, 1998.

SILVERTHORN, D. U. Sistema digestório. In: _____. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2010. cap. 21, p. 698-723.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 173 p.

SIMÕES-PIRES, C. A. *et al.* Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 16, n. 5, p. 307-314, Sept./Oct. 2005.

SINGH, N. *et al.* Protective effect of potato peel extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 241-246, 2008.

SIRICA, A. E. *et al.* Pathobiology of biliary epithelia and cholangiocarcinoma: Proceedings of the Henry M. and Lillian Stratton basic research single-topic conference. **Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 2040-2046, 2008.

SOBRINHO, A. C. N. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from baccharis trinervis (lam.) pers. (asteraceae). **Industrial crops and products**, v. 84, p. 108–115, 2016.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from baccharis trimera and their antihepatotoxic properties. **Planta medica**, v. 53, n. 1, p. 37–39, 1987.

SOUSA, F. C. F. *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-54, 2008.

SUBRAMONIAM, A.; PUSHPANGADAN, P. Development of phytomedicines for liver diseases. **Indian journal of pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 166–175, 1999.

TIAN, S. *et al.* Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different ziziphora clinopodioides lam. extracts. **Pharmacognosy magazine**, v. 7, n. 25, p. 65, 2011.

TORRES, L. M. B. *et al.* Diterpene from baccharis trimera with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 617–619, 2000.

TOTH, C. A.; THOMAS, D. Liver endocytosis and kupffer cells. **Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 255–266, 1992.

TUNON, M. J.; ALVAREZ, M.; CULEBRAS, J. M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 15, n. 25, p. 3086-3098, 2009.

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, jan./fev. 2005.

VITAGLIONE, P.; MORISCO, F.; CAPORASO, V. Dietary antioxidant compounds and liver health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 575-586, 2004.

VIEIRA, T. O. *et al.* Antioxidant effects of crude extracts from baccharis species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 601–607, 2011.

VOICAN, C. S.; PERLEMUTER, G.; NAVEAU, S. Mechanisms of the inflammatory reaction implicated in alcoholic hepatitis, update. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, Paris, v. 35, n. 6-7, p. 465-474, 2011.

WANG, J. *et al.* Inhibitory effect of gallic acid on ccl4-mediated liver fibrosis in mice. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 69, n. 1, p. 21–26, 2014.

WANG, T. *et al.* Protective effects of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, n. 2, p. 300–308, 2008.

WEBER, L. W. D.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical reviews in toxicology**, v. 33, n. 2, p. 105–136, 2003.

WEIMANN, C. *et al.* Spasmolytic effects of baccharis conferta and some of its constituents. **The journal of pharmacy and pharmacology**, v. 54, n. 1973, p. 99–104, 2002.

XING, W. W. *et al.* Hepatoprotective effects of IL-22 on fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. **Cytokine**, v.56, n. 2, p. 174-179, 2011.

XU-YING, W. *et al.* Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 15-19, 2009.

YAN, L.-J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein b of human low-density lipoproteins. **Analytical biochemistry**, v. 228, n. 2, p. 349–351, 1995.

YANG, Chi-Ching *et al.* Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of an aqueous extract formula derived from three Chinese medicinal herbs against

CCl₄-induced liver injury in rats. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 106-113, 2013.

ZANON, S. M. et al. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 41, n. 2, p. 59-62, 1999.

ZHAO, Y. *et al.* Redox proteomic identification of hne-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. **Free radical biology and medicine**, v. 72, p. 55–65, 2014.

ZHAO, P. et al. Enrichment and purification of total flavonoids from Cortex Juglandis Mandshuricae extracts and their suppressive effect on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Mice. **Journal of Chromatography B**, v. 1007, p. 8-17, 2015.

ZHU, W.; FUNG, P. C. W. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 870-880, 2000.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Baccharis trimera (Less) DC. (Asteraceae): EFEITO PROTETOR SOBRE A FIBROSE HEPÁTICA INDUZIDA EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 8027060316, sob a responsabilidade de **Melânia Palermo Manfron e equipe; Iuri de França Bonilha; Daniela Bitencourt Rosa Leal; João Felipe Peres Rezer; Paulo Guilherme Rubenich; Pedro Henrique Doleski** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 09/06/2016.

We certify that the proposal "Baccharis trimera (Less) DC. (Asteraceae): PROTECTIVE EFFECT ON INDUCED HEPATIC FIBROSIS IN RATS ", utilizing 54 Heterogenics rats (54 males), protocol number CEUA 8027060316, under the responsibility of **Melânia Palermo Manfron and team; Iuri de França Bonilha; Daniela Bitencourt Rosa Leal; João Felipe Peres Rezer; Paulo Guilherme Rubenich; Pedro Henrique Doleski** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/09/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2016](#) a [07/2016](#)

Área: [Farmácia Industrial](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [54](#)

Linhagem: [Wistar \(Rattus norvegicus\)](#)

Peso: [250 a 320 g](#)

Resumo: A fibrose hepática é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo devido à hepatite viral crônica, esteatose hepática alcoólica e não-alcoólica (associada com obesidade) e doenças hepáticas colestáticas e auto-imunes. Fibrose hepática é uma resposta de cicatrização reversível caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC) após a lesão hepática. Este processo resulta em cirrose, consequência final da fibrose progressiva, que possui um mau prognóstico e alta mortalidade. Em muitos aspectos, a resposta do fígado à lesão é angiogênica, com formação de novos vasos sanguíneos, remodelação sinusoidal e expansão de células estreladas (HSCs □ hepatic stellate cells). Após a lesão, as HSCs tornam-se ativadas, levando a conversão de uma HSC quiescente (qHSC), rica em vitamina A, à uma HSC que perde as gotas de vitamina A, aumentando a proliferação, contração e liberação de citocinas pró-inflamatórias, pró-fibrogênicas e pró-mitogênicas. Estas células ativadas são capazes de aumentar a migração e deposição de componentes da MEC. Devido à ativação ocorrer muito rapidamente, o alvo terapêutico foi direcionado para as vias regulatórias de sinalização. Dentre os mais importantes estão as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) 1 e 2. Tetracloreto de carbono (CCl4) é a hepatotóxina mais amplamente utilizada no estudo da fibrose hepática e cirrose em roedores. Em muitos aspectos, ele imita a doença crônica humana associada com danos tóxicos. A biotransformação hepática do CCl4 depende do CYP2E1 e produz o radical triclorometil, que está envolvido em diversas reações de radicais livres e processos de peroxidação lipídica, contribuindo para uma reação de fase aguda caracterizada por necrose de hepatócitos centrolobulares; ativação das células de Kupffer e a indução de uma resposta inflamatória. Esta sequência é associada com a produção de diversas citocinas, que promovem a ativação das HSCs e fibrose hepática. Baccharis trimera, popularmente conhecido como "carqueja", membro da família Asteraceae, é um arbusto nativo do Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Chás medicinais, preparados a partir das partes aéreas, são usados na medicina popular para tratar doenças gastrointestinais, hepáticas e processos inflamatórios. Considerando o tradicional uso das espécies do gênero Baccharis em enfermidades hepáticas e a escassez de estudos com esta espécie abordando a fibrose hepática, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do extrato hidroetanólico de Baccharis trimera sobre a fibrose hepática induzida por CCl4 em ratos.

Local do experimento: Serão utilizados no experimento ratos Wistar machos adultos jovens, com idade de 8 semanas, pesando aproximadamente 250 a 320 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais serão mantidos secos, limpos, livres de ruídos excessivos e dentro de uma faixa de temperatura de 21-22 °C, com 60-65% de umidade relativa do ar, com ciclo 12/12 h de claro e escuro mantido artificialmente. A forragem utilizada nas caixas dos animais será de maravalha de Pinus autoclavada e sua troca será executada três vezes por semana. Bebedouros e comedouros serão limpos a cada três dias. Os ratos serão alimentados com a ração padrão para Rattus norvegicus utilizada pelo Biotério da Universidade (SUPRA-



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

LAB) e água ad libitum. Os animais serão mantidos no Biotério de Experimentação do Prédio 19 da UFSM, que possui sistema de exaustão de ar. Os ratos, após ambientação de 7 dias, serão distribuídos randomicamente em gaiolas coletivas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), contendo tubos ou canos de PVC como meio de enriquecimento ambiental, contendo no máximo 4 ratos em cada gaiola. Serão utilizados 6 grupos de 8 animais cada, totalizando 48 animais. O número de animais por grupo segue o protocolo de Constandinou e colaboradores (2005).

Santa Maria, 20 de outubro de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Roseberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Manuscript Details

Manuscript number	JEP_2017_3137
Title	Protective effect of <i>Baccharis trimera</i> extract on liver damage induced by carbon tetrachloride in rats
Article type	Research Paper

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Baccharis trimera* (Less.) (Asteraceae) is a native plant of Brazil. Also known as "carqueja", it has been popularly used to treat liver diseases, diabetes, as well as digestive disorders. Other studies have described the hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activities of the species. Aim of the study: Evaluate the potential of a *Baccharis trimera* hydroalcoholic extract (BtHE) to prevent the damage caused by carbon tetrachloride (CCl₄) exposure in rats. Materials and methods: The dried aerial parts of *B. trimera* was extracted by maceration with EtOH:H₂O (70:30, v/v) at room temperature and lyophilized, obtained the BtHE. In this extract was performed the total phenolic, flavonoid and tannin content. Antioxidant activity was performed by DPPH and β -carotene assay. Rats were submitted of treatment with BtHE by 15 days and CCl₄-induced hepatotoxicity. In liver, was determined the collagen deposition by Picrosirius Red staining, catalase activity, lipid and protein peroxidation. The serum determinations was performed by analysis of ALT activity and albumin and total proteins. Results: BtHE showed high content of polyphenols (15.117 g GAE/100 g DW), flavonoids (19.07 g CE/100 g DW) and tannins (20.165 g CE/100 g DW). The extract presented high antioxidant activity, mainly for the lipophilic substrates. In the liver, BtHE promoted small increase of collagen, but without developing significant fibrosis. However, BtHE showed significant hepatoprotective effect from CCl₄-induced damage. This extract increase the CAT activity in the high concentration (600 mg/kg), protect the liver from lipid peroxidation in the low concentration (300 mg/kg) and reduce the protein carbonylation in both concentrations. In the serum parameters, BtHE 300 mg/kg showed a significant decrease of the activity of ALT, similar to rats induced with CCl₄ and treated with silymarin. However, no significant difference was observed in the TP and ALB values between groups of rats treated with CCl₄ and control groups. Although, the hepatoprotective effect of BtHE was comparable to silymarin, specifically in lower concentration (300 mg/kg), showing dose-dependent effect. Conclusion: The results indicate that the BtHE has a potential hepatoprotective effect on the damage induced by carbon tetrachloride in rats. However, this effect was shown to be dose-dependent. Further studies are needed to evaluate a possible antifibrotic effect, since in the present study the experimental animal model was not sufficient to show consistent fibrosis in the histological analysis.

Keywords	<i>Baccharis trimera</i> ; Hepatoprotective; Carbon tetrachloride; Liver damage
Taxonomy	Phytopharmacy, Pharmacology
Corresponding Author	Iuri Bonilha
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal de Santa Maria
Order of Authors	Iuri Bonilha, Camila Helena Ferreira Cuelho, Pedro Doleski, Paulo Guilherme Schimite, Fernanda Cabral, Karen Luise Moreira, Yanaí Bollick, Lara Da Cas, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Marcelo Leite da Veiga, Daniela Leal, Rafael Moresco, Melânia Manfron