

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

Gabriela Buzatti Cassanego

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* E *Morus nigra* FRENTE À
INDUÇÃO DE DANO HEPÁTICO EM RATOS Wistar**

Santa Maria, RS
2019

Gabriela Buzatti Cassanego

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* E *Morus nigra* FRENTE À INDUÇÃO DE
DANO HEPÁTICO EM RATOS Wistar**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS
2019

Cassanego, Gabriela

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE Baccharis trimera E Morus nigra FRENTE À
INDUÇÃO DE DANO HEPÁTICO EM RATOS Wistar / Gabriela
Cassanego.- 2019.

64 p.; 30 cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Atividade hepatoprotetora 2. Plantas medicinais 3.
Carqueja 4. Amoreira preta I. de Freitas Bauermann,
Liliâne II. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo
autor(s). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca
central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt ratta cma 10/1728.

Gabriela Buzatti Cassanego

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* E *Morus nigra* FRENTE À INDUÇÃO DE
DANO HEPÁTICO EM RATOS Wistar**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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**.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2019:

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

Neila Silva Pereira dos Santos Richards, Dr.^a (UFSM)

Paulo César Ghedini, Dr. (UFG), por parecer

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado a minha família pelo amor, paciência e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por serem meu alicerce sempre me incentivando e inspirando. Meu muito obrigada por proporcionarem a oportunidade e o apoio para estar aqui.

A minha irmã, por ter me apresentado o mundo da Pós-Graduação, sendo minha inspiração;

As minhas amigas de infância Cristiane e Laura, que apesar da distância e do tempo sempre estiveram ao meu lado em todas as etapas, sou muito grata por fazer parte da vida de vocês há 21 anos, obrigada pelo incentivo e por compreenderem os momentos de ausência para a realização desse trabalho;

Ao Lucas, pelo apoio e incentivo incondicional, por ser meu orgulho e meu porto seguro;

A minha orientadora Prof^a Lili, meu muito obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório para uma orientanda desconhecida. Obrigada por ser essa pessoa incrível, de coração gigante e de vasto conhecimento;

A Camille, minha coorientadora e amiga. Você foi uma surpresa pra mim! Obrigada pelas conversas, risadas, pelo aprendizado, pelas inúmeras dicas, pela paciência, compreensão, confiança, pelos cafezinhos pós-almoço e pelas trocas de bolo de pote;

A Kassia, a pessoa mais batalhadora que conheço, por um dia ter permitido participar do seu experimento, esse ato fez com que eu chegasse até aqui, obrigada pelos ensinamentos, por me orientar nos momentos em que me perdi, por dizer que ia dar certo! Obrigada pelo mate de toda manhã, pelas conversas e pela amizade;

A Thainara, Rafaela, Patrícia, Isabel, Lauren, Jéssica, por todo auxílio durante o experimento, por fazer meus dias mais floridos, também devo a vocês a conclusão desse trabalho.

Aos demais colegas LaFex obrigada pela convivência e ajuda em experimentos

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de ensino e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

*“- Quando a gente anda sempre em frente,
não pode mesmo ir longe...”*
O pequeno príncipe

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera*. E *Morus nigra* FRENTE À INDUÇÃO DE DANO HEPÁTICO EM RATOS Wistar

AUTORA: Gabriela Buzatti Cassanego
ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

O fígado é um órgão funcionalmente muito versátil, sendo responsável por manter a homeostasia corporal. O papel que exerce fisiologicamente o torna vulnerável ao desenvolvimento de patologias, sendo de grande relevância clínica. A *Baccharis trimera* (Less.) DC., conhecida popularmente como “carqueja” e a *Morus nigra* Linnaeus denominada de “amoreira preta”, são utilizadas pela população para a prevenção e tratamento de doenças do fígado, no entanto a eficácia das mesmas não está totalmente elucidada na literatura. O objetivo do estudo foi realizar a análise fitoquímica e avaliar a potencial atividade hepatoprotetora dos extratos etanólicos de folhas de *B. trimera* (EFBT) e *M. nigra* (EFMN), perante dano hepático induzido pela tioacetamida. Para isso foram utilizados 30 ratos, divididos em 5 grupos experimentais (n=6). Os animais foram pré-tratados via oral com solução 60°GL, silimarina 50 mg/kg, EFBT 400 mg/kg e EFMN 1000 mg/kg, durante três semanas. A indução do dano hepático ocorreu pela administração de duas doses de tioacetamida (TAA) 300 mg/kg via i.p no 20° e 21° dia. Para o grupo controle, foi administrada pela mesma via, solução salina 0,9%. O perfil cromatográfico do EFBT revelou epicatequina e apigenina como os constituintes majoritários do EFBT. Já a rutina foi o principal composto encontrado no EFMN. Os resultados mostraram que a TAA induziu dano hepático elevando os níveis das enzimas AST, ALT e GGT, contagem de LF e reduzindo a PT, PQ e PPT. O tratamento com EFBT foi capaz de minimizar os níveis das enzimas AST e GGT, além de reduzir os LF, já o tratamento com EFMN minimizou significativamente apenas os níveis da enzima GGT. A administração de EFBT normalizou o ganho de peso corporal e conseqüentemente o peso do fígado dos animais previamente tratados, quando comparado com os grupos. As análises macroscópicas e histopatológicas do fígado estão de acordo com os resultados até então descritos para o estudo. Foi possível observar que as administrações do padrão silimarina e do EFBT reduziram a lipoperoxidação, no tecido hepático quando comparados ao grupo TAA. Através dos resultados obtidos podemos concluir que o modelo de indução de dano hepático utilizado, foi efetivo no seu propósito. Do mesmo modo demonstrou que o tratamento prévio com EFBT minimizou o dano hepático causado pela TAA, mostrando-se como uma fonte natural promissora para utilização farmacológica. Já a administração de EFMN não apresentou resultados significativos quando comparado ao grupo Silimarina e EFBT, sendo necessária assim a realização de mais estudos com a planta.

Palavras-chave: Asteraceae. Moraceae. Hepatotoxicidade. In vivo.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS OF *Baccharis trimera* AND *Morus nigra* AGAINST HEPATIC DAMAGE INDUCED IN Wistar RATS

AUTHOR: Gabriela Buzatti Cassanego
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann

The liver is a very versatile organ and is responsible for maintaining body homeostasis. The role it exerts physiologically makes it vulnerable to the development of pathologies, being of great clinical relevance. *Baccharis trimera* (Less.) DC., popularly known as "carqueja" and *Morus nigra* Linnaeus, also called "amoreira-preta", are used by the population for the prevention and treatment of liver diseases, however their efficacy is not fully elucidated in the literature. The aim of the study was to perform the phytochemical analysis and to evaluate the potential hepatoprotective activity of the ethanolic extract of *B. trimera* (EFBT) and *M. nigra* (EFMN), against hepatic damage induced by thioacetamide. Thirty mice were used, divided into 5 experimental groups (n=6). The animals were pre-treated orally with 60 °GL solution, silymarin 50 mg/kg, EFBT 400 mg/kg and EFMN 1000 mg/kg, for three weeks. Induction of hepatic damage was induced by administering two doses of TAA 300 mg/kg intraperitoneally on 20th and 21st days. To the control group, it was administered solution saline 0,9%. The chromatographic profile of the EFBT revealed epicatechin and apigenin as the major constituents of the EFBT. Rutin was the main compound found in the EFMN. The results showed that TAA induced liver damage by increasing the levels of enzymes AST, ALT, GGT and LF count, and reducing PT, PQ and PPT levels. The treatment with EFBT was able to reduce the levels of the AST and GGT enzymes, in addition to reducing the LF, and the treatment with EFMN significantly reduced only the levels of the GGT enzyme. The administration of EFBT normalized the body weight gain and consequently the liver weight of the previously treated animals when compared to the groups. The macroscopic and histopathological analyzes of the liver are in agreement with the results previously described for the study. It was observed that the administrations of the silymarin and EFBT reduced the lipoperoxidation in the hepatic tissue when compared to the TAA group. Therefore, we can conclude that the model of induction of hepatic damage using TAA, was effective in its purpose. The present investigation demonstrated that previous treatment with EFBT attenuated the liver damage caused by TAA, proving to be a promising natural source for pharmacological use. The administration of EFMN did not present significant results when compared to the silymarin and EFBT group, thus, it is necessary to perform more studies with the plant.

Key words: Asteraceae. Moraceae. Hepatotoxicity. *In vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1 - *Baccharis trimera* (carqueja) - Aspecto geral. Disponível em: <http://www.fitoterapicos.info/carqueja.php>.....22
- Figura 2 - *Morus nigra* (amoreira preta) - Aspecto geral. Disponível em: https://jb.utad.pt/especie/morus_nigra.....24

MANUSCRITO

- Figure 1. Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência representativa da detecção do EFBT. Ácido clorogênico (pico A), catequina (pico B), epicatequina (pico C), luteolina (pico D) e apigenina (pico E).....42
- Figura 2. Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência representativa da detecção do EFMN. Ácido clorogênico (pico A), ácido caféico (pico B) e rutina (pico C).....43
- Figura 3. Resultados referentes à presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no tecido hepático dos grupos experimentais (n= 6). Os resultados são expressos como média \pm DP. Teste de variância one-way ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Níveis expressos em nmol MDA/mg de proteína. ^a comparado com o grupo controle; ^b comparado com o grupo TAA.....44
- Figura 4. Aparência macroscópica do fígado. (A) controle- forma anatômica e aparência normal, a superfície é lisa e regular. (B) TAA- apresenta superfície nodular rugosa, com distribuição uniforme de micronódulos e macronódulos. (C) silimarina- superfície lisa, com presença de micronódulos. (D) EFBT 400 mg/kg e (E) EFMN 1000 mg/kg- apresentam superfície quase lisa e poucos micronódulos. As imagens presentes são amostras representativas (n = 6), para ampliação da imagem foi utilizada lente (200X).....45
- Figura 5. O tecido hepático do grupo controle (A) mostra arquitetura hepática normal, (B) grupo TAA apresenta perda da arquitetura normal, com a presença de infiltrado inflamatório, necrose centrolobular de hepatócitos associada a alterações apoptóticas (C) grupo silimarina mostra infiltrado leve de células mononucleares (D) EFMN e (E) EFMN ainda apresentam infiltrado de células mononucleares, além de pequenas áreas de necrose em (E). As secções são de amostras representativas (n = 6), o aumento utilizado foi de 50 μ45

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1. Constituintes do extrato etanólico de folhas de <i>Baccharis trimera</i>	47
Tabela 2. Constituintes do extrato etanólico de folhas de <i>Morus nigra</i> L.....	47
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos (soro) dos animais utilizados no experimento...48	
Tabela 4. Parâmetros hematológicos em ratos Wistar.....	49
Tabela 5. Relação do peso corporal, peso do fígado e IHS dos animais em estudo.....	50

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase, do inglês <i>alanine aminotransferase</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
AST	Aspartato aminotransferase, do inglês <i>aspartate aminotransferase</i>
ATCC	Coleção de cultura americana, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COL	Colesterol total
CRE	Creatinina
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EFBT	Extrato Etanólico das folhas de <i>Baccharis. trimera</i>
EFMN	Extrato Etanólico das folhas de <i>Morus nigra L.</i>
GGT	Gama glutamil transferase
GLI	Níveis de glicose no sangue, do inglês <i>blood sugar levels</i>
°GL	Gay Lussac
GPx	Glutaciona peroxidase, do inglês <i>glutathion peroxidase</i>
GSH	Glutaciona
H&E	Eosina e hematoxilina, do inglês <i>hematoxylin and eosin</i>
HG	Hemoglobina
HT	Hematócrito
IHS	Índice hepatossomático
IP	Intraperitoneal
LF	Linfócitos
LCT	Leucócitos totais
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPO	Lipoperoxidação
LTDA	Limitada
MDA	Malondialdeído
NOX	Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase
VCM	Volume corpuscular médio
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
PMAQ	Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PPT	Proteína plasmática total
PQ	Plaquetas
PT	Proteína total
HC	Eritrócitos
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS
RLs	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase

SUS	Sistema Único de Saúde
TAA	Tioacetamida
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TRI	Triglicerídeos
URE	Uréia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 FÍGADO: FUNÇÃO E PATOLOGIAS RELACIONADAS.....	14
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	16
1.3 PLANTAS MEDICINAIS	17
1.3.1 Atividade hepatoprotetora de plantas medicinais	19
1.3.2 Descrição da família Asteraceae e espécie <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	20
1.3.3 Descrição da família Moraceae e espécie <i>Morus nigra</i> Linnaeus	23
1.4 OBJETIVOS.....	25
1.4.1 Objetivo geral.....	25
1.4.1 Objetivos específicos.....	25
2 MANUSCRITO	26
3 CONCLUSÃO	51
ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA TIOACETAMIDA	61
ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA SILIMARINA	62
ANEXO C – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 FÍGADO: FUNÇÃO E PATOLOGIAS RELACIONADAS

O fígado é considerado o segundo maior órgão do corpo humano (NAGATO et al., 2011) com um peso médio de 1500 g, representando 2,5 a 4,5% da massa corporal total. Está localizado na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, recebe através da veia porta 80% de sangue rico em nutrientes e pouco oxigenado, os 20% de sangue restante rico em oxigênio, são provenientes da artéria hepática (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A organização funcional e o fluxo sanguíneo próprio permitem ao fígado realizar atividades vitais, essenciais à manutenção da homeostasia corporal. Dentre elas estão funções metabólicas, catabólicas, secretoras, excretoras, de síntese e de armazenamento (THOMSON & KNOLLE, 2010).

Sendo capaz de sintetizar albumina e fatores de coagulação, armazenar glicogênio, triglicerídeos, ferro e vitaminas, controlar a homeostase de glicose, remover amônia do sangue e sintetizar e secretar a bile. Além disso, os hepatócitos, principais células do fígado, são conhecidos por sua capacidade de degradar e detoxificar compostos, entre eles os hormônios esteróides, proteínas séricas, fármacos, toxinas, contaminantes ambientais e o álcool (THOMSON & KNOLLE, 2010).

O papel desempenhado por esse órgão na remoção dessas substâncias do sistema o torna suscetível a ataques, culminando em disfunções hepáticas (BODAKHE & RAM, 2007). Várias são as doenças que acometem o fígado, sendo as principais: cirrose hepática (doença crônica), hepatite viral (infecção viral sistêmica), icterícia (concentração aumentada de bilirrubina no sangue), hipertensão porta e ascite (alterações circulatórias dentro do fígado já comprometido), deficiências nutricionais (incapacidade das células hepáticas lesionadas de metabolizar determinadas vitaminas) e encefalopatia hepática (acúmulo de amônia no soro devido ao comprometimento do metabolismo proteico) (BRASIL, 2016).

Com relação aos transplantes de órgãos, no ano de 2017, houve um aumento de 1,1% nos transplantes de fígado. Estima-se que entre janeiro de 2008 e junho de 2018, tenham sido realizados 17.930 transplantes de fígado no país. Até setembro

de 2018, 1.273 pacientes encontravam-se na lista de espera para transplante, sendo 66, pacientes pediátricos (ABTO, 2018).

Dentre as causas responsáveis pelo aumento de número de casos de disfunções hepáticas, destacamos a lesão hepática induzida por medicamentos, representando um grande desafio clínico e regulatório (RUSSMANN et al., 2009).

O uso de modelos animais adequados, nas últimas décadas, tem contribuído para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela lesão hepatotóxica. Sendo as lesões patológicas originadas por hepatotoxinas semelhantes a várias formas de doenças hepáticas, demonstram contribuir para a avaliação de novos compostos hepatoprotetores (ABUL et al., 2002; BRUCK et al., 2004).

Em estudos, as hepatotoxinas mostraram afetar em primeira instância a região centrolobular do fígado, onde existem altos níveis de oxidases hepáticas do citocromo P450, que medeiam sua conversão em intermediários tóxicos, seguida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), lipoperoxidação (LPO), dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e liberação de citocinas pró-inflamatórias (LUSTER et al., 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A tioacetamida (TAA) é um xenobiótico conhecido como agente hepatotóxico, indutor de cirrose e de câncer (FITZHUGH & NELSON, 1948; BUEGE & AUST, 1978). Sua administração desencadeia a morte de células hepáticas por necrose centrolobular e apoptose (DIEZ-FERNANDEZ et al., 1996; FONTANA et al., 1996). O efeito citotóxico da TAA está relacionado ao seu metabólito S-dióxido, que é instável e reativo, proveniente da biotransformação da TAA mediada pela isoenzima CYP4502E1 (CYP2E1), que inicia a necrose e a geração de EROs, ligando-se covalentemente a macromoléculas de fígado (PORTER & NEAL, 1978; WANG et al., 2000). É amplamente utilizada para o estudo do desenvolvimento do processo patológico e para a pesquisa de terapias alternativas para o seu tratamento (AL-ATTAR et al., 2012; BARDI et al., 2014; KIM et al., 2017; KOPPULA et al., 2017).

Por mais que avanços científicos no campo da hepatologia clínica tenham ocorrido nos últimos anos, os problemas relacionados a disfunções hepáticas continuam em ascensão. Uma abordagem para o tratamento de transtornos hepáticos é o uso de plantas medicinais, um recurso terapêutico muito antigo de baixo custo e fácil acesso, adotado por muitas comunidades e grupos étnicos, no entanto, grande parte delas não possui comprovação científica (JAMAL et al., 2009;

ANBARASU et al., 2012; DAS et al., 2012; ESMAT et al., 2013; BANDI et al., 2014; KIM et al., 2017; KAUR et al., 2017).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres (RL) são moléculas orgânicas e inorgânicas instáveis e reativas, que contêm um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL, 1994). Os mecanismos de geração de radicais livres como radical superóxido, radical hidroxila e espécies intermediárias como o peróxido de hidrogênio, também conferido a estas substâncias o termo de espécies reativas de oxigênio (EROs), geralmente ocorrem nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Sendo a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, a principal geradora de substâncias oxidantes e radicais livres por diferentes tecidos através de reações redutivas do oxigênio molecular (PISOSCHI & POP, 2015). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante a transferência de elétrons, que ocorrem no metabolismo celular normal em decorrência desta produção pode ser iniciado o processo de estresse oxidativo (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O estresse oxidativo é um processo derivado do desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, causado pela geração excessiva de radicais livres ou na perda da velocidade de remoção destes (BARBOSA et al., 2010). Esse desequilíbrio desencadeia a oxidação de biomoléculas, com perda de funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, ocasionando dano oxidativo contra células e tecidos (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Dispondo de grande influência nos processos de senescência, mutação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, como as doenças hepáticas. Por outro lado, é também fato conhecido que as EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) desempenham papéis fisiológicos importantes como sinalização celular, apoptose, fagocitose de agentes patogênicos, controle da pressão sanguínea, entre outros (NIMSE & PAL, 2015).

Os sistemas biológicos desenvolveram formas de defesa (antioxidante) com a função de inibir ou minimizar os danos causados pela ação das EROs ou das ERNs (BIRBEN et al., 2012).

Antioxidante é definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações, retarda ou inibe a oxidação do substrato oxidável de maneira eficaz” (SIES & STAHL, 1995). Tais atividades podem ser alcançadas através de diferentes mecanismos de ação, como o sistema de prevenção, o sistema varredor (*scavenger*) e o sistema de reparo, sendo dividido em sistema enzimático e não enzimático (BIRBEN et al., 2012; OROIAN & ESCRICHE, 2015).

Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, a oxidação de biomoléculas é favorecida, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A primeira linha de defesa, o sistema enzimático é constituído pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). Há também o sistema não enzimático engloba os compostos antioxidantes de origem dietética, como vitaminas, minerais, flavonoides e carotenóides (NIMSE & PAL, 2015).

Os marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídios, proteínas e DNA, sendo os primeiros os de maior expressão (NIMSE & PAL, 2015). Outra forma de abordar a avaliação do estresse oxidativo é empregando métodos indiretos, baseados na capacidade antioxidante, como o malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da lipoperoxidação (LPO), processo de dano da membrana de proteínas e lipídeos, que ocorre fisiologicamente, frequentemente estimado como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) (NIMSE & PAL, 2015). Assim, os marcadores do estresse oxidativo constituem ferramentas notáveis na avaliação dos possíveis efeitos das plantas medicinais no referido processo (BARBOSA et al., 2010).

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais pela população, como terapia para o tratamento de muitas doenças, é uma prática comum desde os primórdios da sociedade. No entanto, apenas no século XIX foram iniciadas as buscas por compostos ativos presentes em plantas medicinais, levando assim à concepção dos primeiros medicamentos com as características que conhecemos atualmente (DUTRA et al., 2016). No Brasil o uso de plantas medicinais para prevenir e tratar enfermidades foi

introduzido principalmente pelas comunidades indígenas e quilombolas (SIEGEL et al., 2016).

Embora avanços tenham ocorrido na fitoterapia nos últimos anos, as plantas medicinais continuam sendo utilizadas, principalmente pelo baixo custo e fácil acesso, sem embasamento científico, persistindo a crença de que estas substâncias são isentas de efeitos nocivos à saúde (BARATA, 2008; TOVAR & PETZEL, 2009). No entanto, estudos toxicológicos revelam que muitas plantas podem ser nocivas à saúde ou até mesmo letais (VERDI et al., 2005; COSTA et al., 2009; LAKSHMANAN et al., 2016).

O Ministério da Saúde através da Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006, instituiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), incluindo a fitoterapia, o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, como opção aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a). No mesmo ano, ocorreu a implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelecendo as principais ações para garantir o uso racional de plantas medicinais de acordo com a legislação nacional (BRASIL, 2006b).

Em 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), lista composta por 71 plantas medicinais, relação de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva, incluindo regulamentação, cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação das mesmas (BRASIL, 2009).

Dentre as últimas iniciativas para promover maior compreensão sobre a disponibilidade e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária, encontra-se o Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ), Portaria nº 1.645, do Ministério da Saúde, publicada em de 2 de outubro de 2015 (BRASIL, 2015). Este inclui informações sobre a disponibilidade da planta seca, fresca, medicamento fitoterápico manipulado ou industrializado presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) para uso no SUS (BRASIL, 2004; CACCIA-BRAVA et al., 2015).

Dessa forma, os pesquisadores são encorajados a realizar estudos para promover o desenvolvimento e a inovação no campo de plantas medicinais, acerca de suas possíveis atividades farmacológicas, garantindo a eficácia das mesmas (CARVALHO et al., 2014).

1.3.1 Atividade hepatoprotetora de plantas medicinais

Apesar dos avanços na medicina, não existem medicamentos completamente eficazes que ofereçam proteção completa para o fígado e que auxiliem na regeneração de células hepáticas. Dessa forma a utilização de plantas e seus compostos desempenham papel fundamental na área da saúde, como uma alternativa terapêutica mais eficiente e menos tóxica (MARMITT et al., 2016).

O pré-tratamento de camundongos com extratos hexânico e etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. preveniu a elevação das enzimas hepáticas AST e ALT, em modelo de lesão hepática aguda induzida pelo etanol (PEREIRA et al., 2010). Estudo realizado por Al-attar et al. (2012), mostrou que a suplementação de ratos com extrato de folhas de *Ginkgo biloba* apresentou atividade potencial contra a fibrose hepática induzida pela TAA e sugere que os constituintes químicos de *G. biloba* foram efetivos na modulação do estresse oxidativo.

Os extratos, aquoso e etanólico das folhas de *Oxalis corniculata* L., reduziu significativamente os níveis das enzimas bioquímicas (AST, ALT e GGT), da albumina, e da necrose observada em secções do fígado. Assim, Das e colaboradores (2012) concluíram que os extratos das folhas de *O. corniculata* possuem potencial atividade hepatoprotetora.

Koppula e colaboradores (2017) investigaram os efeitos antifibróticos do extrato de *Orostachys japonica* em experimento *in vitro* e *in vivo*. E concluíram que o extrato aumentou a apoptose em células estreladas do fígado (HSC-T6) *in vitro* e minimizou a fibrose hepática induzida por TAA *in vivo*. Fornecendo assim evidências científicas para o uso tradicional do extrato da planta para tratar doenças do fígado.

O extrato de *Cuscuta chinensis* Lam. mostrou efeitos hepatoprotetores, evidenciados pelo aumento da apoptose, impedindo o acúmulo de membrana extra celular e diminuindo o colágeno nas células HSC-T6. Além disso, foi capaz de atenuar os níveis de AST, ALT, glutathiona (GSH) e a hidroxiprolina no modelo *in vivo* de fibrose hepática induzida pela TAA em ratos (KIM et al., 2017)

Em estudo realizado por Kaur e colaboradores (2017), foram avaliadas as propriedades hepatoprotetoras da fração acetato de etila da casca de *Butea monosperma* (Beac), em modelo de roedor. O pré-tratamento com Beac mostrou ser capaz de normalizar os marcadores bioquímicos, restaurar a capacidade antioxidante bem como reduzir para o nível normal os marcadores de fibrose,

colágeno e hidroxiprolina. A Beac também inibiu consideravelmente a expressão da proteína Akt fosforilada (p-Akt), do fosfatidilinositol-3-cinase fosforilado (p-PI3K) e do alvo de rapamicina fosforilada (p-mTOR) em hepatócitos.

As folhas da *Andrographis panicula* protegeram significativamente o fígado contra a indução pela TAA, quando foram avaliadas quanto a sua possível atividade hepatoprotetora tanto *in vitro* como *in vivo* (BARDI et al., 2014). Mostrando assim a importância de estudos que comprovem a eficácia das plantas utilizadas na medicina popular.

1.3.2 Descrição da família Asteraceae e espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC.

A família Asteraceae, possui cerca de 1.500 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies. É representada por plantas extremamente heterogênicas, abrangendo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. (ALMEIDA-CORTEZ et al., 1999). Plantas dessa família são amplamente pesquisadas quanto à sua composição química e atividade biológica. O gênero *Baccharis*, membro da família Asteraceae, é constituído por cerca de 500 espécies.

As espécies deste gênero têm porte arbustivo, com altura entre 0,5 e 4,0 metros. São constituídas por arbustos bastante ramificados, caules e ramos verdes com expansões di e trialadas. As inflorescências são do tipo capítulo, dispostas lateralmente nos ramos, de cor esbranquiçada, aparecendo desde o fim do verão até começo do outono (figura 1) (LORENZI & MATOS, 2002).

Popularmente conhecida como “carqueja”, “carqueja-amarga”, “carqueja-domato” e “tiririca-de-balaio”, a *Baccharis trimera* (Less.) DC. representa uma das 120 espécies do gênero *Baccharis* encontradas no Brasil. É considerada uma planta invasora de pastagens, adaptada a solos pobres e ácidos, ocorrendo principalmente em áreas pedregosas, margens das estradas, barrancos e lugares úmidos nas ribanceiras dos rios (VICHNEWSKI et al., 1990; CORREA JÚNIOR et al., 1994). Está presente na lista de 71 plantas da RENISUS, apresenta ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul (VERDI et al., 2005) sendo utilizada pela população como recurso terapêutico para o tratamento de doenças gastrointestinais e do fígado, distúrbios renais, reumatismo, anginas e diabetes (GRANCE et al., 2008).

Figura 1 – *Baccharis trimera* (carqueja) - Aspecto geral.



Fonte: Disponível em <<http://www.fitoterapicos.info/carqueja.php>>

Análises fitoquímicas mostram que os principais constituintes relatados dessa espécie são flavonoides, diterpenos e triterpenos, além de saponinas, taninos, compostos fenólicos e óleos essenciais (VERDI et al., 2005).

Muitas pesquisas já foram desenvolvidas com o intuito de comprovar os efeitos biológicos atribuídos à *B. trimera*. Avancini et al. (2000) comprovaram a atividade antimicrobiana, microbiostática e microbicida do decocto da carqueja utilizando os inóculos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli*, podendo ser utilizado na higienização do ambiente nos sistemas de saúde e de produção animal.

Oliveira et al. (2005) comprovaram o efeito hipoglicemiante após verificar que o tratamento de sete dias com diferentes doses dos extratos de partes aéreas de *B. trimera* reduziu os níveis de glicose de camundongos diabéticos.

Dias et al. (2009) mostraram a atividade antiúlcera *in vivo* do extrato liofilizado de carqueja em camundongos. Segundo Rodrigues et al. (2009), o extrato aquoso da *B. trimera* aumentou a frequência de micronúcleos na medula óssea de camundongos, indicando uma atividade mutagênica, quando em altas doses.

Em estudos com humanos submetidos a tratamento de 30 dias com cápsulas de carqueja desidratada, Figueiredo e Pereira (2009) encontraram ação no tratamento na redução de peso, na motilidade intestinal e na redução do apetite. A atividade anti-inflamatória foi comprovada por Paul et al. (2009) após tratamento com extrato aquoso e por Oliveira et al. (2012) após tratamento com extrato fenólico em ratas.

Já Pádua et al. (2010) verificaram a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera* em estudo *in vitro* e *in vivo* em um modelo de inflamação hepática induzida por paracetamol em ratos. Souza et al. (2011) concluíram que o extrato metanólico de *B. trimera* tem elevada ação na inibição da lipase pancreática, podendo ser promissora no tratamento da obesidade. Em pesquisa *in vitro*, onde foram avaliados os compostos polifenóis e terpenóides da *B. trimera*, concluiu-se que os mesmos induzem a morte de células humanas de câncer de colo do útero (OLIVEIRA et al., 2013).

No ano seguinte, Pádua et al. (2014) concluíram, através dos níveis aumentados de enzimas antioxidantes e a quantidade reduzida de produtos da peroxidação, que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* tem efeito hepatoprotetor contra a toxicidade induzida por paracetamol em ratos.

Em modelo alternativo de *Caenorhabditis elegans* mostrou uma melhora da resposta ao estresse oxidativo, sugerindo que o extrato hidroetanólico de partes aéreas da carqueja pode ter um potencial uso neuroprotetor (PAIVA et al., 2015).

Estudos de toxicidade aguda e subaguda (28 dias) foram realizados com a tintura das folhas de *B. trimera*, onde a mesma foi considerada como relativamente segura, pois não causou morte nem toxicidade para os principais órgãos em ratos Wistar de ambos os sexos (SILVA et al., 2016).

Lívero et al. (2016) mostraram a promissora atividade do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *B. trimera* para o tratamento de esteatose hepática alcoólica, através de mecanismos envolvidos no desequilíbrio de lipídios, estresse oxidativo e metabolismo do álcool.

Em trabalho realizado por Lima et al. (2017) concluiu-se que a administração do extrato aquoso de *B. trimera* tem efeito positivo na regeneração hepática em ratos, 24 horas após a hepatectomia parcial de 70% do fígado.

Araújo et al. (2017) forneceram a primeira evidência de um mecanismo de sinalização desencadeado pela *B. trimera* para modular a produção de EROs. Podendo o efeito inibitório ser explicado pela inibição da expressão e atividade da proteína quinase C, e pela inibição da fosforilação da unidade p47^{phox} de regulação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NOX). Justificando assim o potencial efeito antioxidante exercido pelo extrato hidroetanólico de *B. trimera*.

Nascimento et al. (2017) realizaram estudo demonstrando o efeito potencial dos extratos de *B. trimera* na diferenciação de pré-adipócito 3T3-L1 em adipócitos.

Os extratos mostraram atividades antioxidantes dose-dependente em todos os testes, sendo a carqueja uma promissora alternativa para estratégias terapêuticas disponíveis contra a obesidade. Silva et al. (2018) analisaram a toxicidade aguda da tintura da folha de *B. trimera* e sua capacidade antimicrobiana. Concluíram, através dos resultados, que a tintura é considerada segura quanto à toxicidade e que possui uma atividade antimicrobiana relevante, principalmente contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (isolado clínico), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), devendo ser elucidada em pesquisas subsequentes.

1.3.3 Descrição da família Moraceae e espécie *Morus nigra* Linnaeus

A Moraceae é uma família botânica de plantas com flores, que compreende cerca de 40 gêneros e mais de 1.000 espécies (PAWLOWSK, et al., 2008). Dentre a família Moraceae, destaca-se o gênero *Morus*, ao qual pertencem 24 espécies e uma subespécie, amplamente distribuída pela Ásia, Europa, América do Norte, América do Sul e África (ÖZGEN et al., 2009; PADILHA et al., 2010).

A *Morus nigra* L., conhecida como “amoreira-preta”, presente na lista da RENISUS, é uma das espécies de maior destaque do gênero *Morus*. Representada por árvores que podem atingir até 9 metros de altura, apresentando folhas ovaladas, flores mono ou dióicas, frutos suculentos, com 2-3 cm de comprimento, de coloração roxa à preta que no estágio máximo de maturação apresentam sabor levemente ácido (Figura 2) (KUMAR & CHAUHAN, 2008; ÖZGEN et al., 2009). É considerada uma planta de jardim, encontrada nas regiões de baixa temperatura como no sul e sudeste do Brasil (PAWLOWSK, et al., 2008; MOHIUDDIN et al., 2011).

Esta espécie contém uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, estilbenos, bem como triterpenóides e alcalóides, destacando-se os ácidos fenólicos, rutina e quercetina (KUMAR & CHAUHAN, 2008). Segundo Feng et al. (2015) a *M. nigra*, que tem sido usada na medicina popular como analgésico, diurético, antitussígeno, sedativo, ansiolítico e hipotensivo, além de seus usos no tratamento de distúrbios inflamatórios (NOMURA & HANO, 1994).

Figura 2 -*Morus nigra* (amoreira preta) - Aspecto geral.



Fonte:Disponível em<https://jb.utad.pt/especie/morus_nigra>

A atividade anti-inflamatória do extrato de folhas de *Morus nigra* L. foi testada por Padilha et al. (2010) em modelos animais, utilizando o edema de pata induzido por carragenina e o crescimento de tecido fibrovascular. Ao longo da pesquisa, ficou evidente o efeito anti-inflamatório do extrato por redução no edema de pata e inibição significativa da formação de tecido granulomatoso, sendo o ácido betulínico, β -sitosterol e germanicol os possíveis responsáveis por esse efeito.

No mesmo ano, pesquisa etnomédica realizada por Miranda et al. (2010) mostrou o uso do chá nas formas de infusão ou decocção da amoreira-preta no tratamento de sintomas do climatério.

Em estudo Agabeyli (2012) apresenta a propriedade genoprotetora do extrato hidroetanólico de folhas de *Morus Alba* e *Morus nigra*. Após verificação da redução dos níveis de mutações cromossômicas induzidas por produtos químicos e radiação, em ratos Wistar.

Araujo (2015) mostrou que o tratamento de ratos diabéticos com o extrato hidroetanólico de folha de amoreira-preta reduziu a hiperglicemia, os níveis de metaloproteinases da matriz (MMP-2), proteína carbonilada e o estresse oxidativo. O extrato etanólico de folhas de *M. nigra*, quando incorporado a cosméticos, pode ser considerado um agente de branqueamento natural, promissor contra hiperpigmentação da pele, devido à sua capacidade de inibir a enzima tirosinase (FREITAS et al., 2015). Já o extrato bruto mostrou atividade antinociceptiva, através de mecanismos de ação periférica, observada nos testes das contorções abdominais e da formalina em camundongos (SOUZA et al., 2015).

A *M. nigra* apresenta potencial para melhorar o déficit cognitivo e pode ser considerada útil para minimizar os efeitos do envelhecimento, grande parte devido a sua alta capacidade antioxidante, reduzindo níveis de MDA e elevando SOD, CAT e GPx (TURGUT et al., 2015).

Souza et al. (2016) determinaram a ausência de citotoxicidade e alta atividade antibacteriana e antioxidante do extrato bruto de *M. nigra*, relacionando esses fatores principalmente a presença de compostos fenólicos e flavonoides.

Segundo estudo de Jiang et al. (2017) o extrato etanólico dos frutos de amoreira-preta foi capaz de inibir o desenvolvimento da aterosclerose em ratos ateroscleróticos, regulando o metabolismo lipídico, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e reduzindo as lesões arteriais, fatores possivelmente atribuídos às antocianinas ou à ação cooperativa de antocianinas, polifenóis e flavonoides. No entanto, os autores afirmam que os mecanismos ainda precisam ser elucidados em estudos adicionais.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fitoquímico e a possível atividade hepatoprotetora do extrato etanólico de folhas de *B. trimera* e do extrato etanólico de folhas de *M. nigra*, frente à indução de dano hepático utilizando a tioacetamida em ratos Wistar.

1.4.1 Objetivos específicos

- Delinear o perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *B. trimera*;
- Delinear o perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *M. nigra* L.;
- Induzir um modelo experimental de dano hepático em ratos Wistar;
- Analisar parâmetros hematológicos e bioquímicos;
- Relacionar peso corporal, peso do órgão e índice hepatossomático;
- Analisar macroscópica e histopatologicamente o fígado;
- Avaliar a lipoperoxidação no tecido hepático.

2MANUSCRITO

O presente manuscrito será traduzido para o inglês e submetido ao periódico “*Journal of Ethnopharmacology*”.

Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólicos de *Baccharis trimera* (Less.) DC. e *Morus nigra* Linnaeus frente à indução de dano hepático pela tioacetamida em ratos Wistar

Gabriela Buzatti Cassanego^{a,*}, Camille Gaube Gueux^a, Thainara de Andrade Fortes^a, Rafaela Castro Dornelles^a, Lauren Pappis^a, Ana Martiele Engelmann^b, Roberto Marinho Maciel^c, Gilberti Helena Hübscher Lopes^d, Liliane de Freitas Bauermann^a

^a*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^b*Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^c*Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^d*Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

* Autor Correspondente:

Gabriela Buzatti Cassanego

E-mail: gabrielacassanego@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, RS, Brasil. Telefone: (55) 3220 9380

Resumo

Relevância etnofarmacológica: A *Baccharis trimera* (Less) DC. popularmente conhecida como “carqueja”, planta nativa do Brasil, é utilizada na medicina popular principalmente para o tratamento de distúrbios hepáticos e digestivos. A *Morus nigra* L. é uma planta conhecida como “amoreira preta”, utilizada popularmente para amenizar os sintomas do climatério, como anti-inflamatória, antidiabética, anti-hipertensiva e hepatoprotetora. Apesar do uso das plantas como hepatoprotetoras, a eficácia das mesmas não está totalmente elucidada. **Objetivo do estudo:** Avaliar a possível atividade hepatoprotetora dos extratos etanólicos de folhas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (EFBT) e *Morus nigra* L. (EFMN) frente à indução de dano hepático pela tioacetamida (TAA). **Materiais e métodos:** A composição química dos extratos foi realizada por CLAE-DAD. Para análise *in vivo*, foram utilizados 30 ratos Wistar Machos, sendo eles divididos em 5 grupos experimentais (n=6). Os animais foram tratados via oral com solução 60°GL, silimarina 50 mg/kg, EFBT 400 mg/kg e EFMN 1000 mg/kg, durante 3 semanas. Para a indução do dano hepático, duas doses de TAA 300 mg/kg foram administradas via intraperitoneal (i.p), nos dois últimos dias do experimento. Ao grupo controle foi administrado, via i.p, solução salina 0,9%. Ao final da 3ª semana, os ratos foram eutanasiados. Avaliações do tecido hepático, parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados, bem como análise fitoquímica dos extratos etanólicos. **Resultados:** A epicatequina e a apigenina apresentaram-se como os constituintes majoritários do EFBT. A rutina foi o principal composto no EFMN. Os resultados mostraram que a TAA induziu dano hepático com aumento da AST, ALT, GGT e PT. O tratamento com EFBT minimizou os níveis das enzimas AST, GGT e MDA já o EFMN reduziu significativamente os níveis de GGT. O grupo EFBT apresentou redução de LF e restaurou o ganho de peso dos animais previamente tratados, quando comparado com o grupo TAA. As análises macroscópicas e histopatológicas do fígado estão de acordo com os resultados até então descritos. **Conclusão:** A presente investigação demonstrou que o tratamento prévio com EFBT minimizou o dano hepático causado pela TAA, mostrando-se como uma fonte natural promissora para utilização farmacológica. Já a administração de EFMN não apresentou resultados significativos quando comparado ao grupo silimarina e EFBT, sendo necessária assim a realização de mais estudos com a planta.

Palavras-chave: plantas medicinais, carqueja, amoreira preta, hepatotoxicidade, protetor hepático, *in vivo*.

Compostos químicos estudados no presente artigo: Ácido cafeico (PubChem CID: 689043); Ácido clorogênico (PubChem CID: 1794427); Apigenina (PubChem CID: 5280443); Catequina (PubChem CID: 9064), Epicatequina (PubChem CID: 72276); Luteolina (PubChem CID: 5280445); Rutina (PubChem CID: 5280805).

Abreviações: EFBT - extrato etanólico das folhas de *Baccharis trimera*; EFMN - extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L.; TAA - tioacetamida.

1. Introdução

O fígado realiza atividades que são vitais a homeostasia corporal, como síntese, armazenamento, metabolização, secreção e excreção de uma grande variedade de substâncias, pelo papel essencial que desempenha é um órgão vulnerável a diferentes formas de patologias (Bodakhe & Ram, 2007; Thomson & Knolle, 2010). O uso de plantas medicinais como terapia para o tratamento de muitas doenças percorre toda evolução humana (Dutra et al., 2016).

Entre elas encontramos a *Baccharis trimera* (Less.) DC., planta nativa do Brasil, popularmente conhecida como “carqueja”, pertencente à família Asteraceae. Atividades biológicas como hipoglicemiante (Oliveira et al., 2005), antiinflamatória (Paul et al., 2009; Oliveira et al., 2012), anticancerígena (Oliveira et al., 2013) antioxidante (Pádua et al., 2010; de Araújo et al., 2017), antimicrobiana (Silva et al., 2018), e antiobesidade (Souza et al., 2011; Nascimento et al., 2017) já foram descritas para a planta, bem como seu emprego no tratamento de doenças gastrointestinais e do fígado (Grance et al., 2008; Pádua et al., 2014; Lívero et al., 2016; Lima et al., 2017).

O extrato etanólico das folhas de *B. trimera* foi considerado seguro, após toxicidades aguda e de doses repetidas serem realizadas em trabalho de Silva et al. (2016), pois o extrato não causou morte nem toxicidade para os principais órgãos em ratos Wistar. Ademais, os principais constituintes descritos para a espécie foram flavonóides e terpenóides (Lima et al., 2017).

A *Morus nigra* L., pertence à família Moraceae é popularmente conhecida como “amoreira preta”, apresenta uma variedade de compostos fenólicos, bem como triterpenóides e alcalóides (Kumar & Chauhan, 2008; Feng et al., 2015). Atividades anti-inflamatória (Padilha et al., 2010), hipoglicemiante (Araujo, 2015), antinociceptiva (Souza et al., 2015), antioxidante (Turgut et al., 2015) e genoprotetora (Agabeyli, 2012) já foram identificadas na espécie.

Figueredo et al. (2018) demonstraram a não toxicidade do extrato das folhas de *M. nigra*, quanto as toxicidades aguda e de doses repetidas e a melhora dos marcadores bioquímicos hepáticos de ratos Wistar, após tratamento. Dessa forma, o trabalho tem como objetivo investigar se o extrato etanólico de folhas de *B. trimera* e o extrato etanólico de folhas de *M. nigra* são capazes de proteger e/ou amenizar os danos ao fígado, quando este é exposto a tioacetamida (Stefanello et al., 2017).

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

O extrato etanólico das folhas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (EFBT) e o extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (EFMN) foram obtidos através da empresa Florien (Estrada Vicente Bellini, 175, Piracicaba - SP, Brasil). Os requisitos avaliados para certificação de análise de qualidade realizada foram: análise botânica, características físico-químicas (aspecto, elementos estranhos, solubilidade, densidade, pH e teor alcoólico) e análise microbiológica (contagem total de bactérias, fungos e leveduras).

2.2 Produtos químicos

A tioacetamida PA (TAA), da marca Exodo, foi adquirida por intermédio da empresa Metaquímica Produtos LTDA (Rua Santília Rues Rengel, 144, Ilha da Figueira, Jaragua do Sul, SC, Brasil). A Silimarina foi obtida na Dermaris Farmácia de Manipulação (Rua Erly de Almeida Lima, 188, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil). Todos os demais reagentes químicos eram de grau analítico.

2.3 Quantificação de compostos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Os EFBT e EFMN foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), utilizando cromatógrafo líquido (SHIMADZU, Kyoto/Japão), injetor automático SI-20^a e detector DAD SPD-M20A, controlado por Software LC SP1. A cromatografia foi conduzida em coluna analítica (Zorbax Eclipse Plus), C-18 (dimensões de 4.6 mm X 150 mm), carregada com partículas de 5 µm de diâmetro. Utilizando a fase móvel ácido acético 2% em água (A) e metanol UV/CLAE (B). O sistema de gradiente usado foi: 95% de A (0-10 min); 75% de A (10-20 min); 60% de A (20-30 min); 50% de A (30-40 min); 0% de A (40-45 min); 100% de A (45-55 min), com fluxo 0,8 mL/min e volume de injeção de 40 µl seguindo o método adaptado de Evaristo & Leitão (2001). A identificação dos polifenóis foi realizada através de comparação do tempo de retenção e espectro de absorção das amostras com o das soluções padrões. Os compostos identificados nos extratos foram quantificados, através da elaboração de curvas padrões, no qual se preparou soluções a 200

$\mu\text{g/mL}$ em metanol UV/CLAE com os padrões, e os seguintes pontos foram utilizados: 5,0; 10,0; 25,0; 35,0; 50,0; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Os teores das substâncias quantificadas foram calculados a partir da equação da reta.

2.4 Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, pesando 120-150 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em caixas de polipropileno com enriquecimento ambiental (tubos de PVC), temperatura controlada (22 ± 3 °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso a água e a ração padrão. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria, sob o nº 8460270418. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios humanitários de experimentação animal.

2.5 Desenho experimental

O estudo foi realizado conforme protocolo estabelecido por El Awdan et al. (2018), os animais foram divididos em cinco grupos experimentais ($n= 6$), sendo eles grupo controle, grupo TAA, grupo silimarina 50 mg/kg, grupo EFBT 400 mg/kg e grupo EFMN 1000 mg/kg. A solução 60°GL, a silimarina e os extratos foram administrados via oral, com o auxílio de uma gavagem, diariamente, durante 3 semanas. No 20° e 21° dia os grupos foram tratados com TAA 300 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) para indução do dano hepático, com exceção do grupo controle ao qual foi administrado solução salina 0,9%, via i.p (Silva et al., 2016; Harputluoğlu et al. 2017; Eraky et al., 2018; Figueredo et al., 2018).

Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (50 mg/kg, i.p.) e receberam analgesia com tramadol (8 mg/kg i.p.). A eutanásia foi realizada por punção cardíaca. O sangue coletado foi utilizado para realizar testes bioquímicos e hematológicos, o fígado de cada animal foi removido para análise macroscópica, peso do órgão, índice hepatossomático (IHS), histopatologia e determinação da lipoperoxidação.

2.5.1 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

As análises bioquímicas de albumina (ALB), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), uréia (URE), creatinina

(CRE), proteína total (PT), glicose (GLI), triglicerídeos (TRI) e colesterol (COL) foram realizadas utilizando kit comercial (Bioclin®) com amostras de soro dos animais e de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram processadas em analisador bioquímico automático (Mindray BS-120®).

As análises hematológicas foram realizadas em contador eletrônico (BC-2800 Vet – Auto Hematology Analyser, Mindray®) a partir de amostras acondicionadas em tubos contendo EDTA, sendo determinados os seguintes parâmetros: contagem total de glóbulos vermelhos (HC), concentração de eritrócitos totais (ET), hematócrito (HT), concentração de hemoglobina (HG), concentração de plaquetas (PQ) e concentração de leucócitos totais (LCT), volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O diferencial leucocitário foi realizado em microscopia de imersão, em aumento de 1000x, a partir de esfregaços sanguíneos confeccionados em lâmina de vidro e corados com Panótico rápido (Diff-Quick®). A proteína plasmática total (PPT) foi verificada por refratometria, utilizando-se a porção plasmática do capilar de microhematócrito.

2.5.2 Determinação do peso corporal, peso do fígado e IHS

O peso dos animais foi registrado diariamente, no mesmo horário, fazendo uso de uma balança digital. Durante todo o estudo, os ratos foram observados quanto a sinais de anormalidades como perda de peso, midríase, taquicardia e taquipneia, tremor, espasmos, contrações musculares, vocalização, agressão, salivação, tendência ao isolamento, alteração na micção e defecação, entre outros.

Após remoção e análise macroscópica, o fígado foi pesado para obtenção do peso do órgão e para determinação do IHS, calculado pela equação $IHS = \text{Peso do fígado} / \text{Peso corporal} \times 100$, uma porção do órgão foi destinada para a determinação da lipoperoxidação e outra para análise histopatológica.

2.5.3 Análise macroscópica

Fotografias dos fígados, *ex vivo*, foram tomadas para serem analisadas e comparadas entre os diferentes grupos experimentais.

2.5.4 Análise histopatológica

Seções de tecidos foram fixadas em formalina a 10%, desidratadas e embebidas em parafina para exame microscópico. Cortes de 4 μm de espessura foram corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise da estrutura histológica geral, para as fotos foi utilizado o microscópio de luz Axio Lab. A1(Carl Zeiss - Gottingen, Germany) e o programa de captura de imagens ZEN 2012 (Carl Zeiss - Gottingen, Germany).

2.5.5 Determinação da lipoperoxidação

A estimativa da lipoperoxidação (LPO) dos tecidos hepáticos foi realizada pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quantificado segundo Ohkawa et al. (1979).

2.5.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como post-hoc. Quando os requisitos para a realização do teste paramétrico não foram atingidos, Kruskal-Wallis foi utilizado como teste estatístico (GraphPad Prism Software, Inc., versão 5.0.1). Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Quantificação de compostos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

A análise cromatográfica do EFBT revelou a presença de ácido clorogênico ($t_R= 15,83\text{min}$, pico A), catequina ($t_R= 17,92\text{ min}$, pico B), epicatequina ($t_R= 20,27\text{ min}$, pico C), luteolina ($t_R= 37,88\text{ min}$, pico D) e apigenina ($t_R= 39,57\text{ min}$, pico E) (Figura 1), sendo a epicatequina e a apigenina os constituintes majoritários do extrato, conforme Tabela 1. Já a cromatografia da amostra do EFMN evidencia ácido clorogênico ($t_R= 15,87$, pico A), ácido cafeico ($t_R= 16,65$, pico B) e rutina ($t_R= 27,71$, pico C) (Figura 2), sendo a rutina o constituinte principais desse extrato (Tabela 2).

3.2 Parâmetros bioquímicos

Nosso estudo mostrou um aumento significativo nos valores de AST e ALT nos animais do grupo TAA comparados ao grupo controle e o decréscimo nos níveis de PT, TRI e GLI. O grupo EFBT apresentou uma redução significativa nos valores da AST e aumento no valor do COL, se comparado ao grupo TAA. Já no grupo EFMN foi observado um aumento nos níveis de COL, se comparados ao grupo silimarina. Os demais parâmetros bioquímicos analisados não apresentaram diferença significativa em relação a nossa pergunta de interesse (Tabela 3).

3.3 Parâmetros hematológicos

Em relação à análise hematológica (Tabela 4), um aumento no HT, da contagem de LF, na concentração de PQ e uma diminuição da PPT foram observados em animais do grupo TAA quando comparados ao grupo controle. Já os grupos silimarina e EFBT reduziram a contagem dos LF, quando comparados como grupo TAA. Os demais parâmetros não apresentaram resultados estatisticamente significantes.

3.4 Peso corporal, peso do fígado e IHS.

O peso corporal de todos os animais foi determinado diariamente até o término do experimento. O peso corporal, peso do fígado e a relação do IHS são apresentados na Tabela 5. O grupo controle obteve um ganho de peso normal de 196 a 286 g ao longo período estabelecido para o experimento. O grupo TAA reduziu o ganho de peso de seus animais com relação ao grupo controle. A administração de EFBT aumentou o peso corporal e o peso do fígado, quando comparado com os grupos TAA e silimarina. O maior IHS foi observado no grupo EFMN, quando comparado aos outros grupos.

3.5 Aparência macroscópica

Em comparação com a fisiologia normal do fígado (Figura 3A), com uma superfície regular e lisa, o fígado pertencente ao grupo TAA (Figura 3B), apresentava nódulos e conseqüentemente uma superfície áspera. O tratamento prévio com EFBT e com EFMN aumentou discretamente a recuperação dos danos induzidos por TAA, na estrutura hepática como mostra a Figura 3D e 3E.

3.6 Análise Histopatológica do fígado

Através da microscopia observamos que o fígado do grupo controle estava livre de qualquer anormalidade patológica, possuindo placas distintas de células hepáticas, espaços sinusoidais e uma veia central (Figura 4A). Já o fígado do grupo TAA (Figura 4B) mostrou perda da arquitetura normal, com infiltrados, vacuolização citoplasmática e necrose em determinados pontos. Fígados de ratos tratados com silimarina (Figura 4C), EFBT (Figura 4D) e EFMN (Figura 4E) apresentaram uma redução do infiltrado e da necrose dos hepatócitos com leve vacuolização citoplasmática.

3.7 Determinação da lipoperoxidação.

O estresse oxidativo no tecido hepático foi avaliado através do nível de MDA (malondialdeído) nos homogenatos de fígado, como mostrado na Figura 5. Os níveis de MDA aumentaram significativamente no grupo TAA comparados com os ratos do grupo controle (2,280 vs. 1,434 nmol MDA/mg de proteína). Em comparação com animais do grupo TAA, a administração de EFBT reduziu o nível de MDA (1,393 nmol MDA/mg de proteína), restaurando níveis comparáveis ao grupo controle e ao grupo silimarina. Já o EFMN apresentou valores elevados de MDA, sendo estatisticamente significativo quando comparado com o grupo silimarina (Figura 5).

4. Discussão

As desordens do fígado tornaram-se uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Entre elas, a lesão hepática induzida por drogas é uma das causas mais comuns que representam um grande desafio clínico (Zagar et al., 2017).

A TAA é um fungicida organossulfurado, considerada uma potente hepatotoxina, e frequentemente utilizada em modelos experimentais para estudar os mecanismos envolvidos na progressão da doença hepática, assim como o impacto de várias substâncias nessa progressão. A lesão hepática causada pela TAA em animais mostra semelhança com as lesões observadas nos casos de doença hepática em humanos (Esmat et al., 2013).

Uma abordagem para o tratamento de transtornos hepáticos é o uso de plantas medicinais, estudos já vêm relatando a atividade hepatoprotetora de algumas plantas como da *Ginkgo biloba* (Al-attar, 2012), *Butea monosperma* (Kaur et al., 2017), *Andrographis*

paniculata (Bardi et al., 2014), *Cuscuta chinensis* (Kim et al., 2017), *Orostachys japonicus* (Koppula et al., 2017) entre outras. No presente estudo, para impedir e/ou minimizar os danos causados pela TAA, os extratos etanólicos de folhas de *Baccharis trimera* e *Morus nigra* L. foram utilizados.

Em relação à análise fitoquímica do EFBT, a apigenina e a epicatequina, tipos de flavonóides, mostraram ser os constituintes majoritários do extrato o que corrobora com os compostos descritos por Lima et al. (2017). Já a rutina, o ácido clorogênico e o ácido cafeico foram compostos encontrados no EFMN, apoiando estudos anteriores (Khalid et al., 2011; Salcedo et al., 2017).

As alterações mais observadas na indução de dano com TAA são aumento nos níveis séricos das enzimas hepáticas AST, ALT e GGT, tal qual o observado no grupo TAA (Schemitt et al., 2016; Golbar et al., 2016; Al-Attar & Shawush, 2015; Koppula et al., 2017).

Neste estudo, o aumento dos níveis de enzimas AST e GGT induzido pela TAA foi significativamente reduzido pelo tratamento prévio com EFBT, o EFMN também atuou na redução dos níveis de GGT.

No momento em que o organismo produz mais EROs que defesas, isto confere o estresse oxidativo e conseqüentemente a lipoperoxidação (Barbosa et al., 2010). As administrações de silimarina e EFBT restauraram a capacidade antioxidante hepática, muito provavelmente devido à composição fitoquímica de cada um (Shapiro et al., 2006; Khalid et al., 2011; Esmat et al., 2013; Lima et al., 2017; Salcedo et al., 2017).

Observamos um declínio significativo nos valores de PT e GLI do grupo TAA, indicando distúrbios na metabolização de proteínas e carboidratos (Al-attar, 2012). Os níveis reduzidos de TRI vão contra estudos já realizados, nos quais a indução de dano com a TAA aumentou acentuadamente a concentração de TRI, COL e lipídios totais circulantes (Al-attar, 2012, Esmat et al., 2013). Os níveis de proteína foram reduzidos significativamente nos grupos tratados com TAA, pois o metabolito S-dióxido pode se ligar covalentemente aos resíduos de lisina formando adutos com grupos sulfidríla (SH), diminuindo os níveis de proteína e causando danos significativos (Koen et al., 2013; Zagar et al., 2017). Os resultados obtidos nas análises hematológicas corroboram com as alterações histológicas encontradas, pois o HT e os LF apresentaram-se elevados enquanto as PQ reduzidas no grupo TAA, o que estar associada a problemas hepáticos de acordo com Thrall et al. (2015) em contra partida o EFBT foi capaz de reduzir os LF.

O peso corporal dos animais do grupo controle aumentou significativamente ao final do estudo, indicando um padrão normal de crescimento em roedores. Em oposição, os animais

tratados com TAA apresentaram redução no peso corporal, o qual pode ser devido à toxicidade direta da TAA e da absorção deficiente de nutrientes no intestino desses roedores. Ademais, redução do tecido adiposo e dos níveis de proteínas também pode corroborar com o menor ganho de peso dos animais. O grupo pré-tratado com EFBT conseguiu elevar os pesos para aqueles comparados aos do controle. Estes resultados também foram observados por outros estudos (Kabiri et al., 2014; Zargar et al., 2014; Al-Attar & Shawush, 2015).

Em relação ao peso dos fígados, foi possível observar que manteve relação com o peso corporal do animal, sendo que o grupo TAA apresentou os menores valores, em contrapartida com o grupo EFBT, que apresentou os maiores. No entanto segundo Lin & Lin (2006) e Al-Attar & Shawush (2015) a mudança no peso do fígado não pode prever diretamente o processo patológico nas lesões hepáticas crônicas, pois são muitas variáveis que influem no seu peso. O IHS não apresentou diferenças significativas entre os grupos de estudo.

Quanto às avaliações macroscópicas e histopatológicas, o presente estudo mostrou alterações severas da estrutura hepática em ratos no grupo TAA. Os tratamentos preventivos com silimarina, EFBT e EFMN atenuaram os danos causados pela TAA, corroborando com a literatura (David et al., 2011; Das et al., 2012; Koppula et al., 2017; Zagar et al., 2017).

5. Conclusão

Através dos resultados obtidos no trabalho observamos que a tioacetamida causou dano hepático, através do protocolo utilizado, nos grupos no qual foi administrada. Concluímos que o extrato etanólico de folhas de *B. trimera* melhorou o dano hepático causado pela TAA, e que estudo com maior tempo de administração da planta se faz necessário para validar o uso da carqueja como hepatoprotetora. O extrato etanólico de folhas de *M. nigra* L. não foi capaz de atenuar o dano hepático induzido pela tioacetamida nas condições do nosso trabalho, no entanto, por apresentar propriedades promissoras, é necessária a realização de novos estudos com a espécie.

6. Referências

Agabeyli, A. R. 2012. Antimutagenic Activities Extracts from Leaves of the *Morus alba*, *Morus Nigra* L. and Their Mixtures. *International Journal of Biology*, 4 (2). doi:10.5539/ijb.v4n2p166

Al-Attar, A. M. 2012. Attenuating Effect of Ginkgo biloba Leaves Extract on Liver Fibrosis Induced by Thioacetamide in Mice. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 9. doi:10.1155/2012/761450

Al-Attar, A. M., Shawush, N. A., 2016. Influence of olive and rosemary leaves extracts on chemically induced liver cirrhosis in male rats. Saudi Journal of Biological Sciences, 22, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.005>

Al-Attar, A. M., Al-Rethea, H. A. 2017. Chemoprotective effect of omega-3 fatty acids on thioacetamide induced hepatic fibrosis in male rats. Saudi Journal of Biological Sciences, 24 (4), 956-965. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.029

Araujo, C. M., de Lucio, K. P., Silva, M. E., Isoldi, M. C., de Souza, G. H., Brandão, G. C., Schulz, R., Costa, D. C. 2015. *Morus nigra* leaf extract improves glycemc response and redox profile in the liver of diabetic rats. Food & Function, 6 (11), 3490-9. doi:10.1039/c5fo00474h.

Araújo, G. R., Rabelo, A.C. S., Meira, J.S., Rossoni Júnior, J. V., Borges, W. C., Sá, R. G., Batista, M. A., Lemos, D. S., de Souza, G. H. B., Brandão, G. C., Chaves, M. M., Costa, D. C. 2017. *Baccharis trimera* inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47^{phox} phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. Experimental Biology and Medicine, 242, 333-343.

Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., de Paula S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, 23 (4), 629-643. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

Bardi, D. A., Halabi, M. F., Hassandarvish, P., Rouhollahi, E., Paydar, M., Moghadamtousi, S. Z., Al-Wajeeh, N. S., Ablat, A., Abdullah, N. A., Abdulla, M. A. 2014. *Andrographis paniculata* leaf extract prevents thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. PLoS One; 9 (10), e109424. doi: 10.1371/journal.pone.0109424.

Bodakhe, S. H.; Ram, A. 2007. Hepatoprotective properties of Bauhinia variegata bark extract. Yakugaku Zasshi, 127, 1503-1507.

Das, K., Kathiriya, A. K.,² Kumar E. P.,³ Benson M. K., Einstein, J. W. 2012. Evaluation of hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic extract of *Oxalis corniculata* against intoxication of thioacetamide induced rats. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 22 (2), 412-417. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102695X2011005000189>

Dutra, R.C., Campos, M. M., Santos, A. R., Calixto, J. B. 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacological Research 112, 4-29.

David, C., Rodrigues, G., Bona, S., Meurer, L., Gallego, J. G., Tuñón, M. J., Marroni, N. P. 2011. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. Toxicologic Pathology, 39 (6), 949-57. doi: 10.1177/0192623311418680

El Awdan, S. A. Amin, M. M., Hassan, A. 2018. Cilostazol attenuates indices of liver damage induced by thioacetamide in albino rats through regulating inflammatory cytokines and apoptotic biomarkers. *European Journal of Pharmacology*, 822, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.01.021>

Eraky, S. M., El-Mesery, M., El-Karef, A., Eissa, L. A., El-Gayar, A. M., 2018. Silymarin and caffeine combination ameliorates experimentally-induced hepatic fibrosis through down-regulation of LPAR1 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 101, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.064>.

Esmat, A. Y., Said, M.M., Soliman, A. A., El-Masry, K. S. H., Badiea, E. A. 2013. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. *Nutrition*, 29, 258-267.

Evaristo, I. M.; Leitão, M. C. 2001. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus súber* L. *Silva Lusitana*, 9 (2), 135-141.

Feng, R. Z., Wang, Q., Tong, W. Z., Xiong, J., Wei, Q., Zhou, W. H., Yin, Z. Q., Yin, X. Y., Wang, L. Y., Chen, Y. Q., Lai, Y. H., Huang, H. Y., Luo, Q. L., Wang, L., Jia, R. Y., Song, X., Zou, Y. F., Li, L. X. 2015. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8 (12), 22328-22336.

Figueiredo, A. P.; Pereira, R. S. 2009. Estudo dos efeitos de cápsulas de carqueja (*Baccharis trimera* (less) D.C.), sobre o metabolismo lipídico de pacientes em processo de emagrecimento. *Revista Online Conexão Ciência*. 4 (1). <https://doi.org/10.24862/ccco.v4i1.69>

Figueredo, K. C., Guex, C. G., Reginato, F. Z., da Silva, A. R. H., Cassanego, G. B., Lhamas, C. L., Boligona, A. A., Lopes, G. H. H., Bauermann, L. F. 2018. Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 224, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.013>

Golbar, H. M., Izawa, T., Wijesundera, K. K., Bondoc, A., Tennakoon, A. H., Kuwamura, M., Yamate, J. 2016. Depletion of Hepatic Macrophages Aggravates Liver Lesions Induced in Rats by Thioacetamide (TAA). *Toxicologic Pathology*, 44 (2), 246-58. doi: 10.1177/0192623315621191

Grance, S. R. M., Teixeira, M. A., Leite, R. S., Guimarães, E. B., de Siqueira, J. M., Filiu, W. F. O., Vasconcelos, S. B. S., Vieira, M. C. 2008. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 28–33. doi: 10.1016/j.jep.2007.12.020

Harputluoğlu, M. M. M., Temel, I., Demirel, U., Yüksel Seçkin, Y., Aladağ, M., Otlu, B., Karadağ, N., Özyalın, F., Aydoğan, N., Selçuk, E.B., 2017. Methylprednisolone prevents bacterial translocation in thioacetamide-induced liver failure in rats. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 5, doi:394-400.10.5152/tjg.2017.1775

Kabiri, N., Darabi, M. A., Kopaei, M. R., Setorki, M., Doudi, M., 2014. Protective effect of kombucha tea on liver damage induced by thioacetamide in rats. *Journal of Biological Sciences*, 14, 343-348.

Kaur, V., Kumar, M., Kaur, P., Kaur, S., Singh, A. P., Kaur, S. 2017. Hepatoprotective activity of *Butea monosperma* bark against thioacetamide-induced liver injury in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 332-341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.165>

Khalid, N., Fawad, S .A., Ahmed, I. 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 91–96.

Kim, J. S., Koppula, S., Yum, M. J., Shin, G. M., Chae, Y. J., Hong, S. M., Lee, J.D., Song, M. 2017. Anti-fibrotic effects of *Cuscuta chinensis* with in vitro hepatic stellate cells and a thioacetamide-induced experimental rat model. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 1909-1919. doi: 0.1080/13880209.2017.1340965.

Koen, Y. M., Sarma, D., Hajovsky, H., Galeva, N. A., Williams, T. D., Staudinger, J. L., Hanzlik, R. P. 2013. Protein targets of thioacetamide metabolites in rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 26, 564-574. doi: 10.1021/tx400001x.

Koppula, S., Yum, S. M. J., Kim, J. S., Shin, G. M., Chae, Y. J., Yoon, T., Chun, C. S., Jae-Dong Lee, J. D., MinDong Song, M. D. 2017. Anti-fibrotic effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) on hepatic stellate cells and thioacetamide-induced fibrosis in rats. *Nutrition Research and Practice*, 11 (6), 470-478.

Kumar, V.; Chauhan, S. 2008. Mulberry: Life enhancer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (10), 271-278.

Lima, S. O., Figueiredo, M. B. G. A., Santana, V. R., Santana, D. P. A., Nogueira, M. S., Porto, E.S., Andrade, R. L. B., Macêdo Santos, J. M., Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, R. L. C., Cardoso, J. C. 2017. Effect of aqueous extract of the leaves of *Baccharis trimera* on the proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 32 (4), 263-269. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170040000001>

Lin, W. C., Lin, W. L., 2006. Ameliorative effect of *Ganoderma lucidum* on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 265-270.

Lívero, F. A., Martins, G. G., Telles J. E.Q., Beltrame, O. C., Biscaia, S. M. P., Franco, C. R. C., Elferink, R. P. O., Acco, A. 2016. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* ameliorates alcoholic fatty liver disease in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 260, 22 and 32. doi: 10.1016/j.cbi.2016.10.003

Mostafa, R. E., Salama, A. A. A., Rahman¹, R. F. A., Ogaly, H. A. 2017. Hepato and neuro-protective influences of biopropolis on thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95 (5), 539-547. doi: 10.1139/cjpp-2016-0433.

Nascimento, D. S. M., Oliveira, R. M., Camara, R. B. G., Gomes, D. L., Monte, J. F. S., Costa, M. S. S. P., Fernandes, J. M., Silvana Maria Zucolotto Langassner, S. M. Z., Rocha, H. A. O. 2017. *Baccharis trimera* (Less.) DC. Exhibits an Anti-Adipogenic Effect by Inhibiting the Expression of Proteins Involved in Adipocyte Differentiation. *Molecules*, 22, 972. doi: 10.3390/molecules22060972.

Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 (2), 351-358. <http://dx.doi.org/10>.

Oliveira, A. C. P., Endringer, D. C., Amorim, L. A. S., Brandão, M. G. L., Coelho, M. M. 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumin* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 465-469.

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., Oliveira, J. R., Gosmann, G. 2012. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules*, 17, 1113-1123. doi:10.3390/molecules17011113

Oliveira, C. B., Comunello, L. N., Maciel, E. S., Giubel, S. R., Bruno, A. N., Chiela, E. C., Lenz, G., Gnoatto, S. C., Buffon, A., Gosmann, G. 2013. The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from *Baccharis trimera* in Siha Cells: Differences in Their Activity and Mechanism of Action. *Molecules*. 9 (18), 11022-11032. doi: 10.3390/molecules180911022.

Padilha, M. M., Vilela, F. C., Rocha, C. Q., Dias, M. J., Soncini, R., Santos, M. H., Silva, G. A., Paiva A. G. 2010. Anti-inflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. *Phytotherapy Research*, 24, 1496–1500. doi: 10.1002/ptr.3134

Pádua, B. C., Silva, L. D., Rossoni Júnior J. V., Humberto, J. L., Chaves, M. M., Silva, M. E., Pedrosa, M. L., Costa, D. C. 2010. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 381-386. doi:10.1016/j.jep.2010.04.018

Pádua, B. C., Rossoni Júnior, J. V., Magalhães, C. L., Chaves, M. M., Silva, M. E., Pedrosa, M. L., Souza, G. H., 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 of Inflammation*, 2014, 14. doi: 10.1155/2014/196598.

Paul, E. L., Lunardelli, A., Caberlon, E., Oliveira, C. B., Santos, R. C., Biolchi, V., Bastos, C. M., Moreira, K. B., Nunes, F. B., Gosmann, G., Oliveira, J. R. 2009. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation In Vitro. *Inflammation*, 32 (6), 419-425. doi: 10.1007/s10753-009-9151-1

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. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 97–101. doi:10.1016/j.jep.2009.06.006

Salcedo, E. M. S., Amorós, A., Hernández, F., Martínez, J. J., 2017. Phytochemical properties of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves, a new food supplement. *Journal of food and nutrition research*, 5 (4), 253-261. <http://dx.doi.org/10.12691/jfnr-5-4-7>

Schemitt, E. G., Colares, J. R., Hartmann, R. M., Martins, M. I. M., Marroni, C. A., M. Jesús Tuñón, M. J., Marroni, N. P. 2016. Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in a rat model of fulminant hepatic failure. *Nutrición Hospitalaria*, 33 (2), 210-219.

Shapiro, H., Ashkenazi, M., Weizman, N., Shahmurov, M., Aeed, H., Bruck, R. 2006. Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21, 358-366. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03984.x

Silva, A.R.H., Reginato, F.Z., Guex, C.G., Figueredo, K.C., Araldi, I.C.C., Freitas, R.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Mazzanti, C.M.A., Hübscher, G.H., Bauermann, L.F., 2016. Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 74, 170-177. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.10.024>.

Silva, A. R. H., Lopes, L. Q. S., Cassanego, G. B., de Jesus, P.R., Figueredo, K. C., Santos, R. C. V., Lopes, G. H. H., Bauermann, L. F. 2018. Acute toxicity and antimicrobial activity of leaf tincture *Baccharis trimera* (Less). *Biomedical Journal* xxx, I- 8. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.04.006>

Souza, S. P., Pereira, L. L. S., Souza, A. A., dos Santos, C. D. 2011. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21 (3), 450-455. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000049

Souza, G. R., Silva, J. C., Oliveira Júnior, R. G., Saraiva, S. R. G. L., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Almeida, J. R. G. S. 2015. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra*L. (Moraceae). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 36 (1), 137-142.

Stefanello, S. T., Hartmann, D. D., Amaral, G. P., Courtes, A. A., Leite, M. T. B., da Silva, T. C., Gonçalves, D. F., Souza, M. B., da Rosa, P. C., Dornelles, L., Soares, F. A .A. 2017. Antioxidant protection by β -selenoamines against thioacetamide-induced oxidative stress and hepatotoxicity in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31 (12). doi: 10.1002/jbt.21974

Tamayo, R. P., 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, 3, 112-120.

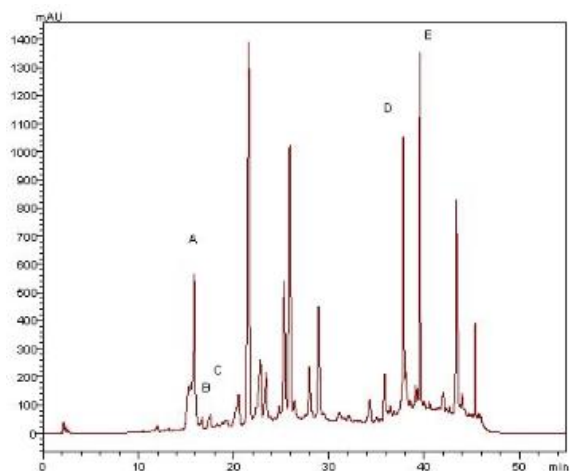
Thomson, A. W.; Knolle, P. A. 2010. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature Reviews Immunology*, 10 (11), 753-66.

Thrall M. A. 2015. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 349-360.

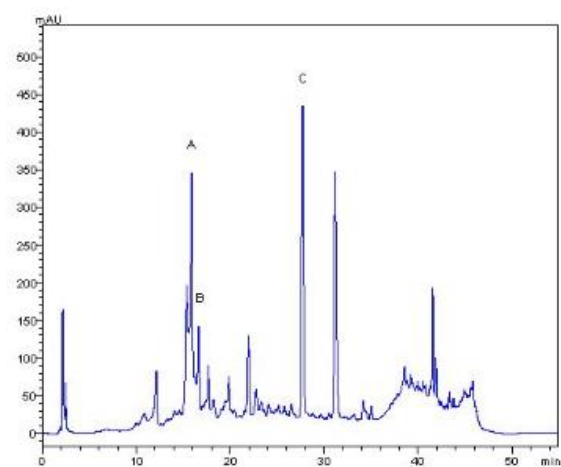
Turgut, N. H., Mert, D. G., Kara, H., Egilmez, H. R., Arslanbas, E., Tepe, B., Gungor, H., Yilmaz, N., Tuncel, N. B. 2015. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d-galactose-induced aging. *Pharmaceutical Biology*, 54.(6), 1052–1064. doi: 10.3109/13880209.2015.1101476

Yamada, Y.; Fausto, N., 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *American Journal of Pathology*, 152, 1577–1589.

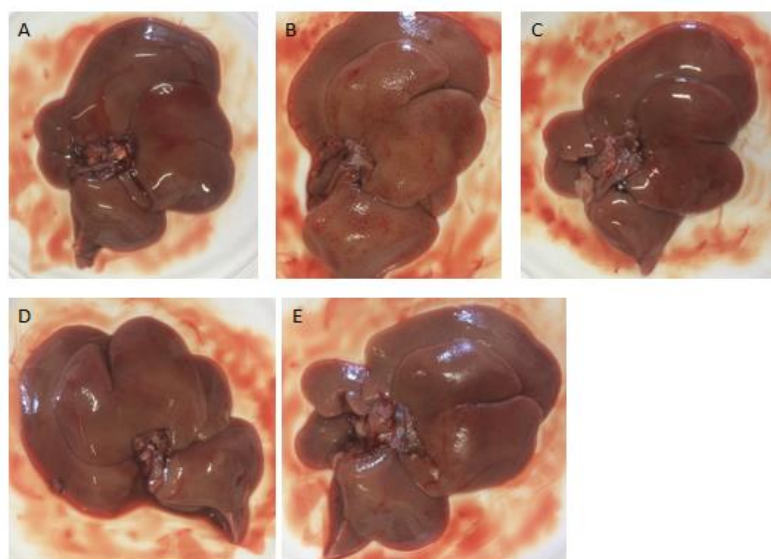
Zargar, S., Wani, T. A., Alamro, A. A., Ganaie, M. A. 2017. Amelioration of thioacetamide-induced liver toxicity in Wistar rats by rutin. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 30 (3), 207-214. doi: 10.1177/0394632017714175

Figura 1.

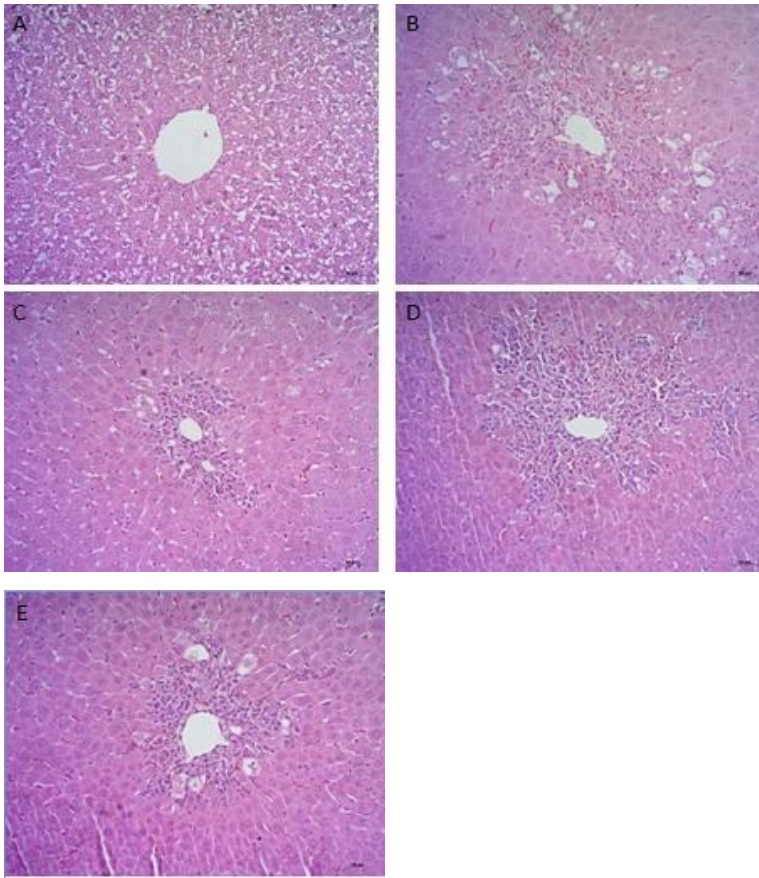
Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência representativa da detecção do EFBT. Ácido clorogênico (pico A), catequina (pico B), epicatequina (pico C), luteolina (pico D) e apigenina (pico E).

Figura 2.

Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência representativa da detecção do EFMN. Ácido clorogênico (pico A), ácido cafeico (pico B) e rutina (pico C).

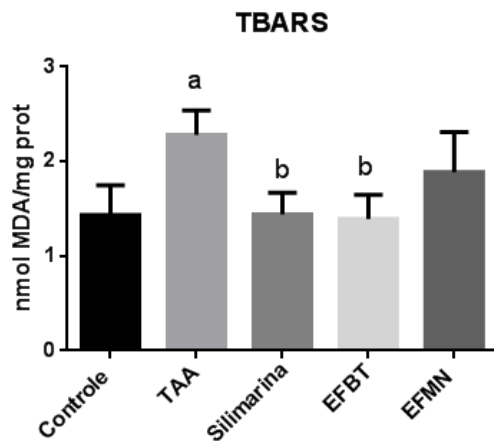
Figura 3.

Aparência macroscópica do fígado. (A) controle- forma anatômica e aparência normal, a superfície é lisa e regular. (B) TAA- apresenta superfície nodular rugosa, com distribuição uniforme de micronódulos e macronódulos. (C) silimarina- superfície lisa, com presença de micronódulos. (D) EFBT 400 mg/kg e (E) EFMN 1000 mg/kg- apresentam superfície quase lisa e poucos micronódulos. As imagens presentes são amostras representativas (n=6).

Figura 4.

O tecido hepático do grupo controle (A) mostra arquitetura hepática normal, (B) grupo TAA apresenta perda da arquitetura normal, com a presença de infiltrado inflamatório, necrose de hepatócitos associada a alterações apoptóticas (C) grupo silimarina mostra infiltrado leve de células mononucleares (D) EFMN e (E) EFMN ainda apresentam infiltrado de células mononucleares, além de pequenas áreas de necrose em (E). As secções são de amostras representativas (n=6), para ampliação da imagem foi utilizada lente (200X).

Figura 5.



Resultados referentes à presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no tecido hepático dos grupos experimentais (n=6). Os resultados são expressos como média \pm DP. Teste de variância one-way ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Níveis expressos em nmol MDA/mg de proteína.

^a comparado com o grupo controle.

^b comparado com o grupo TAA.

Tabela 1. Constituintes do extrato etanólico de folhas de *Baccharis trimera*

Constituintes	<i>Baccharis trimera</i>
	($\mu\text{g/g}$)
Ácido clorogênico	$98,32 \pm 0,85$
Catequina	$103,01 \pm 9,46$
Epicatequina	$490,69 \pm 19,10$
Apigenina	$536,43 \pm 11,00$
Luteolina	$159,92 \pm 1,15$

Os resultados são expressos como média \pm DP.

Tabela 2. Constituintes do extrato etanólico de folhas de *Morus nigra* L.

Constituintes	<i>Morus nigra</i> L.
	($\mu\text{g/g}$)
Ácido clorogênico	$63,67 \pm 2,48$
Ácido cafeíco	$15,08 \pm 0,33$
Rutina	$158,20 \pm 0,80$

Os resultados são expressos como média \pm DP.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos (soro) dos animais utilizados no experimento.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos de estudo				
	Controle	TAA	Silimarina	EFTB 400 mg/kg	EFTB 1000 mg/kg
AST (U/L)	98,17 ± 37,67	829,5 ± 315,2 ^a	495,3 ± 137,7 ^b	248,8 ± 153,7 ^b	542,0 ± 109,5
ALT (U/L)	44,67 ± 9,23	210,3 ± 48,69 ^a	149,7 ± 16,45	174,3 ± 71,94	196,2 ± 52,54
GGT (U/L)	3,17 ± 1,17	6,00 ± 1,10 ^a	4,50 ± 1,05	2,67 ± 1,97 ^b	2,167 ± 2,137 ^b
CRE (mg/dL)	0,57 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,65 ± 0,14	0,63 ± 0,08	0,583 ± 0,10
URE (mg/dL)	35,00 ± 5,02	47,33 ± 9,4	50,17 ± 12,42	46,33 ± 2,34	56,67 ± 12,40
PT (g/dL)	5,98 ± 0,35	4,77 ± 0,32 ^a	5,22 ± 0,28	5,02 ± 1,10	4,267 ± 0,68
ALB (g/dL)	2,55 ± 0,16	2,17 ± 0,10	2,25 ± 0,20	2,50 ± 0,43	2,02 ± 0,45
TRI (mg/dL)	157,8 ± 47,01	33,17 ± 7,96 ^a	43,33 ± 15,95 ^a	124,5 ± 34,92 ^b	47,17 ± 14,47
COL (mg/dL)	53,67 ± 6,98	40,17 ± 7,08	39,83 ± 9,37	59,17 ± 10,26 ^b	42,17 ± 11,21 ^c
GLI (mg/dL)	154,3 ± 24,16	96,00 ± 12,66 ^a	120,7 ± 40,37	130,5 ± 32,32	81,67 ± 4,082

Os resultados são expressos como média ± DP. Teste de variância one-way ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado (n=6/grupo). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

^a comparado com o grupo controle.

^b comparado com o grupo TAA.

^c comparado com o grupo silimarina

Tabela 4. Parâmetros hematológicos em ratos Wistar.

Parâmetros hematológicos	Grupos de estudo				
	Controle	TAA	Silimarina	EFBT 400 mg/kg	EFMN 1000 mg/kg
HC ($\times 10^3/uL$)	7,83 \pm 0,66	8,14 \pm 0,34	8,58 \pm 0,16	8,88 \pm 0,5577	8,38 \pm 0,69
HG (g/dL)	14,95 \pm 0,95	16,32 \pm 1,09	16,22 \pm 0,17	17,02 \pm 1,148	15,92 \pm 1,22
HT (%)	46,48 \pm 2,11	52,91 \pm 2,85 ^a	51,97 \pm 3,38	51,37 \pm 3,144	50,92 \pm 4,88
VCM (fL)	59,62 \pm 3,28	63,60 \pm 4,86	62,72 \pm 1,96	57,95 \pm 3,465	60,85 \pm 3,55
CHCM (g/dL)	32,13 \pm 0,70	30,62 \pm 0,70	31,52 \pm 2,55	33,10 \pm 1,648	31,30 \pm 1,63
LCT (μL)	9333 \pm 2460	14283 \pm 3079	9817 \pm 1631	10783 \pm 2824	12383 \pm 1887
LF	6211 \pm 1569	8750 \pm 1024 ^a	5732 \pm 815,2 ^b	5456 \pm 657,9 ^b	7740 \pm 2187
PQ (μL)	1215 \pm 161,11	634,50 \pm 137,70 ^a	777,50 \pm 230,93	830,33 \pm 386,35	761,50 \pm 124,95
PPT (g/dL)	6,50 \pm 0,21	5,47 \pm 0,55 ^a	5,68 \pm 0,16	5,87 \pm 0,47	5,27 \pm 0,47

Os resultados são expressos como média \pm DP. Teste de variância one-way ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado (n=6/grupo). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

^a comparado com o grupo controle.

^b comparado com o grupo TAA.

Tabela 5. Relação do peso corporal, peso do fígado e IHS dos animais em estudo.

Parâmetros	Grupos de estudo				
	Controle	TAA	Silimarina	EFBT 400 mg/kg	EFMN 1000 mg/kg
Peso corporal (g)	259,0 ± 21,47	209,90 ± 12,95 ^a	221,11 ± 10,40	252,7 ± 41,02 ^b	220,6 ± 14,66
Peso fígado (g)	15,07 ± 0,88	11,77 ± 0,41 ^a	11,91 ± 1,41	14,87 ± 1,08 ^{b,c}	13,83 ± 1,55 ^b
IHS (%)	5,85 ± 0,54	5,64 ± 0,44	5,277 ± 0,45	6,04 ± 1,24	6,27 ± 0,55

Os resultados são expressos como média ± DP. Teste de variância one-way ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado (n=6/grupo). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

^a comparado com grupo controle.

^b comparado com o grupo TAA.

^c comparado com o grupo silimarina.

3 CONCLUSÃO

- Perfil cromatográfico do EFBT revelou a presença de ácido clorogênico, catequina, luteolina, epicatequina e apigenina, os dois últimos mostram-se majoritários.
- Perfil cromatográfico do EFMN mostrou a presença de ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina, sendo a última o constituinte majoritário.
- O modelo de indução de dano hepático pela TAA foi capaz de refletir as complicações clínicas que ocorrem em pacientes com doenças hepáticas, tal fato foi evidenciado pelos achados histopatológicos, pelo aumento dos níveis de marcadores bioquímicos e diminuição do ganho de peso dos animais.
- As análises bioquímicas e hematológicas apresentaram alterações em alguns parâmetros, em grupos específicos.
- O peso corporal e o peso do órgão mostram-se diferentes entre si, o EFBT foi capaz de restaurar o ganho de peso dos animais quando comparado ao grupo indução, que reduziu esse aumento de peso. O IHS não apresentou diferenças significativas entre os grupos.
- A análise macroscópica do fígado mostra a presença de micro e macronódulos e a análise histológica evidencia a arquitetura normal do tecido hepático e as alterações provocadas pela indução de dano hepático pela TAA como a presença de infiltrados e necrose.
- A lipoperoxidação apresentou mudança entre os diferentes grupos. A atividade antioxidante dos extratos e da silimarina conseguiu reduzir os níveis de MDA que se encontravam elevados no grupo TAA.

REFERÊNCIAS

- ABIRAMI, A.; NAGARANI, G.; SIDDHURAJU, P. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, p. 35-41, 2015.
- ABUL, H. et al. Level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and uric acid in thioacetamide-induced cirrhotic rats. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine**, v.31, n. 2, p. 66-71, 2002.
- ABTO. Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: JANEIRO/SETEMBRO-2018. **Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos**, p 5-7, 2018.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, n. 105, p. 121-126, 1984.
- AGABEYLI, A. R. Antimutagenic Activities Extracts from Leaves of the *Morus alba*, *Morus Nigra* L. and Their Mixtures. **International Journal of Biology**, vol. 4, n. 2, 2012.
- AHMAD, P. et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n°3, p. 161-175, 2010.
- AL-ATTAR, A. M. Attenuating Effect of Ginkgo biloba Leaves Extract on Liver Fibrosis Induced by Thioacetamide in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- ALMEIDA R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ARAUJO, C. M. *Morus nigra* leaf extract improves glycemc response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food & Function**, 2015.
- ARAUJO, G. R. et al. *Baccharis trimera* inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47^{phox} phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, p. 333-343, 2017.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.52, n.3, p. 230-234, 2000.
- BARATA, J. Terapêuticas alternativas de origem botânica - efeitos adversos e interações medicamentosas. Lidel edições, 2008.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assay for SOD. **Methods of Biochemical**, v. 32, p.279-312, 1987.

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

BARDI, D. A. et al. *Andrographis paniculata* Leaf Extract Prevents Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats. **PLoS ONE**, v.9, n. 10, p. 109424, 2014.

BIANCHI M. L. P.; ANTUNES L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p.123-30, 1999.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BODAKHE S. H.; RAM A. Hepatoprotective properties of Bauhinia variegata bark extract. **Yakugaku Zasshi**, v.127, p. 1503-1507, 2007.

BRASIL. Resolução nº 88, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 março de 2004.

BRASIL. Portaria nº971, de 3 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 maio de 2006^a, seção 1, p. 20-5, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumo Estratégicos. Departamento de Assistência farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, p. 6, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumo Estratégicos. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**, p. 28, n 1, 2009.

BRASIL. Portaria nº 1.645, de 2 de outubro de 2015. Ministério da Saúde. **Dispõe sobre o Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ-AB) 2015**.

BRASIL. **Portal da Saúde - fígado**, Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Saúde, 2016.

BRUCK, R. et al. A protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate in a rat model of livercirrhosis. **Liver International**, v. 24, n. 2, p. 169–76, 2004.

BUEGE, J. A., AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, v. 52, p. 302-10, 1978.

CACCIA-BRAVA, M. C. G. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ) **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1651-1659, 2015.

- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARVALHO, A. C. B.; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D. Systematic organization of medicinal plant information: a monograph template proposal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p 80-88, 2014.
- CASTRO, J. L. Medicina vegetal: teoria e prática conforme a naturoterapia. 2^o ed. Rio de Janeiro: Europa-América, p. 304, 1981.
- CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. Cultivo de plantas medicinais, codimentares e aromáticas. Jaboticabal: FUNEP, p. 151, 1994.
- COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 710-714, 2009.
- DAS, K. et al. Evaluation of hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic extract of *Oxalis corniculata* against intoxication of thioacetamide induced rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 412-417, 2012.
- DIAS, L. F. T. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC.(Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.
- DIEZ-FERNANDEZ, C.; SANZ, N.; CASCALES M. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1159-63, 1996.
- DRURY, R.; WALLINGTON, E. A. Técnica histológica de Carleton. Oxford University Press, Oxford / Nova York / Toronto, 1980.
- DUTRA, R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research** 112, 4–29, 2016.
- ERAKY, M. S. et al. Silymarin and caffeine combination ameliorates experimentally-induced hepatic fibrosis through down-regulation of LPAR1 expression. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 101, 49–57, 2018.
- ESMAT, A. Y. et al. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. **Nutrition**, v. 29, p. 258–267, 2013.
- EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus súber* L. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 135-141; 2001.

FAUSTO M. C. R.; FONSECA H. M. S. Rotas da atenção básica no Brasil: experiências do trabalho de campo *PMAQ*. Rio de Janeiro: **Saberes Editora**, 2013.

FENG, R. Z. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 12, p. 22328-22336, 2015.

FIGUEIREDO, A. P.; PEREIRA, R. S. Estudo dos efeitos de cápsulas de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) D.C.), sobre o metabolismo lipídico de pacientes em processo de emagrecimento. **Revista Online Conexão Ciência**. v. 4, n. 1, 2009.

FITZHUGH, O. G., NELSON, A. A. Liver Tumors in Rats Fed Thiourea or Thioacetamide. **Science**. Dec 3; v. 108 (2814), p. 626-8, 1948.

FONTANA, L. et al. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced livercirrhosis. **Toxicology**, v. 106, p. 197-206, 1996.

FREITAS, M. et al. Tyrosinase inhibition and cytotoxicity of *Morus nigra* leaves for cosmetic application. **Toxicology Letters**, v. 238,p. S357, 2015.

GRANCE, S. R. M. et al. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 28–33, 2008.

GREEN, D. J., et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **Journal of Physiology**, v. 561, p. 1-25, 2004.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-8, 2004.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. **Nutrition Reviews**, vol. 52, n.8, 1994.

HALLIWELL, B; WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edn. NewYork: Oxford University Press Inc; 2007.

HUANG D; OU B; PRIOR R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.6, p. 1841-56, 2005.

JAMAL , A. K.; YAACOB, W. A.; LAILY, B. D. A chemical study on *Phyllanthus columnaris*. **European Journal of Scientific Research**, v.28, p. 76-81, 2009.

JIANG, Y. et al. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacolog**, v. 200, p. 228–235, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.

KAUR, V., et al. Hepatoprotective activity of *Butea monosperma* bark against thioacetamide-induced liver injury in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 332-341, 2017.

KIM, J. S., et al. Anti-fibrotic effects of *Cuscuta chinensis* with in vitro hepatic stellate cells and a thioacetamide induced experimental rat model. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1909-1919, 2017.

KOPPULA, S., et al. Anti-fibrotic effects of *Orostachys japonica* A. Berger (Crassulaceae) on hepatic stellate cells and thioacetamide-induced fibrosis in rats. **Nutrition Research and Practice**. 11 (6), 470-478, 2017.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

KUMAR, V.; CHAUHAM, S. Mulberry: Life enhancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 271-278, 2008.

LAKSHMANAN, H. et al. Aqueous extract of *Senecio candicans* DC induce liver and kidney damage in a sub-chronic oral toxicity study in Wistar rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 79, p. 25-34, 2016.

LIMA, S. O. et al. Effect of aqueous extract of the leaves of *Baccharis trimera* on the proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 263-269, 2017.

LÍVERO, F. A. R. et al. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* ameliorates alcoholic fatty liver disease in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 22 e 32, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum 512p, 2002.

LUSTER, M. I. et al. Immunotoxicology: role of inflammation in chemical-induced hepato-Toxicity. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, p. 1143–1147, 2000.

MARMITT, D. J. et al. Potencial hepatoprotetor das plantas medicinais da renisus: revisão sistemática. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 14, n. 49, p. 84-91, 2016.

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, v. 36, n. 1, p. 61-68, 2010.

MOHIUDDIN, E. et al. *Morus nigra* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 20, p. 5197-5199, 2011.

NAGATO, A. C. et al. Quantitative and morphological analyses of different types of human liver. **Journal of Morphology**. V. 28, n. 4, p. 275-279, 2011.

NASCIMENTO, D. S. M. et al. *Baccharis trimera* (Less.) DC Exhibits an Anti-Adipogenic Effect by Inhibiting the Expression of Proteins Involved in Adipocyte Differentiation. **Molecules**, v. 22, p. 972, 2017.

NEAL R. A.; HALPERT, J. Toxicology of thionosulfur compounds. **Annal Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 22, p. 321-9, 1982.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, p. 27986, 2015.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of Moraceous plants. **Natural Products Reports**, v.11, p.205-218, 1994.

OLIVEIRA, A. C. P. et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 465-469, 2005.

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

OLIVEIRA, C. B. et al. The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from *Baccharis trimera* in SiHa Cells: Differences in Their Activity and Mechanism of Action. **Molecules**. v. 9, n. 18, p.11022-11032, 2013.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 2015.

ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* L. and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 3, p. 275-279, 2009.

PADILHA, M.M. et al. Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytotherapy Research**, v.24, p 1496–1500, 2010.

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

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

PAIVA, F. A. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 15, 2015.

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. 419-425, 2009.

PAWLOWSKA, A.M.; OLESZEK, W.; BRACCA A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3377-80, 2008.

PEREIRA, B. S. et al. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p.311-316, 2010.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55 and 74, 2015.

PORTER, W. R.; NEAL, R. A. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 6, n. 4, p. 379-88, 1978.

RAMAIAH, S. K.; APTE, U.; MEHENDALE, H. M. Cytochrome P450E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 8, p. 1088-95, 2001.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

RODRIGUES, C. R.F., et al. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in Mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 97–101, 2009.

RUSSMANN, S.; GERD A.; GRATAGLIANO I. Current concepts of mechanism in drug-induced hepatotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3041-3053, 2009.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, n. 2-3, p.133-145, 1982.

SIEGEL, P. et al. Medicinal herbs for cancer patients undergoing chemotherapy in a Brazilian hospital – An exploratory study. **European Journal of Integrative Medicine** 8, 478–483, 2016.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, A. R. H. et al. Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 170-177, 2016.

SILVA, A. R. H., et al. Acute toxicity and antimicrobial activity of leaf tincture *Baccharis trimera* (Less). **Biomedical Journal** xxx, 1- 8, 2018.

SOUZA, S. P. et al. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 450-455, 2011.

SOUZA, G. R. et al. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra*L. (Moraceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, p 137-142, 2015.

STEFANELLO, S. T. et al. Antioxidant protection by β -selenoamines against thioacetamide-induced oxidative stress and hepatotoxicity in mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, e21974, 2017.

THOMSON, A. W.; KNOLLE, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 11, p. 753-66, 2010.

TOVAR, R.T.; PETZEL, R.M. Herbal toxicity. **Disease-a-month**, v.55, n.10, p. 592-641, 2009.

TURGUT, N. H., et al. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d-galactose-induced aging. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1052-1064, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo 4m sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VERDI, L. G.; BRIGHENT, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VICHNEWSKI, W. Análises fitoquímicas de extratos alcoólicos de Asteraceae, *Baccharis trimera*, *Calea teucrifolia*, *Eremanthus eleagnus* e *Vernonia fruticulosa*, 1990. **Encontro regional de química – SBG**, 9, 1990, São Carlos. Resumos, p. 189. 1990.

WANG, T. et al. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 473-9, 2000.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

YANG, J. M. et al. Endotoxins enhance hepatocarcinogenesis induced by oral intake of thioacetamide in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 2, p. 128–132, 1998.

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA TIOACETAMIDA

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Lote: T31255RA
Data de fabricação: 18/04/2018
Data de validade: 18/04/2024
CAS: 62-55-5
Formula molecular: C₂H₅NS
Peso molecular: 75,13 g/mol

TIOACETAMIDA P.A ACS

CARACTERÍSTICAS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Teor	Mín. 99,0%	99,2%
Faixa de Fusão	111,0 – 114,0°C	112,5°C
Clareza da solução a 2%	Passa no teste	Passa no teste
Resíduo após Ignição	Máx. 0,05%	< 0,05%

Documento emitido eletronicamente sob a responsabilidade do Departamento de Controle de Qualidade
Aprovado por Edinilson Barros de Alexandria - CRQIV nº 04414108

ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA SILIMARINA



Certificado de Análise

Produto: Silimarina ✓	P.M: 482.44 g/mL ✓
Fórmula Molecular: $C_{27}H_{42}O_{10}$ ✓	Lote Interno: 28428 ✓
Lote Original: 20161013 ✓	Data Val: 29/10/2019 ✓
Data Fab: 30/10/2016 ✓	Procedência: China ✓
Origem: China ✓	DCB: 08000 ✓
Fabricante: Panjin Huacheng ✓	CAS: 65666-07-1 ✓
Data de Emissão: 15/03/2017 ✓	

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Características	Pó amarelado claro, sem odor característico	De acordo
Identificação	Reação positiva	De acordo
Tamanho da Partícula	Passa 100% em 80 Mesh	100%
Clareza e Cor da Solução	A solução é clara (1% em metanol)	De acordo
Solubilidade	Facilmente solúvel em acetona, acetato de etila, metanol e éter. Praticamente insolúvel em água.	De acordo
Metais Pesados	Máximo 10 ppm	< 10ppm
Cinzas Sulfatadas	Máximo 0,6%	0,15%
Perda por Secagem	Máximo 5,0%	1,38%
Densidade Aparente	0,4 – 0,6 g/mL	0,43 g/mL
Análise Espectrofotométria	Mínimo 80,0%	81,9%
Silybin e Isosilybin (HPLC)	Mínimo 30,0%	31,74%
Bactérias	Máximo 1000UFC/g	< 10UFC/g
Doloras e Leveduras	Máximo 100UFC/g	< 10UFC/g
Salmonella	Ausente	Ausente
Escherichia coli	Ausente	Ausente
Staphylococcus aureus	Ausente	Ausente
Culiformes	Ausente	Ausente

Referência: Especificação interna do fabricante.

Metodologia: Metodologia do Fabricante.

Conservação: Conservar em recipiente hermético protegido de umidade, ao abrigo de luz e calor.
 Controle de Temperatura: 15 a 30°C. Controle da Umidade: Não mais que 70%.

Classificação: Farmacêutico

Conclusão: Todos os resultados estão dentro das especificações.

OBS.: Análise Interna

Certificado original se encontra à disposição de nossos clientes.

Resultado: (X) Aprovado

Amanda Dias Garrido
 Dra. Amanda Dias Garrido
 CRF - SP 62927
 Farmacêutica Responsável Técnica

70-2014
 Mônica
 Mônica S. B. Filippetto
 Farmacêutica
 CRF/RS 4713
 08.04.17

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



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* (Less) DC. E *Morus nigra* Linnaeus FRENTE À INDUÇÃO DE DANO HEPÁTICO PELA TIOACETAMIDA EM RATOS Wistar", protocolada sob o CEUA nº 8460270418, sob a responsabilidade de **Liliane de Freitas Bauermann e equipe; Gabriela Buzatti Cassanego; Amanda Szymansky Heck; Camille Gaube Gueix; Isabel Cristina da Costa Araldi; Kássia Caroline Figueiredo** - 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 24/05/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE HEPATOPROTETORA ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACTS OF *Baccharis trimera* (Less) DC. E *Morus nigra* Linnaeus FRONT OF INDUCTION OF HYPOTHIC DAMAGE BY TIOACETAMIDE IN Wistar RATS", utilizing 84 Heterogenics rats (84 males), protocol number CEUA 8460270418, under the responsibility of **Liliane de Freitas Bauermann and team; Gabriela Buzatti Cassanego; Amanda Szymansky Heck; Camille Gaube Gueix; Isabel Cristina da Costa Araldi; Kássia Caroline Figueiredo** - 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 05/24/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2018 a 01/2019** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 6 semanas**

N: **84**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **120 a 150 g**

Resumo: O fígado, segundo maior órgão do corpo humano, é de extrema importância para a manutenção da homeostasia corporal. Sua função de sintetizar, armazenar e excretar diversas substâncias o torna alvo para o desenvolvimento de doenças, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A *Baccharis trimera* (Less) DC. e a *Morus nigra* Linnaeus, presentes na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS são utilizadas pela população como hepatoprotetoras, no entanto a eficácia das mesmas não está totalmente elucidada. O objetivo do estudo será realizar a análise fitoquímica dos extratos etanólicos de *B. trimera* e *M. nigra* L. e avaliar a atividade hepatoprotetora de ambos os extratos frente ao dano hepático induzido pela tioacetamida, xenobiótico que causa morte de células hepáticas por necrose centrolobular e apoptose. A análise fitoquímica será realizada por CLAE. Um total de 56 ratos Wistar machos serão utilizados no modelo experimental, divididos em grupos aleatórios (n=8), receberão extrato de *B. trimera* nas doses de 250 e 400 mg/Kg, extrato de *Morus nigra* L. nas doses de 750 e 1000 mg/Kg e silymarina na dose de 50 mg/Kg via oral, diariamente durante 8 semanas, concomitantemente a indução de dano hepático com a tioacetamida (200 mg/Kg) via intraperitoneal, 2 vezes por semana. Ao término da 8ª semana, os animais serão eutanasiados, o sangue será coletado para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os rins, o fígado e o baço de cada animal serão pesados e homogeneizados para posterior mensuração da peroxidação lipídica e defesa antioxidante. Uma amostra do fígado também será separada para a análise histopatológica.

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Experimental: prédio 21, sala 5229 - UFSM.

Santa Maria, 24 de maio de 2018



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

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

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria