

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO
AQUOSO DE *Scutia buxifolia* EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Robson Borba de Freitas

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Scutia buxifolia* EM RATOS

Robson Borba de Freitas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE
Scutia buxifolia EM RATOS**

elaborada por
Robson Borba de Freitas

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:


Margareth Linde Athayde, Dr.^a
(Presidente/Orientadora)


Liliane de Freitas Bauermann, Dr.^a
(Co-orientadora)


Maria Isabel Mohjan Martins, Dr.^a. (ULBRA)


Gilberti Helena Hübscher Lopes, Dr.^a. (UFSM)

u Santa Maria, 07 de março de 2013.

Dedico esta dissertação à minha avó Ilumina Oliveira de Borba (In memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Élide e João, por me darem força e apoio durante estes dois anos. Vocês são a minha “*joie de vivre*”.

Às minhas tias Enalda, Nalva, Claira e Cleide e aos meus tios Élvio e Lairton por estarem presentes em todos os momentos.

Também, agradeço aos amigos que a vida acadêmica presenteou-me: Vanessa Bortoluzzi, Lídia Einsfield, Lívia Bueno, Luíza Lena e Sara S. dos Santos. Mesmo distantes nossos laços continuam fortes.

Não posso esquecer dos meus amigos Marcio Lobo, Tiago Szinvelski e Ênio Monteiro que muito me ensinaram.

Outra pessoa que não pode faltar é a minha eterna “cônjuge” Eliana Machado de Linhares a quem devo muita gratidão porque esteve comigo em momentos bem difíceis.

Às queridas colegas do LabFito Thiele, Mariana, Marina, Aline e Amanda.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia, Kadu, Julie, Bruno, Bruna e Isabel pela ajuda nos experimentos.

À professora Liliane pela amizade, apoio e ensinamentos.

À professora Margareth por me orientar no mestrado e solucionar os problemas de forma muito prática.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos.

Ao secretário Paulo por ter sido sempre solícito.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo auxílio com os experimentos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa pela bolsa de estudos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Scutia buxifolia* EM RATOS

AUTOR: ROBSON BORBA DE FREITAS
ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE
CO-ORIENTADORA: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de março de 2013.

As plantas medicinais foram e são de suma importância para a cura de diversas doenças. No entanto, o uso indiscriminado de plantas para fins terapêuticos pode provocar uma série de efeitos colaterais. Existem na literatura, vários relatos de intoxicação por plantas mundialmente usadas e em alguns casos, pacientes apresentaram falência hepática. O conhecimento dos efeitos tóxicos de matérias vegetais ainda é bastante insipiente, pois, há poucos trabalhos científicos sobre farmacocinética e farmacodinâmica. Plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos apresentam efeitos tóxicos para o fígado e já foram bem documentadas. *Scutia buxifolia* é uma Rhamnaceae que ocorre no Uruguai, Argentina e Brasil. Esta planta é popularmente usada no tratamento da hipertensão. Extratos e frações das folhas e cascas de *S. buxifolia* já tiveram suas atividades antimicrobianas e antioxidantes investigadas. Porém, os efeitos tóxicos do extrato de *S. buxifolia* são pouco conhecidos. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a toxicidade aguda e sub-crônica do extrato aquoso de *S. buxifolia* (SBSB). Neste extrato quantificou-se o conteúdo total de compostos fenólicos, taninos condensados, e flavonóides. A atividade antioxidante do SBSB determinada pelo método do DPPH é comparável à do ácido ascórbico. A dose única do SBSB nas concentrações de 100, 200 e 400 mg / kg de peso corporal administrada a ratos da raça Wistar, não causou mortalidade nos grupos e nem alterações comportamentais. Então, especula-se que a dose letal do SBSB seja maior que 400 mg/ kg de peso corporal. No ensaio sub-crônico, trinta e dois animais foram divididos em quatro grupos: o controle que recebeu água e, os experimentais que receberam o extrato nas mesmas doses que as utilizadas no ensaio da toxicidade aguda. Os animais receberam água ou extrato uma vez ao dia via gavagem, durante 30 dias. A atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e o nível de albumina foram mensurados no 15º de 30º dia de tratamento. O conteúdo de malondialdeído (MDA), de tióis não-protéicos e atividade antioxidante das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram quantificadas no fígado dos animais. O tratamento com o SBSB não eleva a atividade da AST e da ALT e, não altera o nível sérico de albumina nas doses de 100 e 400 mg/ kg de peso corporal. Os animais tratados com a dose de 200 mg/kg tiveram um aumento na atividade da enzima AST. O tratamento com SBSB preserva as defesas antioxidantes e não aumenta a peroxidação lipídica no tecido hepático. Esses achados juntamente com análise histopatológica mostram que o SBSB é seguro.

Palavras - chave: ácido cafeico, toxicidade, defesas antioxidantes, fígado.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

TOXICITY EVALUATION OF *Scutia buxifolia* AQUEOUS EXTRACT IN RATS

AUTHOR: ROBSON BORBA DE FREITAS

ADVISOR: MARGARETH LINDE ATHAYDE

CO-ADVISOR: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 07th, 2013.

Medicinal plants were and are very important for healing various diseases. However, improper use of plants for therapeutic purposes can cause a number of side effects. There are in the literature various reports about plants induced-toxicity and, in some cases patients have hepatic disorders. The knowledge about toxicity of vegetable materials is insipient because there are few scientific studies related to pharmacokinetics and pharmacodynamics. Plants containing pyrrolizidine alkaloids show hepatotoxic effects well documented. *Scutia buxifolia* Reiss is a Rhamnaceae. This plant occurred in Uruguay, Argentina and Brazil. It is used for hypertension treatment. Extracts and fractions obtained from *S. buxifolia* have antimicrobial and antioxidants effects. Nevertheless, *S. buxifolia* toxic effects are unknown. The present study was aimed to evaluate the acute and sub-chronic toxicity of *S. buxifolia* aqueous extract (SBSB). The flavonoids, condensed tannins, and flavonoids were measured in SBSB. The antioxidant scavenger capacity of SBSB was determined by DPPH assay. Antioxidant power of SBSB was comparable with the antioxidant ascorbic acid. The single dose of SBSB at concentrations 100, 200, 400 mg/ kg body weight administered to Wistar rats did not cause mortality and, behavioral changes. Then, we speculate that the lethal dose of SBSB is greater than 400 mg / kg body weight. In the sub-chronic assay, thirty-two animals are divided in 4 groups: the control group which receive distilled water by gavage and, the experimental groups which received the same doses used in the acute toxicity assay. The animals received water or SBSB once a day, during 30 days. The serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities and, serum albumin levels were measured on 15^o and 30^o day of treatment. The malondialdehyde (MDA) and non-protein thiol groups (NPSH) contents and, the antioxidant activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were quantified in the liver. Treatment with SBSB did not elevate the activity of AST and ALT, and did not alter the level of serum albumin in the doses of 100 and 400 mg / kg body weight. In animals treated with 200 mg / kg an increased activity of the enzyme AST was observed. This fact can occur due, probably, to hemolysis. Treatment with SBSB preserves antioxidant defenses and does not increase the lipid peroxidation in liver tissue. These findings along with histopathological analysis show that the SBSB is safe.

Key words: caffeic acid, toxicity, antioxidant defense, liver.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação. L representa um lipídeo.21

FIGURA 2 - Exemplares de *S. buxifolia* fotografados em Santana da Boa Vista, RS, em 2008 pelo fotógrafo Martin Molz Disponível na página do Flora RS (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1383), acessada em 23/01/2013.28

MANUSCRITO 1

FIGURE S1- Flavonols composition of SBSB. Data are means \pm standard deviations (S.D.). The symbols in the bars means statistically significant differences for $p < 0.001$52

FIGURE S2- Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels (A), CAT activity (B). Data are means \pm standard deviations (S.D.). There are no differences between groups for $p < 0.05$ 52

MANUSCRITO 2

FIGURE 1- Represented high performance liquid chromatography profile of the *S. buxifolia* lyophilized extract. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and kaempferol (peak 6).69

FIGURE 2- Aspartate aminotransferase (AST) values (A), alanine aminotransferase (ALT) values(B), albumin (C) values on serum. * Different between days. # Different from control group on the same day ($p < 0.05$).70

FIGURE 3- Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels expressed in nmol MDA/ mg protein. No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.71

FIGURE 4- Tissue sulfhydryl groups content (NPSH). No significant difference was noted between control group group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.72

FIGURE 5- Catalase (CAT) activity. No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.73

FIGURE 6- Superoxide dismutase (SOD) activity. No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.74

FIGURE 7- Light micrograph (H & E staining) of liver (A) control group (400x), (B) 100 mg of SBSB/ weight treated group (400x), (C) 200 mg of SBSB/ weight treated group (400x), (D) 400 mg of SBSB/ weight treated group (400x).). Figures show the centrilobular vein. There is presence of red blood cells on (C) and (D).75

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1 – Fármacos derivados de plantas..... 17

MANUSCRITO 1

TABLE S1 - Total phenolics content (TP), flavonoids content (FC), tannins content (TC) and antioxidant scavenger capacity IC_{50} of SBSB53

TABLE S2 - Water and food intake for animal treated with SBSB at different doses (0, 100, 200 and 400 mg/kg BW).....53

MANUSCRITO 2

TABLE 1- Phenolics and flavonoids composition of SBSB. *Results are expressed as mean of three \pm SD of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$ 76

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$ - oxigênio singlet
AcOEt - acetato de etila
ALT- alanina aminotransferase
AP - alcalóide pirrolizidínico
ATCC - american type culture collection
CAT - catalase
 CCl_4 - tetracloreto de carbono
 CH_2Cl_2 - diclorometano
 DL_{50} – dose letal 50
DMN- dimetilnitrosamina
DNA - ácido desoxirribonucléico
DPPH - 2,2-difenil,1-picrihidrazila
ERN - espécie reativa de nitrogênio
ERO - espécie reativa de oxigênio
FA – fosfatase alcalina
GABA - ácido gama-aminobutírico
GGT – gama glutami transferase
GGT - gama-glutamyl-transferase
GPx - glutathione peroxidase
GSH - glutathione
GSSG - glutathione oxidada
GT - glutathione transferase
 H_2O_2 - peróxido de hidrogênio
 HO_2^\bullet - radical hidroperoxila
 IC_{50} - concentração inibitória 50
INF - interferon
 L^\bullet - radical lipídico
 IC_{50} – concentração inibitória 50
 LO^\bullet - radical alcóxila
 LOO^\bullet - radical peróxila
LPO – lipoperoxidação

mg – miligrama

MTC - medicina tradicional chinesa

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NAPBQI - n-acetil-p-benzoquinonaimina

n-BuOH - butanol

NPSH – grupos sulfidrílicos não-proteicos

O₂ - oxigênio molecular

O₂[•] - radical superóxido

HO[•] - hidroxila

RL - radical livre

-SH - grupo sulfrídrico

SOD - superóxido dismutase

-SS - ponte dissulfeto

TAA – tioacetamida

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	14
II	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
III	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	Espécies oxidantes	19
3.2	Peroxidação lipídica	20
3.3	Principais defesas antioxidantes enzimáticas.....	22
3.3.1	Superóxido dismutase (SOD)	22
3.3.2	Catalase (CAT).....	22
3.3.3	Glutathione peroxidase GPx.....	22
3.3.4	Glutathione transferase (GT)	23
3.4	Defesas antioxidantes não-enzimáticas	23
3.4.1	Glutathione	23
3.4.2	Vitamina E	23
3.4.3	Vitamina C	24
3.4.4	Carotenóides	24
3.5	Principais classes de compostos naturais de origem vegetal	24
3.6	Considerações gerais sobre <i>Scutia buxifolia</i>	26
3.7	Toxicidade de plantas medicinais.....	28
3.8	Considerações gerais sobre a função hepática	33
IV	MANUSCRITOS	40
4.1	Manuscrito 1.....	40
4.2	Manuscrito 2.....	54
V	DISCUSSÃO GERAL	77
VI	CONCLUSÕES	83
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

I INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram por muito tempo a fonte de cura para muitas doenças. A terapia herbal é baseada no uso de diversos materiais provenientes de plantas: folhas, cascas, caules, raízes, brotos e outros. Estes materiais podem ser preparados das mais variadas formas através da decocção, infusão e maceração. Também, a planta *in natura* é consumida com finalidade terapêutica. A forma de uso está intimamente ligada ao tipo de planta e aos princípios ativos nela presentes (JUNIOR V. E. V.; PINTO, A. C., 2005).

A biodiversidade dos vegetais constitui uma vasta fonte de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças. Através da análise da medicina de civilizações tradicionais, pesquisadores iniciaram estudos clínicos, farmacológicos e químicos na tentativa de descobrir os princípios ativos das plantas medicinais por elas utilizadas (RATES, S. M. K., 2001). Assim, surgiram os primeiros fármacos com ação biológica elucidada, entre eles: o ácido acetilsalicílico, a digitoxina, a morfina, a quinina e a pilocarpina. E, juntamente com o avanço da indústria farmacêutica, foi observada uma desaceleração no consumo de plantas medicinais. E, culturalmente, foi consolidada a crença de que os medicamentos alopáticos eram mais eficazes, mais potentes e mais seguros. No entanto, os estudos destas plantas não sucumbiram aos avanços da química e da farmacologia. Desta forma, pesquisadores observaram a vastíssima gama de compostos naturais fitoquímicos e suas potencialidades para a produção de novos fármacos (ZÁRATE, R. et al., 2001).

O crescente número de pesquisas químicas e farmacêuticas ao longo do século XX permitiu o desenvolvimento de alternativas farmacológicas para o tratamento de males que assolaram por muito tempo a humanidade, como a tuberculose, a sífilis, o câncer e a hanseníase (CORDEIRO, C .H. G.; CHUNG, M. C., SACRAMENTO, L. V. S., 2005). Também, observou-se um contínuo incremento no número de medicamentos alopáticos usados no tratamento de doenças bastante prevalentes na contemporaneidade como aqueles usados na depressão, diabetes, cardiopatias e na síndrome da imunodeficiência adquirida. Por outro lado, a oferta de medicamentos alopáticos não resolveu totalmente os problemas de saúde, principalmente em populações de países subdesenvolvidos que possuem poder aquisitivo limitado e acesso dificultado a centros especializados de saúde. Segundo um relatório divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da

população destes países tem nas plantas medicinais a fonte de cura e prevenção de doenças (AKERELE, O.,1993).

Muitos farmacólogos usados na clínica são de origem natural ou semi-sintética. Um exemplo clássico é a silimarina. Este composto bioativo é extraído dos frutos de cardo mariano (*Silybum marianum* L. Gaertn). Apresenta propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, anti-hepatotóxicas e hepatoprotetoras (HEVIA, F. et al., 2007). Estudos epidemiológicos mostram que as doenças hepáticas de etiologia viral são de difícil tratamento e que muitos pacientes são refratários aos tratamentos com glicocorticóides e interferon (IFN). Neste cenário, figura-se o uso de extratos padronizados de silimarina. Fried e colaboradores (2012) estudaram o efeito de altas doses de silimarina em pacientes refratários aos tratamentos prosaicos e, ao longo de 24 semanas, observaram que a silimarina não exacerba os níveis séricos da enzima alanina aminotransferase (ALT) e o de nível sérico de RNA viral não foi alterado em pacientes acometidos pela hepatite C.

Ginkgo biloba é considerada uma planta fóssil, sendo a única representante do gênero. A palavra 'gingko' é derivada do chinês *ginkyo* e significa damasco prateado. Na medicina tradicional chinesa (MTC), tem sido utilizada a milhões de anos para o tratamento de afecções do trato respiratório (KLEIJNEN, J.; KNIPSCHILD, P.,1992). No entanto, seu uso clínico abrange, principalmente, as áreas da psiquiatria e da neurologia. Diversos estudos duplos-cegos placebo controlados realizados em pacientes com demência moderada, semelhante ao mal de Alzheimer, tiveram melhora na memória, na atenção e na cognição. Em adição, os efeitos benéficos do ginkgo no cérebro, postulados por pesquisadores, parecem estar relacionados à atividade antioxidante e inibidora da agregação plaquetária (OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A, 1998).

A erva de são João (*Hypericum perforatum*) é usada para fins medicinais a mais de 2000 anos para o tratamento de feridas, da síndrome da fadiga crônica e doenças renais. Hoje, a planta tem sido a mais indicada para o tratamento da depressão. Extratos da planta contêm no mínimo dez componentes bioativos (e. g. *hypericum*) que contribuem nos seus efeitos farmacológicos. Atua na recaptação da serotonina, noradrenalina, do ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato. Estudos de coorte comprovam que a planta tem efeito antidepressivo superior ao placebo e semelhante ao de antidepressivos clássicos como o paroxetina (NATHAN, P. J., 2001).

A lista de fitoterápicos é vastíssima. E, vale lembrar, também, dos fármacos semi-sintéticos que tem como base de suas estruturas químicas, uma estrutura originalmente encontrada em plantas. Em 1785, Willian Withering publicou em um livro as propriedades medicinais da dedaleira (*Digitalis purpurea*). Na clínica moderna, ainda utiliza-se os heterosídeos cardiotônicos extraídos de plantas do gênero *Digitalis* (JUNIOR V. E. V.; PINTO, A. C., 2005).

Há plantas utilizadas em escala mundial e, *Silybum marianum*, *Gingko biloba*, *Hypericum perforatum* ilustram algumas das plantas medicinais mais usadas. Mas, há aquelas de uso regional que ficam restritas a uma determinada parcela da população. Dentre estas, podemos citar a *Scutia buxifolia*, uma árvore encontrada principalmente na América do Sul. No Rio Grande do Sul, ela é popularmente chamada de “canela-de-espinho”, “espinho-de-touro” ou “coronilha”. As cascas das raízes da coronilha contêm material tintorial e serve para a preparação de chás usados no tratamento de desordens cardíacas (WASICKY, R.; WASICKY, M., 1964). Em Porto Alegre, esta planta é vendida por ambulantes como emagrecedora e diurética (DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER M. R., 2007). Estudos fitoquímicos, revelam a presença de alcalóides ciclopetídeos, taninos, flavonóides, antocianinas, esteróides e triterpenos em extratos de *S. buxifolia* (MOREL, A. F. et al., 2005; BOLIGON, A. A. et al, 2012). As propriedades medicinais desta planta, provavelmente, estão relacionadas à elevada concentração de compostos antioxidantes como a quercetina. Este flavonóide tem propriedades antiinflamatórias, anticarcinogênicas, anti-hipertensivas e hepatoprotetoras e é o mais encontrado em frutas e vegetais (CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L., 1997).

Hoje, muitas pessoas buscam tratamentos alternativos ao invés dos alopáticos. Elas acreditam que as terapias de origem natural são mais seguras, eficazes e isentas de efeitos colaterais. Dessa, forma aumentou o número de usuários de plantas medicinais, nutracêuticos, e vitaminas (HERRERA, S.; BRUGUERA, M., 2008). O modismo de que toda matéria de origem natural pregado pela publicidade e pela literatura leiga, levou a um aumento crescente nos casos de intoxicação por plantas medicinais, minerais, vitaminas e outros. A maioria dos casos reportados, são os de hepatite tóxica causadas pelo uso em larga escala de plantas ricas em alcalóides pirrolizidínicos, triterpenos e lactonas (FURBEE, R. B.; BARLOTTA, K. S.; ALLEN, M. K.; HOLSTEGE, C. P., 2006).

Muitos destes casos seriam evitados se as plantas medicinais fossem detalhadamente estudadas. Na literatura, existe um número reduzido de informações sobre doses terapêuticas e tóxicas, interações medicamentosas e outras informações a respeito da fitoterapia. E, é neste mote que se baseia esta dissertação. Até o presente momento, nenhum ensaio de toxicidade tinha sido desenvolvido com *S. buxifolia* em ratos. A toxicidade do extrato aquoso foi investigada em animais que foram tratados aguda e subcronicamente. No ensaio da toxicidade sub-crônica, o órgão alvo do estudo foi o fígado, pois, este é o maior órgão de detoxificação (POUTON, C. W.; HAYNES, J. M., 2005). Juntamente com os ensaios biológicos, foram conduzidas análises fitoquímicas no extrato estudado.

A presente dissertação divulga os resultados obtidos nos ensaios na forma de artigos científicos, sendo formatada de acordo com as diretrizes de cada periódico. Inclui, também, o item discussão geral, o qual aborda os resultados das publicações de forma conjunta, além da conclusão e referências bibliográficas.

-
- **Ácido acetilsalicílico:** encontrado na casca do salgueiro, foi descoberto a mais de um século atrás.
 - **Alcalóides extraídos da vinca (*Vinca rosea*):** são usados na quimioterapia do câncer.
 - **Quinina:** deriva da raiz de *Cinchona*, é usada no tratamento da malária.
 - **Morfina:** é o alcalóide prevalente encontrado no ópio (*Papaver soniferum*). O ópio é usado para fins medicinais a milhares de anos.

Tabela 1 – Fármacos derivados de plantas.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.

O presente estudo objetivou investigar a toxicidade do extrato aquoso da casca das raízes de *S. buxifolia* (SBSB) em ratos através de dois ensaios experimentais.

2.2 Objetivos específicos

- Dosar o conteúdo total de compostos fenólicos, flavonóides e taninos condensados no SBSB;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do SBSB através do método do 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH);
- Quantificar os compostos naturais presentes no SBSB através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Realizar o teste de toxicidade aguda do SBSB em ratos através do método da dose letal 50 (DL₅₀);
- Investigar efeitos tóxicos do SBSB através da administração sub-crônica deste em diferentes doses administrado a ratos da raça Wistar;
- Avaliar os seguintes parâmetros: atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo de tióis não – protéicos (NPSH) no tecido hepático.
- Analisar a presença de hemorragia, inflamação, cirrose, necrose, congestão sinusoidal e ruptura das veias centrais nos tecidos hepáticos dos animais do grupo controle e dos animais dos grupos experimentais através da análise histopatológica;
- Quantificar no plasma sanguíneo dos animais os seguintes marcadores de lesão e função hepática: ALT, AST e albumina.

III REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Espécies oxidantes

Para entender o mecanismo de ação de plantas medicinais que está normalmente vinculado à atividade antioxidante total, é pertinente conhecer o conceito de radicais livres (RLs), espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). O átomo consiste de um núcleo, contendo nêutrons, prótons (cargas positivas) e elétrons (cargas negativas). O número de prótons determina o número de elétrons que orbitam um ou mais orbitais. Um átomo é considerado fundamental quando cada elétron no orbital mais externo tem um elétron correspondente movimentando-se no sentido oposto. Os termos 'oxidação' e 'redução' são usados para denotar perda ou ganho de elétrons, respectivamente (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C., 2007).

Os RLs e espécies reativas referem-se a átomos (por exemplo: nitrogênio e oxigênio) ou moléculas possuidores de elétrons desemparelhados nos orbitais mais externos. O elétron desemparelhado torna os RLs, as EROs e as ERNs altamente reativos. Com a finalidade de estabilizar-se o radical intercepta elétrons de outras estruturas. E estas se tornam espécies radicalares, necessitando de um elétron para emparelharem sua nuvem eletrônica (FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S., 1997). Desta forma, é estabelecida uma reação em cadeia (efeito cascata). Quando o oxigênio recebe um elétron, o radical superóxido (O_2^{\bullet}) é formado. O principal alvo deste ânion é o DNA presente na mitocôndria. A interação entre O_2^{\bullet} e células, resulta, eventualmente, em dano na membrana lipoproteica, mutações no DNA, e morte celular (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. C., 1990).

RLs, EROs e ERNs são quimicamente instáveis, e só tornam-se estáveis porque tem predileção pela membrana lipídica celular, retirando elétrons desta estrutura. Estes são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente; recebe 4 elétrons, formando intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^{\bullet}), hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) e hidroxila (HO^{\bullet}). Também há formação de moléculas de peróxido de hidrogênio que não possui instabilidade química. Normalmente, a redução a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria com a entrada de 4 elétrons (COHEN M. V., 1989). Durante a primeira redução do oxigênio

molecular, forma-se ânions superóxido. Estes ânions são gerados em praticamente todas as células aeróbias e tem um pico de produção durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. O superóxido protonado recebe o nome de radical hidroperoxila. O radical hidroxila (OH^\bullet) é o mais reativo das EROs (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. C., 1990).

Dessa forma, se o HO^\bullet for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação da molécula de DNA. Além disso, o HO^\bullet pode desestruturar várias proteínas (enzimas e membranas celulares) ao oxidar seus grupos sulfidrílicos (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Inicia também a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (EATON J. W., 1991).

O peróxido de hidrogênio não pertence ao grupo das espécies radiculares pois sua molécula é estável. Porém, este fato não o torna menos reativo que os demais. O H_2O_2 é produto do metabolismo incompleto do oxigênio. Possui ação deletéria a estruturas celulares porque é peça chave na produção de OH^\bullet . Apresenta vida longa, sendo capaz de atravessar camadas lipídicas, interagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, como ocorre na hemocromatose transfusional. Já o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) é a forma excitada de oxigênio molecular e não apresenta elétrons desemparelhados em sua nuvem eletrônica (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. C., 1990).

3.2 Peroxidação lipídica

Os efeitos tóxicos do oxigênio começaram a ser investigados no século XIX (LORRAIN-SMITH, J., 1899) e movimentaram pesquisas ao longo do século XX e, ainda é foco de muitas investigações. A toxicidade do O_2 é mediada pela oxidação de componentes celulares, como: (a) tióis, (b) co-fatores enzimáticos, (c) proteínas, (d) nucleotídeos e (e) lípidos poliinsaturados (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C.,2007).

As EROs e ERNs estão relacionadas a etiologia de uma gama de doenças, incluindo o câncer (RAMIREZ, L. V. et al.,2012) doenças hepáticas (KUMAR, R. S.; ASOKKUMAR, K.; MURTHY, N.V., 2011) aterosclerose (CALDERÓN, J.

C.; FERNÁNDEZ, A. Z.; DE JESÚS, A. I. M., 2008) e envelhecimento (BRUCE, A.; BUEHLER, M. D., 2012).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é uma cascata de eventos bioquímicos, resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares. Este processo acarreta em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade da troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA). Estes eventos podem culminar em morte celular.

A LPO é iniciada pelo sequestro de um hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular. A reação é deflagrada, normalmente, pelo radical HO^\bullet e, também, pelo radical alcóxila (LO^\bullet), com posterior formação do radical lipídico (L^\bullet). Na primeira reação de propagação, mostrada na Figura 1, O L^\bullet instantaneamente reage com o O_2 , produzindo o radical peróxila (LOO^\bullet), que por sua vez, sequestrará outro hidrogênio do ácido graxo polinsaturado. Desta forma, novamente, o L^\bullet será formado na segunda fase da propagação. A interrupção da reação, ocorre quando os radicais L^\bullet e LOO^\bullet , produzidos nas etapas anteriores propagam-se até atingirem a estabilidade química. (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C., 2007).

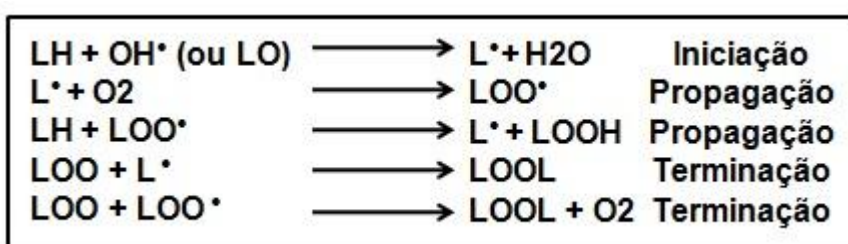


Figura 1. Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação. L representa um lipídeo.

A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Além de ser um fator envolvido na renovação da membrana, a LPO é passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose, pinocitose e lise de membranas intracelulares (MEERSON et al., 1982).

3.3 Principais defesas antioxidantes enzimáticas

3.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD participa de um grupo de enzimas possuidoras de diferentes grupos prostéticos em sua estrutura. Nas células eucarióticas existem duas isoformas de SOD. Elas diferem entre si, tanto na composição quanto no local onde estão presentes. A forma SOD-cobre-zinco localiza-se principalmente no citosol, enquanto que a SOD-manganês é encontrada no espaço intermembranas mitocondrial. A ação antioxidante desta enzima é dada pela capacidade que possui de dismutar o ânion superóxido em O_2 e H_2O_2 . (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C., 2007).

3.3.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína com capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Esta enzima está presente no citosol de células sanguíneas, cardíacas, renais e hepáticas. Sua atividade é dependente de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P). O peróxido de hidrogênio é fracamente reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor membranas celulares facilmente e gerar o radical OH^* (SCOTT M.D., et al., 1991).

3.3.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A enzima GPx pode reagir com uma grande variedade de peróxidos e hidroperóxidos além do H_2O_2 e os hidroperóxidos derivados dos ácidos graxos. Para isto, a enzima emprega a glutathiona (GSH) como co-substrato. A GSH oxidada se reduz por ação da enzima GSH-redutase, que por sua vez utiliza NADPH como co-factor. A metabolização dos hidroperóxidos originam espécies radicalares (FLOHE, L.; GUNZLER, W. A., 1984).

3.3.4 Glutathiona transferase (GT)

A Glutathione transferase (GT) é uma enzima que catalisa a metabolização de xenobióticos por conjugação com a GSH. Está presente nas células hepáticas e detoxifica o fígado da glutathione oxidada (GSSG) quando este órgão sofre dano oxidativo. A transferase também pode metabolizar aldeídos citotóxicos gerados durante a peroxidação lipídica (HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P., 2008).

3.4 Defesas antioxidantes não-enzimáticas

3.4.1 Glutathione (GSH)

A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular e é substrato para a enzima GPx. Além de participar das reações mediadas pelas enzimas GPx e GT, atua também no metabolismo do ácido ascórbico. Sua ação antioxidante previne a oxidação de grupos sulfidrílicos de proteínas. Também, diminui a produção de RLS por ter a capacidade de quelar íons cobre. Talvez sua função mais importante seja a proteção que exerce frente ao dano oxidativo, causado por EROs, geradas durante o metabolismo normal das células (MORAN, L. K.; GUTTERIDGE, J. M. C.; QUINLAN, G. J., 2001).

Suas propriedades químicas permitem atuar como nucleófilo e como um redutor efetivo que interage com numerosos agentes eletrofílicos e oxidantes como o H_2O_2 , o O_2^- e o OH^\bullet . Quando reage com estas espécies, protege os tecidos do dano oxidativo causado pelo OH^\bullet . A diminuição no conteúdo de GSH parece estar ligada com a etiologia de doenças neoplásicas e neurodegenerativas (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C., 2007).

3.4.2 Vitamina E

A vitamina E é o antioxidante mais amplamente distribuído nos tecidos e no plasma. É componente dos óleos vegetais e existem no mínimo oito isômeros da vitamina E, sendo o α -tocoferol o mais conhecido e o que possui atividade biológica mais pronunciada. Participa da estrutura de membranas ricas em lipídeos como as membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático. Interage com lipoperóxidos e radicais alcoxil, protegendo as membranas biológicas do dano oxidativo. Por ter

caráter lipofílico é o principal agente de terminação de reações em cadeia na porção lipofílica das lipoproteínas plasmáticas (MORRISSEY, P. A., SHEEHY, P. J. A., GAYNOR, P., 1994).

3.4.3 Vitamina C

A vitamina C atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a oxidação de lipídeos. Neutraliza os radicais OH^{\bullet} e HO_2^{\bullet} e regenera a vitamina E. Atua também nas reações de dismutação, interrompendo as reações em cadeia (ODIN, A. P., 1997).

3.4.4 Carotenóides

Os carotenóides são corantes naturais presentes em frutas e vegetais (cenoura, tomate, espinafre, laranjas, pêsego, entre outros). Apresentam propriedades antioxidantes porque estes compostos sequestram o ($^1\text{O}_2$) e removem os radicais peróxidos, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células (junções *gap*), e elevam a resposta imune (OLSON J. A., 1999). *In vivo* inibem a LPO induzida pelo sistema xantina oxidase. *In vitro*, podem atuar também como oxidantes em alta pressão parcial de O_2 (KRINSKY, N. I., 1989).

3.5 Principais classes de compostos naturais de origem vegetal

Fenóis possuem um anel benzênico com grupos fenólicos ligados a esta estrutura. Flavonóides pertencem ao grupo de compostos fenólicos, e mais de 4000 tipos de compostos já foram identificados. Estes são pigmentos solúveis em água e atuam como potentes antioxidantes, sendo capazes de estabilizar o radical hidroxila, ânions superóxido e radicais derivados de lipídeos (DUNNE F. J., 2009; MILLER L. G., 1996).

Polifenóis tais como: flavonóides e taninos (protocianidinas oligoméricas) inibiram, em estudos *in vitro*, a oxidação de proteínas de baixa densidade. Dessa

forma, previnem o desenvolvimento da aterosclerose. O consumo moderado de vinho tinto que é rico em compostos fenólicos, diminui a oxidação de proteínas de baixa densidade, interrompendo o primeiro passo da aterogênese, reduzindo o risco de doenças coronárias (MILLER L. G.,1996). Em adição, em função de suas propriedades antioxidantes, os flavonóides podem aumentar o fluxo cerebral e periférico de sangue através da vasodilatação mediada pelo óxido nítrico. Eles também inibem a conversão da enzima angiotensina, responsável pelo aumento da pressão arterial (DUNNE, F. J., 2009).

Flavonóides fazem parte da composição de uma gama de produtos, incluindo chás, vinho tinto, chocolate e plantas medicinais. Os mais investigados são: a quercetina, miricetina, a rutina e narigenina. A quercetina é o flavonóide mais abundante da dieta e é encontrada em frutas e vegetais. Entretanto, este antioxidante pode reagir com íons ferro e tornar-se um pró-oxidante (CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L., 1997).

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água com massa molécula na faixa de 500 a 3000 Daltons. Formam complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas. Eles conferem adstringência a frutos e outras matérias primas vegetais. São estratificados em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis e os condensados. Os hidrolisáveis apresentam um poliol geralmente a β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico. Os condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe de taninos também é denominada como proantocianidinas porque os taninos condensados produzem pigmentos de tom avermelhado (MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, V. P.; ARAÚJO, E. L.. 2005). Na medicina popular, utilizam-se plantas ricas em taninos no tratamento de distúrbios gástricos (gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e processos inflamatórios. A ação farmacológica destes compostos parece estar relacionada principalmente a três características: habilidade de complexarem-se a íons metálicos (ferro, manganês, cobre e cálcio); atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (*scavenger*); liga-se a macromoléculas (proteínas e polisacarídeos) (SIMÕES, C. et al., 2000).

Os alcalóides são compostos heterocíclicos, que possuem um ou mais nitrogênios em seu esqueleto carbônico. Encontram-se principalmente em angiospermas, a maioria apresenta caráter alcalino. Nas plantas, eles exercem

proteção contra predadores, contra parasitas e contra os raios UV, pois, seus núcleos aromáticos absorvem grandes quantidades de energia. Na terapêutica, muitos alcalóides são empregados: emetina (emético), atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgicos), reserpina (anti-hipertensivo), quinina (antimalárico), morfina (analgésico), cafeína (estimulante do sistema nervoso central), teobromina e teofilina (diuréticos), vincristina (antitumoral) e colchicina (tratamento da gota) (SIMÕES, C. et al., 2000).

3.6 Considerações gerais sobre a *Scutia buxifolia*

A família Rhamnaceae engloba plantas dos mais variados tipos, desde ervas até árvores, ocorrendo em florestas tropicais e subtropicais. (LIMA R. B., 2000). Esta família abrange 58 gêneros com aproximadamente 900 espécies (HEYWOOD V. H., 1993). As folhas apresentam morfologia simples, sendo alternadas e normalmente espiculadas, as flores são actinomórficas, bissexuais e pentâmeras. O androceu é formado por cinco estames opostos às pétalas e revestem o receptáculo floral. E, o gineceu, normalmente, é composto por pistilo de 2 a 4 carpelos e os frutos são drupas.

Scutia buxifolia é uma representante desta família. Esta planta é conhecida popularmente por “coronilha” ou “espinho de touro”, ocorrendo no sul do Brasil, Argentina e Uruguai (WASICKY, R.; WASICKY, M., 1964). No Rio Grande do Sul, aparece em florestas com araucárias, florestas ribeirinhas na Serra do Sudeste e no Litoral Sul (SOBRAL, M., et al. 2006). Ocorre também ocasionalmente na Depressão Central e é frequente em certas regiões elevadas da Serra do Sudeste. Seus arbustos podem atingir a altura máxima de 6 metros. Possuem folhas opostas e alternadas, inteiras ou com poucos dentes. As inflorescências são em fascículos axilares com flores pequenas e verdes. Floresce entre outubro e janeiro e dá frutos no mês de março. É usada na medicina popular devido a suas propriedades cardiotônicas, diuréticas e depurativas (WASICKY, R.; WASICKY, M., 1964).

Apresenta ação eletiva pelo sangue e coração, sendo utilizada para curar e aliviar enfermidades tais como: hipertensão arterial, taquicardia e aterosclerose. No Rio Grande do Sul, sua casca de tom avermelhado é adicionada à água do chimarrão. Com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante desta planta, seu extrato bruto e suas frações diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e n-

butanol (n-BuOH) foram submetidos ao método fotocolorimétrico do 2,2-difenil,1-picrihidrazila (DPPH) o qual mensura a capacidade antioxidante total de substâncias. A habilidade de atenuar a absorção do radical DPPH é medida pela descoloração do DPPH que na ausência de antioxidantes possui cor violácea em solução. Em contato com extratos ricos em antioxidantes, a cor passa de violeta para amarela. Neste ensaio, determina-se o IC₅₀ (concentração de extrato ou fração hábil em diminuir a absorbância do radical DPPH em 50% no comprimento de onda de 518 nm). Boligon e colaboradores (2009) mostraram que a IC₅₀ para as frações n-BuOH e AcOEt dos ramos de *S. buxifolia* são $5,74 \pm 0,40$ mg e $6,69 \pm 0,76$ mg, respectivamente. Quanto ao conteúdo de polifenóis e flavonóides, o resultados indicaram que a fração mais rica nestes compostos foi a butanólica. A avaliação fitoquímica dos ramos de *Scutia buxifolia* revelou a presença de cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cianogênicos, fenóis e alcalóides (BOLIGON, A. A. et al., 2009). Portanto, a atividade antioxidante desta planta é justificada pela presença de heterosídeos cianogênicos e flavonóides. A análise fitoquímica das folhas de *S. buxifolia* revela que a fração AcOEt é a possuidora do maior conteúdo de alcalóides totais (BOLIGON A. A., et al, 2012).

Substâncias de origem natural, sejam elas extratos ou compostos isolados são capazes de controlar ou inviabilizar patógenos como bactérias, fungos e vírus (HAYOUNI, E.A. et al.,2008) Bactérias do gênero *Paenibacillus* são responsáveis por causarem infecções em abelhas, levando a diminuição na produção de mel. O extrato bruto *S. buxifolia* e suas frações tiveram suas atividades antimicrobianas testadas frente as bactérias *P. larvae*, *P. borealis*, *P. validus*, *P. pabuli* e *P. azotofixans* pelos métodos da difusão em disco e concentração mínima inibitória. Todas as espécies de *Paenibacillus* testadas foram suscetíveis aos preparados a base das cascas das raízes de *S. buxifolia*. A planta não apresenta toxidez para abelhas da espécie *Apis mellífera* quando o seu extrato foi borrifado uma vez ao dia durante 15 dias em um placa de Petri modificada, contento 6 exemplares adultos da espécie. Boligon e colaboradores (2012) concluíram que a planta testada não causa mortalidade na população de abelhas, sendo possível o uso de extratos de *S. buxifolia* no controle de infecções causadas por *Paenibacillus* spp..

Morel e colaboradores (2005) isolaram do extrato metanólico das cascas das raízes de *S. buxifolia* alcalóides ciclopéptídeos denominados scutianinas. A atividade antimicrobiana destes alcalóides foi avaliada através do método da autobiografia. O

composto com maior espectro de atividade foi a scutianina E. Esta foi efetiva contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25792 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

A fração acetato de etila e os compostos quercetina, rutina e isoquercitina isolados de *S. buxifolia* protegem o DNA de linfócitos humanos do dano causado por H₂O₂ (BOLIGON, A. A. et al., 2012).



Figura 2 – Exemplares de *S. buxifolia* fotografados em Santana da Boa Vista, RS, em 2008 pelo fotógrafo Martin Molz. Disponível na página do Flora RS (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1383), acessada em 23/01/2013.

3.7 Toxicidade de plantas medicinais

No relatório de 2011, do Centro de Informação Toxicológica (CIT) do Rio Grande do Sul, constam nove ocorrências de intoxicação por plantas medicinais. Destas, três foram ocasionadas pela administração de “árvore – avenca” (*Ginkgo biloba*), duas pela “babosa” (*Aloe vera*), um pela “porangaba” (*Cordia ecalyculata*) e três por valeriana (*Valeriana officinalis*). As intoxicações, de acordo com este relatório, acometeram pacientes com faixa etária maior que 19 anos (NICOLELLA, A., FERREIRA, E. M., LESSA, C. A., 2011).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e são indicadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes estas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a toxicidade dos medicamentos usados nos tratamentos alopáticos, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. No entanto, esta conclusão é equivocada, pois, há poucos estudos pré-clínicos e clínicos realizados com plantas. E, muitas investigações científicas já evidenciam a toxidez de alguns compostos e alertam para o uso racional de plantas que os contém (JUNIOR V. E. V.; PINTO, A. C., 2005).

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos séculos, que determinadas preparações apresentam compostos químicos potencialmente letais para humanos e outras espécies (FURBEE, R. B. et al., 2006). Na segunda década do século XX, casos de intoxicação por plantas do gênero *Senecio*, ocorridos na África do Sul, levantaram a hipótese de que algum composto presente nelas seria responsável por alterações no metabolismo hepático. Apenas na década de 80, os alcalóides pirroizilidínicos (APs), encontrados nas espécies dos gêneros *Senecio*, *Crotalaria*, *Helioropium* e *Symphytum*, foram identificados como os causadores de doenças hepáticas (STICKEL F.; EGERER, G.; SEITZ H.K., 2000). Os pirrólicos danificam o endotélio sinusoidal, causando o extravasamento de células vermelhas para o espaço de Disse (CHOJKIER, M., 2003). Em resposta a este evento, são geradas fibras de reticulina no lúmen das veias centrais e sublobulares que obstruem o fluxo venoso, causando congestão hepática. O quadro pode evoluir para necrose (CHOJKIER, M., 2003). Crianças apresentam sensibilidade aumentada aos APs. Nas intoxicações agudas, os pacientes manifestam dores abdominais e ascite. Dos casos reportados, aproximadamente 20% dos pacientes faleceram (STICKEL, F., EGERER, G., SEITZ, H. K., 2000). No entanto, dados sobre incidência e prevalência não são exatamente conhecidos. Na forma crônica, diarreia e fraqueza aparecem com elevada frequência. Além destes, já houve relatos de pressão portal aumentada, encefalopatias e morte (STEENKAMP V., STEWART M. J., ZUCKERMAN M., 2000).

O têucríio ou camédrius (*Teucrium chamaedrys*) é detentor de muitas propriedades farmacológicas, sendo empregado principalmente no tratamento da

gota, diarreia e febre. Em 1992, surgiram os primeiros casos de hepatite tóxica causados pela ingestão desta planta. A maioria dos casos envolveu mulheres usuárias de formulações emagrecedoras contendo têucio em concentrações que variavam entre 600 e 1600 mg por dia (STICKEL, F., EGERER, G., SEITZ, H. K., 2000). A hepatite colestática aguda foi o quadro clínico mais prevalente nos pacientes que desenvolveram cirrose. A origem do efeito tóxico foi atribuída a diterpenos *neo-clerodano* (FAU, D., 1997). Estes diterpenos sofrem metabolização pela enzimas do citocromo p450, gerando hepatotoxinas que possuem uma subunidade epóxido em suas estruturas moleculares. Estudos *in vitro* evidenciaram que diterpenóides causam apoptose em hepatócitos de ratos. Metabólitos eletrofílicos estimulam a apoptose através da captura de tióis, da elevação do conteúdo de cálcio intracelular e ativação de enzimas dependentes de cálcio (transglutaminase e endonuclease) (FAU, D., 1997).

Outra planta medicinal bastante utilizada mundialmente é o “confrei” (*Symphytum officinale*). Ela apresenta elevada concentração de alantoína por isso é detentora de um potente efeito cicatrizante. Mas, também é rica em alcalóides pirrolizidínicos que possuem atividades hepatotóxicas e carcinogênicas já elucidadas. O “confrei”, em sua composição fitoquímica, mostra no mínimo 14 APs, incluindo sinfidina, equimidina e lasiocarpina. Estas substâncias interagem com o DNA de células hepáticas e hepatócitos, resultando em dano ao DNA, mutações e câncer (MEI, N. et al, 2010). Após a notificação de um elevado número de casos de morte desencadeados por estes alcalóides, o uso medicinal do confrei foi condenado pela OMS.

O fitoterápico *Ginkgo biloba* é um dos mais prescritos por clínicos na Europa. E estava presente em 5,4 milhões de prescrições médicas realizadas apenas na Alemanha (BLUMENTAHL, M., 1998). O ginkgo apresenta efeitos colaterais quando administrado em altas doses ou em tratamentos crônicos. Alguns pacientes relataram náusea e vômito. Outros reportaram salivação aumentada, perda de apetite, enxaqueca, alergias cutâneas e insônia. Já foram notificados casos de hemorragia cerebral e subaracnóidea em pacientes que associavam varfarina e aspirina ao tratamento com ginkgo. Estes eventos possivelmente ocorrem porque a planta inibe o fator de agregação plaquetário (DUNNE, F. J., 2009).

As plantas medicinais tem uso limitado quando prescritas por profissionais qualificados porque há uma estreita margem entre os efeitos terapêuticos e tóxicos.

Um exemplo clássico relatado na literatura é a intoxicação causada pelo acônito (*Aconitum napellus*). No Reino Unido e na Ásia, o número de casos de intoxicação ocasionados pelo uso indiscriminado do acônito aumentou nas últimas décadas. Na medicina chinesa, a planta integra o grupo de plantas usadas no tratamento da dor musculoesquelética (CHAN, T. Y. et al, 1993). As raízes são adicionadas em água fervente para que algumas das toxinas presentes no material vegetal sejam hidrolisadas. Se corretamente preparados, os chás parecem ser seguros, porém os efeitos tóxicos aumentam quando plantas processadas incorretamente são usadas (SIMÕES, C. et al., 2000).

Kava (*Piper methysticum*) é uma planta nativa das ilhas do Pacífico Sul. Os ingeriam macerados de kava em cerimônias religiosas e usavam as raízes para o tratamento de distúrbios psíquicos (COTE C. S. et al., 2004). Os efeitos sedativos e ansiolíticos já são bem descritos na literatura. E, as propriedades farmacológicas da planta foram atribuídas a um grupo de compostos, coletivamente chamados de lactonas da kava ou kavalactonas (SINGH Y. N.; SINGH N. N., 2002).

A hepatotoxicidade da kava parece estar intimamente ligada ao método de extração das lactonas (CLOUATRE, D. L., 2004). As extrações tradicionais são macerações feitas com uma mistura de água e leite de coco. Os extratos comerciais são produzidos pela extração com etanol, metanol ou acetona. Estudos comprovam que extrações com água são menos tóxicas do que as preparadas com solventes orgânicos. O extrato aquoso das raízes contém 30% de lactonas, enquanto que a extração com acetona produz um extrato com teor de 70% destes compostos (STICKEL, F. et al., 2003).

O mecanismo envolvido na injúria hepática induzida pelas raízes de kava ainda não foi bem elucidado. Porém, acredita-se que esta reside em alterações metabólicas e/ ou em eventos idiossincráticos. As kavalactonas inibem a atividade do citocromo p450 (RUSSMANN, S. et al., 2005). Experimentalmente, foi demonstrada uma significativa inibição na atividade das enzimas CYP1A2, 2C9 /19, 2D6, 3A4 e 4A9/11. Produtos que contém altos teores de kavalactonas aumentam a peroxidação lipídica e depletam as reservas de glutatona. A atividade sérica da enzima gama-glutamil-transferase (GGT) em consumidores de kava está normalmente aumentada, sendo este achado clínico indicativo de hepatite tóxica (DENHAM, A.; MCINTYRE, M.; WHITEHOUSE J., 2002).

Croton cajucara comumente conhecida como sacaca é um arbusto encontrado na Amazônia. A infusão de suas raízes e folhas é popularmente usada no tratamento da diabetes, diarreia, malária, febre, desordens gastrintestinais, renais e hepáticas, bem como no controle da hipercolesterolemia (DI STASI et al, 1989). Além disso, esta planta ficou bastante conhecida por auxiliar no processo de perda de peso. Porém, o uso contínuo do chá desta planta, levou a um aumento na incidência de casos de hepatite aguda, crônica e fulminante na população amazônica (JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M., 2005). O desenvolvimento de patologias hepáticas, geradas pelo uso de chás, dá-se pela suscetibilidade natural do fígado a agentes externos e ao elevado número de metabólitos presentes neste órgão (MINCIS, 1985).

Outros fitoquímicos como o apiol, o safrol e a lignanas já tiveram suas ações hepatotóxicas comprovadas. E, espécies que contém terpenos e saponinas podem ser nefrotóxicas. Além da toxicidade intrínseca às plantas, existem fatores extrínsecos, relacionados a eventos indesejáveis quando faz-se uso de fitoterápicos e outras preparações vegetais (CAPASSO, R. et al, 2000).

Metais pesados fazem parte das preparações farmacêuticas de várias vertentes da medicina oriental, geralmente incorporados às tinturas e aos extratos vegetais. Na medicina indiana, utiliza-se metais, como mercúrio, ferro, prata e zinco porque algumas desordens bioquímicas são desencadeadas pela carência de elementos traço no organismo (ERNST, E.; THOMPSON, C. J., 2001). Esses produtos são adicionados a tranquilizantes, anti-epilépticos, antiulcerogênicos e sedativos. A contaminação de vegetais com metais pesados pode ter inúmeras origens, tais como acidental, proposital, contaminação do solo e outras. Estudos recentes, realizados no Brasil com plantas nativas e outras oriundas de países estrangeiros, mostraram a presença de metais em altas concentrações. Em extratos de castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*) importados da França e Alemanha, o chumbo foi detectado em dose 4,4 vezes maior que a dose máxima recomendada. Além de metais pesados, adiciona-se medicamentos alopáticos a fitoterápicos com intuito de potencializar os efeitos terapêuticos de plantas. Este tipo de adulteração é bastante observado em formulações da MTC que são distribuídas no mundo todo e também em fórmulas magistrais vendidas em farmácias de manipulação (BENT, S., 2008).

Quando a planta não é coletada na estação correta, podem-se ter alterações no conteúdo de compostos bioativos. Em 1998, um estudo realizado nos EUA destacou a variação na qualidade de produtos a base da erva de são João (*Hypericum perforatum*), mostrando que a cada dez formulações, três tinham teor de compostos inferior ao declarado na bula. Por ser usada como antidepressiva, as formulações não tinham a eficácia esperada e com isso os sintomas da doença não eram tratados ou eram intensificados (MONMONEY, T., 1998). Além da toxicidade relacionada às toxinas e aos metais pesados, há aquela que não pode ser predita pois uma parcela da população manifesta efeitos colaterais no fígado e em outros órgãos de ordem idiossincrática (CORNS C. M., 2003).

3.8 Considerações gerais sobre a função hepática

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior estrutura glandular. Situa-se na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Este órgão recebe todos os nutrientes absorvidos pelo trato gastrintestinal, processando-os e armazenando-os para que sejam utilizados por outros órgãos. É, portanto, a ligação entre o sistema digestivo e o circulatório (MOORE, K. I., DALLEY, A. F., 2001). Aproximadamente 75% do sangue chega ao fígado através da veia porta. E, uma pequena parcela é suprida pela artéria hepática. Todas as substâncias absorvidas pelo intestino são carregadas pela circulação porta, excetuando-se os quilomicrons. O fígado aloja-se em uma posição que facilita a captação, a transformação, o acúmulo e a eliminação de metabólitos. A eliminação ocorre, principalmente na bile, uma secreção exócrina do fígado.

Este órgão é revestido por uma fina camada de tecido conjuntivo que fica mais espesso na região onde a veia porta e a artéria hepática alojam-se. Neste mesmo local, saem os ductos hepáticos e os linfáticos.

A estrutura celular que compõe majoritariamente o fígado é o hepatócito. Estas células estruturam-se em cordões interconectados. O lobo hepático é formado por uma estrutura poligonal de tecido cujo tamanho é variável. Na região periférica do lóbulos, há tecido conectivo contendo ductos biliares, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Essa região é chamada de espaço porta. Existem de 3 a 6 espaços porta por lóbulo, cada um contendo um ramo da veia porta, um ramo da

artéria hepática, um ducto (sistema de ductos biliares) e vasos linfáticos. A artéria hepática carrega sangue oriundo do tronco celíaco da aorta abdominal. A veia porta contém sangue proveniente do trato digestivo. E, o ducto transporta a bile que é sintetizada pelos hepatócitos, a qual desemboca no ducto hepático.

As células hepáticas estão dispostas radialmente no lóbulo hepático, formando placas celulares. As placas estão direcionadas da periferia do lóbulo para o seu centro, formando uma arquitetura labiríntica. Os espaços interplacas contêm capilares, os sinusóides hepáticos. As células endoteliais estão separadas dos hepatócitos adjacentes por uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial conhecido como espaço de Disse que contém microvilos dos hepatócitos. Líquidos provenientes do sangue percolam a parede endotelial, permitindo um contato íntimo com a parede dos hepatócitos, provendo uma troca de macromoléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos e vice-versa. Esta troca é fisiologicamente importante não apenas devido ao grande número de macromoléculas secretadas no sangue pelos hepatócitos mas, também porque o fígado retém e cataboliza muitas moléculas. O sinusóide é revestido por uma bainha de fibras reticulares. Os sinusóides abrigam macrófagos conhecidos como as células de Kupffer. Estas células metabolizam eritrócitos, degradam hemoglobina, secretam proteínas relacionadas com processos imunológicos e fagocitam bactérias presentes no sangue portal. As células de Ito são encontradas no espaço de Disse e armazenam lipídeos (GUYTON, A. C., HALL, J. C., 2002).

O fígado é um grande órgão venoso e passível de expansão, capaz de atuar como importante reservatório de sangue em situações de volume excessivo e, também, capaz de fornecer quantidades adicionais de sangue em casos de hemorragia (GUYTON, A. C., HALL, J. C., 2002). Armazena vitaminas: a vitamina A está em maior concentração que as demais. São encontradas também pequenas concentrações de vitamina D e vitamina B₁₂. Com a finalidade de fornecer a quantidade necessária dessas vitaminas, em condições normais, elas são armazenadas por um período que varia de meses a anos. A vitamina B₁₂ é armazenada em concentrações suficientes para um ano ou mais (GUYTON, A. C., HALL, J. C., 2002). Excetuando-se o ferro da hemoglobina, grande parte deste mineral está contida no fígado sob a forma de ferritina. As células hepáticas contêm grande quantidade de uma proteína chamada apoferritina a qual se liga ao ferro de forma reversível. Em níveis séricos elevados de ferro, este se liga a apoferritina,

originando a ferritina. Então, a ferritina é armazenada nos hepatócitos. Carências deste mineral, fazem com que a ferritina libere o ferro, elevando os níveis séricos. O binômio apoferritina-ferritina atua como tampão sanguíneo do ferro e como meio de estoque deste metal.

Muitas reações químicas ocorrem no fígado devido ao elevado número de células. Estas células apresentam um alto grau metabólico, sintetizam muitas substâncias que são transportadas para outras regiões do organismo e entram em diversas vias do metabolismo. Um das funções do fígado é manter a glicemia em níveis normais. O armazenamento de glicogênio permite ao fígado remover a glicose do sangue, armazená-la e devolvê-la ao sangue quando a glicemia decai. Em casos de hipoglicemia, o fígado aciona mecanismos envolvidos na gliconeogênese com a finalidade de manter os níveis normais de glicose no sangue. Neste caso, uma grande concentração de aminoácidos e de glicerol dos triglicerídeos é convertida em glicose. As gorduras são desestruturadas em glicerol e ácidos graxos (AGs). Os AGs são oxidados e dão origem a dois radicais acetil que formarão a acetil-coenzima A (acetil-CoA). Esta, por sua vez, pode participar do ciclo do ácido cítrico. A oxidação de gorduras ocorre em todas as células do organismo, porém ela é muito mais eficiente nos hepatócitos. Grande parte do colesterol sintetizado no fígado é convertido em sais biliares que são secretados na bile. O colesterol e os fosfolípidos são de suma importância para o funcionamento celular pois são parte integrante de membranas e estruturas intracelulares. O órgão também transforma proteínas e carboidratos em gordura. Esta gordura é carregada pelas lipoproteínas e armazenada no tecido adiposo (CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R., 2012).

O maquinário hepático é responsável pela desaminação de aminoácidos para que estes sejam utilizados na produção de energia. Durante o processo de desaminação, ocorre uma elevada produção de amônia. Ela é retirada dos fluidos corporais e é convertida em uréia. Em disfunções hepáticas, conteúdo de amônia no plasma eleva-se, resultando em coma hepático e morte. O órgão exerce importante função na síntese de proteínas, como a albumina e outras proteínas carreadoras. Estima-se que 90% das proteínas plasmáticas sejam produzidas pelo fígado. A albumina é uma proteína que depende principalmente do aminoácido triptofano para a sua produção, e tem importantes funções, como: manter a pressão oncótica e carrear xenobióticos de maneira inespecífica e pequenas moléculas endógenas. Em

hepatopatias, albumina e outras proteínas plasmáticas aparecem no plasma em concentrações diminutas, causando edema e ascite. Fatores da coagulação são gerados no fígado como o fator I (fibrinogênio), o II (protrombina) e o V, VII, IX, XII e XIII. Por isso, normalmente, pacientes com quadro de cirrose hepática, possuem coagulopatias (CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R., 2012).

Fármacos administrados por via oral são absorvidos no intestino e através da veia porta chegam ao fígado. Lá eles sofrem o metabolismo de primeira passagem, o qual degrada parte da dose do fármaco que foi administrada. Em função deste evento, conduzem-se estudos de biodisponibilidade para saber se o fármaco depois de metabolizado existirá na corrente sanguínea em concentração necessária para que o órgão alvo seja atingido e o efeito terapêutico estabelecido (RANG, H.P.; DALE., 2012).

Muitos fármacos e outros xenobióticos apresentam características lipofílicas que permitem a passagem destes através da membrana plasmática e dessa forma podem desempenhar seus efeitos nos tecidos. No entanto, a mesma propriedade química que aumenta a biodisponibilidade dos fármacos também pode dificultar a excreção renal destes, pois a depuração renal exige substâncias hidrofílicas. Por conseguinte as reações de biotransformação aumentam a hidrofiliabilidade dos compostos para que possam ser excretados na urina. Estas reações podem ser estratificadas em reações de oxidação e redução, reações de hidrólise e conjugação. Algumas delas são mediadas pelas enzimas do sistema P450. Estas enzimas sofrem ação de substâncias que as induzem ou as inibem (RANG, H.P.; DALE., 2012).

A indução de enzimas hepáticas tem como consequência o aumento do metabolismo hepático. A carbamazepina, por exemplo, não apenas induz a 3A4 do sistema p450, como também é metabolizada por esta enzima. Em função deste evento, a carbamazepina aumenta o seu próprio metabolismo. Um fármaco, também, pode aumentar o metabolismo de outro, induzindo a atividade da 3A4 que é responsável pelo metabolismo de 50% de todos os fármacos clinicamente prescritos. Assim, é de suma importância conhecer estes mecanismos com a finalidade de evitar que a biodisponibilidade de fármacos seja diminuída, reduzindo as concentrações do fármaco abaixo dos seus níveis terapêuticos (STOCKLEY, I. H., 2002).

Há evidências de que a erva de são João ou hipérico (*Hypericum perforatum*) diminua o nível sérico de uma considerável gama de fármacos, provavelmente por indução das enzimas do fígado (citocromo p450, isoenzima CYP1A2). A erva diminui significativamente o nível sérico da ciclosporina, fármaco utilizado para diminuir a rejeição de órgãos transplantados. Também existem relatos na literatura que a planta diminui os níveis plasmáticos da digoxina em aproximadamente 25%, alterando a função cardíaca. O hipérico como indutor enzimático interfere na ação de antidepressivos tricíclicos, da amitriptilina, da nortriptilina, da varfarina e da sinvastatina (STOCKLEY, I. H., 2002).

A inibição enzimática pode dar-se através de diversos mecanismos. Por exemplo, o cetoconazol, um antifúngico bastante utilizado na clínica, possui em sua estrutura um nitrogênio que se liga ao ferro hêmico do sítio ativo das enzimas do p450. Esta ligação impede o metabolismo de outros fármacos. Também há a inibição irreversível gerada por barbitúricos que alquilam e bloqueiam permanentemente o complexo P450. Por outro lado, a inibição também pode ser positiva em alguns casos, como o que ocorre com o lopinavir, um inibidor da protease que possui baixíssima biodisponibilidade. Quando este é administrado concomitantemente com ritonavir (outro inibidor da protease) há um aumento na biodisponibilidade do primeiro, uma vez que o segundo é capaz de inibir a metabolização do lopinavir (RANG, H.P.; DALE.,2012)

Várias drogas afetam o fígado por estresse oxidativo. A exposição do tecido hepático a tais agentes químicos constitui um importante risco à saúde. Podem causar injúria pela produção de radicais livres, os quais iniciam o processo de lipoperoxidação ou pela depleção de componentes endógenos de antioxidantes glutatiônicos (PAWA S., ALI. S., 2004). Uma variedade de medicamentos são sugeridos ou confirmados por causarem hepatotoxicidade. A doença hepática crônica induzida por medicamentos e outros xenobióticos pode resultar em cirrose, fibrose, esteatose, neoplasia ou hepatite crônica ativa (LALEMAN W., 2006).

O paracetamol tem propriedades analgésicas e antipiréticas. Quando administrado em elevadas doses, este fármaco torna-se hepatotóxico (MEREDITH T.J., VALE J. A.,1984) Na década de 90, relacionaram a toxicidade do paracetamol à sua metabolização pelos hepatócitos. É metabolizado, principalmente pela sulfatação e glicorunidação, porém, estas rotas saturam-se rapidamente e, assim, o sistema P450 começa atuar. O paracetamol é convertido em N-acetil-p-

benzoquinonaimina (NAPBQI) através de uma via que utiliza O_2 e NADPH. O efeito tóxico da NAPBQI é inicialmente atenuado pela GSH (NELSON S.D., 1990). Mas, quando ocorre depleção dos estoques de GSH, a NAPBQI liga-se a proteínas hepáticas, com predileção por aquelas que possuem resíduos de cisteína. Então, ocorre um aumento no conteúdo de cálcio (Ca^{+2}) intracelular que promove o dano centrilobular (MOORE, M., et al., 1985).

Através do metabolismo de fármacos e de componentes de plantas medicinais são produzidos por diversas rotas produtos extremamente tóxicos e que quando presentes podem originar desordens hepáticas como a cirrose. O fígado cirrótico é caracterizado por deformação nodular do parênquima, fibrose e hiperplasia de ductos biliares. A cirrose é um processo difuso de fibrose e há conversão da arquitetura normal do fígado em lóbulos estruturalmente anormais (CARLTON, W.; MCGAVIN, 1998). A fibrose hepática caracteriza-se por um aumento no acúmulo de proteínas na matriz extracelular, excesso de colágeno, ativação e aumento do número de células estreladas hepáticas (GARCIA, L., 2002). A cirrose hepática é a sétima causa de morte no mundo, e nos EUA, causa mais de 25.000 óbitos a cada ano. No Brasil, são notificadas em média 12.800 mortes/ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2000).

Experimentalmente, a cirrose hepática pode ser induzida cirurgicamente através da ligadura de ductos biliares ou pelo uso de hepatotoxinas, entre elas: o tetracloreto de carbono (CCl_4), a dimetilnitrosamina (DMN) e a tiocetamida (TAA) (PAWA S., ALI. S., 2004). Na metade do século XX, descobriu-se que a administração crônica de TAA leva a quadros de cirrose hepática e de hepatocarcinomas (DAVID, P. et al., 2002). A TAA reduz a atividade antioxidante e acentua a LPO no fígado, estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que leva a necrose celular (TÚNEZ, I. et al., 2005). O modelo de cirrose hepática induzido pela administração de TAA é amplamente utilizado para o estudo do desenvolvimento do processo patológico e para a pesquisa de alternativas para o seu tratamento. A toxicidade da TAA leva à destruição do parênquima com rompimento de endomembranas e perda da matriz citoplasmática. Observa-se também aumento nos níveis de marcadores enzimáticos de funções hepáticas, diminuição nos níveis de zinco e selênio plasmático, decréscimo no peso dos animais e alterações em vários órgãos como baço e rim. O quadro cirrótico estabelecido pela administração crônica de TAA é semelhante ao observado em

humanos, sendo este o xenobiótico de primeira escolha em modelos de dano hepático (AKAHOSHI, T., et al, 2002).

Com a finalidade de saber se uma planta ou medicamento causa alterações na fisiologia hepática, pode-se dosar certas enzimas presentes no interior dos hepatócitos. Elas aparecem no soro após dano na membrana plasmática causado pela LPO. Desta forma, transtornos hepáticos designados como hepatocelulares estão associados, predominantemente, a elevações dos nos níveis das aminotransferases, enquanto os transtornos hepáticos com elevação predominante da fosfatase alcalina (FA) são denominados colestáticos. Já a elevação da asparato aminotransferase e da alanina aminotransferase séricas (AST e ALT, respectivamente) indica lesão e necrose hepatocelular (ADAMS, L. A.; ÂNGULO P, 2005). Níveis acentuadamente elevados (acima de 1.000 U/L) ocorrem tipicamente nas lesões hepatocelulares agudas e crônicas, nas doenças infiltrativas e na obstrução biliar. A FA é uma enzima encontrada em vários tecidos (ossos, intestinos, rins, leucócitos, fígado e placenta) e a elevação concomitante de outras enzimas hepáticas (por exemplo: gama glutamil transpeptidase (GGT) e 5'-nucleotidase) ajuda a estabelecer a origem hepática da FA (GINÈS et al., 2005). Em adição, o nível sérico de FA está frequentemente elevado na obstrução hepática, nas lesões expansivas, cirrose biliar primária e colestase fármaco-induzida. Além desses indicadores outros indicadores como: albumina, bilirrubina, proteínas totais e colesterol podem ser auxiliares na avaliação da função hepática (WILNER, I. R.; REUBEN A, 2005).

Assim, o laboratório de bioquímica tem importante papel na investigação da causa de intoxicações por produtos de origem vegetal através de exames que avaliam a presença de contaminantes como alopáticos e metais pesados no soro de pacientes, aumento de enzimas relacionadas a dano hepático e renal, alterações em parâmetros bioquímicos indicadores de alteração metabólica (CORNS C. M., 2003).

IV MANUSCRITOS

4.1 Manuscrito 1

FREITAS R. B.; ARALDI, I. C.; BOLIGON A. A., BRUM T. F.; ROVANI B. T., PIANA M., MARGARETH LINDE ATHAYDE, M. L., BAUERMANN, L. F. Phytochemical analysis and toxicity investigation of stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek.

Publicado no periódico Natural Product Research.

Phytochemical analysis and toxicity investigation of stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek

Robson Borba de Freitas^a, Isabel Cristina da Costa Araldi^b, Aline Augusti Boligon^a, Thiele Faccin de Brum^a, Bruno Tomazele Rovani^b, Mariana Piana^a, Marina Zadra^a, Margareth Linde Athayde^{a*} and Liliane de Freitas Bauermann^{b*}

^aPhytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, Room 1115, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil; ^bExperimental Physiology Laboratory, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Build 21, Room 5229, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil

(Received 2 July 2012; final version received 2 October 2012)

Phytochemical analysis of lyophilised aqueous extract of the stem bark of *Scutia buxifolia* (SBSB) was carried out by determining total phenolics (0.280 ± 0.02 mg of gallic acid equivalents/g of extract), flavonoids (17.42 ± 2.95 mg of quercetin equivalents/g of extract) and tannins (1.28 ± 0.15 mg of catechin equivalents/g of extract) contents followed by a high-performance liquid chromatography/diode array detection (HPLC/DAD) analysis. The HPLC profile showed caffeic acid, being the major constituent of SBSB (247.21 ± 2.17 mg g⁻¹ of extract). The antioxidant scavenging capacity of SBSB was determined by 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The antioxidant power of SBSB was comparable with that of the antioxidant ascorbic acid. Acute toxicity was assayed in rats whereas catalase activity and malondialdehyde production were determined in rats' liver. The SBSB showed safety in the dose tested. This report is the first realised in animals for *S. buxifolia*.

Keywords: *Scutia buxifolia*; HPLC-DAD; DPPH; caffeic acid; toxicity

1. Introduction

Scutia buxifolia Reiss is a tree belonging to the Rhamnaceae family. This plant is popularly known as Coronilha, and it is native from South America, with a dispersion area that includes Rio Grande do Sul state in Brazil, Argentina and Uruguay. This plant presents cardiogenic and diuretic properties (Wasicky, Wasicky, & Joachimovits, 1964). The tea of stem barks of *S. buxifolia* has a pronounced diuretic activity which is appreciated by persons who desire to lose weight (Dickel, Rates, & Ritter, 2007). Researchers have isolated natural compounds from *S. buxifolia* such as cyclopeptide alkaloids as scutianines (Maldaner et al., 2011), steroids as β -sisterol (Boligon et al., 2010) and phenolic substances by Boligon, Magoga, Feltrin, Janovick, and Athayde (2009) and Boligon, Pereira, et al., (2009).

Trevisan et al., (2009) investigated the analgesic potential of scutianines by tail-flick test. Scutianine B showed antinociceptive action in 15 and 60 min after administration. On the other hand, scutianine C did not demonstrate analgesic effect. In another research, Boligon, Magoga, et al., (2009) and Boligon, Pereira, et al., (2009) analysed the *in vitro* antioxidant properties of

*Corresponding authors. Email: lgfbauermann@gmail.com; margareth@smail.ufsm.br

2 R.B. de Freitas et al.

S. buxifolia extracts. Ethyl acetate and butanolic fractions are rich in antioxidants and are able to scavenge free radicals *in vitro* by the 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method.

Several herbal medicines are potentially toxic and even lethal, if used wrongly. Comfrey (*Symphytum officinale*), pennyroyal (*Mentha pulegium*) (Stickel, Patsenker, & Schuppan, 2005) and Sacaca (*Cronton cajucara*) (Rodrigues et al., 2010) have been reported to have hepatotoxic effect, but little is known about the toxic effect of *S. buxifolia* (Boligon et al., 2011). The present study was aimed to analyse the phytochemical profile by determining the total phenolic, flavonoids and tannins contents besides high-performance liquid chromatography (HPLC) of lyophilised aqueous extract of the stem bark of *S. buxifolia* (SBSB). Radical scavenging capacity was determined by DPPH assay and the acute toxicity of SBSB was also investigated.

2. Results and discussion

2.1. Total phenolics, flavonoids, tannins contents and radical scavenging activities of SBSB

The concentration of total phenolic in the present extract was 0.280 ± 0.02 mg of gallic acid equivalents/g of extract (Table S1 of the Supplementary material, available online). Other researchers found high concentrations of phenolics in butanolic and ethyl acetate fraction of *S. buxifolia* which were different from the contents measured in SBSB (Boligon, Magoga, et al., 2009; Boligon, Pereira, et al., 2009). This fact can be justified by the different polarities of the solvents used for extract preparations (water, ethyl acetate and *n*-butanol).

The same profile can be observed in flavonoids content (FC) and tannins content (TC). The value for FC and TC was 17.42 ± 2.95 mg of quercetin equivalents/g of extract and 1.28 ± 0.15 mg of catechin equivalents/g of extract. Boligon, De Brum, Frohlich, Froeder and Athayde (2012) quantified the FC content in fractions of the stem bark of *S. buxifolia*, and the fraction richest in these compounds was the ethyl acetate fraction. SBSB presents the TC eight times lower than the ethyl acetate fraction. This fraction showed higher concentrations of tannins when TC is compared with that of SBSB. These data are given in Table S1 of the Supplementary material, available online.

The action mechanism of antioxidants is by scavenging free radicals. DPPH is a stable organic nitrogen-free radical. Antioxidants, on interaction with DPPH, transfer either electrons or hydrogen atoms to DPPH, converting it into a stable diamagnetic molecule, and thus neutralising free radical character. DPPH radical form has an absorbance at 518 nm which decreases when it receives an electron from antioxidant compound, and the colour of reaction mixtures changes from purple to yellow. (Banerjee, Dasgupta, & De, 2005). Then the DPPH ability of SBSB and ascorbic acid (AA) is expressed in IC₅₀ (amount of plant extract or antioxidant necessary to decrease the concentration of initial DPPH absorbance by 50%). The IC₅₀ values of SBSB and AA were 15.73 ± 0.13 and 15.83 ± 0.21 , respectively. Student's *t*-test showed that there is no statistic difference for $p < 0.05$ between the SBSB and AA IC₅₀. Under these experimental conditions, SBSB and AA have a similar antioxidant power. IC₅₀ data are given in Table S1 of the Supplementary Information, available online.

2.2. HPLC–DAD analysis of SBSB composition

HPLC analysis of SBSB revealed the presence of the flavonoids, quercetin and rutin along with caffeic, gallic and chlorogenic acids. The respective standard solutions calibration curves were $Y = 88,513x + 5548$ ($r = 0.9991$) for quercetin; $Y = 121,030x + 7623.3$ ($r = 0.9984$); $Y = 53,985x + 1020.8$ for gallic acid; $Y = 37,846x + 1093$ ($r = 0.9938$) and $Y = 287,603x + 1093$ ($r = 0.9950$) for chlorogenic acid. Details of HPLC analysis of SBSB are given in Figure S1 of the Supplementary Information, available online.

Caffeic acid (CA) was the major component found in SBSB, followed by quercetin, rutin, gallic and chlorogenic acids. CA is a hydroxycinnamic acid, which is found in a variety of plant-derived material, such as wine, coffee, fruits, vegetables and folklorical beverages (Barreto, Ando, Estevão, & Zanoni, 2012). According to recent studies, CA exhibited a wide spectrum of pharmacological effects, including anti-inflammatory properties and anti-tumourigenic activity (Challis & Bartlett, 1995). Wang and Yang (2012) measured the antioxidant capacity of CA, using different methods: the DPPH radical scavenging assay, superoxide radical scavenging assay and others. They found that the CA has a powerful antioxidant profile and that it was able to inhibit 92.7% of the DPPH radical. Quercetin, the second major component found in SBSB, has been reported to enhance the antioxidative defence system by up-regulating antioxidant enzymes. Quercetin intake prevents cardiovascular, neoplastic and liver diseases (Tieppo et al., 2007).

In the ethyl acetate fraction extracted from the leaves of *S. buxifolia*, the preponderant compound found was quercetin (Boligon, Magoga, et al., 2009; Boligon, Pereira, et al., 2009). Thus, we can conclude that diverse preparations of extracts and different parts, such as stem bark, leaves, fruits, twigs or branches, resulted in distinguishable chromatographic profiles for the same plant.

2.3. Acute toxicity of SBSB

The SBSB tested at doses 100, 200 and 400 mg kg⁻¹ of body weight (BW) did not show toxicity signals. After 1 h of SBSB or water administration (0 mg kg⁻¹ BW) by gavage, were not observed changes in general animal behaviour. The motor capacity of animals was not affected by SBSB. The food and water consumption were measured on days 2, 7 and 14, and one-way ANOVA revealed a significant increase in the food and water consumption by animals treated with a single dose of 100 mg kg⁻¹ BW on days 7 and 14 ($p < 0.001$). In the group treated with 200 mg kg⁻¹ BW of extract, there was an increase in food intake on day 7 ($p < 0.001$) and on day 14 ($p < 0.001$) comparing with that on day 2. However, no statistical difference was observed in water consumption between the days analysed. We observed that the animals, which received a single dose of 400 mg kg⁻¹ BW of SBSB, gained weight on day 14. Water intake increased on days 7 and 14. Data related to animal's diet are given in Table S2 of the Supplementary Information, available online. We conclude that the SBSB at the tested doses is safe because it did not cause mortality in tested rats. Thus, the lethal dose of SBSB is probably higher than 400 mg kg⁻¹ BW. This report is the first realised in animals using *S. buxifolia*. Previous data revealed a cytotoxic activity of extracts and fraction prepared with twigs, leaves and the stem bark of *S. buxifolia* by brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay (Boligon et al., 2011). In this report, all tested plant fractions were considered toxic for *A. salina*. However, the *in vivo* tests using rats offer the advantage of being more conclusive.

2.4. Measurement of lipid peroxidation (LPO) and catalase activity

Cell membrane damage and enzymatic antioxidant activity were measured in tissues in sub-chronic toxicity evaluation. In our study, we combined these parameters with classical parameters, which were analysed in acute toxicity assessment as described in Section 3 of the Supplementary Information, available online. The liver was chosen because it is the most principal detoxification organ of the body (Pouton & Hayanes, 2005).

Oxidative stress can be defined by a continuous level of oxidative damage in cells, which is caused by an overabundance of reactive oxygen species (ROS) or by a decrease in the antioxidant ability against them (Kunitomo, 2007). Some ROS such as superoxide anion and peroxy radical attack the cell membrane, producing lipid-derived radicals (aldehydes). This process called LPO is a physiologic event (Halliwell & Gutteridge, 1989). On the other

4 R.B. de Freitas et al.

hand, some pathological conditions exacerbate the ROS production and for the consequence of the increased LPO (Ajitha & Rajnarayana, 2001).

The aldehydes, as exemplified by malondialdehyde (MDA), can be measured by the TBARS method (Buege & Aust, 1987). For ROS and hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging, the cells possess an enzymatic machinery. Catalase (CAT) is a key enzyme, which helps in cleaning the H₂O₂ formed during the incomplete oxidation. A single dose of SBSB at different concentrations (100, 200 and 400 mg kg⁻¹) did not change the levels of MDA and CAT activity. These data are given in Figure S2 of the Supplementary material, available online.

3. Conclusions

Phenolic, flavonoids and tannins contents contribute to the SBSB ability to inhibit the stable DPPH-free radical. Thus, SBSB has a great antioxidant potential, given that it can be comparable to a classical antioxidant standard such as AA. The major compound found in SBSB was CA. These results indicate that *S. buxifolia* can be a natural source of CA and other natural antioxidant compounds. In addition, considering the experimental conditions used, the toxicological investigation revealed that this extract was not toxic for animals.

Supplementary material

Figure S1 shows data about flavonols composition of SBSB. Figure S2 represents the level of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels and Catalase (CAT) activity in liver tissue. Table S1 expresses phenolics, flavonoids and tannins contents. Data related to rats diet are represented in Table S2.

References

- Ajitha, M., & Rajnarayana, K. (2001). Role of oxygen free radical in human diseases. *Indian Drugs*, 38, 545–554.
- Banerjee, A., Dasgupta, N., & De, B. (2005). *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90, 727–733.
- Barreto, W.J., Ando, R.A., Estevão, B.M., & Zanoni, K.P.S. (2012). Adsorption of caffeic acid on titanium dioxide: A spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 92, 16–20.
- Boligon, A.A., Magoga, B.R., Feltrin, A.C., Janovick, V., & Athayde, M.L. (2009). Potencial antioxidante *in vitro*, conteúdo de fenóis e flavonóides nos ramos de *Scutia buxifolia* Reiss. *Saúde*, 35, 34–38.
- Boligon, A.A., Pereira, R.P., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Janovick, V., Rocha, J.B.T., & Athayde, M.L. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, 100, 6592–6598.
- Boligon, A.A., Janovick, V., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Frohlich, J.K., & Athayde, M.L. (2010). Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 450–453.
- Boligon, A.A., Janovick, V., Frohlich, J.K., Spader, T.B., Froeder, A.L.F., Alves, S.H., & Athayde, M.L. (2011). Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek. *Natural Product Research*. In press.
- Boligon, A.A., De Brum, T.F., Frohlich, J.K., Froeder, A.L.F., & Athayde, M.L. (2012). HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Research Journal of Phytochemistry*, 6, 84–91.
- Buege, J.A., & Aust, S.D. (1987). Microsomal peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.
- Challis, B.C., & Bartlett, C.D. (1995). Possible carcinogenic effects of coffee constituents. *Nature*, 254, 532–533.
- Dickel, M.L., Rates, S.M.K., & Ritter, M.R. (2007). Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 60–71.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Kunitomo, M. (2007). Oxidative stress and atherosclerosis. *Yakugaku Zasshi*, 127, 1997–2014.
- Maldaner, G., Marangon, P., Ilha, V., Caro, M.S.B., Burrow, R.A., Dalcol, I.I., & Morel, A.F. (2011). Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss. *Phytochemistry*, 72, 804–809.
- Pouton, C.W., & Haynes, J.M. (2005). Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1918–1934.
- Rodrigues, G., Marcolin, E., Bona, S., Porawski, M., Lehmann, M., & Marroni, N.P. (2010). Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (sacaca) in diabetic rats. *Experimental Gastroenterology*, 47, 301–305.
- Stickel, F., Patsenker, E., & Schuppan, D. (2005). Herbal hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*, 43, 901–910.
- Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A.S., Silva, V.M.F., Silveira, T.R., Marroni, C.A., . . . , Picada, J.N. (2007). Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1140–1146.
- Trevisan, G., Maldaner, G., Velloso, N.A., Sant’Anna, G.S., Ilha, V., Gewehr, C.C.V., . . . , Ferreira, J. (2009). Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloid. *Journal of Natural Products*, 72, 608–612.
- Wang, F., & Yang, J. (2012). A comparative study of caffeic acid and a novel caffeic acid conjugate SMND-309 on antioxidant properties *in vitro*. *LTW – Food Science and Technology*, 46, 239–244.
- Wasicky, R., Wasicky, M., & Joachimovits, R. (1964). Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. *Planta Medica*, 12, 13–25.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Phytochemical analysis and toxicity investigation of stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek

Robson Borba de Freitas^a, Isabel Cristina da Costa Araldi^b, Aline Augusti Boligon^a, Thiele Faccin de Brum^a, Bruno Tomazele Rovani^b, Mariana Piana^a, Marina Zadra^a, Margareth Linde Athayde^{a*} and Liliane de Freitas Bauermann^{b*}

Phytochemical analysis of lyophilised aqueous extract of the stem bark of *Scutia buxifolia* (SBSB) was carried out by determining total phenolics (0.280 ± 0.02 mg of gallic acid equivalents/g of extract), flavonoids (17.42 ± 2.95 mg of quercetin equivalents/g of extract) and tannins (1.28 ± 0.15 mg of catechin equivalents/g of extract) contents followed by a high-performance liquid chromatography/diode array detection (HPLC/DAD) analysis. The HPLC profile showed caffeic acid, being the major constituent of SBSB (247.21 ± 2.17 mg g⁻¹ of extract). The antioxidant scavenging capacity of SBSB was determined by 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The antioxidant power of SBSB was comparable with that of the antioxidant ascorbic acid. Acute toxicity was assayed in rats whereas catalase activity and malondialdehyde production were determined in rats' liver. The SBSB showed safety in the dose tested. This report is the first realised in animals for *S. buxifolia*.

Keywords: *Scutia buxifolia*; HPLC-DAD; DPPH; caffeic acid; toxicity

3. Experimental

3.1. *Plant collection and lyophilized aqueous extract preparation*

Stem bark of *S. buxifolia* were collected in Dom Pedrito (Rio Grande do Sul State of Brazil) in February of 2011 (coordinates 30°59'09''S and 54°27'44''W). A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 10919. The part of the plant were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder of root bark (300,5 g) was used for preparation of infused with one liter of boiling water. After filtration, the infused were evaporated under reduced pressure to remove the water. The infuse was submitted to lyofilization. This extract was dissolved in water for biological assay.

3.2 *Chemical and reagents*

All chemical were of analytical grade. Acetic acid, acetonitrile and methanol were acquired from Merck (Darmstadt, Germany) while gallic, caffeic, chlorogenic acids, rutin and quercetin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Misouuri, USA).

3.3 *Determination of total phenolics content*

The determination of total phenolic content of SBSB lyophilized aqueous extract was performed by the Folin–Ciocalteu method with slightly modifications performed by Chandra and Meija (2004). The samples were read at 730 nm in spectrophotometer. The total phenolics content was expressed in milligrams equivalents of gallic acid (GAE) per gram of extract. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid in the range of 0.005 - 0.030 mg/mL was $Y = 11.969x - 0.0454$ ($r = 0.9984$). The experiment was conducted in triplicate. Data was expressed in mean and standard deviation.

3.4 *Determination of total flavonoids content*

The determination of flavonoids in SBSB lyophilized aqueous extract was performed as described by Woisky & Salatino (1998). The absorbance was determined by spectrophotometer at 420 nm. Ethanol was used as a blank. The equation obtained for the calibration curve of quercetin in the range of 0.012 - 0.200 mg/mL was $Y = 0.0024x - 0.018$ ($r = 0.9952$). The content of flavonoids was established as quercetin mg/g extract. The experiment was conducted in triplicate.

3.5 Determination of total tannins content

The tannins content was performed using the method described by Morrison et al. (1995) with some modifications. Samples in concentrations of 0.25 mg/mL, 5mL of solution A (1 g vanillin in 100 mL of methanol) and solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used to experiment. The samples were read at 500 nm in spectrophotometer. The total tannins content was expressed in milligrams equivalents of catechin per gram of each fraction. The equation obtained for the calibration curve of catechin in the range of 0.001 - 0.025 mg/mL was $Y = 0.00015x + 0.005$ ($r = 0.9979$).

3.6 Radical-Scavenging Activity – 2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

The radical scavenging activity of SBSB was quantified in the presence of DPPH• stable radical, according to a slightly modified method (Choi et al, 2002). Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical-scavenging capacity (RSC) and to determine the scavenging concentration or inhibitory concentration (IC_{50}). The DPPH scavenging ability was expressed as IC_{50} (the extract concentration (µg/mL) required to inhibit 50% of the DPPH in the assay medium).

The SBSB was tested at six different ethanol dilutions at 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 µg/mL. Each sample was mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the absorption was measured at 518 nm. A solution of DPPH (1 mL, 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the SBSB provided the positive control. The test was performed in triplicate and the calculation of the antioxidant activity followed the equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [((Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{blank}}) / Abs_{\text{control}}) \times 100]$$

Where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of SBSB without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of ethanol in DPPH.

3.7 HPLC-DAD analysis of SBSB

High performance liquid chromatography/photodiode array detector (HPLC/DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU-20A5 with integrator CBM-20A. UV-VIS detector DAD-SPD-M-20A and software LC Solution 1.22 SP1. Reversed phase chromatographic analyses were carried out under isocratic and gradient conditions using a C18—column (250 mm - 4.6 mm), packed with 5-mm diameter particles; the mobile phase for rutin and quercetin was

methanol/acetonitrile/water (40:15:45 v/v/v) containing 1% of acetic acid in isocratic conditions at flow rate of 1 mL/min. The phenolic acids analysis was carried out using a gradient system using solvent A (water/acetic acid [98:2 v/v]) and solvent B [methanol]. The gradient program was started with 95% of A and 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50% and 100% B at 10, 20, 30 and 40 min, respectively. The mobile phases were filtered through a 0.45 mm membrane filter and then degassed by an ultrasonic bath prior to use. The flow rate was 0.8 mL/min. Detection were done at 254 nm in all analysis and the injection volume was 10 µL. Identification of phenolic acids, rutin and quercetin was achieved by comparing retention times and UV spectra with those of standards. Stock solutions of quercetin, rutin and gallic, caffeic and chlorogenic acids standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.18-0.280 mg/mL for quercetin, 0.0125-0.200mg/mL for rutin, and 0.0625-0.250 mg for phenolic acids. The compounds was carried out by integration of the peak areas using the external standard method. All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

3.8 Animals

Male and female Wistar rats (200-250g), obtained from the General Animal House of the Federal University of Santa Maria, were kept on a separated animal room, in a 12 hours light/dark cycle at room temperature and were feed *ad libitum* with free access to water. All animal were used according to of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from Federal University of Santa Maria, Brazil (project number 091-2011). In addition, efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

3.9 Acute toxicity of SBSB

The oral acute toxicity experiment consisted of 4 groups of 6 animals each (4 males and 2 females per group). Four groups of animals received a single dose of SBSB intragastrically (gavage) at concentrations of 0 mg/kg (distilled water), 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg. After gavages the animals were monitored for eventual signs of toxicity or death 0.15, 0.3, 1.0 and 4.0 after dosing and subsequently once daily during 14 days (Oga, 2003, Brazil, 2004) Alterations in food and water intake, mortality, toxic effects, and/or changes in behavioral pattern were analyzed.

3.10 Measurement of lipid peroxidation and catalase activity

After 14 days SBSB lyophilized aqueous extract administration, the animals were euthanized by deep anesthesia induced by thiopental at 100 mg/kg, administered intraperitoneally. Immediately the liver was excised. The liver was washed with saline solution (NaCl 0.9 %) and 1 g of liver tissue was homogenized in 9 volumes of potassium sodium buffer 0.1 M, pH 7.4 using a Polytron mixer (Kinematica AG, Switzerland). In this sample, level of lipid peroxides was measured as thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) and was expressed as equivalent of malondialdehyde (MDA) (Buege & Aust, 1978). Catalase activity was determined from the rate of decomposition of H₂O₂ monitored by decrease of 240 nm following the addition of tissue homogenate (Aebi, 1983). Total protein content was determined by Lowry method using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al, 1951).

3.10 Statistical analysis

IC₅₀ was analyzed by Student's t-test. Others data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey multiple range test when appropriate, using the software Statistical Package for the Social Sciences 18.0 (SPSS). Results are expressed as the mean ± standard deviation (S.D.) and differences were considered statically significance when p<0.05, p<0.01 and p<0.001.

4. References

- Aebi, H. Catalase *in vitro*. (1984). *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Brazil (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Retrieved from ANVISA website: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RE_N_90_anvisa.pdf
- Buege, J. A., Aust, S.D. (1987). Microsomal peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52, 302-310.
- Chandra, S., & Meija, E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583-3589.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean

medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 63, 1161-1168.

Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 263-275.

Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T., Powell, A.A. (1995). Determination of Lignin and Tannin contents of Cowpea seed coats. *Annal of Botany*, 76, 287-290.

Oga, S. (2003). *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu.

Woisky, R.G. & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures or chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105.

Figures

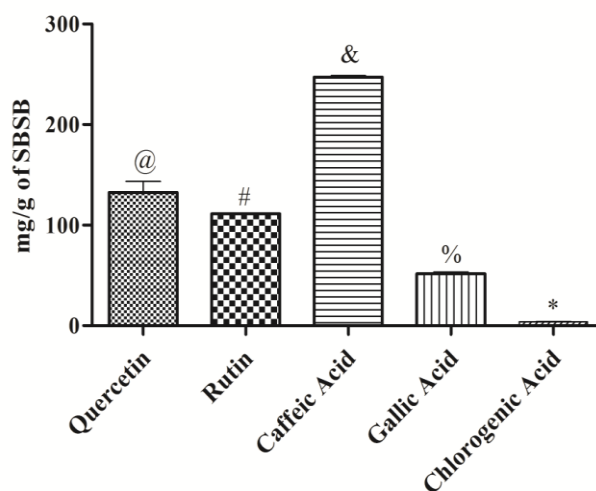


Figure S1. Flavonols composition of SBSB. Data are means \pm standard deviations (S.D.). The symbols in the bars means statistically significant differences for $p < 0.001$.

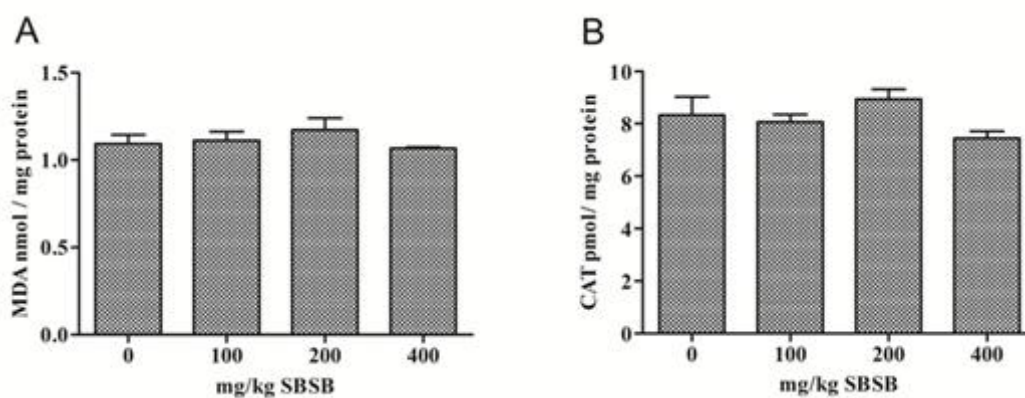


Figure S2. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels (A), CAT activity (B). Data are means \pm standard deviations (S.D.). There are no differences between groups for $p < 0.05$.

Tables

Table S1. Total phenolics content (TP), flavonoids content (FC), tannins content (TC) and antioxidant scavenger capacity (IC₅₀) of SBSB.

Parameter	SBSB	Ascorbic acid
TP	0.280 ± 0.02	-
FC	17.42 ± 2.95	-
TC	1.28 ± 0.15	-
IC ₅₀	15.73 ± 0.13	15.83 ± 0.21

TP: expressed as gallic acid equivalents (mg/g of SBSB ± S.D.). FC: expressed as quercetin (mg/g of SBSB ± S.D.). TC: expressed as catechin equivalents (mg/g of SBSB ± S.D.). IC₅₀: amount of SBSB (µg/mL) necessary to decrease the concentration of initial DPPH absorbance by 50%)

Table S2. Water and food intake for animals treated with SBSB at diferentes doses (0, 100, 200 and 400 mg/kg BW).

Doses	2 nd day		7 th day		14 th day	
	Water	Food	Water	Food	Water	Food
0	1,4±0,01	11,6 ±0,49	2.3±0.3 ^{***}	12.1±1.64	2.5±0.05 ^{***}	12.9±2.6
100	1.3±0.1	10.4±0.43	2.1±0.2 ^{***}	14.3±1.14	2.7 ± 0.1 ^{***}	18.75±1.15 ^{***}
200	1.4±0.02	11.71±1.05	1.4±0.02	16.8±1.25 ^{**}	1.45 ± 0.01	19.3±1.54 ^{***}
400	1 ± 0.01	10.5±0.12	1.2±0.71 [*]	11.6±0.69	1.4 ± 0.2 ^{***}	15.1 ± 2.01 ^{**}

Data were showed in cg of food / g BW and dL of water/ g BW. Data are means ± S.D. *, **, *** means statistically significant differences for p<0.005, p<0.01, p<0.001, respectively.

4.2 Manuscrito 2

FREITAS, R. B.; ARALDI, I. C. C.; ROVANI B. T.; BOLIGON, A. A.; BRUM, T.F.; PIANA M.; ZADRA, M.; VELOZO C. F.; KOBER, H.; MORESCO R.N., BAUERMANN, L. F.; ATHAYDE, M. L. Hepatotoxicity evaluation of aqueous extract from *Scutia buxifolia*.

O presente manuscrito será submetido ao periódico Human & Experimental Toxicology.

Hepatotoxicity evaluation of aqueous extract from *Scutia buxifolia*

Running title: *S. buxifolia* hepatotoxicity evaluation

by

¹Freitas RB; ⁵Araldi ICC; ¹Rovani BT; ¹Boligon AA; ¹Brum TF; ¹Piana M; ¹Zadra M; ³Velozo CF; ²Kober H; ⁴Moresco RN, ⁵Bauermann LF, ^{6*}Athayde ML.

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Graduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Graduate Program in Human Communication Disorders, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁵Department of Physiology and Farmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁶Department of Industrial Pharmacy, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Margareth Linde Athayde, e-mail: margathayde@gmail.com, telephone number: +55 55 3200 9380, mailing address: Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Ave. Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, zip-code: 97105-900, Brazil.

Abstract

Nowadays there was an increase in the number of people taking herbal remedies worldwide. Medicinal plants consumption is associated to diseases such hepatic ones. *Scutia buxifolia* is used for hypertension but little know about its action on liver. 32 wistar rats were divided into 4 groups: control and treated groups with 100, 200 and, 400 mg of lyophilized aqueous of *S. buxifolia* extract (SBSB), during 30 days. This study was planned to explore hepatotoxic effect of SBSB, which was assessed by biomarkers as serum transaminases (ALT and AST) and albumin. In the liver was determined thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, thiols content (NPSH), the activity of catalase (CAT) and, superoxide dismutase (SOD) enzymes. Histopathological studies of liver tissue were performed. Flavonoids and phenolics were quantified in SBSB by high performance liquid chromatography (HPLC/DAD). We did not observe alterations on redox status (TBARS, NPSH, CAT and, SOD) in control and, experimental groups. Albumin level also did not affect by SBSB. However, the SBSB caused an increase AST levels for 200 mg of SBSB treated group. We did not observe alterations on hepatocytes. This way, we conclude that SBSB was not toxic for animals even causing alterations on transaminases which not are necessary related to liver diseases.

Key words: *Scutia buxifolia*, hepatotoxicity, transaminases, redox status, HPLC/DAD

Introduction

In the last few years, there been an explosion in the number of people taking herbal and over-the-counter alternative medicines, principally in western countries¹. Many reasons lead people choose to intake herbal remedies. The side-effects of prescription drugs are widely publicized, whereas herbal preparations are seen as safe, and therefore innocuous. However, several herbal medicines are reported to have hepatotoxic effects. Despite the knowledge about hepatotoxic of herbal remedies is noticed by case reports, the toxicity also could be due by contaminants, adulterants, confusion identification and, seasonal variation of plant composition². Therefore, the safety of any herbal preparation can not be predicted unless it is tested scientifically. In some patients the liver disorders are caused by idiosyncratic reaction to a certain compounds but there are some hepatotoxic phytochemicals such as pyrrolizidine alkaloids, furano neoclerodane diterpenoids, and lignans³⁻⁵. In the literature are described case reports of liver complications related to the consumption of "kava" (*Piper methysticum*), "cascara sagrada" (*Rhamnus purshiana*), "germander" (*Teucrium chamaedrys*), "senna" (*Cassia acutifolia*), "valeriana" (*Valeriana officinales*), "sacaca" (*Croton cajucara*) and, "comfrey" (*Symphytum officinale*)^{6,7}. These plants may elevate transiently conjugated bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), and alkaline phosphatase (AF) in serum of herbal practitioners. And patients that made chronic treatment of medicinal plants can manifest cholestatic hepatitis and liver failure⁷.

Scutia buxifolia Reissek (Rhamnaceae) is widely available in Argentina, Uruguay and Brazil⁸. It is commonly known as "coronilha", a small prickly tree, which its stem bark infusion have diuretic and hypotensive properties⁹. Phytochemical screening from the leaves and stem bark of *S. buxifolia* crude extract and its fractions (butanolic, ethyl acetate and diclorometane) revealed the presence of flavonoids, alkaloids, phenolics and, tannins¹⁰. Four quercetin-type flavonoids were isolated: quercetin, quercitrin, isoquercitrin, and rutin, being quercitrin the major component present on ethyl acetate fraction from the plant¹¹. Cycloptides alkaloids isolated as scutianines from methanolic root bark extract of *S. buxifolia* plays antimicrobial activity against Gram (+), Gram (-) bacteria, and yeasts¹². The analgesic effect of scutianine B was investigated by tail flick test and it showed antinociceptive action in 15 and 60 minutes after administration¹³.

Several studies addressed the *S. buxifolia* antioxidant properties, and some their biological actions, but little is known about its toxicity⁹. Previous data revealed a cytotoxic activity of extracts and fractions prepared with different parts of *S. buxifolia* by brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay. In this report, all tested plant fractions were toxic for *A. salina*¹⁴. The acute toxicity assay of single doses at different concentrations of *S. buxifolia* lyophilized aqueous extract (SBSB) was done by Freitas et al (2012); the authors speculate that the lethal dose of SBSB is higher than 400 mg/ kg body weight inasmuch as neither dose tested cause mortality in animals¹⁵.

In the present communication, we planned to explore at the first time the putative hepatotoxic effect of SBSB in animals treated sub-chronically, which was assessed by damage markers as serum transaminases (ALT and AST) besides serum albumin levels. The hepatic redox balance was determined by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), antioxidant enzymes and, quantification of non-protein sulfhydryl groups (NPSH), along liver histopathological studies. Phenolic and flavonoids compounds were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD).

Material and Methods

Plant material and extract preparation

Stem bark of *S. buxifolia* were collected in Dom Pedrito (Rio Grande do Sul State of Brazil) in February of 2011 (coordinates 30°59'09''S and 54°27'44''W). A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 10919. The part of the plant were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder of stem bark (300.5 g) was used for preparation of infused with one liter of boiling water. After filtration, the infused were evaporated under reduced pressure to remove the water. The infuse was submitted to lyophilisation. This extract was dissolved in distilled water for biological assay.

Chemicals

All chemical were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, chlorogenic acid and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Quantification of phenolics and flavonoids compounds by HPLC-DAD

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD (diode) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% (B) for 2min; 25% (B) until 10 min; 40, 50, 60, 70, 80 and 100% (B) every 10 min, following the method described by Evaristo and Leitão with slight modifications¹⁶. The sample and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.200 mg/ml quercetin, rutin and kaempferol, and 0.010 – 0.100 mg/ml for gallic, chlorogenic and caffeic acids. Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method at 254nm for gallic acid, 327 nm for chlorogenic and caffeic acids, and 365 for quercetin, rutin and kaempferol. The flow rate was 0.7 ml/min and the injection volume was 40µl. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 53985x + 1028.8$ ($r = 0.9997$); chlorogenic acid: $Y = 287603x + 1093$ ($r = 0.9989$); caffeic acid: $Y = 13745x + 1281.7$ ($r = 0.9998$); rutin: $Y = 14791 + 1264.5$ ($r = 0.9998$); quercetin: $Y = 88513x + 5548$ ($r = 0.9999$) and kaempferol: $Y = 51285x - 1063.9$ ($r = 0.9992$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Animals

Thirty-two male Wistar rats (200-250g), obtained from the General Animal House of the Federal University of Santa Maria, were kept on a separated animal room, in a 12 hours light/dark cycle at room temperature and were feed *ad libitum* with free access to tap water. All animals were used according to of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (CEUA) from Federal University of Santa Maria, Brazil (project number 091-2011). In addition, efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Experimental design

In the sub-chronic study, thirty-two rats were randomly divided into four groups. Treatment groups were based on previous study with some modification as shown as below:

1. Group I: received distilled water (0 mg of SBSB/ kg body weight).
2. Group II: received the SBSB at concentration of 100 mg / kg body weight.
3. Group III: received the SBSB at concentration of 200 mg / kg body weight.
4. Group IV: received the SBSB at concentration of 400 mg / kg body weight.

The distilled water (vehicle) and the extract at different dosages were administered by gavage (0.5 ml/ kg body weight). The animals are treated daily, during 30 days in the morning. The dosages of SBSB used in the present protocol were selected according Freitas et al¹⁵.

Liver samples

Twenty-four hours after the latest dosage of SBSB, the animals were euthanized by deep anesthesia induced by thiopental at 100 mg/kg body weight, administered intraperitoneally. The liver was excised and immediately washed with saline solution (NaCl 0.9 %) and 1 g of the tissue was homogenized in 9 volumes of potassium sodium buffer 0.1 M, pH 7.4 using a Polytron mixer (Kinematica AG, Switzerland). A sample from livers were collected for histopathological analysis.

Measurement of biochemical parameters in blood

Blood was collected from retro-orbital puncture in a plain tube for serum biochemistry¹⁷. Blood samples were collected from each rat on 15th and 30th day and, the procedure occurred at morning 24 hours after the last dose For hepatic damage and function analysis, serum alanine aminotransferase (ALT), asparate aminotransferase (AST) and albumin levels were determined. The assays were performed in automatic analyser Cobas Mira (Roche[®]) with Bioclin[®] commercial systems.

Thiobarbituric acid reactive substances

Liver tissue lipoperoxidation (LPO) estimation was performed using the TBARS assay as previously described, where the colorimetric reaction of the LPO product malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA) is quantified. The reaction produces a colored compound that absorbs maximally at 532 nm¹⁸.

Non-enzimatic antioxidant defense

Tissue sulfhydryl groups (NPSH) was quantified after mixing the homogenate with 10% trichloroacetic acid (1:1,v/v), followed by centrifugation, as described by Ellman. Cysteine was used for preparation of a standard curve¹⁹.

Catalase activity

Catalase (CAT) activity was determined by measuring the decrease in hydrogen peroxide (H_2O_2) absorption at 32°C . The method is based on the consumption of H_2O_2 by CAT and loss of absorbance at 240 nm ²⁰.

Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase is an enzyme which catalyzes the dismutation of superoxide radical to form hydrogen peroxide and oxygen. The assay for determination of indirect SOD-activity is based in the inhibition of reaction between superoxide radical with adrenaline²¹.

Histopathological studies

For the histopathological studies, samples of the liver from control and experimental groups were fixed in 10% buffered formalin for 24 h. The processed tissues were embedded in paraffin blocks and sections made were stained with hematoxylin and eosin dye (H & E). The sections were analyzed by observing under light microscope at 400x magnification. These sections were examined by a pathologist without knowledge of the experimental groups for presence of negative features. Preparations were scored for hemorrhage, inflammation, cirrhosis, necrosis, sinusoidal congestion and disruption of central vein. An arbitrary scale was created for analyze the sections: tissue with absence of negative features received score 0. Liver tissue with minor alterations was given a score of +1. Those with moderate and severe negative features were given a score of +2 and +3, respectively²².

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical comparisons were performed by one-way analysis of variance followed Tukey's *post-hoc* test. The data were analyzed by using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 18.0). A *p*-value less than 0.05 were considered to be significant different.

Results

Quantification of phenolic and flavonoids compounds by HPLC-DAD

Flavonoids, such as quercetin, rutin and kaempferol along with caffeic, gallic, and chlorogenic acids were quantified. The HPLC-DAD profile revealed a high concentration of caffeic acid in comparison to the others compounds. The concentration for each substance is given in Table 1. Also, we show the chromatogram in the Figure 1.

Biochemical parameters in blood

The serum transaminases (ALT and AST) were chosen for analyze the hepatic function of animals treated with SBSB at different doses, because they are more sensitive for liver damage. Serum albumin level was also evaluated. The quantification of these parameters occurred on 15th and 30th day of treatment. The control group showed $147. \pm 6.06\text{ U/L}$, $95.3 \pm 8.4\text{ U/L}$ and, $3.52 \pm 0.18\text{ g/dL}$ for AST and ALT activities and albumin levels, respectively on 15th. On the 30th day of treatment for the control, the AST and ALT activities, and albumin levels were $144.58 \pm 8.11\text{ U/L}$, $95.75 \pm 9.33\text{ U/L}$ and, $3.55 \pm 0.03\text{ g/dL}$, respectively. ANOVA for repeated measures shows that there is no difference between days for this group on AST and ALT activity and albumin levels. Statistical analysis revealed that sub-chronic treatment with 100 mg of SBSB/ kg body weight did not change the AST and ALT scores and albumin

levels during the experimental protocol (Figure 2A). We observed that the animals treated with 200 mg of SBSB/ kg body weight not showed fluctuations on the levels of ALT and albumin between days. The 200 mg of SBSB/ kg body weight dose increased 3.7 times the AST value on 30th day ($519.5 \pm 6,51$ U/L) in comparison to 15th day (130 ± 6.28 U/L) ($p < 0.05$). The higher dosage (400 mg of SBSB/ kg body weight) did not alter the parameters evaluated (Figure 2C).

Effect of *S. buxifolia* on lipid peroxidation

The level of MDA in liver tissue determined by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay was not affected by the treatment with SBSB at different dosages compared to control group (Figure 3). MDA content for control group and groups treated with 100, 200 and 400 mg SBSB / kg body weight is follow 1.33 ± 0.11 , 1.23 ± 0.18 , 1.29 ± 0.10 and 1.34 ± 0.21 , respectively.

Effect of *S. buxifolia* on tissue sulfhydryl groups (NPSH)

The level of NPSH in liver tissue was not affected by the treatment with SBSB at different dosages compared to control group (Figure 4). NPSH content for control group and treated groups with 100, 200 and 400 mg SBSB / kg body weight is follow 85.95 ± 9.10 , 85.0 ± 7.83 , 82.49 ± 7.18 , 89.33 ± 6.09 , respectively.

Effect of *S. buxifolia* on enzymatic antioxidant defense

Catalase (CAT) activity is responsible for decomposition of hydrogen peroxide in oxygen and water. There was no difference between groups for CAT activity (Figure 5). Superoxide dismutase (SOD) activity also did not be affected by sub-chronic treatment with SBSB at different dosages (Figure 6).

Histopathological studies

The sub-chronic treatment with SBSB at different dosages evaluated on present protocol did not induced negative features in hepatocytes morphology. All sections analyzed received score 0 (Figure 7).

Discussion

In the recent years, many patients found alternative treatment for various diseases among them, the medicinal plants. Herbal medicine is the base of Traditional Chinese Medicine and Aюрvedic medicine⁵. The massive taking of medicinal plants increase the cases of intoxication by infusion, decoctions, and herbal remedies. In Brazil, some plants which possess depurative, hypoglycaemic and diuretic effects were reported to cause hepatic disorders such as cirrhosis, acute hepatitis and, fulminating hepatitis⁶. The hepatotoxic effects of these plants have causes in common such as: 1) overabundance of toxic secondary metabolites; 2) toxic when consumed for long time and, 3) increase of free radicals production¹.

Scutia buxifolia Reissek is large used for hypertension, renal dysfunction and, losing weight purpose²³. However, there are few knowledge about its biological activities and toxicity effects. Various studies were carried out in order to determine the total antioxidant capacity of *S. buxifolia* crude extract and its fractions^{9,24}. The antioxidant scavenger capacity measured by DPPH method revealed that the aqueous extract used in this protocol has an antioxidant power similar to the ascorbic acid, a well known antioxidant¹⁵. The HPLC/DAD finger-print quantified phenolics and flavonoids compounds present in *S. buxifolia* aqueous extract. Some modifications on HPLC methodologies allowed the

kaempferol quantification. Previous data did not show the presence of this flavonoid in this extract¹⁵.

Gallic, chlorogenic, and caffeic acids along with rutin, and quercetin were quantified (Figure 1 and Table 1). These substances are great antioxidants because in their molecular structures there are hydroxyl groups. Quercetin, one of the most common flavonoid in various botanicals, has been studied as a potent hepatoprotective substance²⁵.

Plants can develop hepatotoxicity because the liver is susceptible to external agents, mainly chemical ones and, various herbal remedies generated an imbalance in some damage markers such as enzymes. ALT enzyme is an acute hepatotoxicity marker more sensible than AST, because while the first enzyme is essentially hepatic, the second also can be found in high concentration in other organs as kidney, lungs and heart²⁶.

ALT and AST activity, and serum albumin content remained unchanged during the experimental protocol for control groups and 100 and 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups (Figures 2A and 2C). The second dose tested (200 mg of SBSB/ kg body weight) did not cause changes on ALT and albumin scores between days and, in comparison to control group (Figure 2B and 2C, respectively). However there was a remarkable elevation on serum AST enzymatic activity on 30th day (Figure 2A). This fact can be not directly related to SBSB toxicity because transaminases activities results are influenced by haemolysis, muscular stress and, xenobiotics like anesthetics²⁷.

Researchers in toxicity assays, beyond use classical markers including transaminases, they evaluated the redox state of organs by antioxidant activity enzymes and, measurement of macromolecules oxidation²⁸. In the present study the oxidative damage on cellular membrane was accessed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. TBARS assay quantified the malondialdehyde (MDA) which is a product of lipoperoxidation (LPO). *S. buxifolia* did not cause overproduction of free radicals in liver because the MDA rates not differ among experimental groups ($p < 0.05$) (Figure 3). SBSB controlled the level of oxidant specimens probably due the presence of antioxidant natural compounds. These compounds, previously reported, have been investigated extensively and there is evidence that they are involved on scavenging of radicals as well as indirect activation of transcription factors that regulate the expression of genes encoding for antioxidant enzymes²⁹.

Tissue sulfhydryl groups act against reactive oxygen species (ROS) which are related to toxic hepatitis induced by herbs. The principal NPSH is the reduced glutathione, comprising 75 - 90% of total intracellular NPSH³⁰. GSH plays an important role in antioxidant defense, because it posses not only direct radical-scavenging properties but it also an essential component on glutathione peroxidase (GPx) systems, which eliminates different hydroperoxides³¹.

Toxic plants investigated on sub-chronic or chronic assays, decline the GSH content present in liver due principally the pro-oxidant effects of extracts on higher doses and to overcome this free-radical stress, GSH is being utilized as the first line of defense²⁸. Concerning to non-enzymatic defense, there are no significance changes on thiols content (NPSH), certainly because occurs a synergistic antioxidant effect between NPSH content and SBSB phytochemicals in the liver tissue (Figure 4).

The CAT and SOD antioxidant activities were also evaluated in hepatic tissue of animals treated of SBSB. CAT together SOD, and GPx exerts the primary defense, catalyzing ROS. We noted that sub-chronic SBSB treatment unaltered CAT and SOD activities in experimental groups, comparing to control (Figure 5 and Figure 6, respectively)³². Theoretically, activity of SOD and CAT should unaffected or rise as compensatory mechanism to overcome free-radicals stress³³.

Several studies have shown that increased oxidative stress and inflammation plays a crucial role in tissue alterations. In the hepatotoxicity, activated Kupffer cells (resident

macrophages and primary immune cells of the liver) and infiltrating neutrophils are major source of ROS and, proinflammatory cytokines, which promotes oxidative stress³⁴⁻³⁸.

Although we observed an incremented on the AST value for 200 mg of SBSB/ kg body weight, there were no observed negative features on microscopic level. Histopathological analysis for experimental and control groups showed absence of hepatocellular necrosis, cirrhosis, inflammation, sinusoidal congestion and, central vein disruption. On Figures 7A, 7B, 7C and 7D appear the centrilobular vein in liver sections of control and treated groups with 100, 200, and 400 mg of SBSB/ kg body weight, respectively. Xenobiotics such toxic plants modifies the hepatocytes architecture by redox imbalance, and in this protocol SBSB preserved the hepatic tissue.

This brief report about *S. buxifolia* sub-chronic toxicity revealed elevation on AST level in 200 mg of SBSB/ kg body weight treated groups which may be associated to haemolysis e not necessary a SBSB component. This hypothesis is supported by unchanged parameters for the others groups. Apparently, SBSB are safe to hepatocytes because we did not observe negative features on histopathological studies. In addition, the redox state (RS) of SBSB dosed groups, assed by TBARS, NPSH, SOD and CAT, was very similar to the control group RS. In conclusion, SBSB revealed to be non toxic for liver.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/ Brazil.

References

1. Herrera S and Bruguera M. Hepatotoxicidad inducida por el uso de hierbas y medicamentos para perder peso. *Gastroenterología y Hepatología* 2008; 31(7): 447: 453.
2. Beyerstein B. Alternative medicine and common errors of reasoning. *Academic medicine: journal of the Association of American Medical Colleges* 2001; 76: 230-237.
3. Zhou S, et al. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences* 2004; 74(8): 935–68.
4. Chojkier M. Hepatic sinusoidal-obstruction syndrome: toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Hepatology* 2003; 39(3):437–46.
5. Corns CM. Herbal remedies and clinical biochemistry. *Annal of Clinical Biochemistry* 2003; 40: 489-507.
6. Rodrigues G, et al. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (sacaca) in diabetic rats. *Experimental Gastroenterology* 2010; 47: 301-305.
7. Furbee RB, Barlotta KS, Allen MK, Holstege CP. Hepatotoxicity associated with herbal products. *Clinics in Laboratory Medicine* 2006; 26: 227-241.
8. Wasicky R, Wasicky M., & Joachimovits, R. Erstuntersuchungen na Coronilha– *Scutia buxifolia* Reissek. *Planta Medica* 1964; 12: 13–25.
9. Boligon AA et al. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Research Journal of Phytochemistry* 2012, 6: 84-91.
10. Boligon AA, et al. Potencial antioxidante *in vitro*, conteúdo de fenóis e flavonóides nos ramos de *Scutia buxifolia* Reiss. *Saúde* 2009; 35: 34-38.
11. Boligon, AA et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology* 2009; 100: 6592-6598.
12. Morel AF, et al. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 2005; 72: 2571-2576.
13. Trevisan G, et al. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloid. *Journal of Natural Products* 2009; 72: 608-612.

14. Boligon AA, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek. *Natural Product Research* 2012; 26(10): 939-944.
15. Freitas, et al. Phytochemical analysis and toxicity investigation of stem bark of Reissek. *Natural Product Research* 2012; 1:1-5.
16. Evaristo LM, Leitão MC. Identificação e quantificação por DAD-HPLC da fracção fenólica contida em folhar de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana* 2001; 9(2): 135-141.
17. Waynforth, PLHB. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press: London, 1980.
18. Buege JA, Aust SD. Microsomal peroxidation. *Methods in Enzymology* 1987; 52: 302 - 310.
19. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1959; 82: 70-77.
20. Aebi H, Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105: 121-126.
21. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 1973; 134: 707-716.
22. Mota CS, et al. Effect of *Vernonia cognata* on oxidative damage induced by ethanol in rats. *Human & Experimental Toxicology* 2011; 30(7): 675-684.
23. Dickel ML, Rates SMK, Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 19: 60-71.
24. Boligon AA, et al. HPLC Analysis and Phytoconstituents Isolated from Ethyl Acetate Fraction of *Scutia buxifolia* Reiss. Leaves. *Latin American Journal of Pharmacy* 2009;1, 121-124.
25. Yang EJ, et al. Fermentation enhances the in vitro antioxidative effect of onion (*Allium cepa*) via an increase in quercetin content. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50: 2042-2048.

26. Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83: 209-217.
27. Cohen JA, Kaplan MM. The SGOT/SGPT ratio an indicator of alcoholic liver disease 1979. *Digestive Diseases and Sciences* 1979; 24: 835-838.
28. Santosh N, Mohan K, Royana S, Yamini TB. Hepatotoxicity of tuber of Indian Kudzu (*Pueraria tuberosa*) in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 40: 1066-1071.
29. Barcelos, GRM et al. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. *Mutation Research* 2011; 726: 109–115.
30. Moran LK, Gutteridge JMC, Quinlan, GJ. Thiols in cellular redox signaling and control. *Current Medical Chemistry* 2001; 8: 763–772.
31. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1019–1026.
32. Halliwell B, Gutteridge JC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: New York, 2007.
33. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36: 89–97.
34. McCuskey RS et al. Role of endotoxin in the hepatic microvascular inflammatory response to ethanol. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1995; 10(1): S18–S23.
35. Wang JF, Komarov P, de Groot H 1993. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: the role of NO, O₂ /H₂O₂, and HOCl. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; 304: 189–196.
36. Ramirez D et al. Influence of Cphycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress, Kupffer cell functioning. *Inflammation Research* 2002; 51: 351–356.
37. Spitzer JA et al. Ethanol, LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase, COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo. *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: a99–a108.
38. Blazka ME et al. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995; 133: 43–52.

Figure Caption

Figure 1. Represented high performance liquid chromatography profile of the *S. buxifolia* lyophilized extract. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and kaempferol (peak 6).

Figure 2. Asparate aminotransferase (AST) values (A), alanine aminotransferase (ALT) values(B), albumin (C) values on serum. * Different between days. # Different from control group on the same day ($p < 0.05$). Data are expressed in means \pm S.D.

Figure 3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels expressed in nmol MDA/ mg protein. No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.

Figure 4. Tissue sulfhydryl groups content (NPSH). No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.

Figure 5. Catalase (CAT) activity. No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.

Figure 6. Superoxide dismutase (SOD) activity. No significant difference was noted between control group and 100, 200, 400 mg of SBSB/ kg body weight treated groups ($p < 0.05$). Data are expressed in mean \pm SD.

Figure 7. Light micrograph (H & E staining) of liver (A) control group (400x), (B) 100 mg of SBSB/ weight treated group (400x), (C) 200 mg of SBSB/ weight treated group (400x), (D) 400 mg of SBSB/ weight treated group (400x). Figures show the centrilobular vein. There is presence of red blood cells on (C) and (D).

Table caption

Table 1. Phenolics and flavonoids composition of SBSB. *Results are expressed as mean of three \pm SD of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

Figure 1

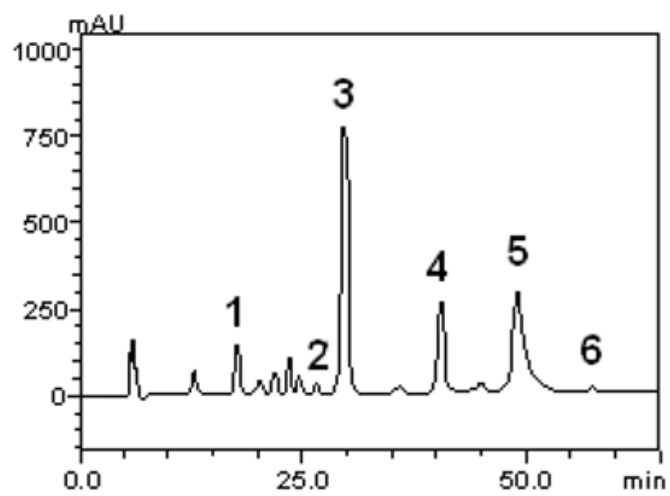


Figure 2

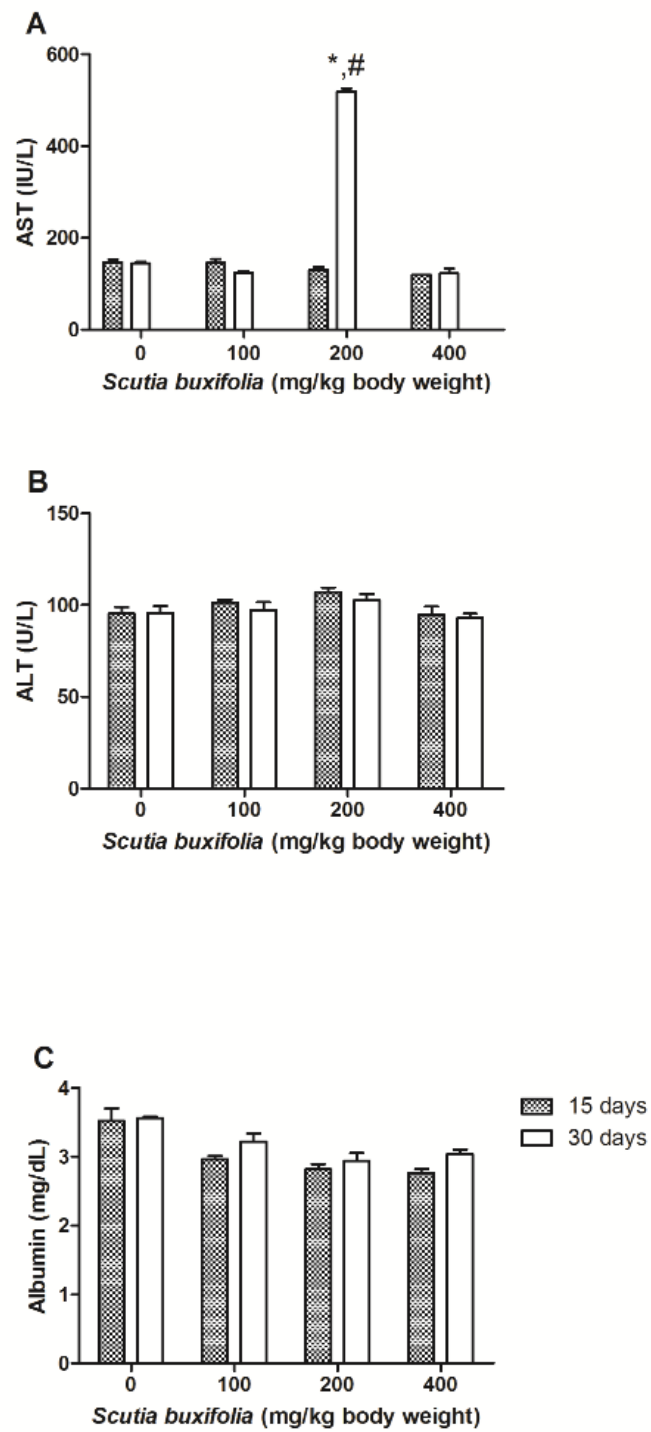


Figure 3

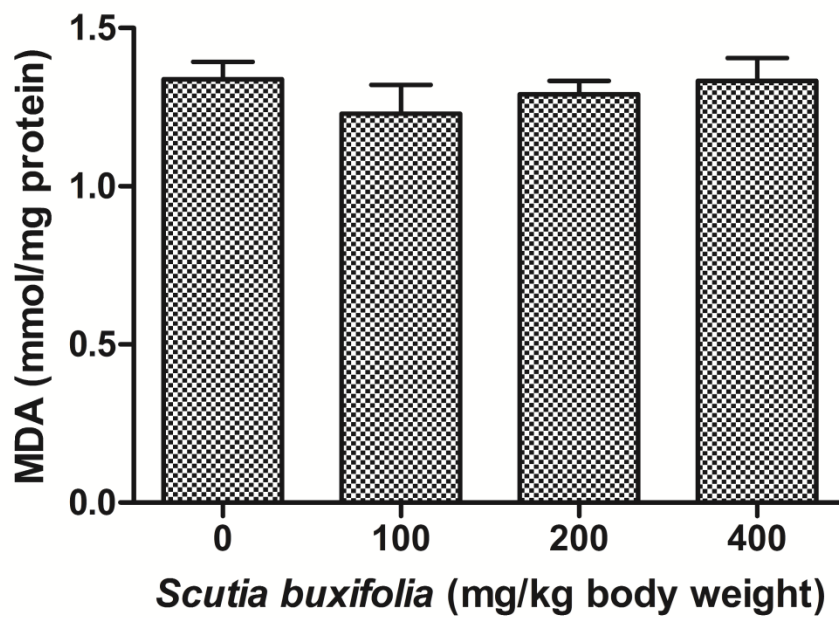


Figure 4

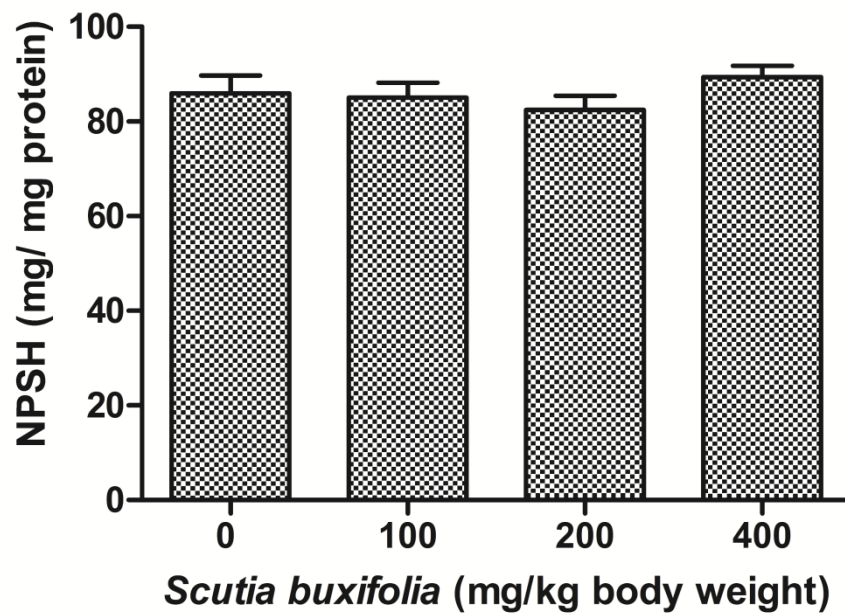


Figure 5

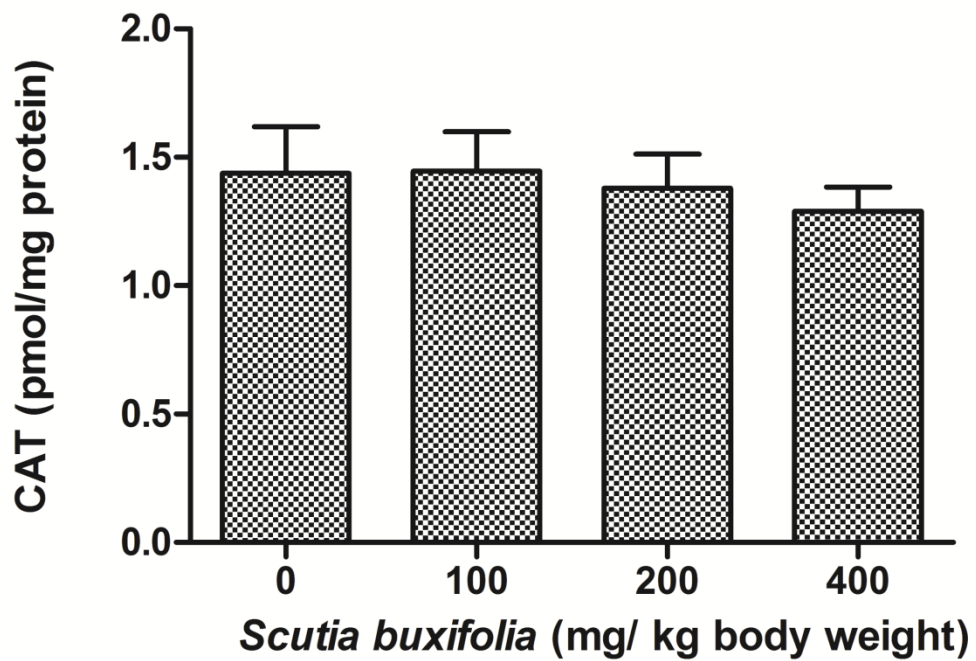


Figure 6

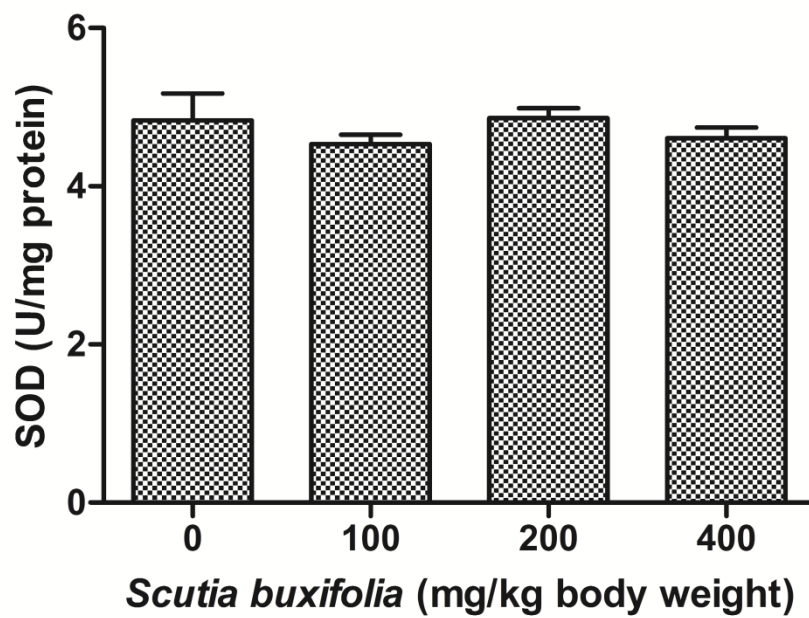


Figure 7

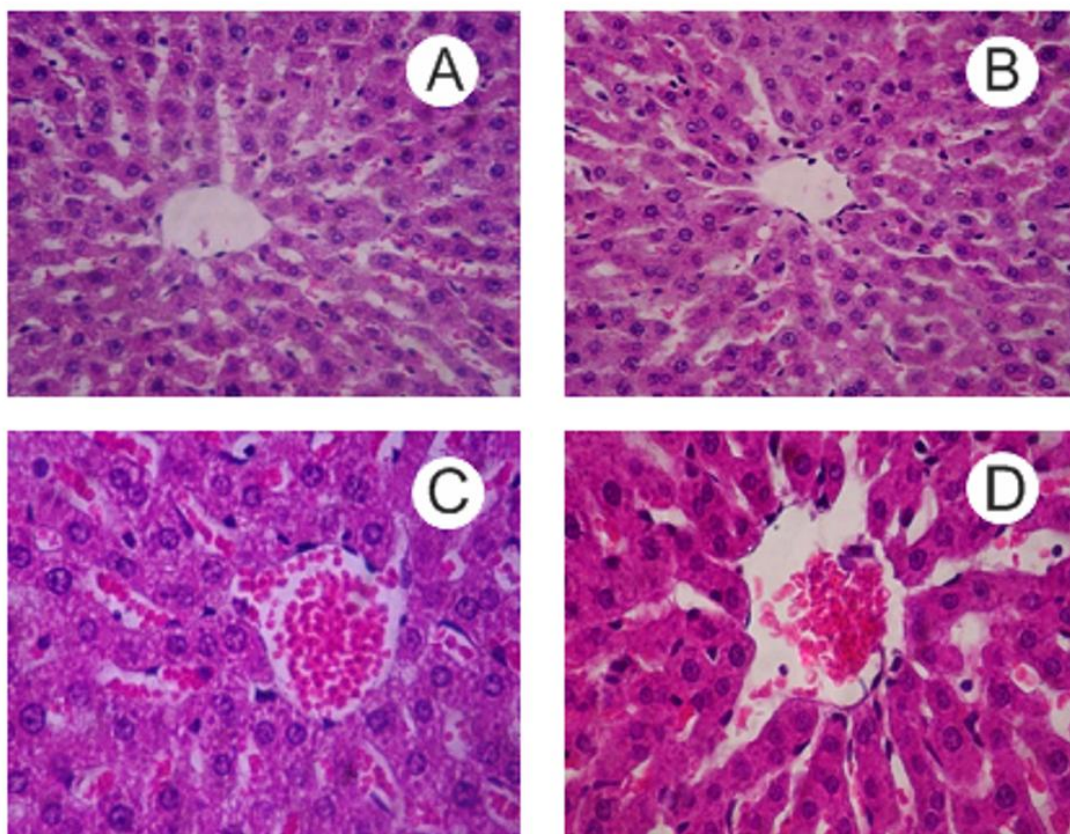


Table 1

<i>S. buxifolia</i>	extract	
	mg/g*	%
Gallic acid	51.88 ± 0.01 a	5.18
Chlorogenic acid	3.98 ± 0.19 b	0.39
Caffeic acid	247.21 ± 2.17 c	24.72
Rutin	11.36 ± 0.63 d	11.16
Quercetin	132.59 ± 12.83 e	13.25
Kaempferol	1.75 ± 0.01 f	0.17

V DISCUSSÃO GERAL

O uso de produtos naturais como fonte de cura é uma prática milenar e por um longo período, matérias de origem vegetal, mineral e animal constituíram o único arsenal terapêutico para as mais diversas patologias. Durante a revolução industrial, houve um significativo crescimento de pesquisas na área da química orgânica, resultando na produção de compostos sintéticos com propriedades bioativas. O crescimento da química farmacêutica deu-se pela maior facilidade na obtenção de fármacos puros e com alto rendimento. Assim os alopáticos foram considerados mais potentes, mais seguros e eficazes que os produtos naturais porque os sintéticos passam por estudos de biodisponibilidade, de bioequivalência, de farmacocinética, farmacodinâmica e também estudos de estabilidade (EISENBERG, D. M., et al.,1998).

Contudo, os produtos naturais têm grande valia na sociedade contemporânea, pois foi consolidada de forma empírica e coletiva a ideia de que estes são isentos de efeitos colaterais e, portanto, mais seguros que os usados na alopatia. Dessa forma, plantas usadas na medicina popular de diversas culturas, ultrapassaram barreiras geográficas e tomaram o mundo com a promessa de serem uma fonte segura de tratamento (RATES, S. M. K., 2001) Entretanto, pouquíssimos medicamentos de origem vegetal possuem suas propriedades farmacológicas investigadas e comprovadas cientificamente. Houve no mundo inteiro, um aumento expressivo no consumo de extratos de plantas, suplementos alimentares, vitaminas e outros. A medicina alternativa deve ser feita com muita parcimônia devido ao fato de plantas causarem efeitos adversos, alterações no metabolismo e interagirem com fármacos. Um exemplo é a perigosa associação do ginkgo com varfarina e outros anticoagulantes. O ginkgo pode potencializar o efeito do anticoagulante pois ele inibe a agregação plaquetária (OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A, 1998). Há também uma procura desenfreada por formulações com efeitos saciogênicos. Muitas das plantas utilizadas para a perda de peso são potencialmente hepatotóxicas (HERRERA, S.; BRUGUERA, M., 2008). A sacaca, planta que ocorre na região da Amazônia, usada como hipoglicemiante e emagrecedora foi responsável por gravíssimos casos de intoxicação e de hepatite fulminante (DI STASI L. C.; SANTOS E. M. G.; HIRUMA C. A.,1989).

Para a OMS as plantas medicinais são aquelas silvestres ou cultivadas, usadas como recurso para prevenir, curar ou alterar um processo fisiológico normal ou patológico ou utilizado como fonte de fármacos e de seus precursores, enquanto fitoterápicos são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos componentes ativos são formados por extratos de raízes, folhas, flores, frutos e outros (RATES, S. M. K., 2001). Em torno de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal. Dentre estes, destaca-se a *Ginkgo biloba*, uma planta fóssil, utilizada principalmente para o alívio de sintomas de doenças neurodegenerativas (OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A., 1998).

Além das plantas mundialmente usadas e que possuem uma gama de estudos realizados pela comunidade científica, há aquelas de uso regional e restrito a uma pequena parcela da população. No Rio Grande do sul, a *Ilex paraguariensis* (erva-mate) é usada na preparação do chimarrão, uma bebida folclórica consumida em larga escala e que têm inúmeros compostos com propriedades ativas já comprovadas. Mas também, já foram conduzidos estudos que avaliaram seus efeitos tóxicos para o fígado e outros órgãos em animais e que o extrato de erva-mate mostrou-se seguro quando administrado a coelhos e ratos (ANDRADE, F. et al., 2012).

Scutia buxifolia Reissek, é outra planta pertencente a flora gaúcha. Popularmente utilizada devido a suas propriedades depurativas, diuréticas, hipotensoras e cardiotônicas (WASICKY, R.; WASICKY, M., 1964). Preparações feitas com diversas partes da planta mostram-se eficazes em inibir o crescimento de bactérias e fungos. Seus alcalóides já tiveram sua ação analgésica comprovada. Os compostos flavônicos quercetina, quercitrina, isoquercitrina e rutina foram isolados da fração acetato de etila da folhas de *S. buxifolia* (Boligon, A. A., et al., 2009).

A concentração de compostos fenólicos totais no extrato aquoso liofilizado das cascas das raízes de *S. buxifolia* (SBSB) foi de $0,280 \pm 0,02$ mg de equivalentes de ácido gálico/ g de extrato. Já, a conteúdo de taninos condensados e flavonóides é $1,28 \pm 0,15$ mg de equivalentes de catequina/ g de extrato e $17,42 \pm 2,95$ mg de equivalentes de quercetina, respectivamente. Dentre o grupo de compostos naturais, os flavonóides estão em maior concentração. Eles têm a propriedade de neutralizar radicais livres e previnem a LPO. A substituição dos núcleos dos flavonóides com grupos hidroxil é essencial para que estes atuem como antioxidantes. Estas substâncias neutralizam HO^\bullet , O_2^- , e também os radicais RO_2^\bullet e RO^\bullet . Além disso,

apresentam grande afinidade para com os íons metálicos e com isso impedem a participação destes em reações oxidativas (SAIJA, A., 1995).

Os flavonóides inibem a atividade das enzimas lipooxigenase, ciclooxigenase, monoaminoxidase, xantino oxidase, suxinatoxidase mitocondrial, fosfolipase A₂, proteinquinase e NADH-oxidase. Os que contêm múltiplas hidroxilas como substituintes, apresentam maior atividade antioxidante frente aos radicais peroxil. E, o requisito fundamental para que os flavonóides atuem como antioxidantes é sua habilidade em atravessar as membranas celulares. Esta característica confere a estes compostos características redox adequadas. Possuem propriedades antilipoperoxidantes, antitumorais, antiplaquetarias, antisquêmicas, antialérgicas, e antiinflamatórias (CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L., 1997).

O efeito antioxidante *in vitro* do SBSB foi avaliado através do ensaio com o radical DPPH, que determina principalmente a capacidade doadora de prótons de determinado composto ou associação. O DPPH é um composto radicalar de absorção característica que possui um próton livre, sendo que, na presença de compostos captadores de prótons, a absorção do DPPH diminui significativamente (MENSOR, L. L. et al., 2001). Determina-se neste ensaio a concentração inibitória 50 (IC₅₀) que é a quantidade de extrato capaz de diminuir em 50% a absorção do radical DPPH a 518 nm. Como padrão emprega-se um antioxidante com propriedades já bem estudadas. Neste caso, o ácido ascórbico foi escolhido. O teste estatístico adequado para o ensaio mostrou que não há diferença entre o IC₅₀ do extrato e do ácido ascórbico. Assim, ambos têm um poder antioxidante semelhante. Acredita-se que a capacidade antioxidante total de SBSB deva-se a um sinergismo entre os compostos naturais nele presentes (flavonóides, compostos fenólicos e taninos).

O *screening* fitoquímico do SBSB revelou a presença de flavonóides e compostos fenólicos que são apresentados em ordem crescente de concentração: ácido cafeico (247,21 ± 2,17), quercetina (132,59 ± 12,83 mg/ g de SBSB), ácido gálico (51,88 ± 0,01 mg/ g de SBSB), rutina (11,36 ± 0,63 mg/ g de SBSB), ácido clorogênico (3,98 ± 0,19 mg/ g de SBSB) e canferol (1,75 ± 0,01 mg/ g de SBSB). O ácido cafeico, composto majoritário nesta preparação, inibe em 92,7% os radicais DPPH e apresenta propriedades antiinflamatórias e anticarcinogênica (WANG, F.; YANG, J., 2012). A quercetina, um dos flavonóides mais prevalentes em frutos e plantas medicinais, é um potente antioxidante, impede o aumento na produção de

radicais em algumas condições patológicas como as doenças hepáticas. Em modelo experimental de indução de cirrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar, observa-se um quadro semelhante ao de humanos, onde há inflamação provocada pelo refluxo biliar, desorganização da arquitetura do parênquima e deposição de colágeno. Milstersteiner e colaboradores (2003) investigaram a ação da quercetina em cirrose secundária biliar e concluíram que os efeitos antioxidantes deste flavonóide não são observados porque nas primeiras horas após a ligadura, o tecido hepática conta com o arsenal enzimático e não enzimático endógeno, não necessitando do antioxidante exógeno. Porém, depois de instalado o processo inflamatório, a quercetina é eficaz em remover do tecido hepáticos as EROs, e diminuir a oxidação hepática. O efeito hepatoprotetor diminui a deposição de colágeno. Em contraste ao efeitos benéficos dos flavonóides, alguns entre eles a quercetina, apresentaram efeitos mutagênicos *in vitro*. Os efeitos nocivos dos flavonóides acontecem no organismo, quando estes são consumidos em larga escala e tornam-se pró-oxidantes (TAKAHAMA, U., 1985).

Muitos produtos de origem vegetal quando consumidos de forma inadequada podem estar relacionado com etiologia de injurias hepáticas, renais e cardíacas. A toxicidade de plantas ocorre quando a ingestão de chás, extratos, tinturas e fitoterápicos é realizada sem indicação clínica e feita de forma indiscriminada. Os efeitos tóxicos destes produtos podem ser relacionados a toxinas como os alcalóides pirrolizidínicos, a metais pesados, a presença de alopáticos e outros adulterantes (JUNIOR V. E. V.; PINTO, A. C., 2005).

Quando não há conhecimento dos efeitos deletérios é de suma importância a investigação de ensaios de toxicidade. Até o presente momento não havia estudos de toxicidade realizados em ratos com o extrato de *S. buxifolia*. Boligon e colaboradores (2011) investigaram a citotoxicidade do extrato bruto e frações de *S. buxifolia* através da metodologia que emprega o microcrustáceo *Artemia Salina*. O extrato bruto e todas as frações investigadas foram tóxicas para *A. salina*. A toxicidade aguda do SBSB teve como base protocolos sugeridos pela Agência Nacional de Vigilância (ANVISA). Os animais foram divididos em quatro grupos: grupos controle e três experimentais que receberam uma dose única dos extratos nas doses de 100, 200, 400 mg de SBSB/ kg de peso corporal. Após 1 hora da administração do extrato, os animais ficaram em observação. Alterações no metabolismo de animais causadas por plantas tóxicas podem ser atribuídas a

interferências na absorção de nutrientes, na fosforilação oxidativa e também, na inibição de processos biossintéticos relacionados às macromoléculas (REBECCA, M.A. et al., 2002). O consumo de líquidos e sólidos foi mensurado 2º, 7º e 14º dia após a administração do extrato. Durante o protocolo experimental, não houve mortes em nenhum dos grupos e tampouco alterações significativas no peso corporal. O conteúdo de malondialdeído (MDA) e a atividade da enzima CAT tiveram seus valores semelhantes aos encontrados no grupo controle, concluindo que a dose única de SBSB não é capaz de alterar as defesas antioxidantes do tecido hepático dos animais. Então, especula-se que dose letal de *S. buxifolia* provavelmente seja maior que 400 mg/ kg de peso corporal.

No ensaio da toxicidade sub-crônica, trinta e dois ratos da raça Wistar foram divididos em quatro grupos: controle e os grupos de animais que receberam por via intragástrica as doses de 100, 200 e 400 mg de SBSB por kg/ peso corporal. Todos receberam uma dose diária de água ou extrato nas diferentes concentrações, durante 30 dias. No 15º e 30º dia, o sangue dos animais foi coletado para que fossem conduzidas provas da função hepática. Determinou-se a atividade das enzimas ALT e AST e o nível sérico de albumina.

A albumina, uma proteína que aparece em níveis diminuídos em hepatopatias, apresentou escore semelhante nos grupos tratados em comparação ao do grupo controle. A ALT é considerada o marcador de função hepática mais sensível e específico porque é essencialmente hepática, já a AST encontra-se em elevadas concentrações nos rins, coração e pulmão (COHEN, J. A., 1979). Sua atividade também não foi alterada pelo tratamento com SBSB. No entanto, o grupo tratado com o SBSB na dose de 200 mg/ kg de peso corporal, teve um incremento de aproximadamente 6 vezes na atividade da enzima AST, no 30º dia em comparação a sua atividade no 15º dia. Especula-se que esta alteração não se deva a algum fator relacionado ao SBSB, uma vez que ainda não foram identificados na planta alcalóides pirrolizidínicos. Estes alcalóides possuem ação hepatotóxica confirmada e está presente em uma variedade de plantas medicinais usadas mundialmente (FURBEE, R. B. et al., 2006). Os resultados de AST são influenciados pela hemólise, pelo estresse e por anestésicos (COHEN, J. A., 1979).

O conteúdo de MDA, um dos produtos da oxidação lipídica, no tecido hepático dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais tratados com o extrato não foi alterado. A atividade das enzimas CAT e SOD também não apresentou flutuações

na suas atividades entre grupos. Estas enzimas atuam como a primeira linha de defesa, desintoxicando o organismo de espécies oxidantes. Acredita-se que os compostos fenólicos e flavonóides do SBSB tenham contribuído para que não houvesse declínio na atividade enzimática. Estudos comprovam que a quercetina e outros flavonóides estimulam genes que estão envolvidos na síntese de enzimas antioxidantes (BARCELOS, G. R. M. et al., 2011). A ANOVA de duas vias mostra que o SBSB não altera o conteúdo de tióis não-proteicos no fígado dos animais (NPSH). Os tióis são defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo a glutathiona (GSH) um dos principais. A GSH interage com hidroperóxidos produzidos em reações oxidativas, neutralizando-os (DICKINSON D. A.; FORMAN H. J., 2002).

Processos inflamatórios hepáticos promovem uma superprodução de EORs mediada pelas células de Kupffer. O estresse oxidativo deteriora a arquitetura dos hepatócitos e em cortes histológicos de fígados de animais tratados com plantas tóxicas encontra-se congestão sinusoidal, necrose, deposição de colágeno e cirrose (MCCUSKEY, R. S. et al., 1995) As peças histológicas dos fígados dos animais controle e dos pertencentes aos grupos experimentais receberam escore 0 de acordo com o escore semi-quantitativo usado neste protocolo, pois, não apresentaram características negativas. Os resultados encontrados para MDA, CAT, SOD e NPSH corroboram com a histologia, pois, o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes resulta em alteração no funcionamento e na estrutura das células hepáticas.

Os dois ensaios realizados neste trabalho indicam que de maneira geral, o extrato aquoso de *S. buxifolia* é seguro. Não foi possível estabelecer a causa da elevação da enzima AST no grupo tratado com a dose de 200 mg/ kg de peso corporal mas provavelmente este aumento foi causado por alguma falha na punção do plexo retro-orbital, uma vez que estes ensaios são bastante sensíveis à hemólise. Através dos ensaios que avaliaram a capacidade antioxidante do tecido hepático pode-se inferir que o SBSB não altera o estado redox. Deste modo, extratos e frações de *S. buxifolia* podem ser usados no tratamento de doenças hepáticas induzidas experimentalmente em animais.

VI CONCLUSÕES

- A análise fitoquímica preliminar indicou a presença de compostos fenólicos, flavonóides e taninos condensados que tiveram seus valores expressos em equivalentes de ácido gálico, equivalentes de quercetina, equivalentes de catequina/g de SBSB, respectivamente.
- A capacidade antioxidante total do SBSB foi determinada pelo método do DDPH, e este possui uma atividade semelhante à do ácido ascórbico.
- A cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) realizada neste protocolo, identificou e quantificou os seguintes compostos: quercetina, rutina, canferol e os ácidos cafeico, clorogênico e gálico. O composto majoritário encontrado na preparação foi o ácido cafeico.
- A dose única do extrato nas doses de 100, 200 e 400 mg/ kg de peso corporal não mostraram-se tóxicas para os animais pois estes não apresentaram alterações no comportamento e no metabolismo.
- Nos animais tratados sub-crônicamente com SBSB nas diferentes doses, observou-se que o SBSB não causou alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas analisadas (CAT e SOD), não elevou o conteúdo de MDA, e não depletou os tíois não-proteicos no tecido hepático.
- Não foram observadas características negativas (inflamação, cirrose, necrose, congestão sinusoidal e ruptura das veias centrais) na análise histopatológica do fígado para todos os grupos.
- O conteúdo sérico de albumina não foi alterado pelo tratamento sub-crônico com SBSB. Também, não alterou a atividade da enzima ALT entre os grupos. O grupo tratado com a dose de 200 mg de SBSB/ kg de peso corporal apresentou atividade elevada a enzima AST no 30º dia de tratamento em comparação ao grupo controle.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. A.; ÂNGULO P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetic Medicine**. v 22, p. 1129-1133, 2005.

AKAHOSHI, T., et al. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor β -1. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.17 (1), p. 59-65, 2002.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-19. 1993.

ANDRADE, F. et al. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. **Food and Chemical Toxicology**. v.50, p.318-324, 2012.

BARCELOS, G. R. M. et al. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. **Mutation Research**. v.726, p. 109–115, 2011.

BENT, S. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation. **Journal of General Internal Medicine**, v. 23(6), p. 854-859, 2008.

BLUMENTAHL, M. **The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicine**. American Botanical Council: New York, 1998.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 105-107, 2013.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek. **Natural Product Research**. v. 26(10), p.939-944, 2012.

BOLIGON, A. A. et al. Determination of phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek leaves. **International Journal of Medicinal Plants**, v. 1, p. 01-05, 2012.

BOLIGON, A. A. et al. Protective Effects of Extracts and Flavonoids Isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against Chromosome Damage in Human Lymphocytes Exposed to Hydrogen Peroxide. **Molecules**, v. 17, p. 5757-5769, 2012.

BOLIGON, A. A., et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 6592-6598, 2009.

BRUCE, A.; BUEHLER, M. D. The free radical theory of aging and antioxidant supplements: a systematic review. **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 23, p. 345-384, 2012.

CALDERÓN, J. C.; FERNÁNDEZ, A. Z.; DE JESÚS, A. I. M. Atherosclerosis, oxidative stress and physical activity. Review. **Investigacion Clinica**, v. 49, p. 397-410, 2008.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 22(5), 749-760, 1997.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARLTON, W.; MCGAVIN. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 1998.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2012.

CHAN, T. Y. et al. A case of acute aconitine poisoning caused by chuanwu and caowu. **The Journal of tropical medicine and hygiene**. v. 23, p. 268-271, 1993.

CHOJKIER, M. Hepatic sinusoidal-obstruction syndrome: toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Hepatology**, v.39(3), p. 437-46, 2003.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v. 150(1), p. 85-96, 2004.

COHEN M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**. v.111, p. 918-31, 1989.

COHEN, J.A.; KAPLAN M. M. The SGOT/SGPT ratio an indicador of alcoholic liver disease 1979. **Digestive Diseases and Sciences**. v.24, p. 835-838,1979.

CORDEIRO, C .H. G.; CHUNG, M. C., SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15(3), p.272-278, 2005.

CORNS C. M. Herbal remedies and clinical biochemistry. **Annal of Clinical Biochemistry**. v.40, p. 489-507, 2003.

COTE C.S. et al. Composition and biological activity of traditional and commercial kava extracts. **Biochemcal Biophysical Research Communications**. v. 322(1), p.147–52, 2004.

DAVID, P. Failure of liver cirrhosis induction by thiocetamide in Nagase analbuminaemic rats. **Laboratory Animals**, v. 36 (2), p. 158-164, 2002.

DENHAM, A.; MCINTYRE, M.; WHITEHOUSE J. Kava-the unfolding story: report on a workin-progress. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 8(3), p.237–63, 2002.

DI STASI L. C.; SANTOS E. M. G.; HIRUMA C. A. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Editora UNESP, p 127-138, 1989.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.19, p. 60-71,2007.

DICKINSON D. A.; FORMAN H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**. v. 64, p. 1019–1026, 2002.

DUNNE, F. J. The 'natural health service': natural does not mean safe. **Advances in psychiatric treatment**, v. 15, p. 49-56, 2009.

EATON J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **The Journal of Laboatory Clinical Medicine**. v.118, p. 3-4, 1991.

EISENBERG, D. M., et al. Trends in alternative medicine use in United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. v. 280, p. 1569-1575, 1998.

ERNST, E.; THOMPSON, C. J. Heavy metals in traditional Chinese medicines: a systematic review. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v. 70(6), p. 497-504, 2001.

FAU, D. et al. Diterpenoids from germander, an herbal medicine, induce apoptosis in isolated rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 113(4), p. 1334-1346, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos e mecanismos de lesão. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43(1), p. 61-68, 1997.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 114-21, 1984.

FRIED M. W. et al. Effect of silymarin (Milk Thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy. **Journal of American Medical Association**, v. 308, p. 274-282, 2012.

FURBEE, R. B. et al. Hepatotoxicity associated with herbal products. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 26, p. 227-241, 2006.

GARCIA, L., et al. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. **Journal of Hepatology**. v.37, p. 797-805, 2002.

GINÈS P. M.D., CÁRDENA A. M.D., ARROYO V. M.D., RODÉS J. M.D. Management of Cirrhosis and Ascites. **New England Journal of Medicine**. v. 350, p. 1646-1654, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**. v.186, p. 01-85, 1990.

HAYOUNI, E. A. et al. Mechanism of action of *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Gaertn) Sm. essential oil on six LAB strains as assessed by multiparametric flow cytometry and automated microtiterbased assay. **Food Chemistry**, v. 111, p. 707–718, 2008.

HERRERA, S.; BRUGUERA, M. Hepatotoxicidad inducida por el uso de hierbas y medicamentos para perder peso. **Gastroenterología y Hepatología**. v. 31(7), p. 447- 453, 2008.

HEVIA, F. et al. Calidad de cardo mariano (*Silybum marianum* (L.). Gaertn.) cosechado em diferentes estados fenológicos. **Información Tecnológica**, v. 18, p. 69 -74, 2007.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. London; Ed. Batsford; 1993.
HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v.31, p. 1170-1179, 2008.

JUINOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519 – 528, 2005.

KLEIJNEN, J.; KNIPSCHILD, P. *Ginkgo biloba* for cerebral insufficiency. **British Journal of Pharmacology**. v.34, p. 352-358, 1992.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, p. 617-635, 1989.

KUMAR, R.S., ASOKKUMAR, K., MURTHY, N.V. Hepatoprotective effects and antioxidant role of *Scutia myrtina* on paracetamol induced hepatotoxicity in rats. **Journal of complementary Integrative Medicine**, v. 8, p. 01-08, 2011.

LALEMAN., W. Prometheus Versus Molecular Adsorbents Recirculating System: Comparison of Efficiency in Two Different Liver Detoxification Devices. **Artificial Organs**. v. 30, p 276-284, 2006.

LIMA, R. B. **Rhamnaceae do Brasil**. Sao Paulo: Tese de Doutorado da Universidade de Sao Paulo, 2000.

LORRAIN-SMITH, J. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. **Journal of Physiology**, v. 24, p. 19-25, 1899.

MCCUSKEY, R. S. et al. Role of endotoxin in the hepatic microvascular inflammatory response to ethanol. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 10(1), p. S18–S23, 1995.

MEERSON, F. Z. et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. **Basic Research in Cardiology**, v. 1, p. 465-485, 1982.

MEI, N. et al. Metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity of comfrey. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 13(7-8), p. 509-528, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts of antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MEREDITH T.J., VALE J. A. Epidemiology of analgesic overdose in England and Wales. **Human Toxicology**. v. 3, p. 61S-74S.

MILLER, L. G. Antioxidant flavonoids structure, function and clinical usage. **Alternative Medicine Review**, v. 1, p. 103-111, 1996.

MILTERSTEINER, A. et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18(3), p. 322-327, 2003.

MINCIS, M. Doença hepática induzida por drogas: aspectos de interesse clínico. **Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**, v. 4, p 102-108, 1985).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Glossário de doenças: tópicos de A a Z, 2000.

MONMANEY, T. **St John's Wort: regulatory vacuum leaves doubt about potency, effects of herb used for depression**. Los Angeles, 1998.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, V. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. v.28, p. 892-896, 2005.

MOORE, K. L., DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MOORE, M., et al. The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca^{+2} . **Journal of Biological Chemistry**. v. 260, p.13035-13040, 1985.

MORAN, L. K.; GUTTERIDGE, J. M. C.; QUINLAN, G. J. Thiols in cellular redox signaling and control. **Current Medical Chemistry**.v. 8, p. 763–772, 2001.

MOREL, A. F. et al. Cyclopeptide alkaloids of *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2571 – 2576, 2005.

MORRISSEY, P. A., SHEEHY, P. J. A., GAYNOR, P. Vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda**, v.62, p.260-264, 1994.

NATHAN, P. J. *Hypericum perforatum* (St John's wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of recent advances in its pharmacology, **Journal of Psychopharmacology**, v. 15, p. 47-54, 2001.

NELSON S.D. Molecular mechanisms of hepatotoxicity caused by acetaminophen. **Seminars in Liver Disease**, v.10, p. 267-278, 1990.

NICOLELLA, A., FERREIRA, E. M., LESSA, C. A. Relatório Anual 2011, Dados de atendimento. **Centro de informação Toxicológica do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/2011_ver02.pdf>. Acesso em 22 jan. 2013.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research**. v. 386, p. 39-67, 1997.

OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A. The efficacy of *Gingko biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 55, p.1409-1524, 1998).

OLSON J. A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, p. 7S-11S, 1999.

PAWA S., ALI. S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxianionic form of tungsten. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**. v. 1688, p 210-220, 2004.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57 (13), p. 1918-1934, 2005.

RAMIREZ, L. V. et al. Long-term effects of systemic cancer treatment on DNA oxidative damage: The potential for targeted therapies. **Cancer Letters**, v. 327, p. 134-141, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

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.

REBECCA, M. A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, p. 101–104, 2002.

RUSSMANN, S. et al. Traditional aqueous kava extracts inhibit cytochrome P450 1A2 in humans: protective effect against environmental carcinogens? **Clinical Pharmacology Therapeutics**. v.77(5), p. 453–464, 2005.

SAIJA, A., et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**. v 19(4), p. 481-487, 1995.

SCOTT M.D.; LUBIN B.H.; ZUO L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**. v. 118: 7-16, 1991.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª edição Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SINGH Y.N.; SINGH N. N. Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. **CNS Drugs**. v.16(11), p. 731–43, 2002.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul**. São Carlos: Novo Ambiente, 2006.

STEENKAMP V.; STEWART M. J.; ZUCKERMAN M. Clinical and analytical aspects of pyrrolizidine poisoning caused by South African traditional medicines. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22(3), p. 302–306, 2000.

STICKEL, F. et al. Hepatitis induced by Kava (Piper methysticum rhizoma). **Journal of Hepatology**. v.39(1), p. 62–67, 2003.

STICKEL, F., EGERER, G., SEITZ, H.K. Hepatotoxicity of botanicals. **Public Health Nutrition**, v. 3(2), p. 113-124, 2000.

STOCKLEY, I. H. **Stockley's drug interactions**. 6^a Ed. London/Chicago: Pharmaceutical Press, 2002.

TAKAHAMA, U. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function. **Phytochemistry**. v. 24, p. 1443–1446; 1985.

TÚNEZ, I., et al. Hepato and neurotoxicity induced by thiocetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmaceutical Research**. v. 52 (3), p. 223-228, 2005.

WANG, F.; YANG, J. A comparative study of caffeic acid and a novel caffeic acid conjugate SMND-309 on antioxidant properties in vitro. **LTW- Food Science and Technology**, v. 46, p. 239-244, 2012.

WASICKY, R.; WASICKY, M. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. **Planta Medica**, v. 12, p. 13-25, 1964.

WILNER, I. R.; REUBEN A. Alcohol and the liver. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 21, p. 323 -330, 2005.

ZARATÉ, R. et al. Terpenoid indole alkaloid profile changes in *Catharanthus pusillus* during development. **Plant Science**, v. 160, p. 971-977, 2001.