

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RENAN SALGADO TEIXEIRA

Isolamento e identificação da arctigenina a partir dos  
frutos da *Arctium lappa L.* e avaliação de atividade citotóxica *in*  
*vitro* e hepatoprotetora em ratos.

JUIZ DE FORA, MG  
2013

RENAN SALGADO TEIXEIRA

Isolamento e identificação da arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa L.* e avaliação de atividade citotóxica *in vitro* e hepatoprotetora em ratos.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

JUIZ DE FORA  
2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Salgado Teixeira, Renan.

Isolamento e identificação da arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa* L. e avaliação de atividade citotóxica in vitro e hepatoprotetora em ratos / Renan Salgado Teixeira.

-- 2013.

94 f.

Orientador: Jorge Willian Leandro Nascimento

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. Arctigenina. 2. HepG-2. 3. Hepatoproteção. 4. BDL. I. Leandro Nascimento, Jorge Willian, orient. II. Título.

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem saber ver.”

Gabriel García Marquez

Dedico aos responsáveis por minha vida,  
minha formação e pela força em prosseguir,  
minha mãe Lourdes e Marcílio.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me proporcionar a vida e mostrar os caminhos;
- A minha mãe Lourdes, a pessoa mais importante em minha, por ter me ensinado valores e atitudes que devem ser exercidas e cumpridas durante toda uma vida;
- Ao Marcílio, grande amigo, exemplo de amor paterno e profissional. Obrigado por me apoiar em todos meus passos;
- Aos primos, amigos e familiares, pelo apoio e por ter me ajudado a levantar em momentos difíceis;
- Aos meus queridos, que mesmo não estando mais nesse plano estão me guiando;
- Ao prof. e orientador Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento, pela confiança depositava e acreditar em meu trabalho e minha capacidade;
- Aos profs. Dr. Jair Aguiar, Ademar Alves e Valquíria Medeiros pela honrada contribuição no trabalho, fornecimento da estrutura e acolhimento em seus laboratórios;
- À prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Nagaoka e demais parceiros do Laboratório de Hepatologia Experimental da Escola Paulista de Medicina, Unifesp/SP, pela acolhida em seu laboratório e total disponibilidade para desenvolver parte deste trabalho;
- Ao Instituto de Química do ICE da UFJF pelas análises de RMN;
- Aos amigos da turma do mestrado pela excelente convivência e pela troca de conhecimento nesses dois anos;
- Aos professores do PPGCienFar pelos ensinamentos em momentos de dificuldades;
- Aos profs. Marinella Lapport e Marcelo Reis que despertaram a ciência e a pesquisa em minha vida;
- À CAPES pela bolsa concedida;
- À todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa pudesse ser completada.

## RESUMO

Arctigenina é uma lignana isolada da *Arctium lappa L.*, planta esta, pertencente a família *Asteraceae* que é amplamente utilizada na Medicina Tradicional Chinesa. Publicações citam inúmeras atividades farmacológicas do extrato bruto dessa planta e também da substância arctigenina, como a atividade anti-inflamatória, hepatoprotetora, hipoglicemiante, antitumoral, antimicrobiana, mas, estudos detalhados da atividade hepatoprotetora ainda não foram amplamente desenvolvidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi o isolamento, a obtenção e identificação da arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa L.*, para avaliar a atividade citotóxica *in vitro* frente à cultura de células de carcinoma hepático (HepG-2) e também avaliar os efeitos dessa substância isolada em lesão hepática por Ligação do Ducto Biliar (BDL). O extrato clorofórmico bruto da *Arctium lappa L.* foi obtido por soxhlet. Para isolar as substâncias, foi realizada coluna a vácuo e observou grande quantidade de arctiina, uma precursora da arctigenina. Para obter a arctigenina, foi necessário realizar uma hidrólise para retirada da molécula de glicose presente na arctiina. A mesma foi identificada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtendo excelente grau de pureza e adicionalmente também foi realizado um perfil cromatográfico por CLAE. Nos experimentos *in vitro*, a arctigenina diminuiu a viabilidade celular no teste por MTT e azul de Tripán sobre células HepG-2 e não causou citotoxicidade sobre células NIH/3T3. O teste de adesão por fornecimento de colágeno tipo I sobre HepG-2 também foi realizado para observar os mecanismos que envolvem a atividade antitumoral da arctigenina. Nos experimentos *in vivo* foram realizadas cirurgias de BDL em ratos Wistar, com  $n=6$  e grupos divididos em: sham controle, sham arctigenina, BDL controle, BDL arctigenina e BDL silimarina. O tratamento dos animais foi feitos por 48 horas e após esse período, eutanasiados e o sangue e fígado foram coletados para realizar avaliações bioquímicas séricas (AST, ALT, FA e TNF- $\alpha$ ) e também avaliação tissular (MPO). A metodologia de extração, isolamento e obtenção da arctigenina desenvolvida foi eficaz, diminuiu gastos com solventes e com o tempo para se obter as substâncias. Os parâmetros de confiança analisados por CLAE demonstraram que o método analítico desenvolvido foi específico e reprodutível, o que contribui para estudos em controle de qualidade e ensaios bioanalíticos. A arctigenina demonstrou atividade citotóxica e antiadesão, sendo a atividade dose dependente para células HepG-2, com IC 50 de 90,8  $\mu\text{M}$ . Nenhuma atividade sobre células NIH/3T3, o que demonstrou ação específica sobre a células HepG-2. Resultados do estudo *in vivo* de 48 horas não apresentaram resultados significantes quando comparados aos grupos controle e controle positivo, entretanto, levantamentos bibliográficos mostram que a arctigenina é uma substância promissora e estudos de hepatoproteção por períodos maiores complementariam a elucidação de sua atividade.

**Palavras chaves:** arctigenina. HepG-2. hepatoproteção. BDL.

## ABSTRACT

Arctigenin is a lignan isolated from *Arctium lappa* L., this plant, belonging to family Asteraceae is widely used in traditional chinese medicine. Publications suggest numerous pharmacological activities of crude extracts of this plant and arctigenin as anti-inflammatory activity, hepatoprotective, hypoglycemic, anticancer and antimicrobial, however detailed studies of hepatoprotective activity have not yet been widely developed. The aim of this study was the isolation and identification of arctigenin obtained from the fruits of *Arctium lappa* L., to evaluate the cytotoxic *in vitro* of arctigenin in cell culture of liver carcinoma (HepG-2) and assess the effects of this isolated compound on liver injury by ligation bile duct (BDL). The crude chloroform extract of *Arctium lappa* L. was obtained by soxhlet. To isolate the compounds was held vacuum column and observed high concentration of arctiin, a precursor of arctigenin. To obtain arctigenin, it was necessary to carry out a hydrolysis to remove the glucose molecule present in arctiin. After, the molecule was identified by <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C, attaining excellent purity, and additionally, was carried out his chromatographic profile by HPLC.. *In vitro* experiments show that the arctigenin decreased cell viability by MTT assay and the Trypan blue on HepG-2 cells and did not cause cytotoxicity on NIH/3T3 cells. Adhesion testing by providing collagen type I on HepG-2 was also carried out to observe the mechanisms involving the antitumor activity of arctigenin. *In vivo* experiments were performed by surgery in BDL rats, with n = 6 and divided into groups: sham control, sham arctigenin, control BDL, arctigenin BDL and silymarin BDL. The treatment of animals was made for 48 hours and after this period, euthanized and blood and liver were collected for serum biochemical assessments (AST, ALT, FA and TNF- $\alpha$ ) and also tissue rating (MPO). The methodology of extraction, isolation and obtaining arctigenin developed was effective, decreased spending solvents and the time to get compounds. The trust parameters analyzed by HPLC showed that the analytical method was specific and reproducible, which contributes to quality control studies and bioanalytical assays. The arctigenin demonstrated cytotoxic activity and anti-adhesion, and dependent dose activity in HepG-2 cells, with IC 50 of 90.8  $\mu$ M. No activity on NIH/3T3 cells, demonstrating the specific action on HepG-2 cells. Results of BDL done in 48 hours showed no significant results when comparing with control groups and positive control, however, literature reports show that the arctigenin is a promising compound and hepatoprotection studies for longer periods would complement the elucidation of its activity.

**Key words:** arctigenin. HepG-2. hepatoprotection. BDL.

## ILUSTRAÇÕES

- Ilustração 1 – Espécie *Arctium lappa L.* da família *Asteraceae*, comumente chamada de Bardana no Brasil.....21
- Ilustração 2 – Estrutura química da arctigenina, extraída da espécie *Arctium lappa L.* .....22
- Ilustração 3 – Representação da anatomia do fígado humano, demonstrando seu sistema de circulação sanguínea e glândula auxiliar. ....23
- Ilustração 4 – Linhagem celular de carcinoma hepático humano (HepG-2) em cultura, por escala bar 100  $\mu\text{m}$ .....28
- Ilustração. 5 - Modelos mais comuns de lesão hepática experimental.....29
- Ilustração 6 - Representação simplificada das reações que ocorrem no metabolismo oxidativo dos neutrófilos. (1): formação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  através da NADPH oxidase. (2): produção da  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pela SOD. (3): produção de HOCl pela MPO a partir da  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (4): conversão das espécies reativas de oxigênio a outras espécies oxidantes. (5): inativação das espécies oxidantes no meio extracelular pelos componentes do sistema de defesa celular e tecidual (representados em verde).. .....32
- Ilustração 7 – Espécie de *Arctium lappa L.* presente no horto da Faculdade de Farmácia da UFJF onde foi coletada os frutos para extração e isolamento da arctigenina.....37
- Ilustração 8 – CCD da primeira VLC realizada sobre o extrato clorofórmico bruto da AL. As amostras foram aplicadas com tubo capilar, fase móvel (ACOEt: MeOH – 7:3), revelada com luz ultravioleta (UV).....39
- Ilustração 9 - Hidrólise sob refluxo das frações 6 e 7. Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos e Ativos Naturais (NIPPAN).....40
- Ilustração 10 – Esquema utilizado para realização da hidrólise nas frações 6 e 7 que contêm arctiina obtidas do extrato clorofórmico bruto da *Arctium lappa L.* As frações 6 e 7 foram submetidas a hidrólise ácida utilizando como solvente solução de metanol: ácido sulfúrico 5% (1:1, v/v) em refluxo por 6 horas sob temperatura de 35°C. A solução hidrolisada foi particionada com clorofórmio e concentrada em rotaevaporador, obtendo assim a fração H 6-7.....41
- Ilustração 11 – CCD da VLC realizada sobre as frações 6 e 7 hidrolisadas. As amostras foram aplicadas com tubo capilar, fase móvel ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH – 9:1), revelada com iodo.....42

- Ilustração 12 – CCD da CF realizada sobre a subfrações H8-10. As amostras foram aplicadas com tubo capilar, fase móvel (DCM: EtOH – 97:3), revelada com luz UV.....44
- Ilustração 13 – Laparotomia do animal, visualizando o fígado do animal e posteriormente realização da ruptura do ducto biliar.....54
- Ilustração. 14 – Fluxograma da extração, isolamento da arctigenina e obtenção da arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa L.*, demonstrando todos os procedimentos químicos realizados até obtenção da subfração AL-H11 que foi submetida a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para possível identificação.....58
- Ilustração 15 – Subfração AL- H11: sólido cristalino branco.....59
- Ilustração 16: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância AL- H11 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) que foi comparado com os dados espectroscópicos de RAHMAN *et. al.* (1990) e assim pode-se confirmar que a substância AL-H11 é arctigenina.....60
- Ilustração 17: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância AL- H11 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (deslocamento químico) em ppm), que foi comparado com os dados espectroscópicos de RAHMAN *et. al.* (1990) e assim pode-se confirmar que a substância AL-H11 é arctigenina.....62
- Ilustração 18 - Estrutura química da arctigenina, que após análise de RMN por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados espectroscópicos publicados por \*RAHMAN *et. al.* (1990), pode-se dizer que a subfração AL-H11 é a substância arctigenina.....63
- Ilustração 19 – Cromatograma obtido a partir da análise da arctigenina por CLAE, utilizando equipamento da marca Waters, modelo Alliance, amostra preparada na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6x150 mm). Amostra esta injetada para visualizar o perfil cromatográfico da arctigenina frente ao método analítico proposto.....64
- Ilustração 20 – Curva padrão da arctigenina para o teste de linearidade, utilizando as concentrações de 8, 9, 10, 11 e 12  $\mu\text{g/ mL}$ . Desenvolvida em CLAE, utilizando equipamento da marca Waters, modelo Alliance, FM composta de ácido fosfórico 0,1%:MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6x150 mm). Cada amostra da curva foi injetada em triplicata, obtendo  $r = 0,9973$ .....65
- Ilustração 21 – Cromatograma do teste de precisão obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra a arctigenina, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, amostra preparada na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6x150 mm).....65
- Ilustração 22 – Cromatograma obtido no teste de especificidade obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra o diluente, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema

gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6x150 mm). Amostra injetada em triplicata e nenhum interferente foi observado no cromatograma.....66

Ilustração 23 – Cromatograma obtido no teste de especificidade obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra a fase móvel do método analítico desenvolvido, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6x150 mm).....66

Ilustração 24 – Cromatograma obtido no teste de especificidade obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra arctigenina, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, amostra preparada na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6x150 mm).....67

Ilustração 25 – Resultado da citotoxicidade da arctigenina e arctiina em linhagem de fibroblasto murino NIH/3T3 pelo método MTT. Não ocorrendo efeito citotóxico da arctigenina em nenhuma concentração testada e também da arctiina.....68

Ilustração 26 – Resultado da citotoxicidade da arctigenina e arctiina em linhagem de carcinoma hepático humano HepG-2 pelo método MTT. Ocorrendo efeito citotóxico da arctigenina sobre a linhagem nas concentrações 107, 161, 215 e 269 micromolar. A arctiina não apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem HepG-2.....68

Ilustração 27 – Concentração inibitória 50 da arctigenina sobre HepG-2, calculada pelo software GraFit que senta a concentração de 90,8  $\mu\text{M}$  como a concentração de arctigenina capaz de inibir 50 % das células do experimento de MTT.....69

Ilustração 28 – Experimento exclusão por azul de Tripán, no qual foi analisada a atividade *in vitro* do DMEM, da arctigenina e arctiina sobre HepG-2.....70

Ilustração 29 – Resultado do experimento Adesão Celular por Colágeno da arctigenina sobre HepG-2.....70

Ilustração 30 - Alterações do peso dos animais utilizados no experimento *in vivo*. Os animais foram pesados antes do início do experimento e antes de serem eutanasiados.....71

Ilustração 31 - Porcentagem do peso do fígado em relação ao peso dos animais do experimento *in vivo*.....72

Ilustração 32 – Avaliação da atividade específica da AST/TGO nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.....74

Ilustração 33 – Avaliação da atividade específica da ALT/TGP nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.....74

Ilustração 34 - Avaliação da atividade específica da fosfatase alcalina nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.....75

Ilustração 35 – Avaliação das dosagens de proteínas totais nos grupos experimentais do teste <i>in vivo</i> após tratamento com arctigenina.....	75
Ilustração 36 – Avaliação das dosagens de mieloperoxidase nos grupos experimentais do teste <i>in vivo</i> após tratamento com arctigenina.....	76
Ilustração 37 - Avaliação das dosagens de TNF- $\alpha$ nos grupos experimentais do teste <i>in vivo</i> após tratamento com arctigenina.....	77

## TABELAS

Tabela 1. Frações obtidas por VLC do extrato clorofórmico bruto.....	39
Tabela 2 Subfrações obtidas por VLC de H6-7.....	42
Tabela 3 Purificação de H 8-10 por cromatografia em coluna de sílica gel flash....	43
Tabela 4 Demonstração das linhagens, ensaio, placa, concentração celular volume de suspensão e tempo de incubação de 24 horas para todos os experimentos <i>in vitro</i> realizados.....	48
Tabela 5 Diluição das soluções utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i> , a partir da solução de 537 $\mu$ M para experimento de citotoxicidade por reagente MTT e adesão celular por colágeno.....	49
Tabela 6 Diluição da solução utilizada no experimento <i>in vitro</i> , a partir da solução estoque de 54 mM para experimento de exclusão por Azul de Tripan.....	49
Tabela 7 Demonstração da microplaca P96 na realização dos experimentos de MTT em linhagens celulares (HepG-2 e NIH/3T3) frente a arctigenina e arctiina.....	51
Tabela 8 Dados do espectro de RMN de $^1\text{H}$ , da substância AL- H11, a 300 MHz em $\text{CDCl}_3$ .....	61
Tabela 9 Dados do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , das substâncias AL- H11 a 75 MHz em $\text{CDCl}_3$ .....	63
Tabela 10 Valores médios obtidos dos pesos dos animais utilizados no experimento.....	71
Tabela 11 Valores médios obtidos dos parâmetros bioquímicos séricos avaliados.....	73
Tabela 12 Valores médios obtidos na avaliação da atividade da MPO no experimento <i>in vivo</i> .....	76
Tabela 13 Valores médios obtidos na avaliação da atividade de TNF- $\alpha$ no experimento <i>in vivo</i> .....	77

**ABREVIACÕES**

A549	Linhagem celular de câncer de pulmão
AC	Arctigenina
AcOEt	Acetato de etila
AL	<i>Arctium lappa L.</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	cido Bicinconínico
BDL	Ligao do Ducto Biliar
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CF	Coluna <i>Flash</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTV	Cetavlon
CYP	Citocromo P
DCM	Diclorometano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfido
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EtOH	Etanol
FA	Fosfatase Alcalina
FM	Fase Móvel
Gama-GT	Gama-Glutamil Transpeptidase
GPO	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S transferase
HepG-2	Linhagem celular de carcinoma hepático humano

Hex	Hexano
I.P.	Intraperitoneal
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
KATO III	Linhagem celular de câncer de estômago
LPS	Lipopolissacarídeo
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
MTT	Difenil tetrazolium brometo
NIH/3T3	Linhagem celular de fibroblasto murino
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
NK	<i>Natural killer</i>
OD	Densidade Óptica
P.A.	Pureza absoluta
PBS	Tampão fosfato salino
ptn	Proteína
Ptn Tot	Proteína Total
q.s.p	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
SLPI	Inibidor de Protease Secretória de Leucócitos
SOD	Superóxido Dismutase
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
UDPGT	Glicuronosiltransferase
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USA	Estados Unidos da América
VLC	Cromatografia Líquida a Vácuo

**SÍMBOLOS**

-	Menos
%	Porcentagem
'	Minutes
"	Segundos
°	Grau
µg	Micrograma
µm	Micrometro
µM	Micromolar
<sup>13</sup> C	Carbono treze
<sup>1</sup> H	Hidrogênio
C	Carbono
C18	Octadecil carbono
CCl <sub>3</sub>	Tricloreto de carbono
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CDCl <sub>3</sub>	Tricloreto de carbono deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
dL	Decilitro
g	Gramas
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HOBBr	Ácido hipobromoso
HOCl	Ácido hipocloroso
HOI	Ácido hipoiódoso
Kg	Kilograma
L	Litro
m	Metro
MHz	Mega hertz

min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanômetro
n°	Número
°C	Grau Celsius
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
X	Vezes

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>ARCTIUM LAPPA L.</i> .....	<b>22</b>
2.2 HEPATOPROTEÇÃO.....	<b>24</b>
2.3 AGENTES HEPATOTÓXICOS .....	<b>27</b>
2.4 MODELO DE LIGAÇÃO DO DUCTO BILIAR (BDL) .....	<b>30</b>
2.5 MIELOPEROXIDASE .....	<b>31</b>
2.6 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA .....	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	<b>34</b>
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>34</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS CROMATOGRÁFICOS .....	<b>35</b>
4.1.1 Materiais e Reagentes.....	<b>36</b>
4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	<b>37</b>
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO BRUTO DOS FRUTOS DA <i>ARCTIUM LAPPA L.</i> .....	<b>37</b>
4.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO UTILIZANDO PROCESSO CROMATOGRÁFICO DE COLUNA A VÁCUO (VLC). .....	<b>38</b>
4.5 HIDRÓLISE DA ARCTIINA .....	<b>40</b>
4.5.1 Isolamento e Purificação do Hidrolisado .....	<b>41</b>
4.5.2 Estudo da Subfração Clorofórmica H 8-10 .....	<b>43</b>
4.5.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	<b>44</b>
4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA ARCTIGENINA .....	<b>46</b>
4.6.1 Manutenção das Linhagens .....	<b>47</b>
4.6.2 Preparo das Células para o Ensaio .....	<b>47</b>
4.6.3 Preparo das Soluções .....	<b>48</b>
4.6.4 Viabilidade Celular por Reagente MTT.....	<b>50</b>
4.6.5 Exclusão por Azul de Tripán.....	<b>51</b>
4.6.6 Adesão Celular por Colágeno .....	<b>52</b>
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DA ARCTIGENINA EM MODELO DE BDL EM RATOS.....	<b>52</b>
4.7.1 Tratamento e Procedimento Cirúrgico.....	<b>53</b>

4.7.2 Dosagem de MPO.....	55
4.7.3 Dosagem de Proteínas pelo Método de Ácido Bicinconínico (BCA) .....	56
4.7.4 Dosagem de TNF- $\alpha$ .....	56
4.7.5 Análise estatística .....	56
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO METABÓLITO DE INTERESSE.....	57
5.2 DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.....	59
5.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA ARCTIGENINA.....	64
5.3.1 Linearidade.....	64
5.3.2 Repetibilidade.....	65
5.3.3 Especificidade .....	66
5.4 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	67
5.4.1 Viabilidade Celular por Reagente MTT.....	67
5.4.2 Exclusão por Azul de Tripán.....	69
5.4.3 Adesão Celular por Colágeno .....	70
5.5 AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE DA ARCTIGENINA EM MODELO BDL EM RATOS .....	71
5.5.1 Parâmetros Biométricos .....	71
5.5.2 Dosagens Bioquímicas.....	72
5.5.3 Mieloperoxidase .....	76
5.5.4 TNF-ALFA .....	77
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos provenientes de fontes naturais tem sua utilização relatada desde o início do século XIX (BARROS, 2006) e, mesmo nos dias atuais, cerca de dois terços dos medicamentos mais comercializados em todo o mundo têm sua origem ligada a produtos naturais (CALIXTO *et al.*, 2003). Estima-se atualmente, que na Alemanha e na França, 75% da população façam uso de medicamentos de origem vegetal, no Canadá 70% e nos EUA 42% (GREGÓRIO, 2006). Estima-se que aproximadamente 80% da população em países em desenvolvimento utilizam produtos naturais para a assistência primária à saúde e 25% das prescrições nestes países, são de fármacos derivados de plantas medicinais (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002).

Apesar da evolução do setor farmacêutico, que permitiu a entrada de moléculas sintéticas no mercado, o advento de novas doenças e a busca de tratamentos mais efetivos e seguros levou a retomada das pesquisas com produtos naturais, uma vez que os mesmos representam uma fonte inesgotável de novas substâncias ainda pouco conhecidas (CALIXTO, 2001).

O Brasil é o país com maior biodiversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (NODARI; GUERRA, 1999). Considerando a enorme riqueza da flora do Brasil, que possui 22% das espécies de plantas do planeta, ainda existe uma enorme e inexplorada fonte natural de metabólitos secundários vegetais com inúmeras propriedades químicas e medicinais ainda não reveladas (RATES, 2001).

Como estímulo ao desenvolvimento e consumo dos fitoterápicos foi lançado no Brasil o decreto nº 5813 (Brasil, 2006) incentivando a formação técnica e científica, o cultivo e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, planejando maior divulgação do setor e maior interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e organizações não-governamentais na área de fitoterapia (KLEIN *et al.*, 2009). Esse estímulo se deve pelo fato dos fitoterápicos serem tão eficientes quanto os medicamentos sintéticos. Mas para conseguir avançar os estudos e assim comercializar o fitoterápico, a qualidade da matéria-prima deverá ser amplamente inspecionada observando o plantio/coleta do vegetal e um criterioso controle de qualidade deverá também ser recebido, a fim de

garantir a qualidade final do produto comercializado (OGAVA *et al.*, 2003; TOLEDO *et al.*, 2003).

Plantas já estão sendo utilizadas como fármacos, por exemplo, algumas espécies da família *Asteraceae* como a *Tithonia*, que possui ação anti-inflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana frente a doenças sexuais (RÜNGELER *et al.*, 1998), e hipoglicemiantes (TAKAHASHI, 1998) e a *Arctium lappa L.*, utilizada em culturas orientais como anti-inflamatório, hipoglicemiante e antimicrobiano (CHAN *et al.*, 2011). A *Arctium lappa L.* é um planta muito citada na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), é popularmente conhecida como Burdock e, no Brasil como Bardana (Ilustração 1). Possui uso popular já descrito em literatura para tratamento de doenças infecciosas e problemas de pele. Além de estar presente em dois produtos vegetais, comercializados como auxiliares no tratamento do câncer, Flor-Essence® e Essiac® (TAMOYO *et al.*, 2000; TAI *et al.*, 2004; LEONARD *et al.*, 2006).

Atualmente, com os avanços das técnicas analíticas e separativas foi possível identificar um maior número de substâncias oriundas da *Arctium lappa L.*, tais como: taninos, arctigenina, arctiina, ácido caféico, ácido clorogênico, inulina, lappaol e diartctigenina (CHAN, 2010). Assim, isolamos a arctiina e obtivemos a arctigenina (AC) com um processo de extração eficiente para obtenção dessa substância, no qual aperfeiçoamos o tempo de extração, assim obtivemos a arctiina, realizamos uma hidrólise ácida sobre essa substância para retirarmos a molécula de glicose presente em sua estrutura para assim obtermos a arctigenina. A arctigenina, é uma dibenzilbutirolactônica, com dois anéis aromáticos e um anel lactônico presentes em sua estrutura, tendo fórmula molecular  $C_{21}H_{24}O_6$  e peso molecular 372,40 (GAO *et al.*, 2008). Possui atividades biológicas descritas na literatura, incluindo: hepatoproteção (LIN, S.C.; LIN, C.H.; LIN, C.C., 2000), ação anti-inflamatória (ISOMAKI; PUNNONEN, 1997; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; TILG *et al.*, 1992) e anticancerígena (TAMAYO *et al.*, 2000).

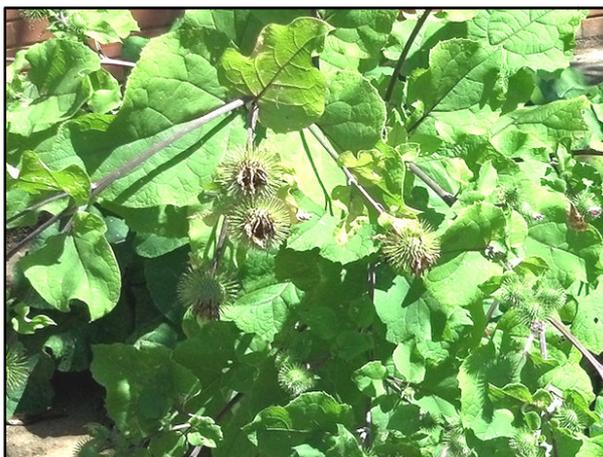


Ilustração 1 – Espécie *Arctium lappa* L. da família *Asteraceae*, comumente chamada de Bardana no Brasil. Fonte: Horto da Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autor (2013).

Desta forma, o presente estudo, possui o intuito de contribuir com maiores descobertas das atividades biológicas da arctigenina, como as que estudamos durante o período que compreendeu o mestrado. Que foi aprofundar os estudos sobre a atividade citotóxica *in vitro* da arctigenina sobre linhagem de carcinoma hepático humano, através de testes mais robustos, inéditos e com maior ampliação das técnicas de viabilidade celular. O que também foi estudado durante esse mesmo período foi a realização do estudo de hepatoproteção ainda não descrito na literatura no qual se avaliou a atividade de hepatotoxicidade e potencial hepatoprotetor da arctigenina frente ao modelo de ligação do ducto biliar (BDL) em ratos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Arctium lappa L.*

A arctigenina, uma lignana dibenzilbutirolactônica (JANG *et al.*, 2002) (Ilustração 2) que apresenta dois anéis aromáticos inclinados, formando um ângulo de 68,75°, possui ligações carbono/ hidrogênio e hidrogênio/ oxigênio, é encontrada em diversas plantas, como na *Bardanae fructus*, *Saussurea medusa*, *Thitonia nucifera* e *tropical*, *Ipomea cairica* e também na *Arctium lappa L.* (UMEHARA *et al.*, 1996; JANG *et al.*, 2002).

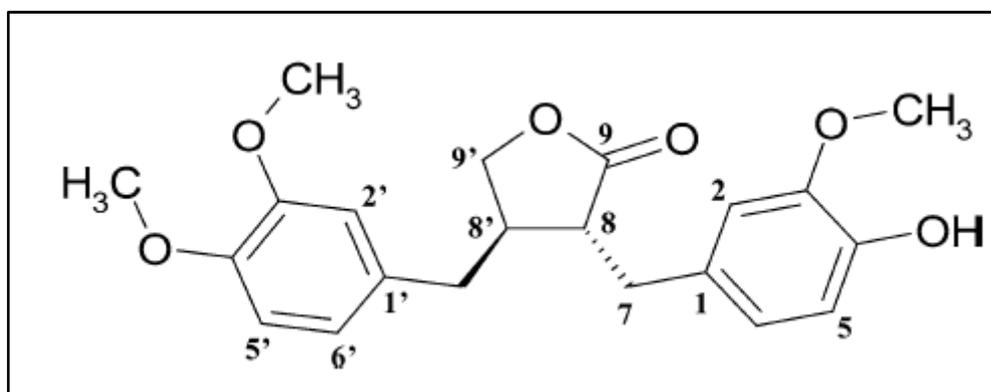


Ilustração 2 – Estrutura química da arctigenina, extraída da espécie *Arctium lappa L.* Fonte: SUSANTI *et al.*, 2012.

A família *Asteraceae*, na qual pertence a espécie *Arctium lappa L.*, possui espécies que armazenam substâncias como inulina, poliacetilenos, terpenóides e lactonas sesquiterpênicas (CRONQUIST, 1981). Entretanto, a presença de lactonas sesquiterpênicas em espécies da família *Asteraceae* demonstra uma característica fisiológica e fitoquímica das plantas dessa família (Azevedo, 2000).

A *Arctium lappa L.* é uma planta herbácea e bienal, pertence à família *Asteraceae* (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003), de fácil cultivo, capaz de se desenvolver em ambientes úmidos e sombreados, podendo chegar até a 1,5m de altura, com folhas de tamanho grande no formato oval ou lanceolado, possui flores e frutos e sua floração acontece somente no verão (MORGAN, 1997). Originária da Europa e encontrada em países como Itália, Portugal e Espanha, também comum no Japão, Taiwan (CHEN; WU; CHEN, 2004) e China (WANG; YEN; CHANG, 2007). As partes mais utilizadas da *Arctium lappa L.* na terapêutica são: folhas, frutos e

sementes e raiz (YU; YAN; XIONG, 2003), sendo que nos frutos e sementes são encontradas lignanas, terpenos e polifenóis (CHAN *et al.*, 2011).

Na medicina tradicional chinesa (MTC) a *Arctium lappa L.* é usada como diurética, anti-inflamatória, agente detoxificante (PARK *et al.*, 2007), digestiva e no tratamento de doenças dermatológicas, como psoríase (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Estudos publicados mostram a diversificada ação terapêutica da *Arctium lappa L.*, como: ação do extrato bruto sobre inibição da degranulação e liberação de leucotrienos por monócitos periféricos, atuando como inibidor da resposta inflamatória (KNIPPING; VAN ESCH; WIJERING, 2008), significativa inibição no aumento do edema de pata em ratos sugerindo ação inflamatória (LIN, S.C.; LIN, C.H.; LIN, C.C., 2000), ação antidiabética e hipoglicemiantes (MITSUO; NOBUO; KATSUYA, 2005), antitumoral quando foi realizado estudo de citotoxicidade em células de carcinoma hepático humano (HepG-2), células cancerígenas de pulmão (A549) e cancerígenas de estômago (KATO III) (SUSANTI *et al.*, 2012) e também efeito hepatoprotetor diminuindo a intoxicação em ratos por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) ou acetaminofeno (paracetamol), bem como dano hepático em ratos induzidos por etanol potencializado por CCl<sub>4</sub> (LIN, S.C.; LIN, C.H.; LIN, C.C., 2000; LIN, S.C.; CHUNG; LIN, C.C., 2002).

A *Arctium lappa L.*, além de outras espécies do gênero *Arctium*, é rica em lignanas dibenzilbutirolactona (MATSUMOTO; HOSONO-NISHIYAMA; YAMADA, 2006) e elas estão presentes em altas concentrações nas sementes e frutos dos vegetais, por isso, as dietas orientais e ocidentais já fazem uso de lignanas ao consumirem bebidas como chá, café ou vinho (LIU; SAARIENENE; THOMPSON, 2006).

As lignanas são dímeros de unidades de fenilpropanóides ligadas por um carbono central de suas cadeias (C6-C3) (HAWORTH, 1936), possuem um anel lactônico comum a todas as estruturas e relacionada com a atividade biológica dessas substâncias. Estudos demonstram que alterações realizadas em substituintes do anel aromático desses compostos alteram a ação biológica, o que mostra a extrema importância da configuração estereoquímica sobre o anel lactônico (BOTTA *et al.*, 2001). Assim, lignanas possuem diversas atividades biológicas como: atividades antioxidantes, estrogênica e antiestrogênica, capacidade de influenciar o metabolismo e a disponibilidade hormonal, além de atuar na expressão gênica e/ou na atividade enzimática (LANDETE, 2012). Além disso, evidências indicam que

alimentos ricos em lignanas podem proteger contra doenças crônicas e na prevenção do câncer, entretanto, maiores estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos na ação dessas substâncias (LANDETE, 2012). As lignanas com maior atividade antitumoral são: arctigenina e podofilotoxina e seus análogos (BOTTA *et al.*, 2001).

A arctigenina é um metabólito secundário encontrado também nos frutos da *Arctium lappa L.* que já possui relatos de atividade anti-inflamatória (CHO; PARK; JANG, 2002), bloqueio na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos da linhagem RAW 264.7 quando estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) (CHO; PARK; JANG, 2002; ZHAO; WANG; LIU, 2009) e possui atividade hepatoprotetora demonstrada em cultura de células hepáticas lesadas com CCl<sub>4</sub> (KIM *et al.*, 2003). Essas atividades são atribuídas às propriedades antioxidantes dessa substância, e poderiam estar relacionadas a uma possível proteção hepática (WANG; YEN; CHANG, 2007).

Entretanto, a arctigenina isolada ainda é uma substância muito pouco estudada quanto às suas propriedades antitumoral, antioxidante e hepatoprotetora, apesar de já demonstrar um grande potencial na terapêutica de doenças que envolvam estresse oxidativo ou de ação citotóxica sobre células tumorais.

## 2.2 Hepatoproteção

O fígado é a maior glândula do corpo, pesa aproximadamente 1,5 Kg. Quase todos os nutrientes absorvidos pelo trato gastrointestinal são inicialmente levados para o fígado pelo sistema porta hepático, porque este possui atividade metabólica além de armazenar glicogênio e secretar bile (MOORE; DALLEY, 2007).

Externamente, o fígado é dividido em dois lobos anatômicos, o lobo direito grande e o lobo esquerdo pequeno. Quanto a divisão funcional, é demarcado internamente, onde possui fígados direito e esquerdo funcionalmente independentes, que tem tamanhos muito mais semelhantes do que os lobos anatômicos (Ilustração 3) (MOORE; DALLEY, 2007).

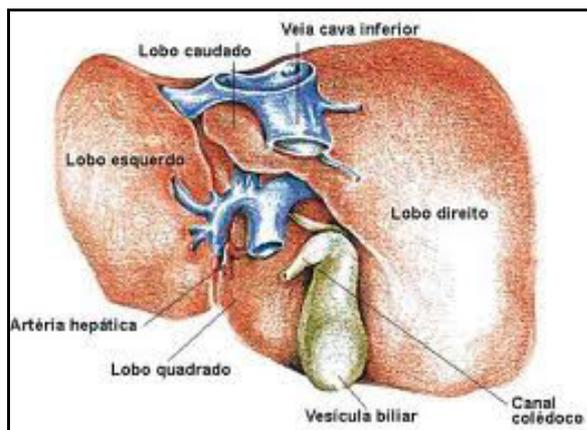


Ilustração 3 – Representação da anatomia do fígado humano, demonstrando seu sistema de circulação sanguínea e glândula auxiliar. Fonte: MOORE, L. K., DALLEY, F. A. Anatomia orientada para clínica. 5ª e. d. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, p. 268)

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática ou hepatócitos, são células poliédricas, com seis ou mais superfícies. Em cortes corados com hematoxilina e eosina, o citoplasma do hepatócito é eosinofílico, principalmente devido ao grande número de mitocôndrias e algum retículo endoplasmático liso. O hepatócito possui abundante retículo endoplasmático, tanto liso quanto rugoso. O retículo endoplasmático rugoso forma corpos basofílicos e os polirribossomos sintetizam albumina e fibrinogênio. Já o liso, é responsável pelos processos de oxidação, metilação e conjugação, requeridos para a inativação ou detoxificação de várias substâncias antes de sua excreção pelo organismo.

Os lisossomos do hepatócito são importantes na degradação e renovação das organelas intracelulares. Os peroxissomos, organelas que contêm enzimas, a sua função é oxidação de ácidos graxos em excesso, quebra do peróxido de hidrogênio gerado pela oxidação, quebra de purinas com consequente formação de ácido úrico e participação na síntese de colesterol, ácidos biliares e alguns lipídeos utilizados para a síntese de mielina. Os Complexos de Golgi no hepatócito formam os lisossomos e secretam proteínas plasmáticas, glicoproteínas e lipoproteínas.

O hepatócito é, provavelmente, a célula mais versátil do organismo. É uma célula com funções endócrinas e exócrinas, que também acumula, detoxifica e transporta diversas substâncias (MOORE; DALLEY, 2007).

Quando se diz que o fígado passou por um mecanismo de regeneração, há uma citação errônea para uma explicação biológica. O que ocorre nesse tipo de processo é uma mudança funcional do fígado, ocorrendo uma hiperplasia celular

compensatória nos lobos que ainda estão intactos e não uma recuperação do lobo danificado (GODOY *et al.*, 2006).

Drogas como o acetaminofeno ou etanol produzem alterações metabólicas e podem levar a lesão hepatocelular através de complexos mecanismos interativos. Estes hepatócitos, quando danificados, podem modificar sua função e sua estrutura levando a lesões permanentes ou transitórias dependendo da intensidade. As alterações do funcionamento e mudanças histológicas são acompanhadas em todas as etapas da lesão, desde variações nas organelas a membrana. Tais alterações podem ser seguidas ou não de manifestações clínicas ou anormalidades laboratoriais (FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995).

Há diretrizes divergentes entre pesquisadores quando se trata de lesão hepática, algumas incluem alterações dos parâmetros bioquímicos e outros tipos não, sendo Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Bilirrubinas, Gama-Glutamil Transpeptidase (Gama-GT) e Fosfatase Alcalina (FA) as que mais sofrem alterações (MARZELLA *et al.*, 1991).

As aminotransferases ou transaminases, como a AST e a ALT, são enzimas que indicam com maior sensibilidade danos hepatocelulares e são as que mais ajudam a diagnosticar doenças hepáticas agudas. A AST é encontrada no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, cérebro, pulmão. A ALT é encontrada no fígado. As transaminases possuem níveis séricos em baixas concentrações quando não há nenhuma patologia instalada. Mas quando há dano hepático, ocorre um aumento de permeabilidade para essas enzimas o que faz aumentar a concentração dessas na corrente sanguínea. As aminotransferases geralmente não se elevam em obstruções ictéricas, tendo como exceção a fase aguda da obstrução biliar causada pela passagem de um cálculo pelo ducto biliar. Neste caso, os níveis das transaminases podem estar entre 1000 a 2000 U/L. No entanto, os níveis das transaminases podem diminuir rapidamente, passando a demonstrar um típico caso de colestase (KASPER *et al.*, 2005).

A FA é encontrada na membrana do canalículo biliar dos hepatócitos ou próxima a ela, e seus níveis podem estar elevados na colestase. Elevações de FA maiores que quatro vezes que o normal ocorre primeiramente em pacientes com colestase e também doenças infiltrativas do fígado, como câncer. Elevações de FA derivados do fígado nem sempre são específicas para colestase, e uma elevação

três vezes menos que a normal pode ser vista em qualquer tipo de doença hepática (KASPER *et al.*, 2005).

Assim, para um diagnóstico correto e específico de doenças hepáticas é necessário realizar diversos testes laboratoriais porque só a associação e correlação dos mesmos com os dados clínicos é que pode levar a definição da doença (KASPER *et al.*, 2005).

### **2.3 Agentes Hepatotóxicos**

A utilização de modelos de hepatotoxicidade tornou-se um vasto campo de estudos experimentais. Estas lesões induzidas permitem o estudo das doenças do fígado humano, toxicidade ambiental e industrial, a seleção de princípios ativos para possíveis efeitos de hepatoproteção, estudos de fisiologia, patologia hepática e no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico (BRUGUERA; BORDAS; RODES, 1977).

Diversos modelos de lesão hepática podem ser úteis para estudos de histopatologia hepática. Atualmente, quase todas as lesões agudas e crônicas conhecidas podem ser reproduzidas utilizando experimentos laboratoriais. Atividade fisiológica, efeitos de fármacos e certas lesões específicas como corpos apoptóticos, anormalidades de nucléolo, megalócitos e colestase podem ser induzidas por modelos animais e cultura de células. Uma linhagem celular descoberta em 1980 que vem sendo muito estudada atualmente é a linhagem de carcinoma hepático humano (HepG-2) (SAHU *et al.*, 2007).

A HepG-2 (Ilustração 4) possui características que levam a sua utilização em estudos de hepatotoxicidade, dentre elas a capacidade de expressar e induzir enzimas que metabolizam drogas, como as enzimas de fase I (CYP1A, CYP2B, CYP3A e CYP2E) e também as enzimas de fase II (UDPGT e GST). Entretanto, nota-se que nem todas as enzimas estão presentes em células HepG-2 (SAHU *et al.*, 2007). A avaliação de conclusões de trabalhos com uso de HepG-2 sugerem que o modelo pode detectar hepatotoxicidade celular humana com até 80% de sensibilidade e 90% de especificidade (O'BRIEN *et al.*, 2006) e, assim, ser preditor de fosfolipidose, toxicidade mitocondrial e estresse oxidativo (BOVA *et al.*, 2005; SAWADA; TAKAMI; ASAHI, 2005).

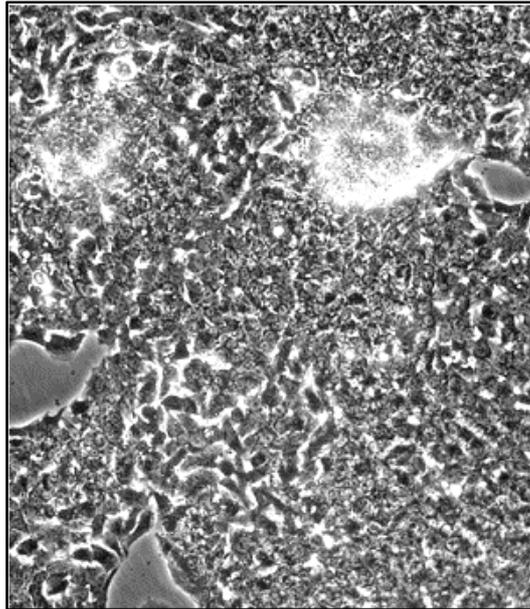


Ilustração 4 – Linhagem celular de carcinoma hepático humano (HepG-2) em cultura, por escala bar 100  $\mu\text{m}$ . Fonte: ATCC.

Em se tratando de modelos *in vivo*, os modelos experimentais mais comuns são com  $\text{CCl}_4$ , acetaminofeno, etanol, ligação de ducto biliar (BDL) e isquemia-reperfusão (Ilustração 5) (BRUGUERA *et al.*, 1977). Sendo o modelo indução do dano hepático por  $\text{CCl}_4$  o mais utilizado e o considerado como escolha para hepatotoxicidade por xenobiótico mediado por radicais livres, em animais (JOLLOW *et al.*, 1973). O mecanismo pelo qual ocorre a lesão estaria ligado à sua metabolização e ativação nos microsossomos hepáticos através de reações mediadas pela citocromo P450 para reativar o radical livre triclorometil ( $\text{CCl}_3$ ), o que lesa os hepatócitos através de ligações covalentes com os ácido graxos poliinsaturados nas membranas celulares durante a peroxidação lipídica (RECKNAGEL *et al.*, 1989; COMPORTI, 1985).

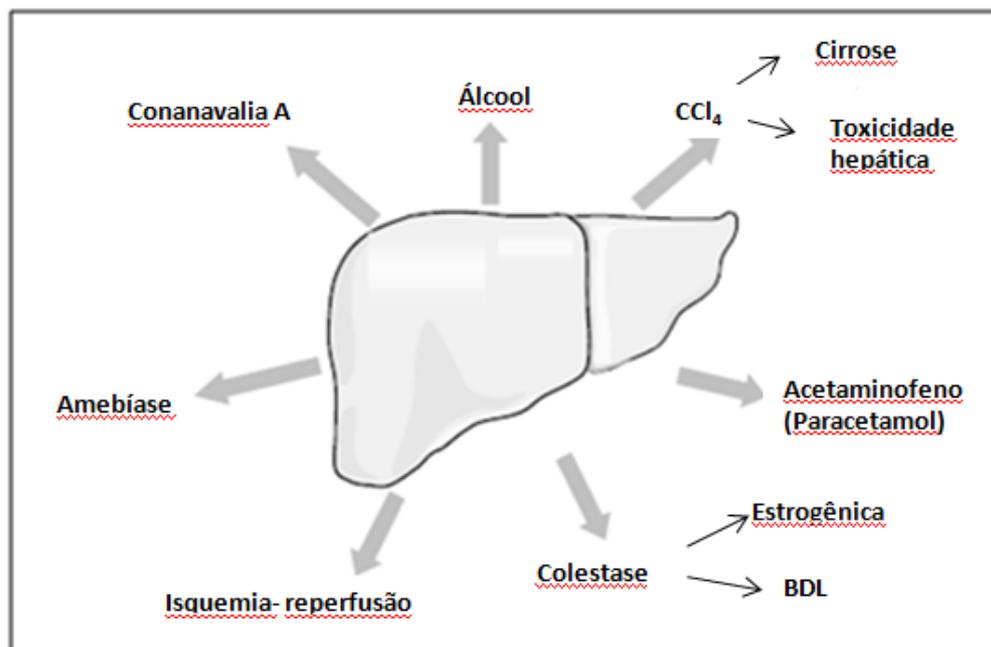


Ilustração. 5 - Modelos mais comuns de lesão hepática experimental. Fonte: PABLO MURIEL. Some Experimental Models of Liver Damage. In: SAURA C. SAHU *et al.* Hepatotoxicity: from genomics to *in vitro* and *in vivo* models. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, C. 6, p. 120, 2007.

Outro modelo também utilizado é o que utiliza acetaminofeno, um analgésico e antitérmico eficaz com baixos efeitos colaterais que quando administrado em doses terapêuticas ou sobre dose, ou em associação com etanol, pode causar dano ao fígado, levando a uma severa necrose hepática centrilobular, falência renal e morte (BORGES *et al.*, 1999; MITCHEL *et al.*, 1973; MITCHEL, 1988; SAHU *et al.*, 2007). Embora a lesão hepática por acetaminofeno seja estudada há muitos anos, os mecanismos ainda não são totalmente claros e estabelecidos. Até o momento, o que se observa é a depleção a nível hepatocelular de grupos sulfidril de glutathione, com isso o metabólito ativo *N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina se liga covalentemente com macromoléculas celulares, acarretando disfunção dos sistemas enzimáticos e desarranjo estrutural e metabólico. Além disso, a depleção de grupos sulfidril da glutathione intracelulares torna o hepatócito altamente susceptível ao estresse oxidativo e à apoptose (BOYD; BERECZKY, 1966).

O modelo utilizando etanol é outro modelo estudado devido ao elevado consumo de álcool constitui um dos casos mais comuns de doenças hepáticas em humanos. Então, parece ser lógico que o modelo por indução com etanol seja o melhor modelo para dano hepático, mas, é importante ressaltar que esse modelo

possui características importantes que pode dificultar a implantação do modelo, como: aversão dos animais pelo etanol, elevado metabolismo do etanol pelos ratos e alta tolerância dos animais para o etanol (TSUKAMOTO; GAAL; FRENCH, 1990). O modelo em si permite investigar mecanismos patogénéticos de necrose hepática e fibrose (SAHU *et al.*, 2007).

Já o modelo por isquemia/ reperfusão hepática permite analisar os efeitos causados por uma das patologias com maior número de morbidade e mortalidade em lesões hepáticas e transplantes, no qual o dano é causado pela anoxia ou isquemia. Além disso, podem ser analisados também os efeitos da redução do fornecimento de sangue para o fígado, que resulta na baixa perfusão e com uma hipoxia resultante. Modelos de isquemia/ reperfusão representam a situação clínica simplificada e a escolha do modelo adequado vai depender da questão clínica a ser respondida (SAHU *et al.*, 2007).

O modelo por BDL é extensivamente examinado desde a década de 70 e diversos estudos já foram publicados reportando a sistemática do estudo por prolongamento de BDL como um modelo de cirrose em ratos (SAHU *et al.*, 2007). O modelo pode ser dividido por períodos em que se prolonga a ligação do ducto biliar, assim, permite estudar inflamação aguda, elevado número de mitose e necrose (período de 5 dias), fibrose e proliferação do ducto biliar em área portal (período de 10 dias ou mais) e produção de septos fibrosos ligados a área portal e estendidos para lóbulos (período de 50 dias) (SAHU *et al.*, 2007).

## **2.4 Modelo de Ligação do Ducto Biliar (BDL)**

O modelo de BDL apresenta algumas vantagens sobre o de CCl<sub>4</sub>, provando ser mais útil para o estudo de cirrose humana (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006) e para comprovar a eficácia de drogas antifibróticas (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2001). Assim, leva-se a necessidade de estudar e entender a metodologia experimental para conseguir obter uma melhor resposta do estudo realizado.

O estudo sobre colestase é de grande importância devido à frequente incidência, tanto em adultos quanto em crianças, e a elevada variedade de causas que podem levar ao surgimento da patologia. É uma condição hepática comum no

período neonatal e também nos primeiros meses de lactância (REICH & SIMON, 1994). Podendo evoluir para cirrose biliar em recém nascidos mais rapidamente do que em adultos (BURDELSKI, 1995).

O modelo de BDL resulta em prejuízo funcional da captação hepatocelular, do transporte dos sais biliares e da excreção canalicular (TRAUNER et al., 1997). Assim, é caracterizada pela acumulação anormal de bile causada por uma anormalidade no transporte dos ácidos biliares para o duodeno. Essa diminuição ou ausência de fluxo biliar é a principal característica de várias desordens progressivas crônicas no fígado, tais como a atresia biliar, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária. O evento primário da colestase implica no desenvolvimento da lesão hepatocelular progressiva, fibrogênese hepática, cirrose e morte por insuficiência hepática. No entanto, os mecanismos pelos quais provocam a colestase permanecem em grande parte incerta (SAHU *et al.*, 2007).

Evidências indicam que os radicais livres, o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica podem estar presentes em danos colestáticos. Radicais livres induzem alterações celulares e podem estar fortemente associado na proliferação celular, diferenciação e morte, bem como na expressão de genes. Mas também, acredita-se que o estresse oxidativo é um provável mediador de dano colestática e a terapia antioxidante é uma estratégia terapêutica recomendada (SAHU *et al.*, 2007).

## 2.5 Mieloperoxidase (MPO)

O aumento de MPO está condicionado a patologias, como por exemplo, a aterosclerose, fibrose pulmonar, endometriose e câncer (ONG; HALLIWELL, 2004). Essa enzima, pertencente a família das hemeperoxidases, presente principalmente em neutrófilos e monócitos (PROKOPOWICZ *et al.*, 2011). A MPO é capaz de modificar o  $H_2O_2$  na presença de haletos  $Cl^-$ ,  $Br^-$  e  $I^-$  em moléculas com um alto poder oxidante como o ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr) e ácido hipoiodoso (HOI), tendo maior produção do HOCl, devido a elevada concentração de  $Cl^-$  nos fluidos biológicos (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009).

Como a MPO possui um grupamento heme na constituição da sua molécula, esta possui um íon  $Fe^{3+}$ , que é capaz de reagir com o  $H_2O_2$  formando um composto intermediário denominado composto I ( $Fe^{4+}$ ). Este composto reagindo com o  $Cl^-$  há

formação do HOCl e reduzindo assim, a MPO ao seu estado natural ( $MPO^{3+}$ ). Nesse estado a MPO pode reagir com  $O_2$  e  $H_2O_2$ , além de também ser capaz de formar outras espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila e oxigênio singlete (Ilustração 6) (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; PROKOPOWICZ *et al.*, 2011).

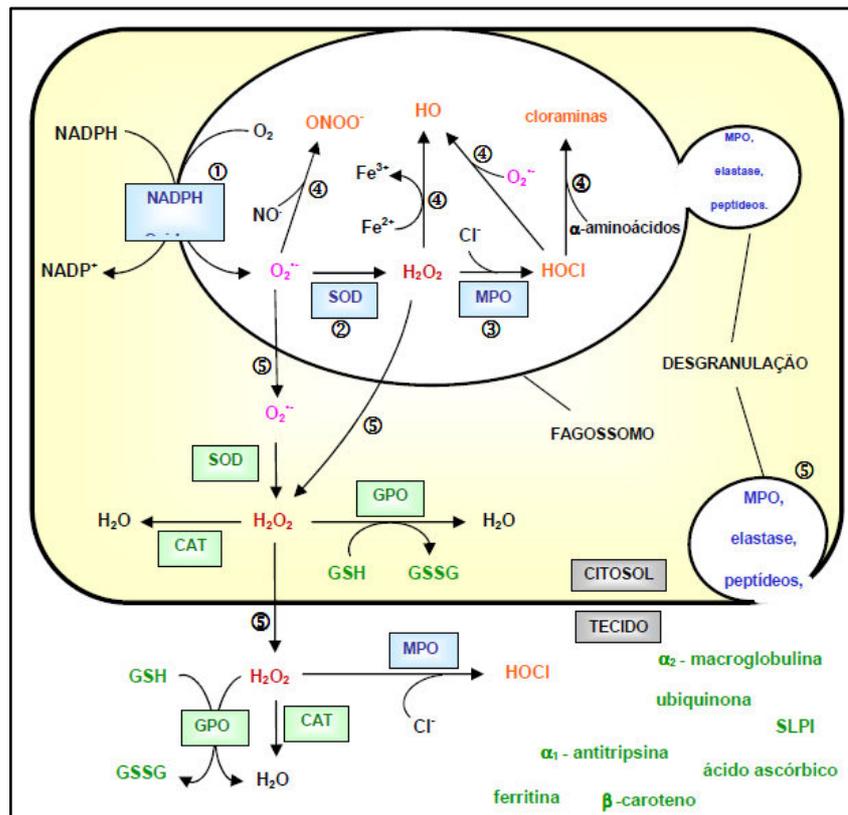


Ilustração 6 - Representação simplificada das reações que ocorrem no metabolismo oxidativo dos neutrófilos. (1): formação do  $O_2^{\bullet-}$  através da NADPH oxidase. (2): produção da  $H_2O_2$  pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  pela SOD. (3): produção de HOCl pela MPO a partir da  $H_2O_2$ . (4): conversão das espécies reativas de oxigênio a outras espécies oxidantes. (5): inativação das espécies oxidantes no meio extracelular pelos componentes do sistema de defesa celular e tecidual (representados em verde). Fonte: KABEYA, 2006 (adaptado por KLEIN, 1990; WEISS, 1989 E HALLIWELL, 1999).

## 2.6 Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O TNF-  $\alpha$  é uma potente citocina multifuncional, podendo exercer efeitos citotóxicos, regulatórios e inflamatórios sobre diversas células, como as células tumorais, linfóides e não linfóides. O TNF-  $\alpha$  é secretado por macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e NK e quando ocorre ligação aos receptores de membrana do

TNF-  $\alpha$  é que desencadeia as atividades biológicas dessa citocina, como: citólise e citostase de células tumorais *in vitro*, necrose hemorrágica de tumores *in vivo*, aumento da proliferação de fibroblastos, quimiotaxia e estímulo da fagocitose pelos neutrófilos (REICHEL *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que o TNF-  $\alpha$  desempenha um papel crítico em diversos processos fisiopatológicos, incluindo doenças neurodegenerativas, hepatite viral crônica (KINNMAN; ANDERSSON; HULTCRANTZ, 2000) e em pacientes com doenças hepáticas causadas pelo alcoolismo (FELVER *et al.*, 1990).

Em vários modelos de lesão hepática, como o álcool ou pela lesão induzida pela dimetilnitrosamina (YIN *et al.*, 1999; KITAMURA *et al.*, 2002), o TNF-  $\alpha$  desempenha o papel de ativar as células hepáticas estreladas em experimentos *in vitro* (HELLERBRAND *et al.*, 1998). Além disso, o TNF-  $\alpha$  induz a insuficiência hepática ou pode agravar a lesão hepática após exposição a CCl<sub>4</sub> (CZAJA; XU; ALT, 1995). Por outro lado, o TNF-  $\alpha$  é necessário para regeneração do fígado após hepatectomia parcial (YAMADA *et al.*, 1997).

Em experimento de BDL, para reproduzir colestase experimental, os níveis de TNF-  $\alpha$  estão aumentados tanto a níveis séricos (BEMELMANS *et al.*, 1992) quanto em macrófagos hepáticos (FOX; KIM; TRACY, 1997).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar o isolamento, obtenção e identificação da arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa L.* e avaliar a atividade citotóxica *in vitro* e hepatoprotetora em ratos da arctigenina.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1) Extrair, isolar e purificar a arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa L.*;
- 2) Desenvolver metodologia analítica para quantificação da arctigenina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- 3) Avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica da arctigenina sobre as linhagens celulares de carcinoma hepático humano (HepG-2) e fibroblasto (NIH/3T3);
- 4) Avaliar o efeito *in vitro* da arctigenina sobre a adesão celular em linhagem de carcinoma hepático humano (HepG-2);
- 5) Avaliar o efeito da arctigenina sobre marcadores hepáticos e inflamatórios (AST, ALT, FA, MPO e TNF- $\alpha$ ) em modelo de lesão hepática por BDL em ratos;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Instrumentação e Materiais Cromatográficos

Para realização deste trabalho o Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), disponibilizou os seguintes equipamentos:

- Rotaevaporador (Fisaton<sup>®</sup>, modelo 558); bomba à vácuo (Prismatec<sup>®</sup>, modelo 121) e Banho Ultratermostático (Cientec<sup>®</sup>, modelo CT-281-28).
- Aparelho de Soxhlet com manta aquecedora Marconi<sup>®</sup>
- Bomba *Bunchi V-700*.
- Câmara de Ultravioleta 254e 366 nm (U.V. SL-204, Solab Científica<sup>®</sup>).
- Balança semi-analítica (BL 320, Marte<sup>®</sup>).
- Balança analítica (AY 220, Marte<sup>®</sup>).

Nos processos cromatográficos, o tipo de fase estacionária utilizada variou conforme a separação desejada:

- para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel GF<sub>254</sub>, com espessura de 25 mm (TLC Silicagel 60 F<sub>254</sub>, 20x20 cm, Merck<sup>®</sup>).
- para cromatografia em coluna líquida a vácuo (VLC) utilizou-se como adsorvente sílica gel (porosidade de 60 Å, 70-230 µm, Sigma Aldrich<sup>®</sup>) e coluna de vidro de diferentes alturas e diâmetros.
- para cromatografia em coluna *flash* (CF) utilizou-se como adsorvente sílica gel (40-60 µm, Silicycle<sup>®</sup>) e colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros.

O departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da UFJF disponibilizou a utilização do espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/300 que opera em campo magnético de 300 MHz (RMN <sup>1</sup>H) e 75 MHz (RMN <sup>13</sup>C).

O laboratório de Glicoconjugados do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF disponibilizou para realização dos ensaios *in vitro* e dosagens tissulares os seguintes equipamentos:

- Leitor Espectrofotométrico de placa de Elisa (Thermo Electro<sup>®</sup>, modelo Multiskan Ascent).

- Fluxo Laminar (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo 1300 series A2).
- Bomba a Vácuo (FANEM<sup>®</sup>, modelo DAG-82631).
- Estufa com Controle de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo 3111).
- Microscópio Invertido (Olympus<sup>®</sup>, modelo CKX41SF).
- Centrífuga de Microtubos (Thermo Scientific<sup>®</sup>).
- Centrífuga (Centribio<sup>®</sup>).
- Desruptor de Células Ultrasônico (Unique<sup>®</sup>, modelo DESRUPTOR).
- Banho Maria (Nova Técnica<sup>®</sup>, modelo NT 265).
- Purificador de Água Osmose Reversa (Cienlab<sup>®</sup>).

O laboratório de Farmacologia do ICB da UFJF disponibilizou para desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação da arctigenina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, com detector UV, injetor automático, forno para coluna e amostrador (Waters<sup>®</sup>, modelo Alliance).
- Coluna Cromatográfica C18, 4,6 x 250 mm, 5µm (Waters<sup>®</sup>, modelo X-Bridge).

O Laboratório Santarosa de Análises Clínicas disponibilizou para realização das dosagens bioquímicas séricas do experimento *in vivo* o seguinte equipamento:

- Analisador Bioquímico (Labtest<sup>®</sup>, modelo Labquest).

#### 4.1.1 Materiais e Reagentes

O grau de pureza dos solventes, reagentes e meios de cultura utilizados variou de acordo com a finalidade:

- para as extrações, partições e sistemas cromatográficos, utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas Vetec, Tedia, J. T. Baker, Merck, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec e grau técnico previamente submetido à destilação fracionada;
- para realização dos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* utilizou-se meios de culturas e reagentes de pureza adequada, dos seguintes fornecedores, Merck, CultiLab, Sigma-Aldrich, Labtest, Thermo Scientific, BioLegend.

- Para as revelações dos cromatogramas obtidos em placas comparativas utilizaram-se vapores de iodo, solução de anisaldeído sulfúrico, solução de vanilina em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm).

- Nas análises espectroscópicas utilizou-se clorofórmio deuterado: CHOLOFORM-D (D, 99,8%) Cambridg Isotope Laboratories, Inc.

#### **4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal**

O material vegetal (Ilustração 7) foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia - UFJF, no município de Juiz de Fora – MG (21°46'39.48" S; 43°22'00.10" O). A coleta do material foi realizada no mês de setembro de 2012.

A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa sob o número de tombo 37.197, sigla VIC e identificado por Fernanda Souza, farmacêutica do Herbário da Universidade Federal de Viçosa.



Ilustração 7 – Espécie de *Arctium lappa* L. presente no horto da Faculdade de Farmácia da UFJF onde foi coletada os frutos para extração e isolamento da arctigenina. Fonte: Horto da Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autor (2013).

#### **4.3 Obtenção do Extrato Clorofórmico Bruto dos Frutos da *Arctium lappa* L.**

Após a separação dos frutos, este material vegetal foi submetido à secagem por 15 dias em temperatura ambiente. Foram obtidos 1,4 Kg de frutos secos. A pulverização dos frutos foi realizada em liquidificar e o pó obtido (1,4 Kg) foi

submetido à extração em Soxhlet, utilizando como solvente extrator clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) por um período de 3 horas a temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , seguido de filtração. O uso de um solvente com polaridade intermediária e também do equipamento Soxhlet tem como objetivo a extração de componentes com polaridade intermediária, como as lignanas arctiina e arctigenina, e não a obtenção de um extrato bruto completo da planta.

Assim, as soluções clorofórmicas obtidas foram filtradas e transferidas progressivamente para balões de fundo redondo e, então, concentradas com auxílio de rotaevaporador. O extrato obtido foi transferido para frasco previamente pesado, resultando em 210 g de extrato clorofórmico bruto dos frutos de *Arctium lappa L.* (AL).

#### **4.4 Fracionamento do Extrato Bruto Clorofórmico utilizando Processo Cromatográfico de Coluna a Vácuo (VLC)**

Com a finalidade de separação inicial de seus constituintes, o extrato clorofórmico bruto foi submetido à cromatografia por VLC com solventes orgânicos. Assim, o extrato bruto (50 g) foi solubilizado em metanol (MeOH) e incorporado em 50 g de sílica gel utilizada como adsorvente. Esta mistura foi homogeneizada vigorosamente até a secura com a eliminação do solvente. E assim, depositada no topo da coluna cromatográfica de vidro de 10 cm de diâmetro, empacotada com 500 g de sílica gel em 16 cm de altura.

Foram coletadas 7 frações de 2 L, utilizando-se como eluentes misturas de solventes com polaridades crescentes, conforme Tabela 1.

Após análise por CCD, reuniram-se as frações que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes (Ilustração 8).

**Tabela 1.** Frações obtidas por VLC do extrato clorofórmico bruto

Eluentes	Frações	Massa (g)
AcOEt 100%	1	6,5
AcOEt:MeOH 9:1	2	2,7
AcOEt:MeOH 8:2	3	0,3
AcOEt:MeOH 8:2	4	1,2
AcOEt:MeOH 8:2	5	0,1
AcOEt:MeOH 7:3	6	14,3
AcOEt:MeOH 1:1	7	23,1

**Legenda:** VLC: cromatografia de coluna a vácuo; g: grama; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol

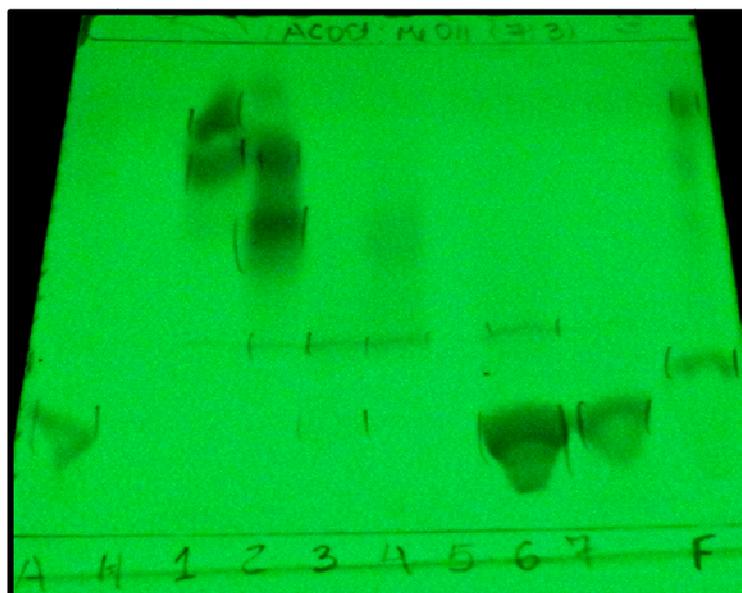


Ilustração 8 – CCD da primeira VLC realizada sobre o extrato clorofórmico bruto da AL. As amostras foram aplicadas com tubo capilar, fase móvel (AcOEt: MeOH – 7:3), revelada com luz ultravioleta (UV). Sendo as amostra: **A:** padrão de arctiina cedido pelo NIPPAN; **1:** fração AcOEt 100%; **2:** fração AcOEt:MeOH 9:1; **3:** fração AcOEt:MeOH 8:2; **4:** fração AcOEt:MeOH 8:2; **5:** fração AcOEt:MeOH 8:2; **6:** fração AcOEt:MeOH 7:3; **7:** fração AcOEt:MeOH 1:1. Foto: Autor (2013).

#### 4.5 Hidrólise da arctiina

A substância majoritária extraída da *Arctium lappa* L. é uma lignana denominada arctiina, que se difere da arctigenina por conter uma molécula de glicose em sua estrutura química (ZHAO; WANG; LIU, 2009). Com o objetivo de se obter a aglicona deste heterosídeo foi realizada uma hidrólise ácida, conforme método descrito por Chaturvedula, Venkata, Prakash (2011) e com algumas modificações (Ilustração 9), nas frações 6 e 7, que apresentaram perfil cromatográfico semelhantes quando comparadas entre si e com padrão de arctiina, cedido pelo NIPPAN.

Cerca de 25 g das frações 6 e 7 foram solubilizadas em 500 mL de MeOH. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionada de igual volume de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 5%. Esta mistura foi submetida a refluxo por 6 horas à temperatura de  $35^\circ C$  conforme demonstrado na ilustração 9.



Ilustração 9 - Hidrólise sob refluxo das frações 6 e 7. Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos e Ativos Naturais (NIPPAN) - Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autor (2013).

Após refluxo e arrefecimento da solução, adicionou-se quantidade de carbonato de sódio suficiente para neutralizar a solução hidrolisada.

A solução neutralizada foi filtrada em papel de filtro e particionada com  $CHCl_3$  (5X de 500 mL). A fração clorofórmica obtida foi concentrada em rotaevaporador obtendo-se 15,25 g de hidrolisado.

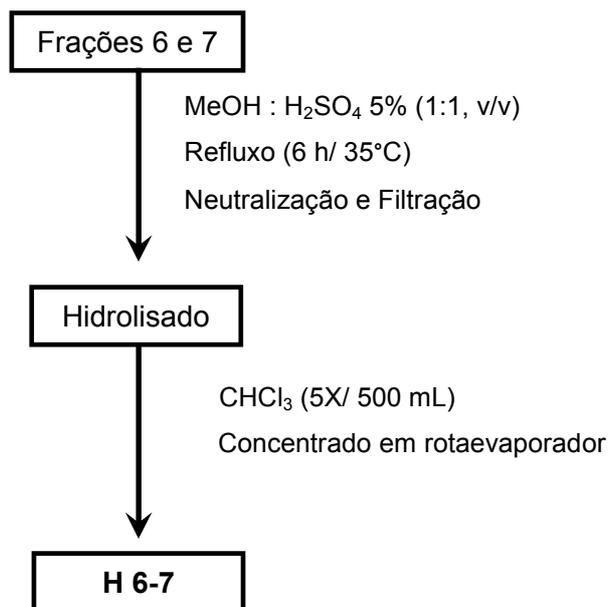


Ilustração 10 – Esquema utilizado para realização da hidrólise nas frações 6 e 7 que contêm arctiina obtidas do extrato clorofórmico bruto da *Arctium lappa* L. As frações 6 e 7 foram submetidas a hidrólise ácida utilizando como solvente solução de metanol: ácido sulfúrico 5% (1:1, v/v) em refluxo por 6 horas sob temperatura de 35°C. A solução hidrolisada foi particionada com clorofórmio e concentrada em rotaevaporador, obtendo assim a fração H 6-7.

#### 4.5.1 Isolamento e Purificação do Hidrolisado

A substância presente nas frações 6 e 7 após, hidrolisada e renomeada como H 6-7, com o objetivo retirar possíveis impurezas provenientes do processo de hidrólise e também outras substâncias, foi cromatografada em VLC. No qual, 10,0 g da fração hidrolisada foram solubilizadas na fase móvel (FM) Hex:AcOEt (8:2 v/v) e incorporada em 10 g de sílica gel utilizada como adsorvente. Esta mistura foi homogeneizada vigorosamente até a secura com a eliminação do solvente. E assim, depositada no topo da coluna cromatográfica de vidro de 10 cm de diâmetro, empacotada com 100 g de sílica gel em 5 cm de altura.

A FM utilizada foi Hex:AcOEt (8:2 v/v) em gradiente de polaridade e a série eluotrópica utilizada na cromatografia está descrita na tabela abaixo. Foram recolhidas frações de 500 mL, conforme Tabela 2.

Após análise por CCD, reuniram-se as frações que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes (Ilustração 10). Na primeira análise por CCD realizada com as frações reunidas evidenciou uma diferença entre as frações H11 e H12-14, ao repetir a CCD foi possível visualizar que as duas apresentavam mesmo perfil

cromatográfico, assim, as frações H11 e H12-14 foram reunidas e transformadas em uma única fração.

**Tabela 2.** Subfrações obtidas por VLC de H6-7

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hex:AcOEt – 8:2 → 7:3	H 1–7	0,061
Hex:AcOEt – 7:3	H 8–10	3,966
Hex:AcOEt – 1:1	H 11	0,162
Hex:AcOEt – 1:1	H 12–14	0,142

**Legenda:** VLC: cromatografia de coluna a vácuo; **H6-7:** fração 6 e 7 hidrolisada; **g:** grama; **Hex:** hexano; **AcOEt:** acetato de etila.

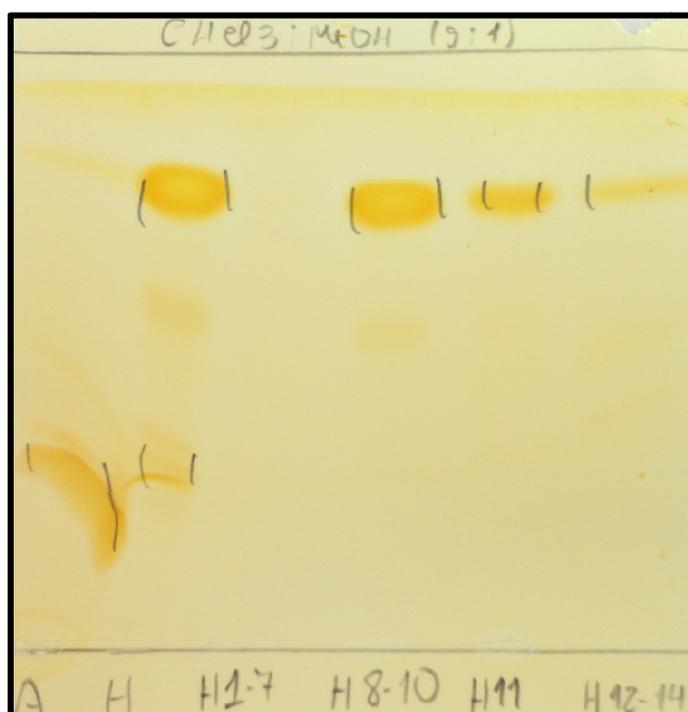


Ilustração 11 – CCD da VLC realizada sobre as frações 6 e 7 hidrolisadas. As amostras foram aplicadas com tubo capilar, fase móvel (CHCl<sub>3</sub>: MeOH – 9:1), revelada com iodo. Sendo as amostras: **A:** padrão de arctiina cedido pelo NIPPAN; **H1-7:** subfração Hex:AcOEt nas concentrações 8:2 e 7:3; **H8-10:** subfração Hex:AcOEt 7:3; **H11:** subfração Hex:AcOEt 1:1; **H12-14:** subfração Hex:AcOEt 1:1; **MeOH:** metanol. Foto: Autor (2013).

De acordo com perfil em CCD revelado com iodo, a subfração H 8-10 foi selecionada para dar continuidade aos procedimentos de purificação dessa subfração para se obter uma maior quantidade de substância isolada.

#### 4.5.2 Estudo da Subfração Clorofórmica H 8-10

A subfração H 8-10 (3,0 g) foi solubilizada nos solventes DCM:EtOH (98:2 v/v), mistura esta também utilizada como fase móvel inicial da cromatografia em coluna *flash* (CF), o objetivo da presente coluna cromatográfica e suas devidas especificações é a separação da substância em maior quantidade na subfração H8-10, como ser visualizado na ilustração 12.

Em prosseguimento, aplicou-se a amostra diretamente solubilizada na FM numa coluna *flash* de vidro (3 cm de diâmetro por 60 cm de altura), previamente empacotada com 45 g de sílica gel *flash* que atingiram de 14,5 cm altura na coluna.

Foram coletadas 43 frações de 50 mL cada, utilizando-se como FM DCM:EtOH (98:2), DCM:EtOH (97:3), DCM:EtOH (95:5) e DCM:EtOH (9:1), para finalizar a coluna passou-se  $\text{CHCl}_3$  100%, conforme Tabela 3.

A ilustração 11 apresenta a CCD da CF realizada para purificar a subfração H8-10 e também a reunião das frações realizada.

**Tabela 3.** Purificação de H 8-10 por cromatografia em coluna de sílica gel flash

Eluentes	Frações	Massa (g)
DCM:EtOH – 98:2	A	0,011
DCM:EtOH – 98:2	B	0,945
DCM:EtOH – 97:3	C	0,923
DCM:EtOH – 97:3	D	0,021
DCM:EtOH – 95:5	E	0,062
DCM:EtOH – 9:1 → $\text{CHCl}_3$ 100%	F	0,008

**Legenda:** H 8-10: subfração hidrolisada e reunida 8-10; g: grama; DCM: diclorometano; EtOH: etanol.

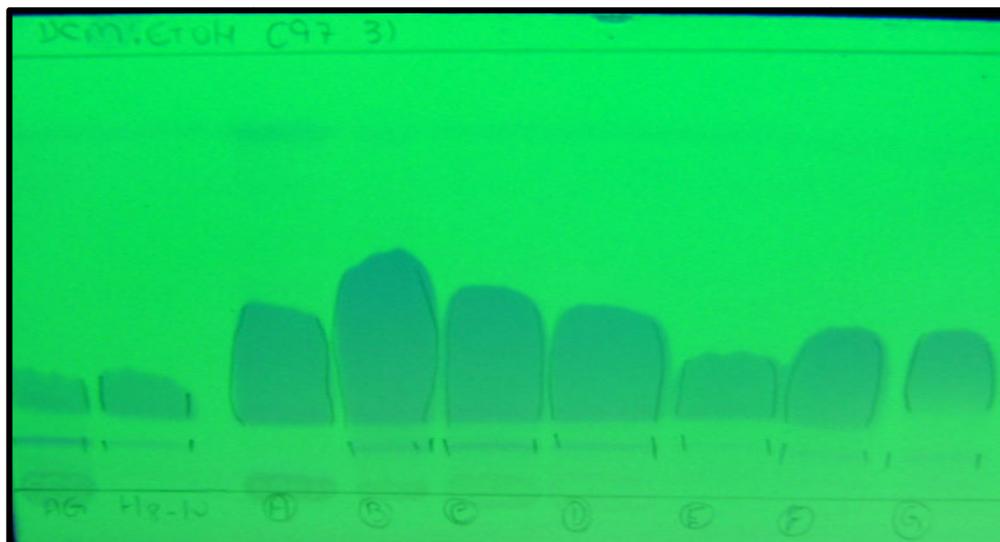


Ilustração 12 – CCD da CF realizada sobre as subfrações H8-10. As amostras foram aplicadas com tubo capilar, fase móvel (DCM: EtOH – 97:3), revelada com luz UV. Sendo as amostras: **AG**: fração contendo arctigenina cedida pelo NIPPAN; H8-10: subfração hidrolisada Hex:AcOEt 7:3; **A**: subfração DCM:EtOH 98:2; **B**: subfração DCM:EtOH 98:2; **C**: subfração DCM:EtOH 97:3; **D**: subfração DCM:EtOH 97:3; **E**: subfração DCM:EtOH 95:5; **F**: subfração DCM:EtOH 9:1 a  $\text{CHCl}_3$  100%. Foto: Autor (2013).

A fração (H 6 e 7) foi hidrolisada obtendo as subfrações H11 e H12-14. Outra subfração que também continha a substância desejada (H8-10) foi purificada através de CF e após avaliar o perfil cromatográfico por CCD de todas, foi realizada a reunião e assim denominada, AL-H11, que foi escolhida para ser submetida à análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  para a confirmação de sua identidade química.

#### 4.5.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Desenvolveu-se, no Laboratório de Farmacologia da UFJF, método para determinação do perfil cromatográfico para identificação e doseamento da arctigenina utilizando técnica de CLAE em equipamento Alliance modelo 2695 (Waters, USA) com detector de ultravioleta (UV) modelo 2489 de duplo comprimento de onda, no qual foi utilizado para o experimento o comprimento de onda de 280 nm. A separação cromatográfica se deu através de coluna X-Bridge C18, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Waters, USA), operando a 35°C. A fase móvel foi composta de um sistema gradiente utilizando solução de ácido fosfórico 0,1% (A) e metanol (B) no seguinte

gradiente: 0 min (60:40), 1-5 min (50:50), 5-10 min (60:40). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1,1 mL/ min e o volume de injeção de 10  $\mu$ L, conforme técnica de Liu *et al.* (2010) modificada. Para assegurar o método utilizado, foram realizados testes de linearidade, precisão, exatidão e especificidade, e foi usado o software Enpower 3 (Waters, USA) para processamento das amostras, integração dos picos e avaliação dos cromatogramas obtidos.

Uma validação analítica tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, determinar qualitativamente, semi-quantitativamente e/ou quantitativamente fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos ou amostras biológicas (RE nº 899, de 29 de maio de 2003). Realizando uma validação analítica, conseguiu-se garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

Conforme a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, os testes exigidos para determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou em matéria-prima devem ser: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez. Os testes realizados nesse trabalho foram a especificidade, linearidade e precisão. Sendo a especificidade a capacidade do método de medir exatamente a substância mesmo na presença de outros componentes, a linearidade a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração da substância tendo como critério mínimo aceitável o coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,99 e a faixa utilizada entre 80 a 120% da concentração de trabalho. A precisão é uma averiguação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostra múltipla de uma mesma amostra, determinada por no mínimo 6 determinações da amostra a 100%.

As amostras foram preparadas da seguinte maneira e usando MeOH como diluente:

Solução Inicial:

- 10 mg de arctigenina/ balão volumétrico de 10 mL – concentração de 1 mg/ mL
- 1 mL da solução anterior para balão volumétrico de 10 mL – concentração de 100  $\mu$ g/ mL

- **Linearidade:**
  - 800 µL da solução anterior/ balão volumétrico de 10 mL – concentração de 8 µg/ mL
  - 900 µL da solução anterior/ balão volumétrico de 10 mL – concentração de 9 µg/ mL
  - 1000 µL da solução anterior/ balão volumétrico de 10 mL – concentração de 10 µg/ mL
  - 1100 µL da solução anterior/ balão volumétrico de 10 mL – concentração de 11 µg/ mL
  - 1200 µL da solução anterior/ balão volumétrico de 10 mL – concentração de 12 µg/ mL
  
- **Especificidade:** fase móvel: ácido fosfórico 0,1%:MeOH (1:1)
  - diluyente: metanol 100%
  - arctigenina: conforme solução de 10 µg/ mL da linearidade
  
- **Precisão:** conforme solução de 10 µg/ mL da linearidade

As amostras foram submetidas à análise por CLAE e seguindo todas as exigências que a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 determina.

#### 4.6 Avaliação da citotoxicidade da arctigenina

Os ensaios farmacológicos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Análises de Glicoconjugados do Departamento de Bioquímica/ ICB da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para realização deste experimento, foram utilizadas células de carcinoma hepático humano (HepG-2) e fibroblasto (NIH/3T3), cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina G (100 UI/mL) e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa. Todos os materiais utilizados para realização dos experimentos eram estéreis ou esterilizados.

#### 4.6.1 Manutenção das Linhagens

A linhagem celular foi descongelada e transferida para uma placa de Petri estéril (100 x 15 mm) que continha 8 mL de meio de cultura. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas, renovando o meio de cultura após esse período. A placa foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub>, renovando o meio de cultura de 2 em 2 dias, até que as células apresentasse 80% confluência. Após atingir 80% de confluência, as células eram replicadas em placa de Petri (100 x 15 mm) e também congeladas.

O meio de cultura da placa em incubação foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de EBSS. Após lavagem, adicionou-se 2 mL de tripsina-DMEM (1:9), e as células foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 5 min. As células foram transferidas para meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino e centrifugadas. O precipitado foi resuspenso com 2 mL soro fetal bovino com 10% de DMSO (substância crioprotetora), para a linhagem NIH/ 3T3 e para a linhagem HepG-2, soro fetal bovino com 5% de DMSO e assim, foram congelados. Os frascos foram mantidos em geladeira (4°C) por 30 minutos, no freezer (-8°C) por 40 minutos e *overnight* em freezer (-80°C). Assim, os frascos foram depositados em tanque de N<sub>2</sub> líquido.

#### 4.6.2 Preparo das Células para o Ensaio

Após replicação celular, o meio de cultura foi removido, as células lavadas duas vezes com EBSS e submetidas a incubação com solução tripsina:DMEM (1:9) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 5 min. Após este período, a suspensão contendo as células foram transferidas para tubo tipo Falcon de 15 mL contendo DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. O precipitado celular foi resuspenso em meio de cultura para a realização de contagem celular, conforme descrito por Martins, Boaventura e Lima (2005). O número de células utilizadas variou para cada experimento realizado conforme descrito na Tabela 4.

**Tabela 4.** Demonstração das linhagens, ensaio, placa, concentração celular volume de suspensão e tempo de incubação de 24 horas para todos os experimentos *in vitro* realizados.

Linhagem	Ensaio	Placa	Concentração Celular (céls/ mL)	Vol/ poço (µL)
HepG-2	Citotoxicidade	P 96	$5 \times 10^5$	200
HepG-2	Azul de Tripan	P 24	$4 \times 10^4$	500
HepG-2	Adesão Celular	P 96	$5 \times 10^5$	200
NIH/3T3	Citotoxicidade	P 96	$5 \times 10^5$	200

**Legenda:** **HepG-2:** linhagem celular de carcinoma hepático humano; **NIH/3T3:** linhagem celular de fibroblasto murino; **P96:** microplaca com 96 poços; **P24:** microplaca com 24 poços; **céls/ mL:** células por mililitro; **vol/ poço:** volume adicionado em cada poço da microplaca; **µL:** microlitro; **24 h:** período de incubação das células em estufa CO<sub>2</sub> umidificada.

#### 4.6.3 Preparo das Soluções

Para os ensaios de citotoxicidade, azul de Tripan e adesão celular por colágeno, pesou-se 10 mg da arctigenina solubilizada em DMSO, para concentração de 54 mM. Para evitar possíveis interferências nos experimentos, as soluções foram sempre recém-preparadas.

A partir da solução anterior preparou-se uma na nova na concentração de 537 µM, solubilizada em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino, filtrada em membrana 0,20 µm e submetida a diluições utilizadas nos experimentos, conforme demonstrado nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5.** Diluição das soluções utilizadas nos experimentos *in vitro*, a partir da solução de 537  $\mu\text{M}$  para experimento de citotoxicidade por reagente MTT e adesão celular por colágeno. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  das soluções em cada poço determinado e todas as soluções utilizaram DMEM sem SFB como solvente.

Concentração Final ( $\mu\text{M}$ )	Vol* ( $\mu\text{L}$ )	Vol Solvente ( $\mu\text{L}$ )
27	80	1520
54	160	1440
107	320	1280
161	480	1140
215	640	960
269	800	800

**Legenda:** Vol\*: volume da solução de uso (537  $\mu\text{M}$ );  $\mu\text{M}$ : micromolar; vol: volume de solvente para completar a solução;  $\mu\text{L}$ : microlitro; **DMEM sem SFB**: meio de cultura utilizado para manutenção das células pois não possui em sua composição soro fetal bovino.

**Tabela 6.** Diluição da solução utilizada no experimento *in vitro*, a partir da solução estoque de 54 mM para experimento de exclusão por Azul de Tripán. Foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  da solução em cada poço determinado e todas as soluções utilizaram DMEM sem SFB como solvente.

Concentração Final ( $\mu\text{M}$ )	Vol* ( $\mu\text{L}$ )	Vol Solvente ( $\mu\text{L}$ )
94	10,5	5989,5

**Legenda:** Vol\*: volume da solução de uso na concentração de 54 milimolar;  $\mu\text{M}$ : micromolar; vol: volume de solvente para completar a solução;  $\mu\text{L}$ : microlitro; **DMEM sem SFB**: meio de cultura utilizado para manutenção das células pois não possui em sua composição soro fetal bovino.

Para testar também a citotoxicidade da substância arctiina, o NIPPAN cedeu a substância utilizada como padrão nas análises por CCD no processo de extração, obtenção e purificação da arctigenina para realizar esses experimentos *in vitro*. Então, pesou-se 10 mg da arctiina e solubilizou-se em DMSO para obter-se a concentração de 38 mM. A partir da solução anterior, preparou-se uma solução de uso na concentração de 187  $\mu\text{M}$  solubilizada em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino e filtrada em membrana 0,20  $\mu\text{m}$ . E aplicadas nos experimentos de viabilidade celular e exclusão por azul de Tripán.

#### 4.6.4 Viabilidade Celular por reagente MTT

O teste de viabilidade celular por MTT é um método colorimétrico para analisar a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular, no qual células metabolicamente ativas são capazes de converter o corante azul escuro, insolúvel em água, a formazan por reduzir a quebra do anel tetrazólico (SLATER; SANWYER; STRAUCHLI, 1963; MOSMANN, 1983).

A ação da arctigenina e arctiina sobre a viabilidade celular foi analisada pelo método MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), no qual se avaliou a viabilidade celular *in vitro*, baseando-se na redução do MTT a formazan (BRUGGISSER *et al.*, 2002).

Para o experimento, as células (NIH/3T3 e HepG-2) em crescimento por aderência (80% de confluência em placas P100) foram dissociadas por desagregação enzimática (Solução 1:9 - Tripsina:Meio DMEM), transferidas para placas de 96 poços e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após as 24 h, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se diferentes concentrações de arctigenina (27; 54; 107, 161, 215, 269 µM, em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino) e arctiina (187 µM, em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino) (Tabela 7), a placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 20 h (QUEIROZ *et al.*, 2006). Após este período, foi adicionado a solução de MTT (5 mg/mL, 20 µL) e as células foram incubadas por mais 4 h.

Na sequência, foi retirado todo o sobrenadante de cada poço e os cristais de formazan precipitados foram ressuspensos com 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de MTT-formazan obtida é diretamente proporcional ao número de células vivas (viáveis) e foi determinada pela medida da densidade ótica (OD) a 492 nm em leitor de placas. O DMSO a 1% em meio de cultura foi utilizado como controle negativo. Para todas as concentrações foram realizados sextuplicatas e o resultado expresso pela média ± desvio padrão da média.

**Tabela 7.** Demonstração da microplaca P96 na realização dos experimentos de MTT em linhagens celulares (HepG-2 e NIH/3T3) frente a arctigenina e arctiina. O DMSO foi utilizado como controle negativo do experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	EBSS	EBSS	EBSS	EBSS								
<b>B</b>	EBSS	DMSO	27	54	107	161	215	269	Arctiina			EBSS
<b>C</b>	EBSS	DMSO	27	54	107	161	215	269	Arctiina			EBSS
<b>D</b>	EBSS	DMSO	27	54	107	161	215	269	Arctiina			EBSS
<b>E</b>	EBSS	DMSO	27	54	107	161	215	269	Arctiina			EBSS
<b>F</b>	EBSS	DMSO	27	54	107	161	215	269	Arctiina			EBSS
<b>G</b>	EBSS	DMSO	27	54	107	161	215	269	Arctiina			EBSS
<b>H</b>	EBSS	EBSS	EBSS	EBSS								

**Legenda:** Experimento de MTT utilizando diversas arctigenina nas concentrações de 27, 54, 107, 161, 215 e 269 micromolar e arctiina na concentração de 187 micromolar. **EBSS:** *Earle's balanced salt solution*; **DMSO:** dimetilsulfóxido.

#### 4.6.5 Exclusão por Azul de Tripán

A viabilidade celular após incubação com arctigenina e arctiina para a linhagem HepG-2 também foi investigada pelo método de exclusão por azul de Tripán, no qual as células viáveis apresentam auto-fluorescência e membrana bem definida enquanto as não-viáveis incorporam o corante, apresentando membranas disformes e coloração azul quando visualizadas em microscópio óptico (FRESHNEY, 1987). Desta forma, as células HepG-2 foram subcultivadas em placas de 24 poços conforme descrito na Tabela 4. Após 24h, o meio de cultura foi retirado e 1 mL da solução de arctigenina (94  $\mu$ M em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino) ou 1 mL de DMEM sem soro fetal bovino (controle negativo) ou 1 mL da solução de arctiina (187  $\mu$ M em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino) foram adicionados a placa e incubada por 24 h estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em tubo tipo *ependorf*. Cada poço foi lavado com 300  $\mu$ L de EBSS, toda a solução retirada dos poços foi adicionado ao tubo correspondente. As células foram incubadas com 200  $\mu$ L de tripsina:DMEM (1:9) em estufa por 10 min. Em seguida, a suspensão celular foi adicionada ao *ependorf* correspondente e centrifugado por 5 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspenso em 30  $\mu$ L de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino. A esta solução adicionou-se 30  $\mu$ L de azul de Tripán 0,4% em PBS pH 7,0. 10  $\mu$ L desta solução foram aplicadas em câmara de Newbauer e a contagem do número de células viáveis e não-viáveis foi realizada,

conforme Souza-Fagundes *et al.* (2002) com algumas modificações. O experimento foi realizado em quadruplicata e o resultado expresso pela média  $\pm$  desvio padrão da média.

#### 4.6.6 Adesão Celular por Colágeno

Colágeno tipo I diluído em ácido acético 0,1% foi imobilizado por 16 h a 4° C *overnight* em placa de 96 poços (0,01 mg/mL; 100  $\mu$ L/poço). Decorrido este período, o sobrenadante foi descartado e o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado pela incubação com 200  $\mu$ L de BSA 1% por 1 h a 37° C (CARVALHO, 2009).

Posteriormente, as células HepG-2 foram tripsinizadas, contadas e adicionadas ( $10 \times 10^3$  células/poço) na presença de arctigenina em diferentes concentrações (27, 54, 107, 161, 215, 269  $\mu$ M, em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino) e solução de arctiina (187  $\mu$ M, em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino). A placa foi incubada em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 1 h, 20  $\mu$ L/poço de MTT (5 mg/mL) foi adicionado e a placa foi novamente incubada por 4 h (CARVALHO, 2009). Após este período, o sobrenadante foi retirado da placa e os cristais de formazan precipitado foram ressuspensos com 200  $\mu$ L de DMSO (CARVALHO, 2009). A quantidade de MTT-formazam obtida é diretamente proporcional ao número de células aderidas e foi determinada pela medida da densidade ótica (OD) a 492 nm em leitor de placas. O DMSO a 1% em meio de cultura foi utilizado como controle negativo. Para todas as concentrações foram realizados sextuplicatas e o resultado expresso pela média  $\pm$  desvio padrão da média.

#### 4.7 Avaliação da atividade hepatoprotetora da arctigenina em modelo de BDL em ratos.

Foram utilizados *ratus norvegicus*, linhagem Wistar, adultos, machos, pesando entre 180 a 250 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp/ São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/ escuro) e

temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $55\% \pm 10\%$ ), com restrição alimentar 6 h antes da cirurgia e até 24 h após a cirurgia, mantendo acesso livre a água e ração. O protocolo experimental para utilização dos animais está de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF, com número de protocolo 088/2012.

#### 4.7.1 Tratamento e Procedimento Cirúrgico

Os animais (ratos *Wistar*) foram mantidos com acesso livre a água e ração durante todo o experimento, sendo a ração trocada por solução de glicose a 20% apenas nas 24 horas após cirurgia. O tratamento consistiu na administração por gavagem da arctigenina na dose de 50 mg/Kg/dia, ou seja, administrado 50 mg/ kg no dia da realização da cirurgia, um dia após a cirurgia e no dia da eutanásia. A arctigenina foi solubilizada em 3% de glicerina e solução salina 0,9% q.s.p. Como controle positivo do experimento utilizou-se a substância silimarina, administrada por gavagem, em seringas graduadas, na dose de 50 mg/Kg/dia durante 48 horas, sendo solubilizada em 3% de glicerina e solução salina 0,9% q.s.p.

A silimarina é um extrato das flores e folhas da planta *silybum marianum*, um medicamento já comercializado e usado no tratamento de doenças hepáticas por muito tempo. Essa espécie é segura, não causa nenhum dano à saúde e não tem nenhum efeito colateral significativo. Possui atividade antioxidante demonstrada em artigos já publicados e sua atividade hepatoprotetora é alvo de estudos clínicos que demonstram que ela é capaz de tratar uma variedade de distúrbios hepáticos, tais como hepatite crônica e aguda, cirrose e hepatite causada por toxinas (KAZEMIFAR *et al.*, 2012).

Os 30 animais foram separados em 5 grupos de 6 animais:

- Grupo Controle Sham (controle tratado com veículo)
- Grupo Sham Arctigenina (tratado com arctigenina)
- Grupo Controle BDL (controle tratado com veículo)
- Grupo BDL Arctigenina (tratado com arctigenina)
- Grupo BDL Silimarina (controle positivo tratado com silimarina).

Os animais foram pesados antes do início do experimento e no final, após anestesia, para verificar ganho ou perda de peso durante o experimento.

Previamente à cirurgia, os mesmos foram anestesiados com isoflurano inalatório, administrado através de circuito de Magil, em oxigênio 22% por meio de aparelho de ventilação mecânica, com auxílio de máscara de tamanho apropriado. A averiguação da condição anestésica foi realizada avaliando-se o relaxamento muscular e os reflexos digitais. Realizou-se a tricotomia e assepsia do abdome do animal com álcool iodado a 10 %. Com auxílio de um bisturi fez-se a laparotomia (Ilustração 13). Para os grupos sham, foi realizada a laparotomia exploratória e para os grupos BDL, foi realizada a laparotomia e também a ruptura do ducto biliar do animal, antes da ruptura o ducto é amarrado em duas extremidades para que a bile não extravasasse para a cavidade abdominal (NAGAOKA, 2006; 2011). Foram mantidos 6 animais por gaiolas e receberam 3 gotas de dipirona 50 mg/ mL após cirurgia. As gaiolas utilizadas foram de polipropileno com grade de aço inoxidável que se encaixa na gaiola e possui divisórias para colocação de ração e bebedouro, a cama utilizada foi maravalha, sendo trocada diariamente.



Ilustração 13 – Laparotomia do animal, visualizando o fígado do animal e posteriormente realização da ruptura do ducto biliar. Fonte: Laboratório de Hepatologia Experimental – Escola Paulista de Medicina/Unifesp. Foto: Autor (2013).

Após 48 horas de tratamentos os animais foram anestesiados com uretana 20%, via I.P. Foram coletados cerca de 5 mL de sangue da aorta abdominal, com auxílio de uma cânula. O fígado foi perfundido com cerca de 50 mL de solução salina e assim, retirado. Um fragmento do fígado foi separado para as análises enzimáticas em tecido como mieloperoxidase (MPO), proteínas e TNF- $\alpha$ .

As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora e em banho Maria a 37°C por mais 1 hora. Posteriormente foram centrifugadas a

3000 rpm por 5 min e o plasma obtido foi armazenado em freezer (-80°C) até o momento das análises.

Foram avaliados no soro os seguintes parâmetros bioquímicos: proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO) e fosfatase alcalina (FA), utilizando analisador bioquímico LabQuest® (Labtest, Brasil) e seguindo procedimento técnico dos kits adquiridos da empresa LabTest.

#### 4.7.2 Dosagem de MPO

Uma porção de aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi triturado em cadinho com nitrogênio líquido e adicionou-se 6 mL da solução tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 com 0,5% de cetavlon (CTV) (BRADLEY *et al.* 1982). As amostras ficaram em banho de gelo por 20 min e depois foram centrifugadas a 15000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 2 mL da solução anterior. O material foi sonicado por 20 s com 80% de potência, congelado em nitrogênio líquido e descongelado em água corrente por 3 vezes. Após esse processo foram novamente centrifugados a 15000 rpm por 15 min a 4°C, no qual o sobrenadante foi coletado, aliquoteado e congelado em freezer (-80°C) (BRADLEY *et al.* 1982).

Para realizar o doseamento da MPO foi preparado o reagente de trabalho conforme descrito a seguir: 100 µL de tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0 + 10 µL de o-dianisidina 2 mg/ mL + 4 µL água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mM em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 + 76 µL de água destilada (BRADLEY *et al.* 1982).

Foi preparada uma curva analítica com 4 pontos de cada amostra (0,625, 1,25, 2,5 e 5 µL de amostra por poço) em triplicata, inserindo 10 µL da amostra e fazendo diluição seriada. Foram realizadas leituras a cada 30 s totalizando 20 leituras em comprimento de onda de 492 nm, para obtenção da curva de absorvância *versus* tempo e da velocidade de obtenção do substrato (BRADLEY *et al.* 1982).

#### 4.7.3 Dosagem de Proteínas pelo Método de Ácido Bicinconínico (BCA)

Uma curva padrão foi construída para realização do experimento utilizando padrão de Albumina a 2 mg/ mL e abrangendo a faixa de 20 a 2000  $\mu\text{g/ mL}$ , contendo 8 pontos ( 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g/ mL}$ ) e um nono ponto como branco, sem padrão de albumina. Pipetou-se 25  $\mu\text{L}$  de cada solução da curva para um determinado poço da placa P96 e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho (50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B de BCA).

As amostras foram preparadas em triplicata e da seguinte maneira em placa P96: 5  $\mu\text{L}$  da amostra proveniente da extração para o teste de MPO para cada poço e adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de água destilada nos mesmos, e posteriormente adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho. A placa foi agitada por 30s e incubada por 30 min a 37°C. Antes de realizar a leitura em 540 e 590 nm a placa foi resfriada a temperatura ambiente.

#### 4.7.4 Dosagem de TNF- $\alpha$

A dosagem do TNF- $\alpha$  foi realizada a partir do kit LEGEND MAX™ (ELISA Kit with Pre-coated Plates Rat TNF- $\alpha$ ) do fabricante BioLegend (USA). Foram seguidas as instruções do fabricante e não ocorreu nenhuma modificação da metodologia designada.

#### 4.7.5 Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizado software estatístico específico (InStat - GraphPad, versão 3.05). Para análise entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças entre os grupos foram comparadas através do teste de Tukey (não paramétrico). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, quando apropriado. A probabilidade de erro tipo I foi assumida como 5% em todos os testes ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Isolamento e Purificação do Metabólito de Interesse

Dando prosseguimento ao processo de isolamento e purificação do metabólito de interesse do extrato clorofórmico bruto dos frutos da *A. lappa* L. (AL) foi realizada VLC para obtenção da arctiina (frações 6 e 7), sendo esta submetida a hidrólise, obtendo-se a aglicona (fração H6-7), a qual foi submetida a nova VLC para purificar a aglicona, obtendo êxito na subfração H11 e H12-14. Na subfração H8-10, foi realizado processo cromatográfico por CF, resultando no isolamento da substância B (0,945 g). Após esses procedimentos, as subfrações H11, H12-14 e B foram reunidas e, portanto renomeada como AL-H11, na qual foi submetida à análise de RMN para identificação da substância obtida. As etapas para obtenção da arctigenina estão relacionadas no fluxograma da ilustração 14.

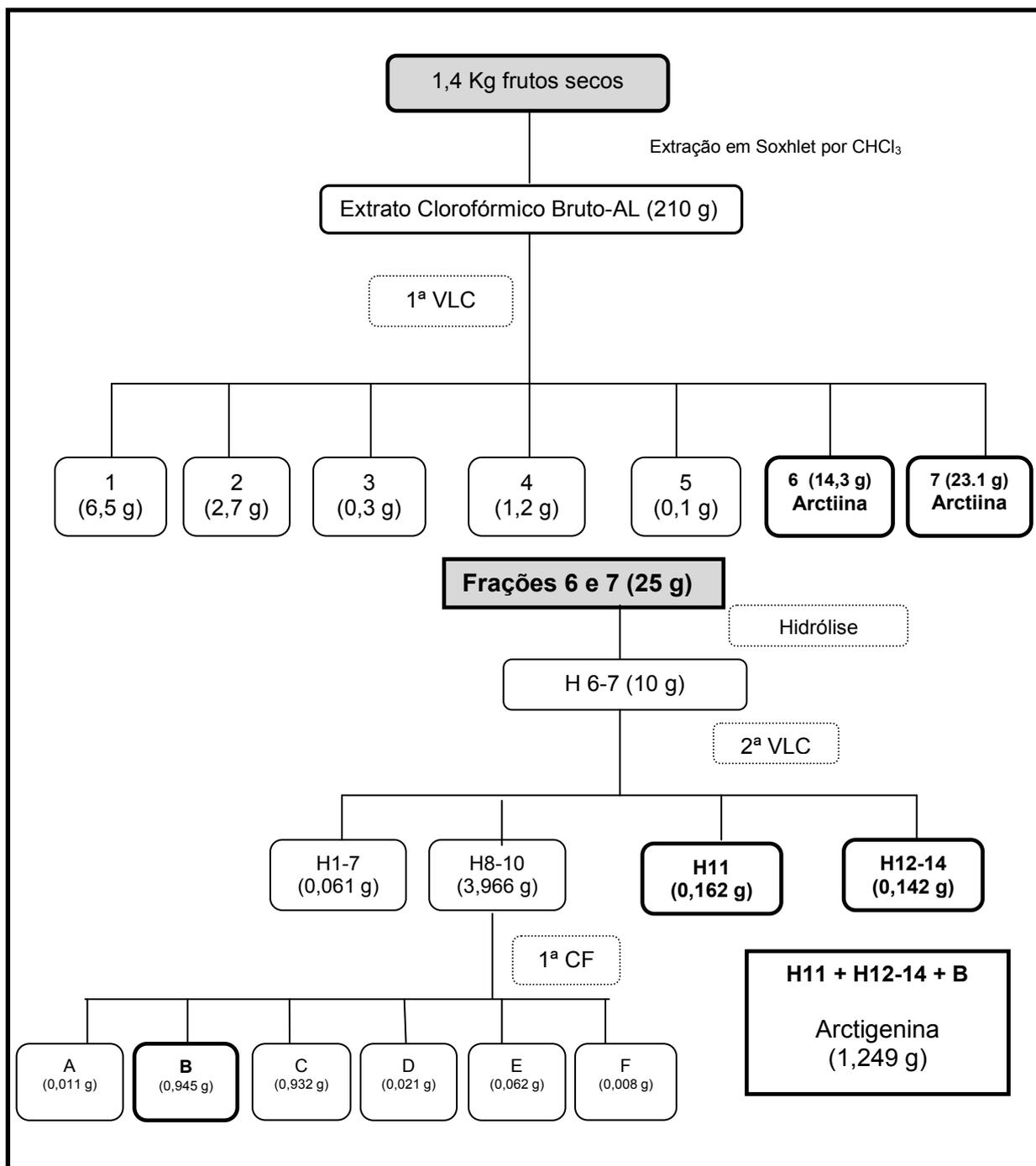


Ilustração. 14 – Fluxograma da extração, isolamento da arctiina e obtenção da arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa* L., demonstrando todos os procedimentos químicos realizados até obtenção da subfração AL-H11 que foi submetida a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para possível identificação. **Legenda:** Kg: kilograma; AL: *Arctium lappa* L; g: grama; VLC: cromatografia de coluna a vácuo; 1: fração AcOEt 100%; 2: fração AcOEt:MeOH 9:1; 3: fração AcOEt:MeOH 8:2; 4: fração AcOEt:MeOH 8:2; 5: fração AcOEt:MeOH 8:2; 6: fração AcOEt:MeOH 7:3; 7: fração AcOEt:MeOH 1:1; H6-7: frações 6 e 7 após processo de hidrólise; H1-7: subfração Hex:AcOEt nas concentrações 8:2 e 7:3; H8-10: subfração Hex:AcOEt 7:3; H11: subfração Hex:AcOEt 1:1; H12-14: subfração Hex:AcOEt 1:1; CF: coluna cromatográfica flash; A: subfração DCM:EtOH 98:2; B: subfração DCM:EtOH 98:2; C: subfração DCM:EtOH 97:3; D: subfração DCM:EtOH 97:3; E: subfração DCM:EtOH 95:5; F: subfração DCM:EtOH 9:1 a  $\text{CHCl}_3$  100%.

A substância AL- H11 foi submetida à análise espectroscópica conforme descrito a seguir.

## 5.2 Determinação e Identificação Estrutural da Substância Isolada

A identificação estrutural da substância anteriormente descrita foi realizada mediante a análise dos dados espectroscópicos obtidos e comparação com os dados publicados na literatura (RAHMAN *et al.*, 1990).

A subfração AL-H11 foi obtida a partir da hidrólise das frações 6 e 7 (supostamente arctiina) apresentando-se na forma um sólido branco, conforme ilustração 15 (LIU *et al.*, 2010). Após purificação, a estrutura química desta substância foi confirmada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) conforme ilustração 16 e tabela 8 e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) conforme ilustração 17 e tabela 9, em comparação com dados de referência obtidos na literatura (RAHMAN *et al.*, 1990).



Ilustração 15 – Subfração AL- H11: sólido cristalino branco. Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos e Ativos Naturais (NIPPAN) - Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autor (2013).

Desta forma, como objetivado, foi observado o êxito na hidrólise da arctiina (arctigenina 4'-O-glicosídeo) com a formação da aglicona desejada, a artigenina (Ilustração 18) (RHAMAN *et. al*, 1990; WANG; YEN; CHANG, 2007; ZHAO; WANG; LIU, 2009). A arctigenina obtida foi utilizada nos ensaios antitumorais *in vitro* e hepatoprotectores *in vivo*.

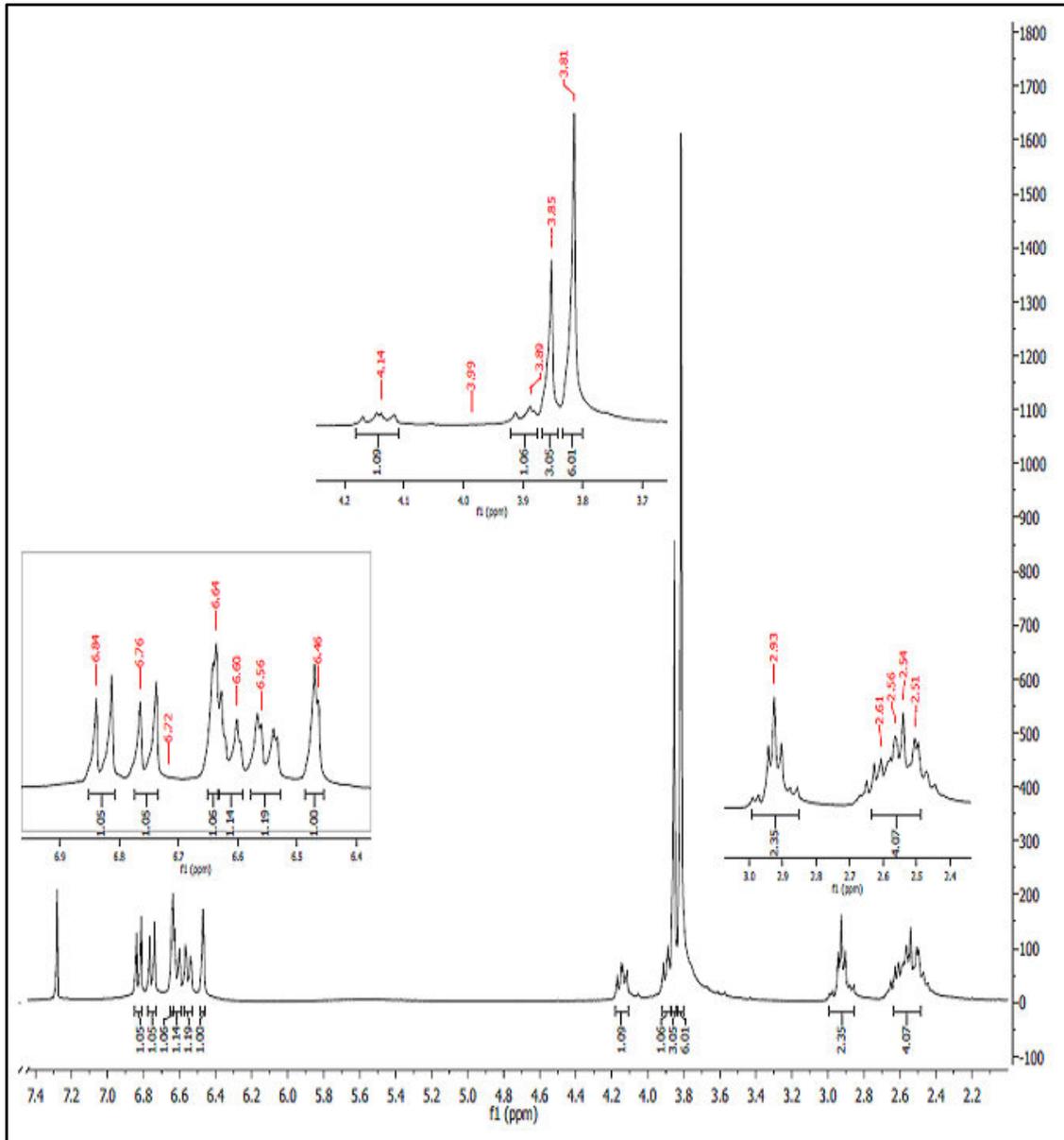


Ilustração 16: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância AL- H11 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) que foi comparado com os dados espectroscópicos de RAHMAN *et. al.* (1990) e assim pode-se confirmar que a substância AL-H11 é arctigenina.

**Tabela 8.** Dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , da substância AL- H11, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$

Hidrogênio	AL- H11	Arctigenina*
<b>2</b>	6,45 ( <i>d</i> , 1H, 2,0 Hz)	6,46 ( <i>d</i> , 1H, $J = 1,9$ )
<b>2'</b>	6,62 ( <i>d</i> , 1H, 1,9 Hz)	6,63 ( <i>d</i> , 1H, $J = 1,7$ )
<b>5</b>	6,73 ( <i>d</i> , 1H; 8,2 Hz)	6,75 ( <i>d</i> , 1H; 8, $J = 8,1$ )
<b>5'</b>	6,80 ( <i>d</i> , 1H; 7,9 Hz)	6,83 ( <i>d</i> , 1H; $J = 7,8$ )
<b>6</b>	6,55 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1 = 8,2$ e $J_2 = 1,9$ Hz)	6,54 ( <i>dd</i> , 1H; $J = 8,1, 2,0$ )
<b>6'</b>	6,59 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1 = 8,1$ e $J_2 = 1,9$ Hz)	6,66 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1 = 8,0, 1,9$ )
<b>7</b>	2,53 ( <i>m</i> , 2H)	ca 2,5 ( <i>m</i> , 2H)
<b>7'</b>	2,92 ( <i>dd</i> , 2H; $J_1 = 10,71$ e $J_2 = 5,2$ Hz)	2,93 (2 x <i>dd</i> , 2H)
<b>8, 8'</b>	2,53 ( <i>m</i> , 2H)	ca 2,55 ( <i>m</i> , 2H)
<b>9a</b>	4,14 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1 = 9,0$ e $J_2 = 6,8$ Hz)	4,15 ( <i>dd</i> , 1H; $J = 9,3, 6,7$ )
<b>9b</b>	3,90 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1 = 9,2$ e $J_2 = 7,1$ Hz)	3,89 ( <i>dd</i> , 1H; $J = 9,3, 7,1$ )
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	3,85 ( <i>s</i> ; 3H); 3,81( <i>s</i> ; 6H)	3,85 ( <i>s</i> ; 3H); 3,81( <i>s</i> ; 6H)

**Legenda:** Os dados espectroscópicos obtidos na análise por RMN de  $^1\text{H}$  da subfração AL-H11 foram comparados com os dados publicados por \*RAHMAN et. al. (1990), após comparação dos dados conseguiu-se compreender que a subfração AL-H11 é a substância arctigenina. ( $\delta$  - deslocamento em ppm, multiplicidade),  $J$  em Hz.

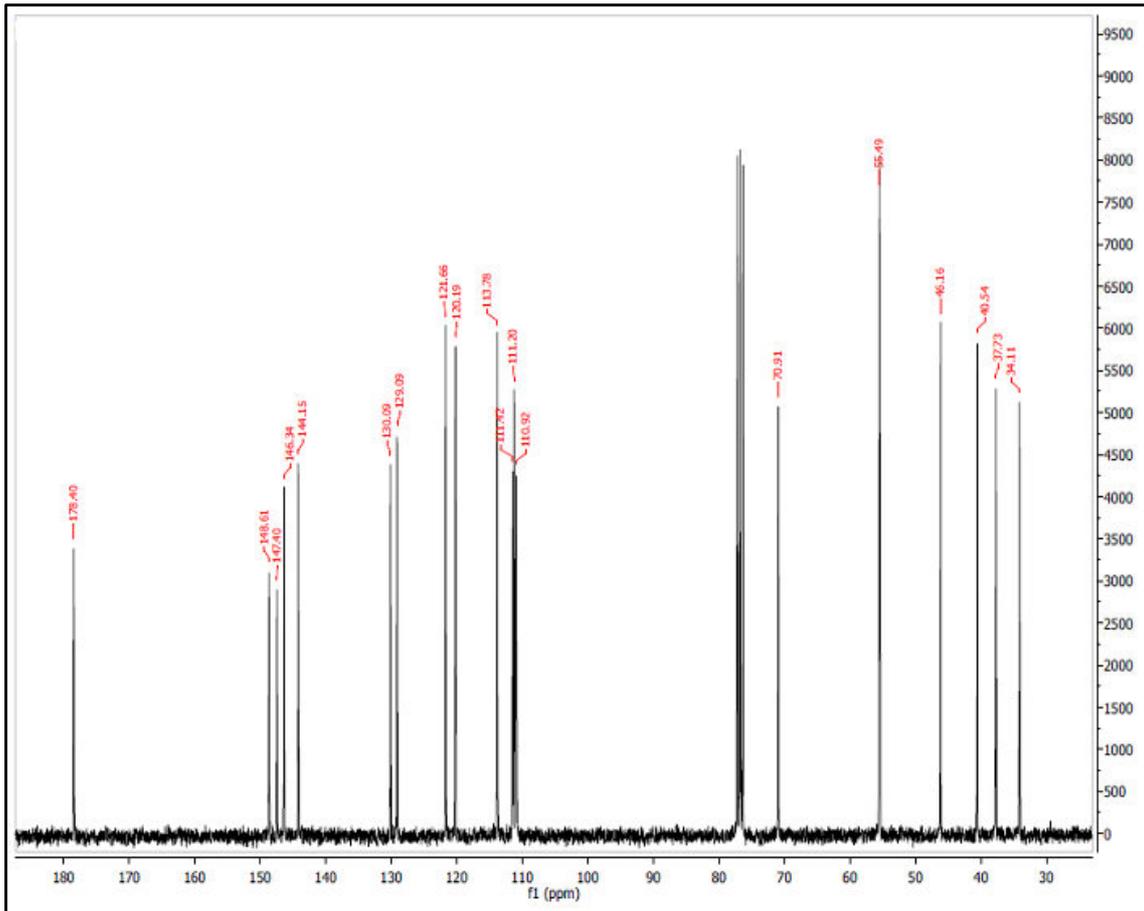


Ilustração 17: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância AL- H11 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (deslocamento químico) em ppm), que foi comparado com os dados espectroscópicos de RAHMAN *et. al.* (1990) e assim pode-se confirmar que a substância AL-H11 é arctigenina.

**Tabela 9.** Dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , das substâncias AL- H11 a 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

Carbono	AL-H11	*Arctigenina
1	130,18	131,17
1'	129,21	128,78
2	111,05	112,34
2'	111,55	113,37
3	148,77	148,62
3'	147,58	147,34
4	146,43	147,27
4'	144,27	145,05
5	111,26	111,81
5'	113,84	115,21
6	120,31	120,30
6'	121,81	121,48
7	37,91	36,83
7'	34,25	33,65
8	40,65	40,72
8'	46,32	45,59
9	71,02	70,58
9'	178,45	178,33
O-CH <sub>3</sub>	55,62	55,28; 55,40; 55,45

**Legenda:** Os dados espectroscópicos obtidos na análise por RMN de  $^{13}\text{C}$  da subfração AL-H11 foram comparados com os dados publicados por \*RAHMAN et. al. (1990), após comparação dos dados conseguiu-se compreender que a subfração AL-H11 é a substância arctigenina. ( $\delta$  - deslocamento em ppm, multiplicidade),  $J$  em Hz.

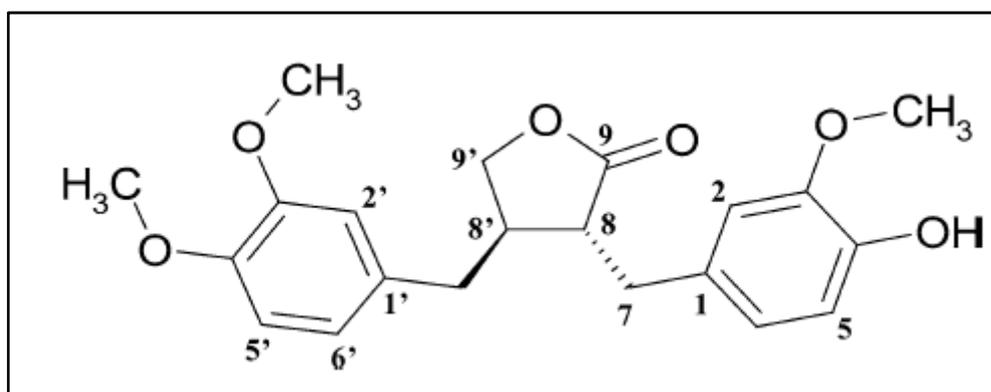


Ilustração 18 - Estrutura química da arctigenina, que após análise de RMN por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados espectroscópicos publicados por \*RAHMAN et. al. (1990), pode-se dizer que a subfração AL-H11 é a substância arctigenina. Fonte: SUSANTI, et al., 2012.

### 5.3 Perfil Cromatográfico da Arctigenina

A ilustração 19 representa o cromatograma da arctigenina obtido em CLAE-UV. A detecção da arctigenina foi obtida no comprimento de onda 280 nm, com tempo de retenção de 7,6 min, sendo a fase móvel composta de água acidificada e solvente orgânico. O método analítico obteve êxito, demonstrando resolução satisfatória, portanto, os parâmetros de validação analítica foram desenvolvidos. Para melhorar os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico utilizou-se fase móvel em gradiente no qual a concentração de metanol passou de 40% para 50%, para melhorar ainda mais os parâmetros de adequabilidade do sistema.

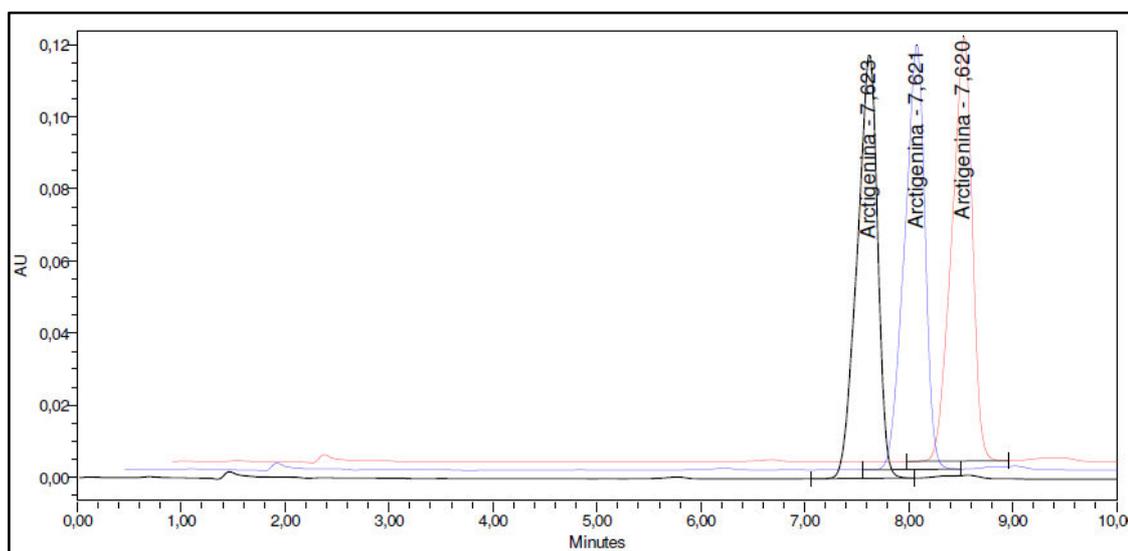


Ilustração 19 – Cromatograma obtido a partir da análise da arctigenina por CLAE, utilizando equipamento da marca Waters, modelo Alliance, amostra preparada na concentração de 10 µg/mL, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5 µm (4,6x150 mm). Amostra esta injetada para visualizar o perfil cromatográfico da arctigenina frente ao método analítico proposto.

#### 5.3.1 Linearidade

A curva de calibração da arctigenina foi determinada utilizando cinco concentrações (8, 9, 10, 11 e 12 µg/ mL). A relação entre a concentração do analito e a área do pico foi expressa como equação de regressão:  $Y = 1,57e+004 X + 6,72e+004$ . Boa linearidade foi obtida na faixa de 8 a 12 µg/ mL com coeficiente de correlação (r) de 0,9973 (Ilustração 20).

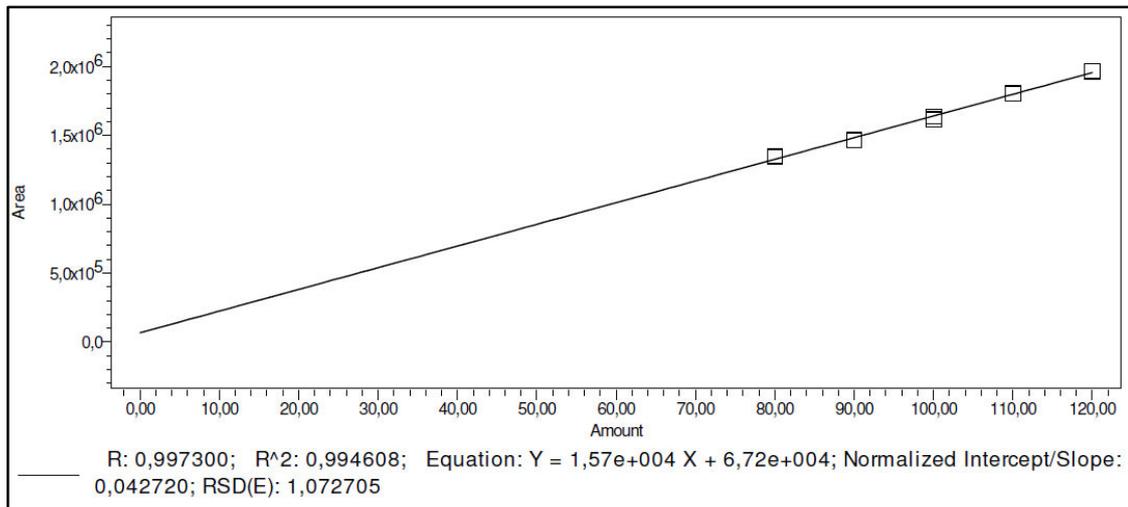


Ilustração 20 – Curva padrão da arctigenina para o teste de linearidade, utilizando as concentrações de 8, 9, 10, 11 e 12 µg/ mL. Desenvolvida em CLAE, utilizando equipamento da marca Waters, modelo Alliance, FM composta de ácido fosfórico 0,1%:MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5 µm (4,6x150 mm). Cada amostra da curva foi injetada em triplicata, obtendo  $r = 0,9973$ .

### 5.3.2 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através de seis replicatas e pela variação da área do pico. O desvio padrão relativo entre as áreas das injeções da solução de arctigenina foi de 0,3% e entre os tempos de retenção das injeções foi de 0,0% (ilustração 21).

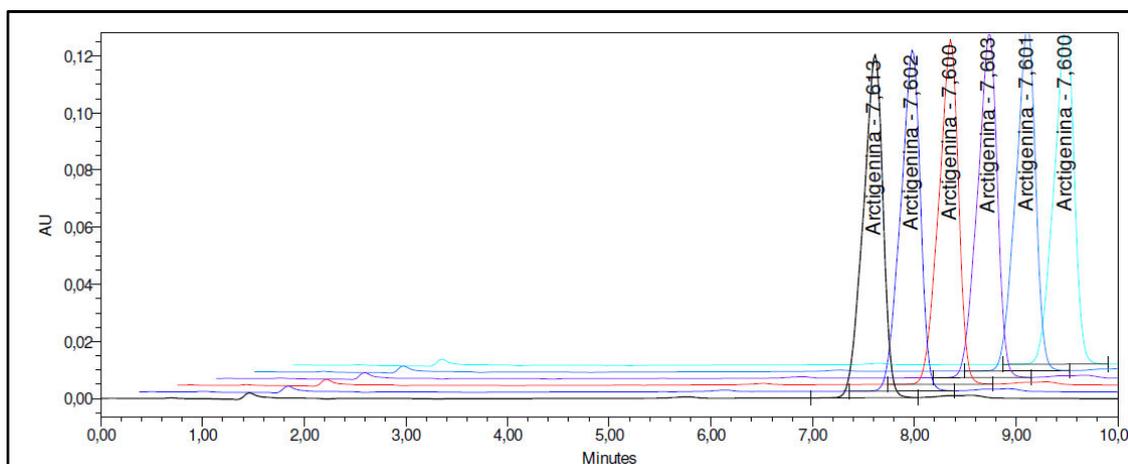


Ilustração 21 – Cromatograma do teste de precisão obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra a arctigenina, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, amostra preparada na concentração de 10 µg/mL, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5 µm (4,6x150 mm). Amostra esta injetada para visualizar o perfil cromatográfico da arctigenina frente ao método analítico proposto.

### 5.3.3 Especificidade

A especificidade foi realizada injetando três replicatas do diluente, fase móvel e solução de arctigenina 10 µg/ mL. Não foi observado em nenhum cromatograma picos interferentes ou algum pico no mesmo tempo de retenção da arctigenina (Ilustração 22, 23 e 24).

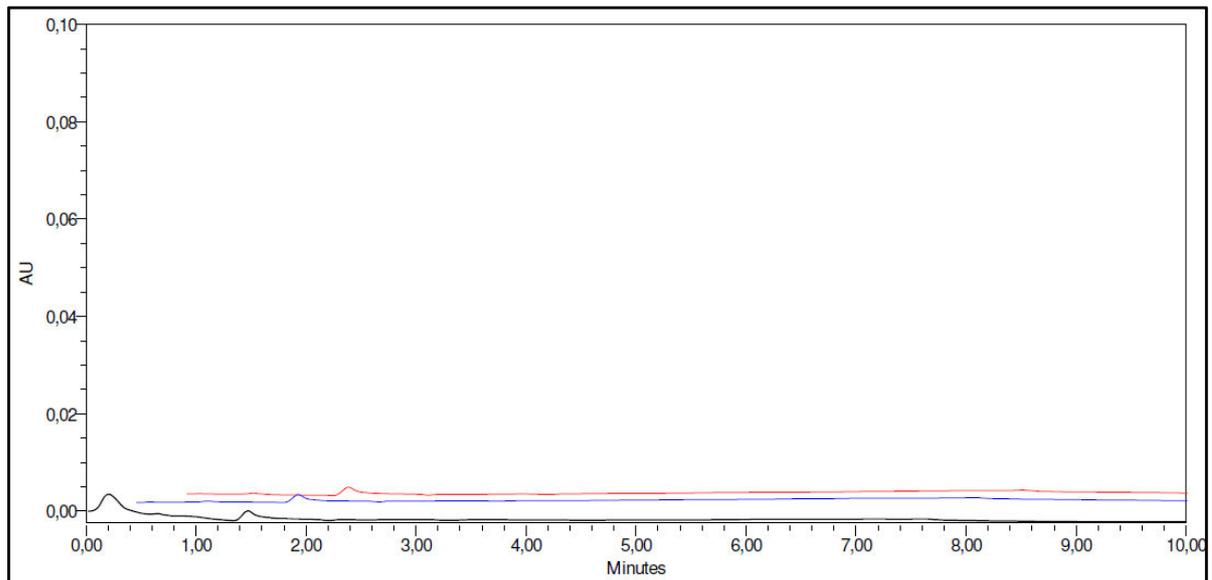


Ilustração 22 – Cromatograma obtido no teste de especificidade obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra o diluente, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5 µm (4,6x150 mm). Amostra injetada em triplicata e nenhum interferente foi observado no cromatograma.

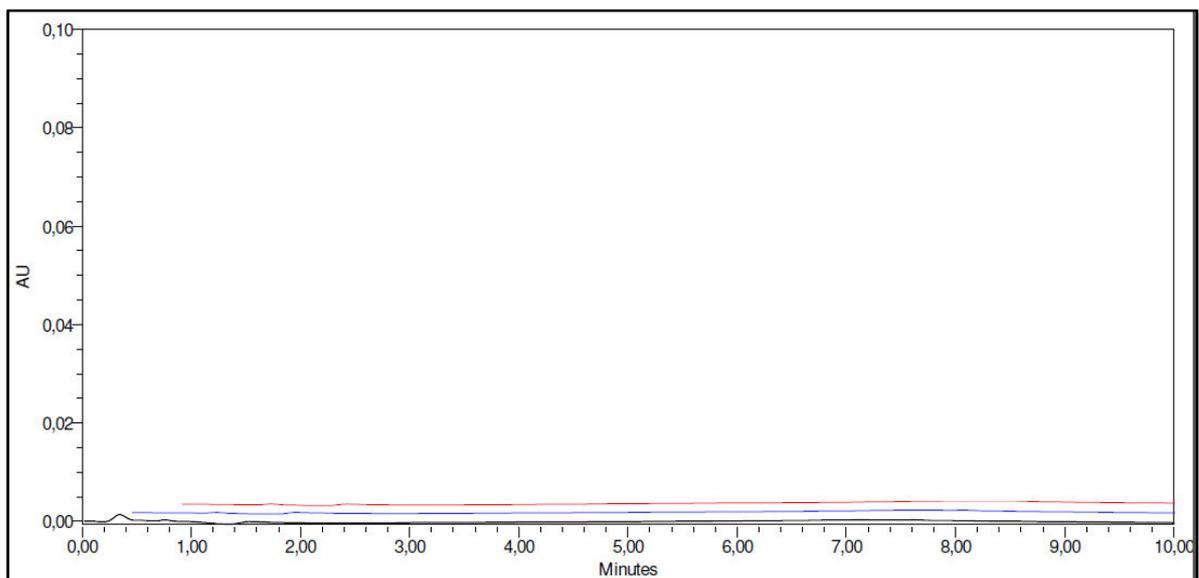


Ilustração 23 – Cromatograma obtido no teste de especificidade obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra a fase móvel do método analítico desenvolvido, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5 µm (4,6x150 mm). Amostra injetada em triplicata e nenhum interferente foi observado no cromatograma.

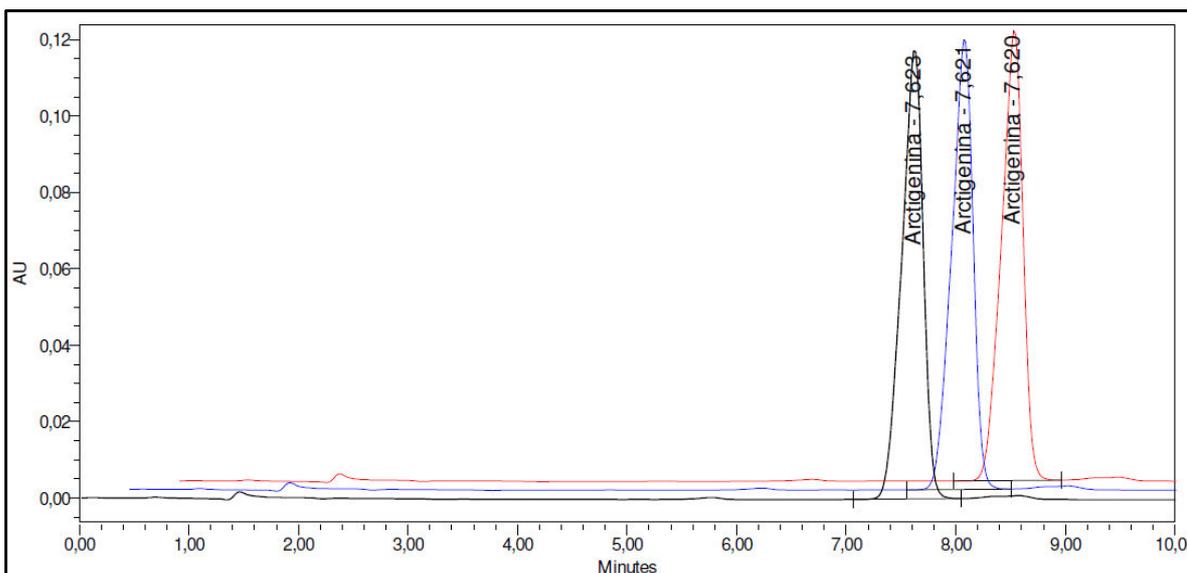


Ilustração 24 – Cromatograma obtido no teste de especificidade obtido a partir da análise por CLAE, utilizando como amostra arctigenina, equipamento da marca Waters, modelo Alliance, amostra preparada na concentração de 10 µg/mL, FM composta de ácido fosfórico 0,1%: MeOH em sistema gradiente e utilizando coluna cromatográfica C18, 5 µm (4,6x150 mm). Amostra injetada em triplicata e nenhum interferente foi observado no tempo de retenção da amostra.

## 5.4 Experimentos *in vitro*

### 5.4.1 Viabilidade Celular por Reagente MTT

A análise da viabilidade celular das linhagens HepG-2 e NIH/3T3 após a incubação com diferentes concentrações de arctigenina (27 a 269 µM) e arctiina (189 µM) não mostrou nenhum efeito citotóxico da arctigenina e arctiina sobre a linhagem de fibroblasto NIH/3T3 quando comparado ao controle (Ilustração 25). No entanto, foi observado efeito citotóxico dose-dependente (107—269 µM) da arctigenina sobre a linhagem HepG-2 tendo apresentado para a concentração de 269 µM 70,6% de células viáveis quando comparado ao controle negativo. A arctiina na concentração investigada não apresentou efeito citotóxico sobre as células HepG-2 (Ilustração 26).

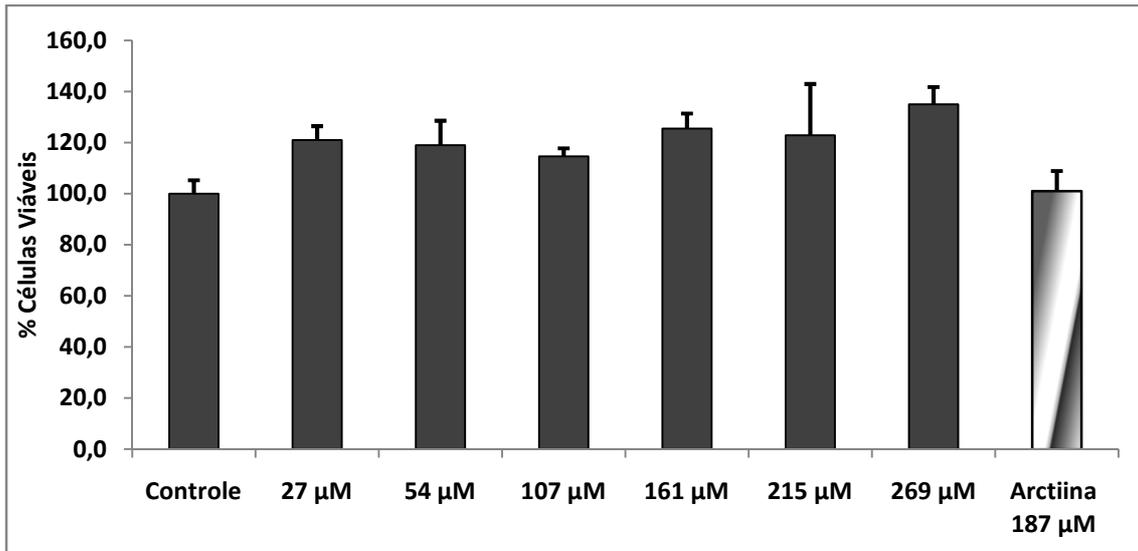


Ilustração 25 – Resultado da citotoxicidade da arctigenina e arctiina em linhagem de fibroblasto murino NIH/3T3 pelo método MTT. Não ocorrendo efeito citotóxico da arctigenina em nenhuma concentração testada e também da arctiina. **Legenda:** µM: micromolar.

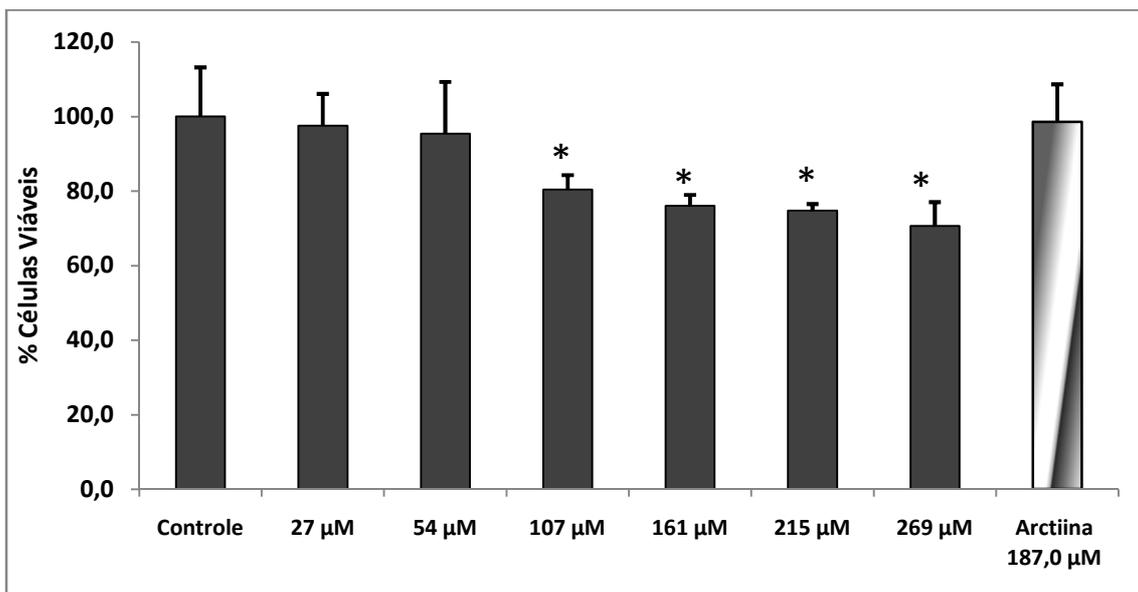


Ilustração 26 – Resultado da citotoxicidade da arctigenina e arctiina em linhagem de carcinoma hepático humano HepG-2 pelo método MTT. Ocorrendo efeito citotóxico da arctigenina sobre a linhagem nas concentrações 107, 161, 215 e 269 micromolar. A arctiina não apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem HepG-2. **Legenda:** µM: micromolar. \* diferença estatisticamente significativa entre as amostras e o controle.

Utilizando o programa GraFit, versão 5.0.0, determinou-se o CI 50 (Concentração Inibitória de 50%) da ação da arctigenina sobre a célula HepG-2. Dentro da faixa de concentração (27-269 µM) a inibição de 50% do valor do maior efeito citotóxico observado na concentração 90,8 µM (Ilustração 27).

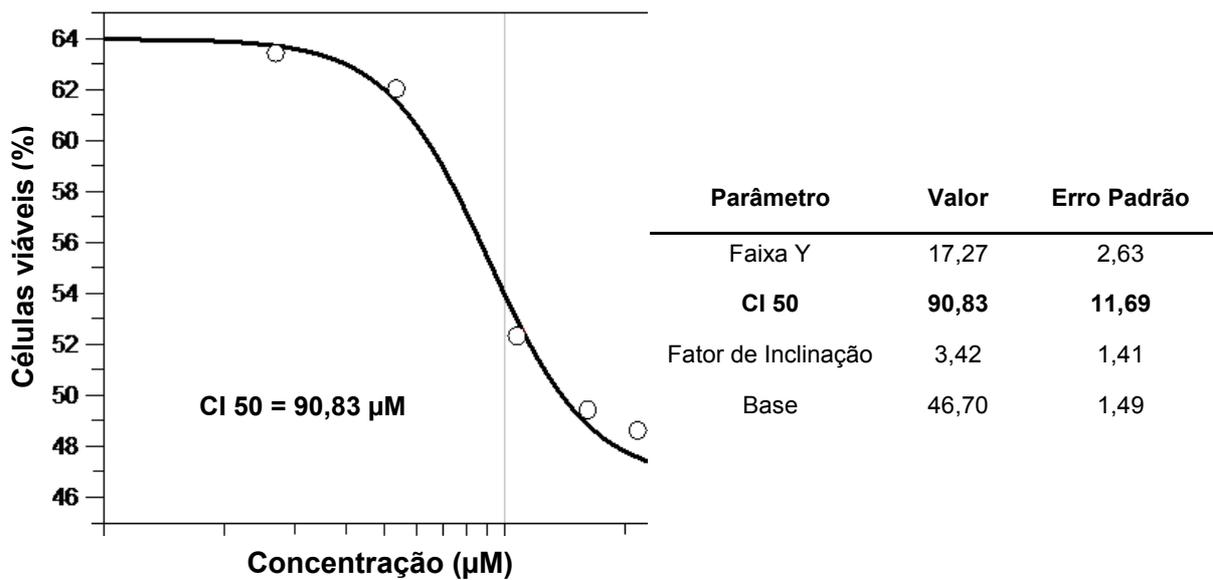


Ilustração 27 – Concentração inibitória 50 da arctigenina sobre HepG-2, calculada pelo software GraFit que senta a concentração de 90,8  $\mu\text{M}$  como a concentração de arctigenina capaz de inibir 50 % das células do experimento de MTT. **Legenda:**  $\mu\text{M}$ : micromolar; **CI**: concentração inibitória.

#### 5.4.2 Exclusão por Azul de Tripán

A ação da arctigenina (94  $\mu\text{M}$ ) e arctiina (187  $\mu\text{M}$ ) sobre a viabilidade da linhagem celular HepG-2 também foi investigada aplicando-se o método de exclusão por azul de tripan. Conforme demonstrado na ilustração 28, 75,4% e 90,9% de células viáveis foram encontradas após a incubação com a arctigenina e arctiina, respectivamente. Estes dados corroboram com o resultado encontrado para a análise da viabilidade celular pelo método MTT.

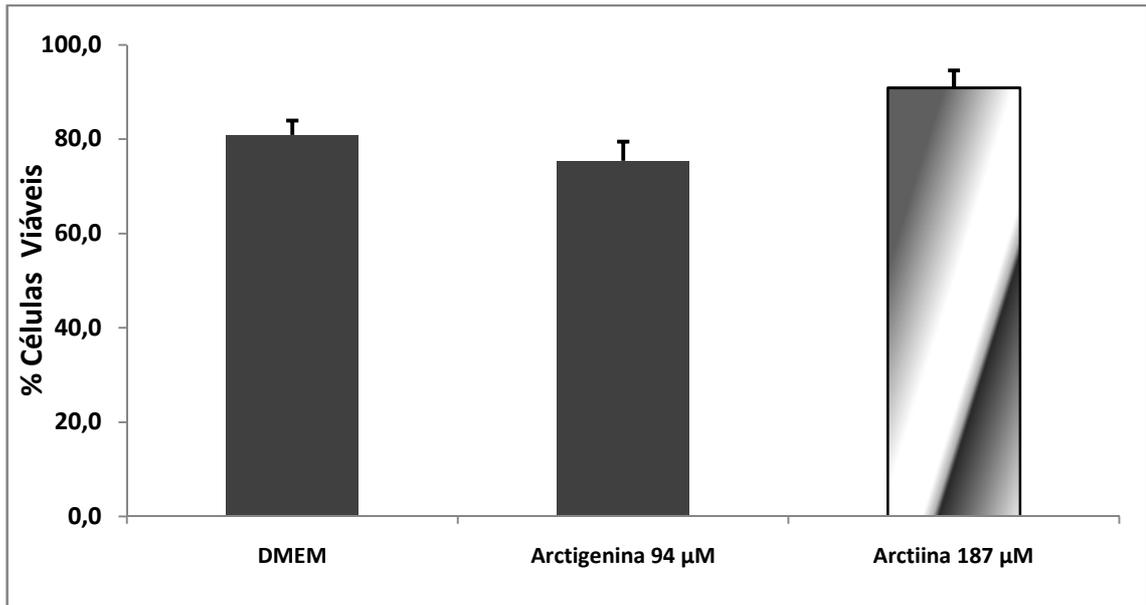


Ilustração 28 – Experimento exclusão por azul de Tripán, no qual foi analisada a atividade *in vitro* do DMEM, da arctigenina e arctiina sobre HepG-2. **Legenda:** DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*; µM: micromolar.

#### 5.4.3 Adesão Celular por Colágeno

A investigação do efeito da arctigenina (27 a 269 µM) sobre a adesão da célula HepG-2 a moléculas de matriz extracelular tal como o colágeno demonstrou que houve uma inibição significativa da adesão (16,7 a 23,9%) em todas as concentrações analisadas, exceto na concentração de 54 µM (10,4%) (Ilustração 29).

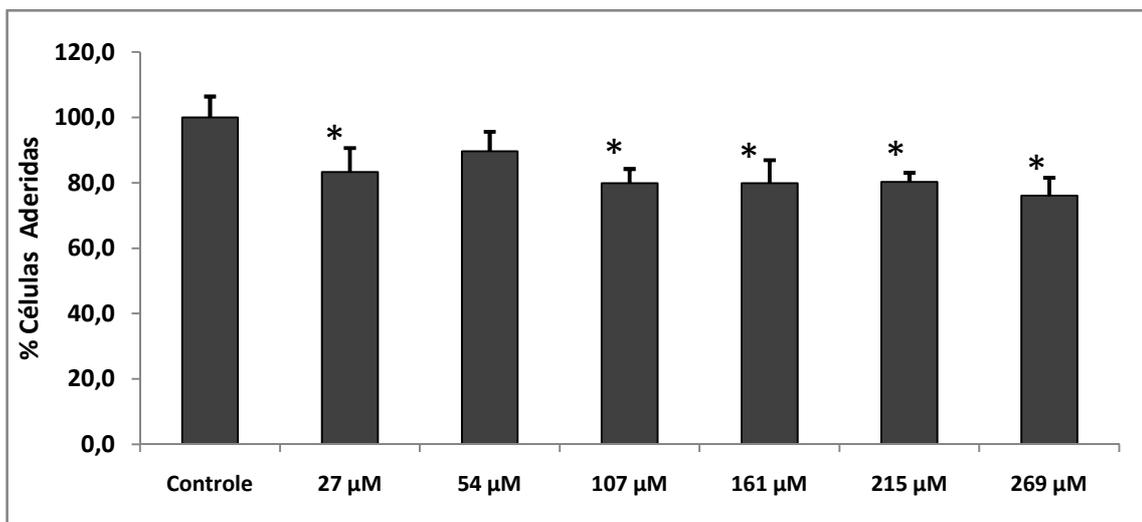


Ilustração 29 – Resultado do experimento Adesão Celular por Colágeno da arctigenina sobre HepG-2. **Legenda:** µM: micromolar. \* diferença estatisticamente significativa entre as amostras e o controle.

## 5.5 Avaliação da hepatotoxicidade da arctigenina em modelo BDL em ratos

### 5.5.1 Parâmetros Biométricos

Os animais de todos os grupos após realização do modelo experimental foram eutanasiados e os parâmetros biométricos foram coletados. O peso corporal dos animais diminuiu após cirurgia/ tratamento conforme tabela 10 e ilustração 30. O percentual que o fígado representa sobre o peso do animal manteve constante em todos os grupos não havendo nenhuma alteração significativa (Ilustração 31).

**Tabela 10.** Valores médios obtidos dos pesos dos animais utilizados no experimento

Peso (g)	Sham Controle	Sham Arctigenina	BDL Controle	BDL Arctigenina	BDL Silimarina
Inicial	224,83	203,17	204,00	220,67	209,50
Final	215,04	200,90	192,17	200,92	195,99
<b>Erro Pad</b>	2,83	0,65	3,42	5,70	3,90

Os animais foram pesados antes do início do tratamento e realização da cirurgia e posteriormente antes da eutanásia, ao final do tratamento. Obtendo a diferença entre o peso dos animais entre o início e o final do experimento. **Legenda:** g: grama; **BDL:** grupo de animais que sofreram a cirurgia de ruptura do ducto biliar; **Erro Pad:** erro padrão.

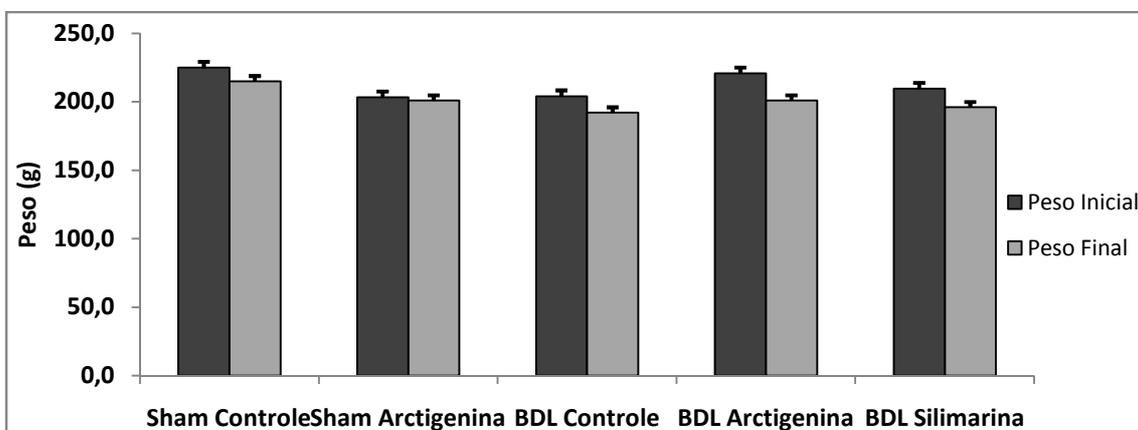


Ilustração 30 - Alterações do peso dos animais utilizados no experimento *in vivo*. Os animais foram pesados antes do início do experimento e antes de serem eutanasiados.

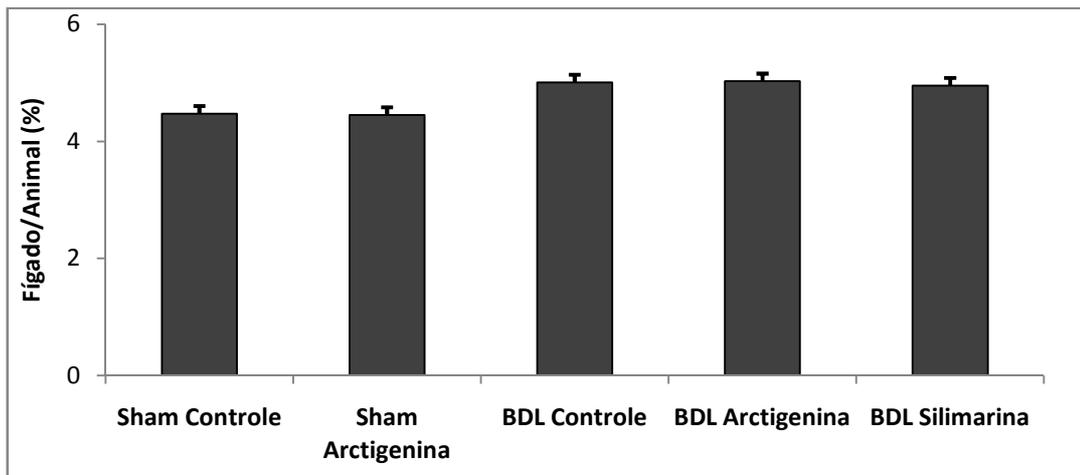


Ilustração 31 - Porcentagem do peso do fígado em relação ao peso dos animais do experimento *in vivo*.

### 5.5.2 Dosagens Bioquímicas

Para avaliar a lesão hepática produzida nos animais foram realizadas as dosagens dos marcadores AST, ALT, FA e Ptn Tot, como demonstra a tabela 11 e as ilustrações 32, 33, 34 e 35. Os resultados encontrados demonstram que o modelo de lesão hepática utilizado foi eficaz quanto a produzir dano no fígado, ao comparar os valores das enzimas do grupo sham controle e BDL controle. O que também pode ser notado é que a arctigenina não possui efeito hepatotóxico quando administrada nos animais, visto que os níveis das enzimas dos grupos sham controle e sham arctigenina não apresentam diferenças estatisticamente significante. Quanto aos grupos tratados com arctigenina e silimarina, amostra e controle positivo respectivamente, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais, mas ocorreu uma tendência em diminuir os níveis das enzimas dos grupos quando realizou o tratamento com as substâncias em comparação ao grupo BDL controle. Como na dosagem de AST, no qual o grupo BDL apresentou valor de 17,86 U/ mg de ptn enquanto os grupos BDL arctigenina e BDL silimarina apresentaram respectivamente, 12,81 e 14, 50 U/ mg de ptn. Na dosagem de ALT, o grupo BDL apresentou valor de 7,70 U/ mg de ptn enquanto o grupo BDL arctigenina apresentou 6,69 U/ mg de ptn. Na dosagem de FA, o grupo BDL apresentou valor de 10,75 U/ mg de ptn enquanto os grupos BDL arctigenina e BDL silimarina apresentaram respectivamente, 9,91 e 7,86 U/ mg de ptn.

**Tabela 11.** Valores médios obtidos dos parâmetros bioquímicos séricos avaliados

<b>Avaliação</b>	<b>Sham</b>	<b>Sham</b>	<b>BDL</b>	<b>BDL</b>	<b>BDL</b>
<b>Laboratorial</b>	<b>Controle</b>	<b>Arctigenina</b>	<b>Controle</b>	<b>Arctigenina</b>	<b>Silimarina</b>
<b>AST</b>	4,48	4,61	17,86	12,81	14,50
<b>Erro Pad</b>	1,27	1,01	0,56	1,82	1,65
<b>ALT</b>	1,04	0,78	7,70	6,69	7,74
<b>Erro Pad</b>	0,15	0,08	0,44	0,94	0,97
<b>FA</b>	3,66	3,53	10,75	9,91	7,86
<b>Erro Pad</b>	0,27	0,33	0,77	1,03	0,91
<b>Ptn Tot</b>	6,26	6,17	6,64	6,52	6,68
<b>Erro Pad</b>	0,15	0,20	0,11	0,16	0,14

Resultados de FA, AST e ALT apresentados em Unidade por mg de proteína. **Legenda:** **AST:** aspartato aminotransferase; **ALT:** alanina aminotransferase; **FA:** fosfatase alcalina; **Ptn Tot:** proteínas totais; **BDL:** grupo de animais que sofreram a cirurgia de ruptura do ducto biliar; **Erro Pad:** erro padrão.

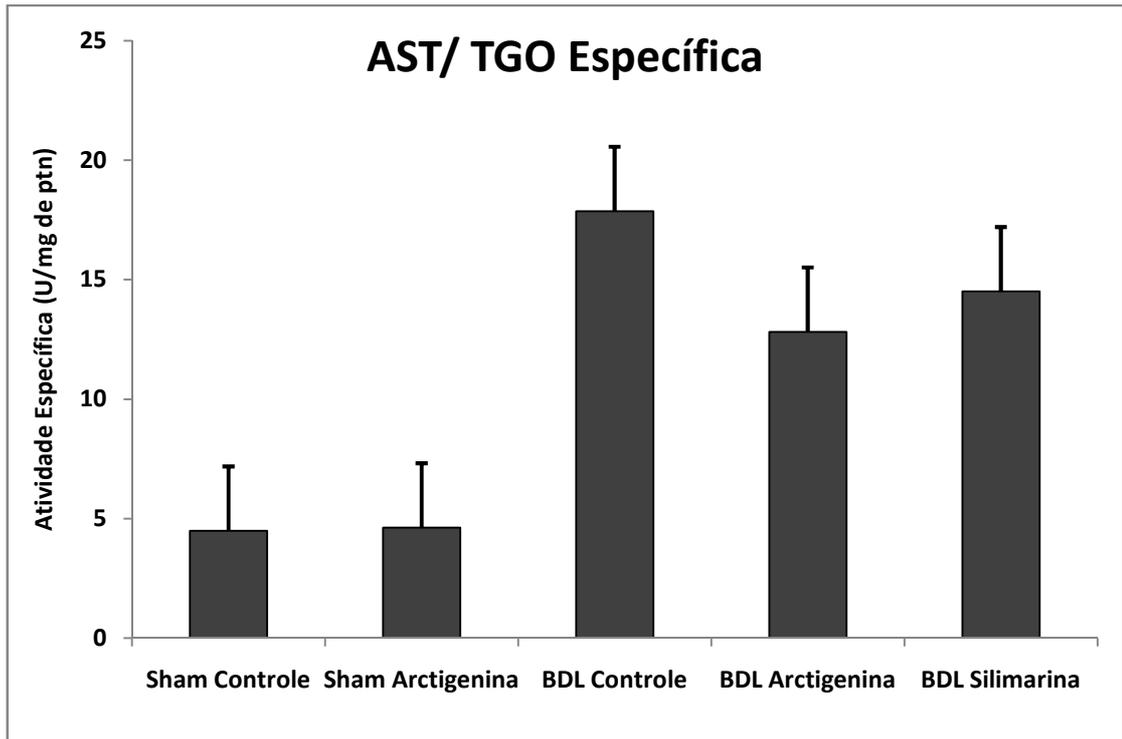


Ilustração 32 - Avaliação da atividade específica da AST/TGO nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.

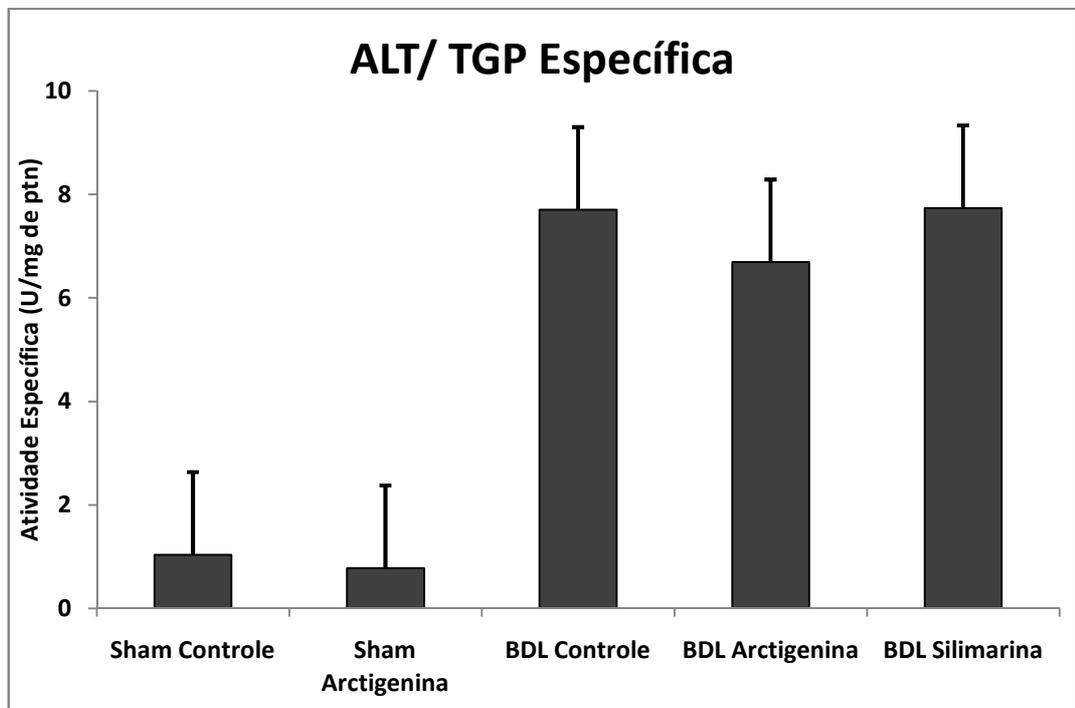


Ilustração 33 – Avaliação da atividade específica da ALT/TGP nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.

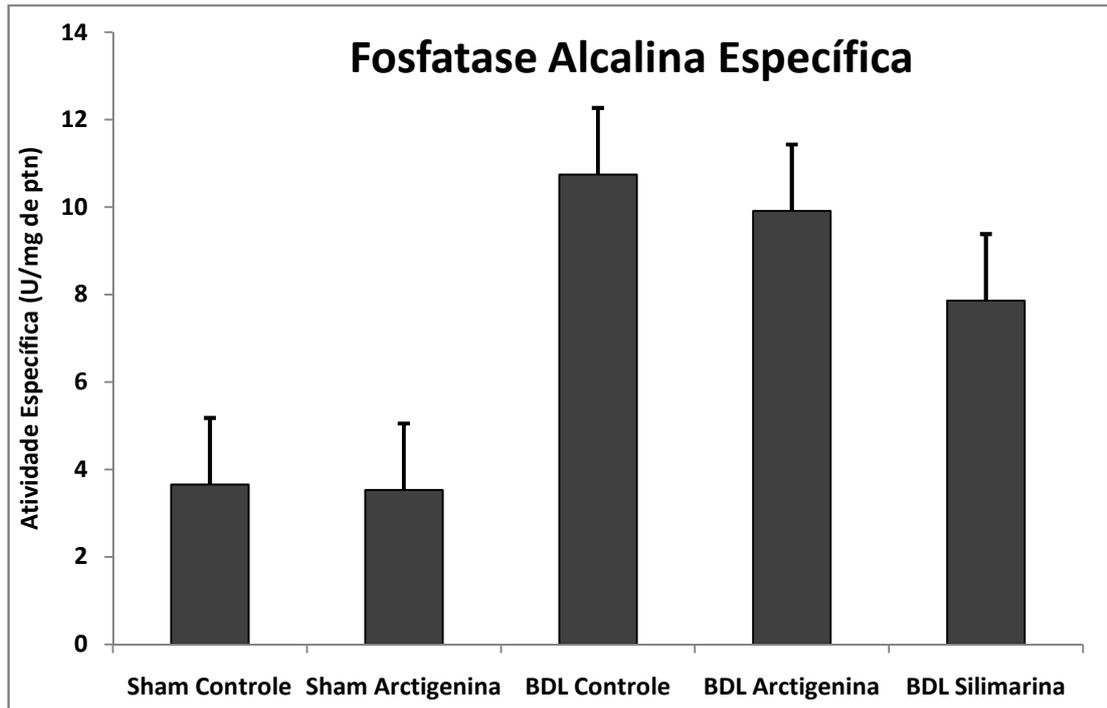


Ilustração 34 - Avaliação da atividade específica da fosfatase alcalina nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.

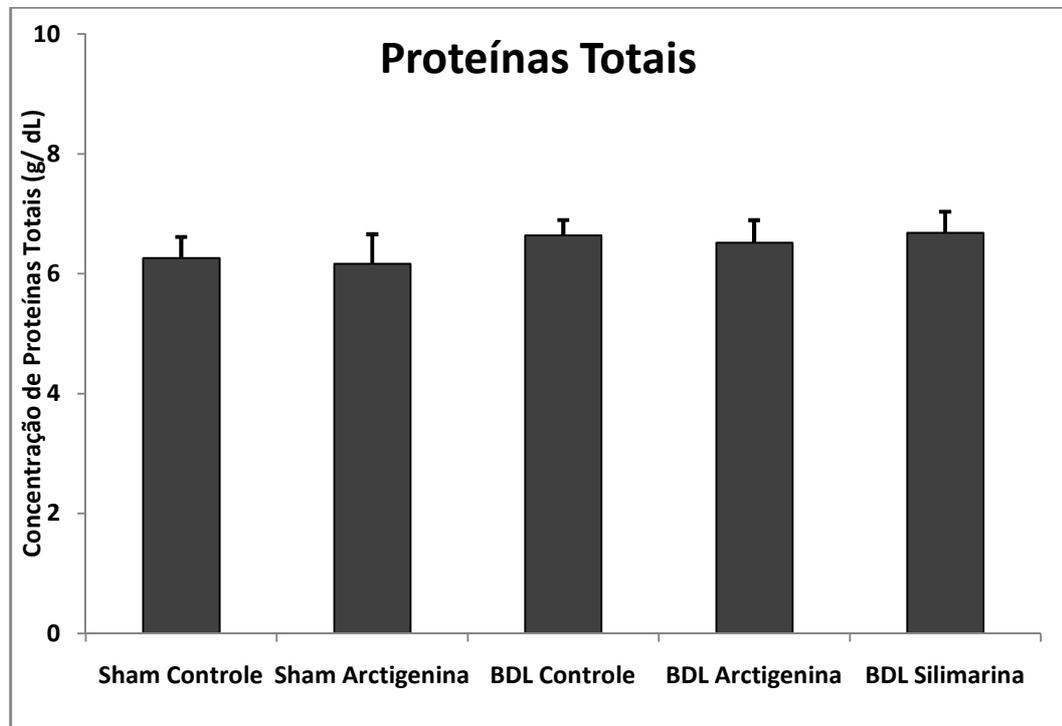


Ilustração 35 – Avaliação das dosagens de proteínas totais nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.

### 5.5.3 Mieloperoxidase

Os resultados obtidos nas avaliações da enzima MPO utilizando como material o tecido hepático dos animais do experimento *in vivo* estão demonstrados na tabela 12 e na ilustração 35.

**Tabela 12.** Valores médios obtidos na avaliação da atividade da MPO no experimento *in vivo*.

Avaliação	Sham Controle	Sham Arctigenina	BDL Controle	BDL Arctigenina	BDL Silimarina
MPO	0,001951	0,002052	0,002332	0,002238	0,002247
Erro Pad	0,000361	0,000095	0,000290	0,000205	0,000416

Os valores de MPO apresentados em Unidade Especifica por mg de proteína. **Legenda:** **Erro Pad:** erro padrão.

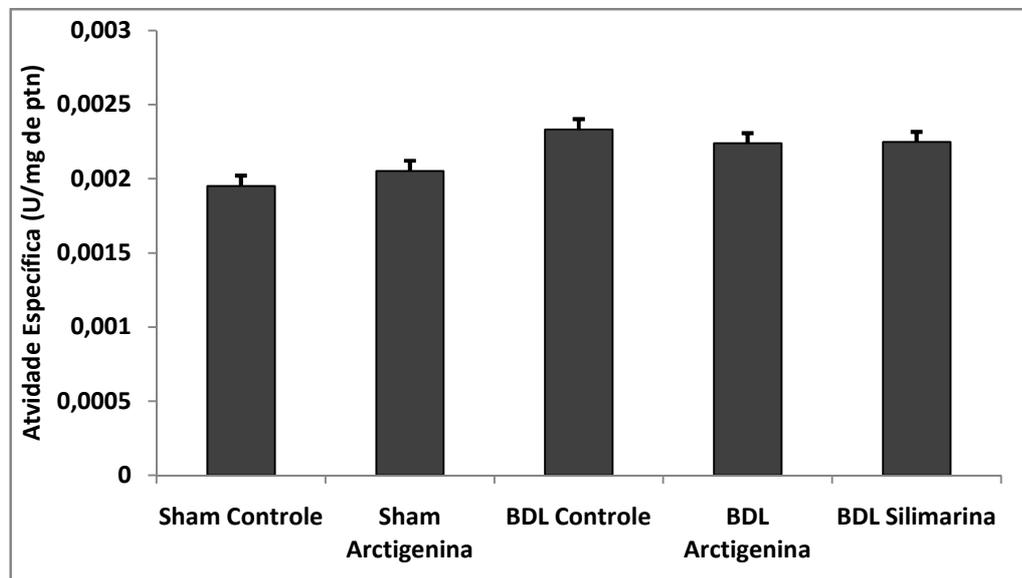


Ilustração 36 – Avaliação das dosagens de mieloperoxidase nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.

#### 5.5.4 TNF- $\alpha$

Os resultados obtidos na avaliação do TNF-  $\alpha$  utilizando como material o tecido hepático dos animais do experimento *in vivo* estão demonstrados na tabela 13 e na ilustração 36.

**Tabela 13.** Valores médios obtidos na avaliação da atividade de TNF-  $\alpha$  no experimento *in vivo*.

Avaliação	Sham Controle	Sham Arctigenina	BDL Controle	BDL Arctigenina	BDL Silimarina
TNF- $\alpha$	0,687	0,823	5,858	5,038	4,530
Erro Pad	0,24	0,46	0,86	1,42	0,65

Os valores de MPO apresentados em Unidade Especifica por mg de proteína. **Legenda:** **Erro Pad:** erro padrão.

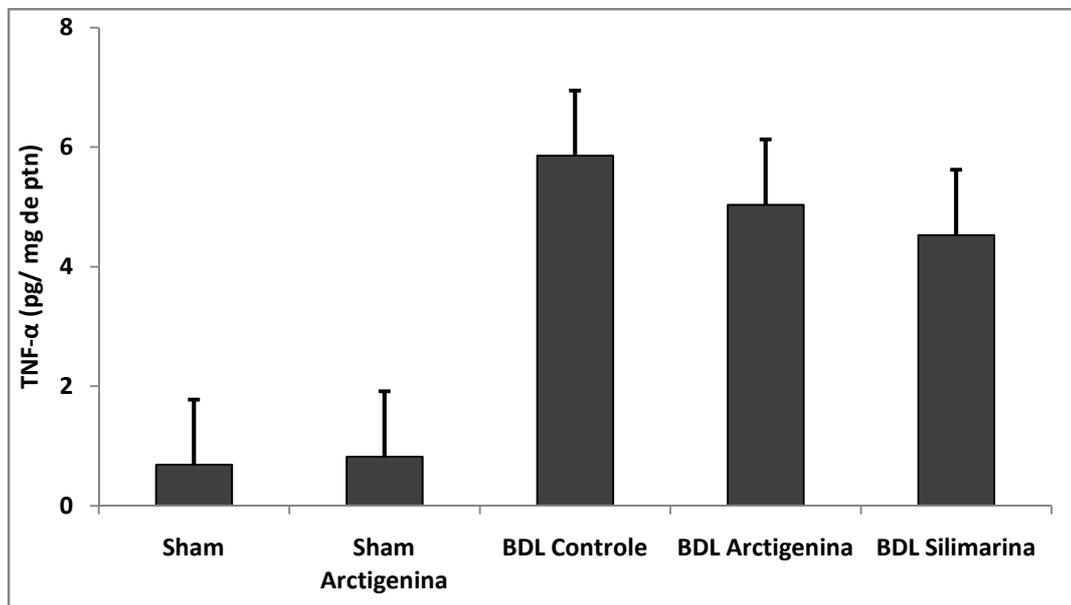


Ilustração 37 - Avaliação das dosagens de TNF-  $\alpha$  nos grupos experimentais do teste *in vivo* após tratamento com arctigenina.

## 6 Discussão

A arctigenina, metabólito secundário conhecido da *Arctium lappa L.* apresenta descrição de diversas ações farmacológicas, como anti-inflamatória, hipoglicemiante, antimicrobiana e hepatoprotetora (CHAN, *et al.* 2011). No entanto, algumas destas indicações não apresentam estudos que comprovem seu efeito. Assim, este estudo procurou avaliar alguns aspectos biológicos desta substância em modelos experimentais que ajudassem no embasamento científico das indicações terapêuticas da arctigenina para o tratamento antitumoral e hepatoprotetor.

Inicialmente, realizamos experimentos para obtenção de um extrato clorofórmico bruto a partir dos frutos secos da *Arctium lappa L.*, a utilização de partes aéreas da planta é vantajoso e sustentável, pois não gera nenhum dano a planta, podendo essa manter-se viva. Sabe-se que nos frutos *Arctium lappa L.* têm-se presente arctiina e arctigenina, assim, para o isolamento das mesmas, foi utilizado solvente com polaridade intermediária, no caso  $\text{CHCl}_3$  e também do equipamento Soxhlet, que aperfeiçoa e diminui o tempo de extração. O objetivo do trabalho é a obtenção da arctigenina ou arctiina, não a extração total de todos os constituintes presentes na *Arctium lappa L.* Por isso, optou-se por desenvolver uma metodologia de extração que assegurasse conseguir uma quantidade suficiente de substâncias sem que fosse necessário realizar etapas intermediárias, como a maceração utilizando um solvente com polaridade mais alta, no caso etanol. Seria um processo que extrairia mais substâncias da planta, mas ao mesmo tempo, aumentaria o tempo de processo e sairia do intuito do trabalho, que seria a obtenção da arctigenina ou arctiina.

A arctiina se diferencia da arctigenina por possuir uma molécula de glicose em sua estrutura, desta forma, optamos por realizar uma hidrólise ácida na fração 6 e 7 que continha maior concentração de arctiina, para retirar a molécula de glicose e adquirir maior quantidade da substância arctigenina. A metodologia empregada na hidrólise ácida realizada na fração 6 e 7 mostrou-se satisfatória quando comparada ao padrão de arctiina, cedido pelo NIPPAN, demonstrando seletividade em retirar a molécula de glicose da arctiina levando à formação em aglicona, obtendo-se 61% de rendimento.

Há metodologias publicadas com isolamento da arctiina e obtenção da arctigenina, como mostram os estudos de Tsai *et al.* (2011) e Zhao *et al.* (2009), mas observa-se uma otimização do processo quando se utiliza  $\text{CHCl}_3$ , Soxhlet e hidrólise ácida. Zhao *et al.* (2009), ainda propõe enzimólise sobre a arctiina para se obter arctigenina, só que utilizando a enzima hidrolase obtida de caracol. Além de ser um processo longo, porque o tempo de reação seria de 36 a 48h, a substância é difícil de ser encontrada para compra.

Assim, uma metodologia de extração, isolamento da arctiina e obtenção da arctigenina foram desenvolvidos nesse estudo. Em virtude disso, a metodologia desenvolvida para obtenção da arctigenina se difere das outras metodologias já apresentadas em outros artigos, por ter uma maior eficácia na obtenção das substâncias, gerando um menor gasto de solventes, reagentes e minimizou também o tempo para se obter as substâncias. O que é visto como uma contribuição importante para futuros estudos fitoquímicos com essas substâncias aqui evidenciadas.

Desta forma, as frações obtidas após hidrólise ácida e purificação do hidrolisado (frações H11 e H12-14) e após purificação da fração hidrolisada H8-10, fração B, foram reunidas e chamadas de fração AL-H11, que foi submetida à análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificada, após análise comparativa dos espectros obtidos com os de RAHMAN *et al.* (1990). Portanto, os dados obtidos pela análise espectral foram semelhantes aos publicados por RAHMAN *et al.* (1990), corroborando a correta identificação da molécula e demonstrando um elevado grau de pureza da substância identificada, a arctigenina.

Adicionalmente foi desenvolvido um método cromatográfico para determinação do perfil cromatográfico para identificação e doseamento da arctigenina utilizando técnica de CLAE. Foram realizados testes necessários para aplicação da metodologia analítica desenvolvida, como os seguintes parâmetros de confiança: linearidade, repetibilidade e especificidade. Testes estes realizados na concentração de arctigenina em torno de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o que demonstrou excelente recuperação da arctigenina e parâmetros cromatográficos adequados. A metodologia empregada se mostrou linear e nenhum interferente foi observado nos cromatogramas, o que também sugere um elevado grau de pureza da amostra utilizada nos estudos. Considerando a utilização desta substância em tratamentos futuros, têm-se uma metodologia analítica simples, para uso em controle de

qualidade e ensaios bioanalíticos já pré desenvolvida e com alguns parâmetros de validação analítica analisados. O método analítico desenvolvido e aplicado nesses experimentos utilizando CLAE permitiu uma determinação rápida (tempo de retenção=7,6 min), eficiente e reprodutível da arctigenina. Com menor gasto de solvente e tempo quando comparado aos estudos realizados por BOLDIZSÁR *et al.* (2010) e LIU *et al.* (2010), que sugerem um tempo de corrida de 20 e 19 min com tempo de retenção do ativo de 12 e 11,5 min, respectivamente. Assim, mais uma vez propomos um método analítico alternativo, só que esse para identificação e quantificação da arctigenina utilizando CLAE, uma técnica refinada e robusta, exigida pelos órgãos reguladores e fiscalizadores como metodologia de análise segura e eficaz quanto a ensaios quali e quantitativos.

Com a obtenção da arctigenina, foram avaliados os efeitos farmacológicos *in vitro* desta substância, utilizando o modelo de citotoxicidade por reagente MTT em linhagens celulares NIH/3T3 e HepG-2. O estudo realizado por SUSANTI *et al.* (2012) mostrou que a arctigenina não apresentou efeito citotóxico em linhagens celulares de fibroblasto, porém quando avaliada frente à linhagem HepG-2, a arctigenina apresentou citotoxicidade. O mesmo ocorreu nos experimentos realizados no presente estudo, onde a arctigenina não foi citotóxica em NIH/3T3 e apresentou resultados significantes sobre a citotoxicidade em HepG-2, uma ação dose dependente sendo a maior na concentração de 269  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). SUSANTI *et al.* (2012) e MORITANI *et al.* (1996) também realizaram experimentos de viabilidade celular da arctigenina sobre HepG-2 e os resultados obtidos indicam citotoxicidade da arctigenina sobre esta linhagem de carcinoma hepático humano.

No experimento de citotoxicidade por MTT foi avaliada também a atividade da arctigenina frente a células NIH/3T3 e HepG-2, que demonstrou não haver nenhuma citotoxicidade dessa substância sobre as células. Ressaltando a importância em estudar a arctigenina por causa da sua atividade citotóxica específica para células cancerígenas e não por células normais. SUSANTI *et al.* (2012) menciona que a atividade da arctigenina está ligada à capacidade de inibir especificamente a proliferação das células cancerígenas que induzir a apoptose.

Adicionalmente, foi realizado o teste de adesão, inédito para esta molécula. O ensaio de adesão permite determinar se a substância interfere no processo da embriogênese, invasão, migração e remodelagem tissular através da adesão das células aos componentes de matriz extracelular (via receptores de adesão),

formando complexos com os componentes do citoesqueleto, a qual afeta a motilidade celular, diferenciação, proliferação e sobrevivência. O experimento realizado mostra que a arctigenina foi capaz de inibir a adesão celular sobre a células HepG-2 de maneira concentração-dependente.

Apesar de evidências *in vitro* da atividade hepatoprotetora da arctigenina, nenhum estudo havia sido realizado *in vivo*, até o momento. KIM *et al.* (2003), avaliou o efeito hepatoprotetor *in vitro* da arctigenina, comparado à silibina e propôs que os mecanismos hepatoprotetores poderiam estar ligados à capacidade de inativar espécies reativas de oxigênio e pela manutenção da atividade de enzimas antioxidantes. LIN *et al.* (2002) avaliou a atividade hepatoprotetora *in vivo* do extrato bruto de *Arctium lappa L.* em modelo de lesão hepática em ratos induzida por etanol e potencializada com CCl<sub>4</sub>, foi demonstrado efeito hepatoprotetor observando diminuição dos níveis séricos de transaminases e diminuição dos níveis das enzimas ligadas a mecanismos antioxidantes, como a glutatona e malonildialdeído. Entretanto não há relatos de estudos da Arctigenina *in vivo* o que corrobora com o trabalho realizado.

Para escolha do modelo de lesão hepática a se utilizar, foi realizado levantamento bibliográfico dos modelos já descritos e amplamente utilizados, e com isso, foi possível assumir posições quanto ao método correto e adequado para tal experimento.

O método comumente utilizado para induzir cirrose experimental é a administração crônica com CCl<sub>4</sub> que se assemelha com a cirrose alcoólica humano, mas também mostra algumas diferenças importantes. Além disso, a resposta individual de animais é variável, a mortalidade é elevada e o aplicação do método é extensa, de 8 a 12 semanas, para produzir cirrose. E, hoje em dia a intoxicação por CCl<sub>4</sub> é mais rara no homem (SAHU *et al.*, 2007).

No modelo de BDL, as alterações morfológicas são comparáveis àquelas na cirrose biliar humana, não sendo necessária nenhuma bioativação de qualquer toxina externa como ocorre no modelo de CCl<sub>4</sub>. Este modelo obstrutivo parece ter algumas vantagens sobre o CCl<sub>4</sub> e pode provar ser um instrumento útil para o estudo de cirrose humana e estudos de medicamentos antifibróticos (SAHU *et al.*, 2007). No entanto, ambos os modelos possuem vantagens e desvantagens, por exemplo, a administração de CCl<sub>4</sub> é mais fácil de realizar do que a realização de uma cirurgia. Reverter ou paralisar a lesão hepática pelo modelo de CCl<sub>4</sub> é mais

simples que no modelo de BDL, porque no modelo de CCl<sub>4</sub> é só interromper a administração do agente hepatotóxico, o que não é possível com o BDL. Na cirrose por CCl<sub>4</sub>, o estresse oxidativo é o mecanismo principal de danos no fígado, enquanto que no modelo de BDL o estresse oxidativo ocorre como consequência e não como causa da lesão hepática (SAHU *et al.*, 2007).

Os resultados encontrados na realização do experimento *in vivo* não demonstrou nenhuma alteração significativa entre os parâmetros analisados, mas foi observado diferenças entre os grupos sham e os grupos BDL, o que demonstra a eficácia do método. Também observou-se uma tendência em diminuir os níveis de AST, ALT e TNF- $\alpha$ , quando comparado o grupo BDL controle com o grupo BDL tratado com arctigenina. As transaminases são utilizadas como marcadores hepáticas porque quando há lesão hepática, seus níveis séricos podem elevar (HARRISON'S *et al*, 2005). Já o TNF- $\alpha$  pode desempenhar um papel importante na regeneração hepática como também estar associado à lesão hepática em modelos experimentais. No modelo de BDL, os ratos passam a ter icterícia e os níveis de TNF- $\alpha$  podem estar elevados nesses casos (GÄBELE *et al*, 2009).

KOUNTOURAS *et al.* (1984) demonstrou em seu estudo várias etapas quando se realiza BDL, sendo dividida da seguinte forma: 5 primeiros dias há fibrose ocorrendo somente nas regiões onde há formação de novas vias biliares, edema leve e reação inflamatória aguda; 10 primeiros dias ou mais, foi observada a fibrose e proliferação do ducto biliar. Assim, fica a necessidade de complementar o presente estudo com outros modelos de lesão hepática, bem como em estudo a longo prazo com o próprio modelo BDL.

## 7 CONCLUSÃO

A metodologia extrativa proposta para obtenção da arctigenina mostrou-se eficaz para obtenção de forma seletiva da arctigenina e arctigenina, sendo um método de extração alternativo para estudos fitoquímicos que se utilize a arctigenina.

Além disso, com a identificação da substância pura, a AL-H11 ou arctigenina, foi possível também desenvolver uma nova metodologia analítica em CLAE, nos quais foram avaliados alguns parâmetros de validação analítica. O desenvolvimento desta metodologia poderá ser útil para identificação e doseamento da arctigenina em análises de controle de qualidade e também em ensaios bioanalíticos.

Os resultados encontrados sugerem o potencial promissor da arctigenina, apresentando um potencial citotóxico frente à linhagem de carcinoma hepático humano. As evidências demonstrando a atividade hepatoprotetora e as raras publicações neste sentido com a arctigenina demonstram a importância da continuidade dos estudos com esta molécula, investigando assim sua ação e aplicação terapêutica, como forma de contribuir no tratamento de pacientes que sofram de hepatopatias.

## 8 REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A. S. **Caracterização anatômica e análise do óleo essencial de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae)**. Viçosa, 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 67, 2000.
- BARROS, D. **Fitomedicamentos na indústria brasileira**. Phytomédica, ano 1, v. 1. Disponível no endereço: [http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica\\_jornal/numero5.pdf](http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf). Acesso em 24/05/2013.
- BEMELMANS, M. H. *et al.* **Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice**. Hepatology, 15: 1132–1136; 1992.
- BOLDIZSÁR I. *et al.* **Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: Their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts**. Journal of Chromatography A, 1217: 1674–1682; 2010.
- BORGES, D. R. *et al.* **Avaliação terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento**. 19ª ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 321-325; 1999.
- BOTTA, B. *et al.* **Aryltetralin lignans: chemistry, pharmacology and biotransformations**. Curr. Med. Chem. 8, 1363, 2001.
- BOVA, M. P. *et al.* **Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells**. Toxicol Lett, 155: 41–50; 2005.
- BOYD, E. M.; BERECZKY, G. M. **Liver necrosis from paracetamol**. Br. J. Pharmacol. n. 26, p. 606-614, 1966.
- BRADLEY, P. P. *et al.* **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker**. The Journal of Investigative dermatology, 78: 206-209, 1982.
- BRUGGISSER, R. *et al.* **Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay**. Planta Med, 68: 445-448, 2002.
- BRUGUERA, M.; BORDAS, J. M.; RODES J. **Asymptomatic liver disease in alcoholics**. Arch Pathol Lab Med. 1977. n°. 101, p. 644-647; 1977.
- BURDELSKI, M. **Current concepts in diagnosis and therapy of pediatric liver diseases**. J. Hepatol., v.23, p.45-8, 1995.

CALIXTO, C. P. *et al.* **Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso bruto das folhas da *Arctium lappa* L.(EA).** In: XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia, 2003, Águas de Lindóia, SBFTE, Resumos, p.187-188; 2003

CALIXTO, J. B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos.** Cienc. Cult., vol.55, nº. 3, p.37-39; 2003.

CALIXTO, J. B. **Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais.** In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 1ª ed. Chapecó: Argos; 2001.

CARVALHO, A. A. **Estudo da atividade antimetastática da biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*.** Fortaleza, 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2009.

CHAN, E.; WONG, C. Y. K.; WAN, C. W. **Evaluation of anti-oxidant capacity of root of *Scutellaria baicalensis Georgi*, in comparison with roots of *Polygonum multiflorum Thunb* and *Panax ginseng CA Meyer*.** Am J Chinese Med, 38: 815–827, 2010.

CHAN, Y. S. *et al.* **A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock).** Inflammopharmacol, 19: 245–254, 2011.

CHATURVEDULA, P.; VENKATA, S.; PRAKASH, I. **Acid and Alkaline Hydrolysis Studies of *Stevioside* and *Rebaudioside A*.** Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (08); 104-108, 2011.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. **The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active.** Food Chemistry, v. 86, p. 479-484, 2004.

CHO, M. K.; PARK, J. W.; JANG, Y. P. **Potent inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by dibenzylbutyrolactone lignans through inhibition of I-kappa B alpha phosphorylation and of p65 nuclear translocation in macrophages.** Int Immunopharmacol, 2: 105–116, 2002.

COMPORTI, M. **Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury.** Lab Invest. n. 53, p. 599-623, 1985.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press, p. 1262, 1981.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia.** 1ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, 2003.

CZAJA, M. J.; XU, J.; ALT, E., **Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor.** *Gastroenterology*, 108: 1849-1854, 1995.

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. **Liver Regeneration 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration.** *Federation of American Societies for Experimental Biology*. v. 9, n. 15, p. 1527-1536; 1995.

FELVER, M. E. *et al.* **Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis.** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 14: 255– 259; 1990.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E. *et al.* **Effects of thalidomide and 3-pthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat.** *Drug Dev Res* 54: 209–218, 2001.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E. *et al.* **Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat.** *Exp Toxicol Pathol* 58: 49–58, 2006.

FOX, E. S.; KIM, J. C.; TRACY, T. F. **NF-kappa B activation and modulation in hepatic macrophages during cholestatic injury.** *J. Surg. Res.*, 72: 129–134; 1997.

FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** p. 117, Alan R Liss, Inc., New York, 1987.

GÄBELE, E. *et al.* **TNF $\alpha$  is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378: 348–353; 2009.

GAO, H. *et al.* **Arctigenin: a lignan from *Arctium lappa*.** *Acta Cryst.* E64, 1538; 2008.

GODOY, J. L.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U. **Regeneração hepática: o mito de Prometeu revisado.** *Jornal Brasileiro de Transplantes*. v. 9, p. 535-539, 2006.

GREGÓRIO, G. **Nova legislação de fitomedicamentos inclui plantas brasileiras.** *Phytomedica*, ano 1, v. 1. Disponível no endereço: [http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica\\_jornal/numero5.pdf](http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf). Acesso em 24/05/2013.

HAWORTH, R. D. **Natural resins.** *Ann. Rep. Prog. Chem.* 33, 266, 1936.

HELLERBRAND, C. *et al.* **Cytokines induce NF-kappaB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells.** *Am. J. Physiol.*, 275: G269–G278; 1998.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives.** *Phytochemistry Rev.*, v. 1, p. 275 – 285, 2002.

ISOMAKI, P.; PUNNONEN, J. **Pro-and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid, arthritis.** *Annals of Medicine*, v. 29, 499-507; 1997.

JANG, Y. P. *et al.* **Arctigenin protects cultured cortical neurons from glutamate-induced neurodegeneration by binding to kainate receptor.** *J Neurosci Res*, n.68, 233–40, 2002.

JOLLOW, D. J. *et al.* **Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding *in vivo*.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* n. 187, p. 195-202; 1973.

KAZEMIFAR, A. M. *et al.* **Hepatoprotective Property of Oral Silymarin is Comparable to N-Acetyl Cysteine in Acetaminophen Poisoning.** *Gastroenterology Research*, 5 (5): 190-194, 2012.

KASPER, D. L. *et al.* **Harrison's Principles of Internal Medicine.** 16<sup>a</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, USA; 2005.

KIM, S. H. *et al.* **Hepatoprotective Dibenzylbutyrolactone Lignans of *Torreya nucifera* against CCl<sub>4</sub>-Induced Toxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes.** *Biol. Pharm. Bull*, 26 (8): 1202—1205; 2003.

KINNMAN, N.; ANDERSSON, U.; HULTCRANTZ, R. **In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C.** *Scand. J. Gastroenterol.*, 35: 1294–1300; 2000.

- KITAMURA, K. *et al.* **Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis.** Lab. Invest. 82: 571–583; 2002.
- KLEIN, T. *et al.* **Fitoterápicos: um mercado promissor.** Rev Ciênc Farm Básica Apl., 30 (3): 241-248; 2009.
- KNIPPING, K.; VAN ESCH, E.; WIJERING, S. C. ***In vitro* and *in vivo* anti-allergic effects of *Arctium lappa* L.** Exp Biol Med, 233: 1469; 2008.
- KOUNTOURAS, J. *et al.* **Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat.** Br J Exp Pathol, 65: 305–311; 1984.
- LANDETE, J. M. **Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health.** Food Research International, 46: 410–424; 2012.
- LEONARD, S. *et al.* **Essiac tea: Scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage.** J Ethnopharmacol, 103 (2): 288-296; 2006.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. **Inflammation and atherosclerosis.** Circulation, v. 105: 1135-1143; 2002.
- LIN, S. C.; CHUNG, T. C.; LIN, C. C. **Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen induced liver damage.** Am J Chin Med, 28: 163–173; 2000.
- LIN, S. C.; LIN, C. H.; LIN, C. C. **Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride.** J Biomed Sci, 9: 401–409; 2002.
- LIU, H. *et al.* **Determination of the major constituents in fruit of *Arctium lappa* L. by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with HPLC separation and fluorescence detection.** Journal of Chromatography B, 878: 2707–2711; 2010.
- LIU, Z.; SAARINENE, N. M.; THOMPSON, L. U. **Sesamin is one of the major precursors of mammalian lignans in sesamen seed (*Sesamun indicum*) as observed *in vitro* and in rats.** The Journal of Nutrition, 136: 906–912; 2006.

- MARZELLA, L. et al. **Pathology of the liver: functional and structural alterations of hepatocyte organelles induced by cell injury.** Hepatotoxicology. Boca Raton, CRC Press. p. 93-138; 1991.
- MARTINS, A. K. A.; BOAVENTURA, M. F. C.; LIMA, M. M. R. Cultivo de linhagens permanentes. In: PERES, C. M.; CURI, R. (ORG.) **Como Cultivar Células.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 41-49.
- MATSUMOTO, T.; HOSONO-NISHIYAMA, K.; YAMADA, H. **Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells.** Planta Med., 72: 276—278; 2006.
- MITCHELL, J. **Acetaminophen toxicity.** New England Journal of Medicine. n. 319. p. 1601-1602, 1988.
- MITCHELL, J. R. et al. **Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 1973. n. 187, p. 211-217, 1973.
- MITSUO, M.; NOBUO, Y.; KATSUYA, T. **Inhibitory compounds of alpha glucosidase activity from *Arctium lappa* L.** J Oleo Sci, 54: 589–594; 2005.
- MOORE, L. K.; DALLEY, F. A. **Anatomia orientada para clínica.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 268; 2007.
- MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais.** 8ª ed. São Paulo: Hemus, 1997.
- MORITANI, S. et al. **Cytotoxic Components of *Bardanae Fructus* (Goboshi).** Biol. Pharm. Bull., 19 (11): 1515-1517; 1996.
- MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological methods, 95: 55-63; 1983.
- NAGAOKA, M. R. et al. **Is the expression of kinin B1 receptor related to intrahepatic vascular response?** Biochimica et Biophysica Acta, 1760: 1831–1836; 2006.
- NAGAOKA, M. R. et al. **Differential response related to genotoxicity in multiple organs of cirrhotic rats.** Hepatology International, v. 5, 2, p. 740-746; 2011.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos**, Apud: SIMÕES, O. M. C., SCHENKEL, R. P., Gosmann, G., MELLO, P. C. J., MENTZ, A. L., PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta medicamento. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.

O'BRIEN, P. J. *et al.* **High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening.** Arch Toxicol, 80: 580–604; 2006.

OGAVA, S. E. M. *et al.* **Implantação do programa de fitoterapia “Verde Vida” na secretaria de saúde de Maringá (2000-2003).** Rev Bras Farmacogn., 13: 58-62; 2003.

ONG, W. Y.; HALLIWELL, B. **Iron, atherosclerosis, and neurodegeneration: a key role for cholesterol in promoting iron-dependent oxidative damage?** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1012: 51–64; 2004.

PARK, S. Y. *et al.* **Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production.** Chem.Pharm.Bull., 55: 150–152; 2007.

PROKOPOWICZ, Z. *et al.* **Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman.** Archivum Immunologiae et Therapiae experimentalis; 2011.

QUEIROZ, K. C. S. *et al.* **Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells.** Biochemistry, v. 71, i. 12, p 1312-1315; 2006.

RAHMAN, M. M. A. *et al.* **Lignans of *forsythia intermedia*.** Phytochemistry, 1 29, nº 6, p 1971-1980; 1990.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicon, Oxford, v. 39, p. 603-613, 2001.

RECKNAGEL, R. O. *et al.* **Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity.** Pharmacol Ther. n. 43, p. 139-154; 1989.

REICHEL, C., *et al.* **Elevated soluble tumour necrosis factor receptor serum concentrations and short-term mortality in liver cirrhosis without acute infections.** Digestion, 62: 44–51; 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Brasília, 2003. 15p. Disponível em:

< <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=> >.

Acesso em: 15 de maio de 2013.

RÜNGELER, P. *et al.* **Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets.** *Planta Med.*, 64, 588; 1998.

SAHU, S. C. *et al.* **Hepatotoxicity: from genomics to *in vitro* and *in vivo* models** In: (MURIEL, P.) *Some Experimental Models of Liver Damage* Chichester: John Wiley & Sons Ltd, C. 6, p. 119-137; 2007.

SAWADA, H.; TAKAMI, K.; ASAHI, S. **A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel *in vitro* screening system.** *Toxicol Sci* 83: 282–292; 2005.

SLATER, T. F.; SANWYER, B.; STRAUCHLI, U. **Studies on succinate tetrazolium reductase system III. Points of coupling of four different tetrazolium salts.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 77: 383-93; 1963.

SOUZA-FAGUNDES, E. M *et al.* **Screening and Fractionation of Plant Extracts with Antiproliferative Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97 (8): 1207-1212; 2002.

SUSANTI, S. *et al.* **Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctium lappa L.*** *J Nat Med*, 66: 614–621; 2012.

TAI, J. *et al.* ***In vitro* comparison of Essiac® and Flor- Essence® on human tumor cell lines.** *Oncol Rep.*, 11(2):471-476; 2004.

TAKAHASHI, M. **Compositions for curing diabetes mellitus, processes for the preparation of same, and usage of same.** US Pat. 814–01; 1998.

TAMAYO, C. *et al.* **The chemistry and biological activity of herbs used in Flor-Essence® herbal tonic and Essiac.** *Phytother Res*, 14 (1): 1-14; 2000.

TILG, H. *et al.* **Serum levels of cytokines in chronic liver diseases.** *Gastroenterology*, v. 103, 264-758; 1992.

TOLEDO, A. C. O. *et al.* **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica.** *Rev Lecta*, 21 (1/2): 7-13; 2003.

TSAI, W. J. *et al.* **Arctigenin from *Arctium lappa* inhibits interleukin-2 and interferon gene expression in primary human T lymphocytes.** Chinese Medicine, 6: 12; 2011.

TSUKAMOTO, H.; GAAL, K.; FRENCH, S. W. **Insights into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis: status report.** Hepatology, 12: 599–608; 1990.

UMEHARA, K. *et al.* **Studies on differentiation inducers: VI. Lignan derivatives from *Arctium fructus*.** (2). Chem. Pharm Bull, n. 44, 2300–4, 1996.

VAN DER VEEN, B. S.; WINTHER, M. P. J.; HEERINGA, P. **Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease.** Antioxidantes & redox signaling. Larchmont, v. 11, n. 11, p. 2899-2937; 2009.

WANG, B. S.; YEN, G. C.; CHANG, L. W. **Protective effects of burdock (*Arctium lappa* Linne) on oxidation of low-density lipoprotein and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages.** Food Chem. n. 101: 729–738; 2007.

YAMADA, Y. *et al.* **Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor.** Proc. Natl. Acad. Sci., 1441–1446; 1997.

YIN, M. *et al.* **Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice,** Gastroenterology, 117: 942–952; 1999.

YU, B. S.; YAN, X. P.; XIONG, J. Y. **Simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythin and arctiin in Chinese traditional medicines preparation by reversed phase-HPLC.** Chem Pharm Bull, 51: 421–424; 2003.

ZHAO, F.; WANG, L.; LIU; K. ***In vitro* anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway.** Journal of Ethnopharmacology. 122. p. 457–462. 2009.