

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

Isolamento e identificação da licochalcona A a partir da *Glycyrrhiza inflata* e avaliação de suas atividades citotóxica *in vitro* e hepatoprotetora em modelo de lesão hepática em ratos.

Paulo Henrique Dias de Carvalho

JUIZ DE FORA, MG

2013

PAULO HENRIQUE DIAS DE CARVALHO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA LICOCHALCONA A  
A PARTIR DA *Glycyrrhiza inflata* E AVALIAÇÃO DE SUAS  
ATIVIDADES CITOTÓXICA *IN VITRO* E  
HEPATOPROTETORA EM MODELO DE LESÃO HEPÁTICA  
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

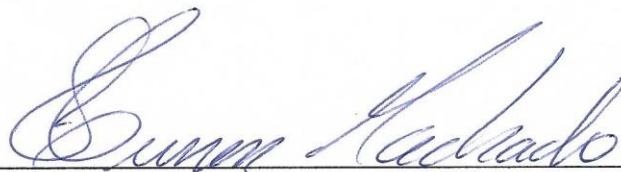
**Isolamento e identificação da licochalcona A a partir da *Glycyrrhiza inflata* e avaliação de suas atividades citotóxicas *in vitro* e hepatoprotetora em modelo de lesão hepática em ratos.**

**Paulo Henrique Dias de Carvalho**

**ORIENTADOR: Jorge Willian Leandro Nascimento**

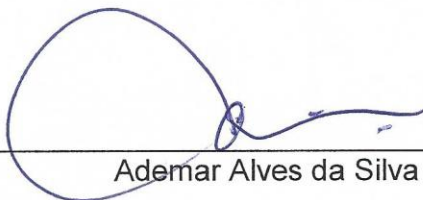
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26/07/2013



---

Hussen Machado



---

Ademar Alves da Silva Filho



---

Jorge Willian Leandro Nascimento

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

Carvalho, Paulo Henrique Dias de.

Isolamento e identificação da licochalcona A a partir da Glycyrrhiza inflata e avaliação de suas atividades citotóxica in vitro e hepatoprotetora em modelo de lesão hepática em ratos / Paulo Henrique Dias de Carvalho. -- 2013.  
96 f. : il.

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. Licochalcona. 2. Glycyrrhiza. 3. Ligação do ducto biliar. 4. Hepatoproteção. I. Nascimento, Jorge Willian Leandro, orient. II. Título.

*"Esforça-te, e tem bom ânimo;  
não temas, nem te espantes;  
porque o SENHOR teu Deus é contigo,  
por onde quer que andares."*

(Josué 1:9)

**Bíblia Sagrada**

Aos meus pais Evando e Vanda,  
aos meus irmãos  
(Douglas, Evando Júnior e Raphael)  
e à minha digníssima Clarissa,  
pelo amor incondicional, dedico.

## AGRADECIMENTOS

### *A vida é uma eterna universidade e eu, um mero aprendiz. Agradeço:*

A Deus, por ser o grande reitor, conduzindo meus passos para uma vida plena de alegria e esperança.

Aos meus pais, Evando e Vanda, por serem meus coordenadores, me ensinando a ser uma pessoa sempre melhor.

Aos meus irmãos, Douglas, Evando Júnior e Raphael, que em todos os momentos, presentes ou não, foram professores ao me mostrar que a vida é feita de escolhas.

A minha querida e amada Clarissa, monitora de todas as horas, que me incentivou dia após dia para nunca desistir.

As minhas sobrinhas, Maria Eduarda, Ana Luiza e Isabela, que um dia estarão no meu lugar.

Aos meus avós, amigos e familiares por me ensinar, com meus erros, que a humildade é a maior virtude do aluno.

Ao Professor Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento, pelo apadrinhamento acadêmico, ensinamentos e exemplo de vida.

Ao companheiro de labuta Renan Teixeira Salgado, que esteve firme e forte comigo mesmo diante de todas as dificuldades, valeu Mestre.

Ao Professor Dr. Ademar Alves da Silva Filho, primeiramente por ter aberto as portas do NIPPAN para a realização de grande parte deste trabalho, pelo exemplo de profissional sério e competente e, ainda, pelas dicas que não tem preço.

A todos da equipe NIPPAN por tornarem os dias de trabalhos menos dolorosos e mais agradáveis.

Aos Professores Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar e Dr.<sup>a</sup> Valquíria Pereira de Medeiros, pela colaboração no trabalho, que foi de enorme valia, e pela estrutura disponibilizada para a realização de várias etapas deste trabalho.

A todos do Laboratório de Análise de Glicoconjugados ICB/UFJF pela ajuda no trabalho de bancada, paciência e acolhimento.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina Nagaoka, pela disponibilidade de tempo, equipamentos e muita dedicação na realização dos experimentos em animais.

Muitíssimo obrigado a todos do Laboratório de Hepatologia Experimental da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP, sem exceção, pela receptividade maravilhosa.

À Prof. Dr. Mara Rúbia Costa Couri, do Departamento de Química da UFJF pela permissão para o uso do aparelho de RMN.

Ao Laboratório Santarosa de Análise Clínicas em Andrelândia/MG pelo fornecimento dos aparatos para a realização dos testes de análises bioquímicas deste trabalho.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial ao Programa de Pós Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade desta conquista.

Aos amigos da segunda turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFJF pelo compartilhamento de sabedorias e experiências.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos grandes ensinamentos passados.

Aos participantes da banca examinadora da defesa desta dissertação: Hussen Machado, pelo exemplo de profissional dedicado e pelos ensinamentos que carrego desde a graduação de Farmácia; Marcelo Silva Silvério, pelo exemplo de didática e pelos conhecimentos passados na especialização em Farmacologia Clínica; Ademar A. da Silva Filho, mais uma vez, pela disponibilidade de fazer parte de mais esta etapa; Jair A. Kopke de Águiar, novamente, pela enorme colaboração.

À minha mãe científica Leopoldina Leonor Fagundes, mãe Dina, por me inserir no meio acadêmico-científico e por nunca ter desistido do nosso trio.

Ao programa REUNI/CAPES pela bolsa concedida.

Peço desculpas àqueles não mencionados nominalmente, pois é impossível agradecer tantos que fizeram parte desta vitória e não se esquecer de alguém. Portanto, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa pudesse ser completada.



## RESUMO

A descoberta de protótipos naturais associada às metodologias de isolamento e identificação química de constituintes a partir de novas fontes botânicas, bem como da avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas dessas moléculas demonstram grandes perspectivas para o desenvolvimento racional de novos fármacos. Tendo em vista a alta incidência de doenças do fígado, no Brasil e no mundo, e que existem poucos medicamentos eficazes e capazes de reverter ou reduzir a progressão destas, o isolamento e a identificação de substâncias com potencial hepatoprotetor é, hoje, uma área promissora na busca de novas substâncias bioativas. Tradicionalmente, as raízes de *Glycyrrhiza sp.*, conhecidas como licorice, são usadas na medicina alternativa com inúmeras finalidades, dentre elas hepatoprotetora. Entretanto, até o momento, não existem relatos desta atividade vinculada à licochalcona A, uma das substâncias majoritárias nas raízes de *Glycyrrhiza inflata*. No presente trabalho avaliaram-se as atividades da licochalcona A em ensaios de viabilidade celular das linhagens de fibroblásto (NIH/3T3) e carcinoma hepatocelular humano (HepG-2), adesão celular de HepG-2 e em modelo de lesão hepática induzida por ligação do ducto biliar (BDL) em ratos Wistar. Além disso, desenvolveu-se uma metodologia para determinação da licochalcona A em CLAE-UV, utilizando coluna C<sub>18</sub>, fase móvel em gradiente de água acidificada (0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e metanol (50:50 – 20:80 v/v), fluxo de 1,1 mL/min e comprimento de onda para detecção em 372 nm. A licochalcona A isolada a partir do extrato seco das raízes de *G. inflata* foi identificada por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. O isolamento apresentou-se satisfatório, bem como a metodologia proposta para quantificação desta substância por CLAE-UV, que apresentou excelente linearidade, precisão e exatidão. Nos experimentos *in vitro*, a licochalcona A não demonstrou redução significativa na viabilidade das células da linhagem HepG-2 (IC<sub>50</sub> > 200 µM) e da NIH/3T3 (IC<sub>50</sub> > 100 µM), bem como no experimento de adesão das células HepG-2 (IC<sub>50</sub> > 200 µM) (p>0,05). Estes dados corroboram com aqueles encontrados no experimento *in vivo*, no qual a licochalcona A (50 mg/Kg) também não apresentou toxicidade ao fígado, já que os resultados encontrados não foram significativamente diferentes aos do grupo controle (p>0,05). Contudo, ela também não demonstrou capacidade de promover ou reduzir os danos hepáticos causado pelo BDL, no tempo de tratamento do estudo realizado (48 h).

**Palavras-chave:** licochalcona, *Glycyrrhiza*, ligação do ducto biliar, hepatoproteção.

## ABSTRACT

The natural prototypes discovery associated with methods of chemical constituents isolation and identification from new botanical sources, as well as the evaluation of pharmacological and toxicological activities of these molecules show great prospects for the new drugs rational development. In view of the high incidence of liver disease in Brazil and the world, and there are few effective drugs and able to reverse or slow the progression of these disease, the substances isolation and identification with potential hepatoprotective today is a promising area in search for new bioactive substances. Traditionally, the roots of *Glycyrrhiza sp.*, known as licorice, are used in alternative medicine with numerous purposes, among them hepatoprotective. However, to date, there are no reports of this activity linked to licochalcona A, one majority of the substances in the roots of *Glycyrrhiza inflata*. In the present study evaluated the activities of licochalcone A in cell viability assays of strains fibroblast (NIH/3T3) and human hepatocellular carcinoma (HepG-2), cell adhesion HepG-2 and model of liver injury induced by bile duct ligation (BDL) in Wistar rats. In addition, we developed a methodology for determining the licochalcone A quantitative HPLC-UV, using C<sub>18</sub> column and a mobile phase gradient of acidified water (0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and methanol (50:50 - 20:80 v/v), flow rate of 1.1 mL/min and detection wavelength at 372 nm. The licochalcone A isolated from the dried extract of the roots of *G. inflata* was identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. The isolation had to be satisfactory, as well as the proposed methodology for quantification of this substance by HPLC-UV, which showed excellent linearity, reproducibility and accuracy. In *in vitro* experiments, licochalcone A showed no significant reduction in the viability of the cell line HepG-2 (IC<sub>50</sub> > 200 μM) and NIH/3T3 (IC<sub>50</sub> > 100 μM), as well as in cell adhesion HepG-2 experiments (IC<sub>50</sub> > 200 μM) (p > 0.05). These data corroborate those found in the *in vivo* experiment, in which the licochalcone A (50 mg/kg) also showed no toxicity to the liver, since the results were not significantly different to the control group (p > 0.05). Nevertheless, it has not shown the ability to promote or reduce liver damage caused by BDL, at the treatment time of the study (48 h).

**Keywords:** licochalcone, *Glycyrrhiza*, bile duct ligation, hepatoprotection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	- Alanina transaminase
AST	- Aspartato transaminase
BDL	- Ligação do ducto biliar
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CEH	- Colestase extra-hepática
CLAE-UV	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta
CLC	- Cromatografia líquida clássica
CLV	- Cromatografia líquida a vácuo
CoA	- Coenzima A
CIM	- Concentração inibitória mínima
D	- Duplete
Dd	- Duplo duplete
DMSO	- Dimetilsulfóxido
FA	- Fosfatase alcalina
NF-kB	- Fator nuclear kB
Gi	- <i>Glycyrrhiza inflata</i>
GGT	- Gama-Glutamil Transpeptidase
GHS	- Glutathione reduzida
HepG-2	- Célula de carcinoma hepatocelular humano
IC <sub>50</sub>	- Concentração inibitória para 50% das células
iNOS	- Óxido nítrico sintase
MPO	- Mieloperoxidase
MTT	- Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil
NIH/3T3	- Fibroblasto de camundongo
NO	- Óxido nítrico
pH	- Potencial hidrogeniônico
Ppm	- partes por milhão
RMN	- Ressonância magnética nuclear
STAT-3	- Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral <i>alfa</i> ( <i>tumor necrosis factor alpha</i> )

TRAIL - Fator de necrose tumoral induzido por ligante relacionado a apoptose  
(*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)

UV - Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura química básica da chalcona (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O).....	3
<b>Figura 2</b>	Esquema geral da reação de condensação de Claisen-Schmidt em síntese química de chalconas .....	4
<b>Figura 3</b>	Esquema simplificado da rota biossintética das chalconas por via mista (acetato e chiquimato) .....	5
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da licochalcona A (C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> ) .....	6
<b>Figura 5</b>	Foto de espécies de <i>Glycyrrhiza sp.</i> .....	6
<b>Figura 6</b>	Substâncias que formam o complexo denominado silimarina .....	12
<b>Figura 7</b>	<i>Silybum marianum</i> .....	13
<b>Figura 8</b>	Fígado humano .....	14
<b>Figura 9</b>	Vesícula e vias biliares .....	15
<b>Figura 10</b>	CCD das frações 1 a 7 obtidas na CLV, a partir do extrato seco das raízes de <i>Glycyrrhiza inflata</i> . .....	26
<b>Figura 11</b>	CCD das frações Gi-1, Gi-2 e Gi-7 obtidas na CLV, a partir do extrato seco das raízes de <i>Glycyrrhiza inflata</i> . .....	26
<b>Figura 12</b>	CCD das subfrações obtidas na cromatografia líquida em coluna filtrante da fração Gi-7 (obtidas na CLV). .....	27
<b>Figura 13</b>	CCD das subfrações 17 – 25 obtidas na cromatografia líquida em coluna filtrante da fração Gi-7 (obtidas na CLV).....	27
<b>Figura 14</b>	CCD da substância purificada (LA), utilizando licochalcona A padrão (Lico A) como parâmetro de comparação.....	29
<b>Figura 15</b>	Sólido formado após a purificação e evaporação do solvente.....	29
<b>Figura 16</b>	Fluxograma das etapas realizadas.....	30
<b>Figura 17</b>	Fluxograma do estudo <i>in vitro</i> da licochalcona A .....	32
<b>Figura 18</b>	Fluxograma do estudo <i>in vivo</i> da licochalcona A .....	34
<b>Figura 19</b>	Processo cirúrgico de BDL .....	36
<b>Figura 20</b>	Comparação do fígado antes (A) e depois (B) da perfusão com solução salina.....	38
<b>Figura 21</b>	Analisador bioquímico utilizado para avaliar os parâmetros	39

	bioquímicos no soro dos animais do experimento <i>in vivo</i> .....	
<b>Figura 22</b>	Estrutura da licochalcona A (C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> ).....	43
<b>Figura 23</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H da Licochalcona A (300MHz;MeOD).....	44
<b>Figura 24</b>	Ampliação da região 7,4 a 8,1 (ppm) do espectro RMN <sup>1</sup> H da Licochalcona A (300MHz:MeOD).....	45
<b>Figura 25</b>	Esquema representativo da ressonância do Aduto de Michael.....	46
<b>Figura 26</b>	Ampliação da região 6,0 a 8,1 (ppm) do espectro RMN <sup>1</sup> H da Licochalcona A (300MHz:MeOD).....	46
<b>Figura 27</b>	Ampliação da região 0,5 a 6,5 (ppm) do espectro RMN <sup>1</sup> H da Licochalcona A (300MHz:MeOD).....	48
<b>Figura 28</b>	Espectro RMN <sup>13</sup> C da Licochalcona A (75MHz;MeOD).....	49
<b>Figura 29</b>	Cromatograma obtido a partir da análise da licochalcona A (20 µg/mL) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em Ultravioleta (CLAE-UV).....	51
<b>Figura 30</b>	Linearidade do método cromatográfico para licochalcona A.....	51
<b>Figura 31</b>	Precisão do método cromatográfico para licochalcona A (20 µg/mL).....	52
<b>Figura 32</b>	Exatidão do método cromatográfico para licochalcona A (10 µg/mL).....	53
<b>Figura 33</b>	Exatidão do método cromatográfico para licochalcona A (20 µg/mL).....	53
<b>Figura 34</b>	Exatidão do método cromatográfico para licochalcona A (100 µg/mL).....	53
<b>Figura 35</b>	Especificidade do método. Cromatograma do diluente.....	54
<b>Figura 36</b>	Especificidade do método. Cromatograma da fase móvel.....	54
<b>Figura 37</b>	Especificidade do método cromatográfico para licochalcona A (20 µg/ mL).....	55
<b>Figura 38</b>	Efeito da licochalcona A sobre a viabilidade de células HepG-2.....	56
<b>Figura 39</b>	Efeito da licochalcona A sobre a viabilidade de células NIH/3T3...	57
<b>Figura 40</b>	Efeito da licochalcona A sobre a adesão de células HepG-2.....	59
<b>Figura 41</b>	Pesos médios iniciais e finais dos animais.....	60

<b>Figura 42</b>	Peso médio dos fígados em relação ao peso dos animais.....	60
<b>Figura 43</b>	Níveis séricos de proteínas totais.....	61
<b>Figura 44</b>	Níveis séricos de Aspartato Transaminase (AST).....	62
<b>Figura 45</b>	Níveis séricos de Alanina Transaminase (ALT).....	62
<b>Figura 46</b>	Níveis séricos de Fosfatase Alcalina (FA).....	64
<b>Figura 47</b>	Atividade específica de Mieloperoxidase (MPO) extraída de tecido hepático.....	65
<b>Figura 48</b>	Níveis séricos de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Fases móveis utilizada na cromatografia líquida em coluna a vácuo do extrato seco das raízes de <i>Glycyrrhiza inflata</i> .....	26
<b>Tabela 2</b>	Frações obtidas na cromatografia líquida em coluna filtrante.....	27
<b>Tabela 3</b>	Frações obtidas na cromatografia líquida clássica (CLC) da subfração Gi-7-22.....	28
<b>Tabela 4</b>	Esquema representativo dos grupos de animais utilizados.....	37
<b>Tabela 5</b>	Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H da licochalcona A (300 MHz: MeOD) e comparação com a literatura.....	43
<b>Tabela 6</b>	Comparação dos dados espectroscópicos do RMN <sup>13</sup> C da licochalcona A com a literatura.....	48



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Substâncias naturais com atividade hepatoprotetoras .....	9
-----------------	---	---

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	2
1.2	CHALCONAS	3
1.3	LICOCHALCONA A	6
1.4	AGENTES HEPATOPROTETORES DE ORIGEM NATURAL	9
1.5	FÍGADO	13
1.6	MODELO DE LIGAÇÃO DO DUCTO BILIAR (BDL)	15
1.7	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA	17
1.7.1	Avaliação da lesão hepatocelular	18
1.7.2	Avaliação do fluxo biliar e lesão de vias biliares	18
1.8	MIELOPEROXIDASE	19
1.9	FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	24
3.2	ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO	25
3.2.1	Cromatografia líquida a vácuo	26
3.2.2	Cromatografia líquida em coluna filtrante	27
3.2.3	Cromatografia líquida em coluna clássica	28
3.2.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
3.3	PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CLAE-UV	31
3.4	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	31

3.4.1	Cultivo das células	32
3.4.2	Viabilidade celular	32
3.4.3	Adesão celular	33
3.5	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	34
3.5.1	Animais	34
3.5.2	Procedimento Cirúrgico para Ligação do Ducto Biliar (BDL)	35
3.5.3	Tratamento dos animais e preparo das amostras	37
3.5.4	Coleta sanguínea, extração de material e eutanásia	37
3.5.5	Análises bioquímicas	38
3.5.6	Extração de mieloperoxidase do tecido	39
3.5.7	Mieloperoxidase de tecido	39
3.5.8	Dosagem de proteína total pelo método BCA	40
3.5.9	Fator de necrose tumoral-alfa	41
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
4.1	IDENTIFICAÇÃO DA LICOCHALCONA-A	43
4.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA LICOCHALCONA A	50
4.2.1	Linearidade	51
4.2.2	Precisão	52
4.2.3	Exatidão	52
4.2.4	Especificidade	54
4.3	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	56
4.3.1	Viabilidade celular	56
4.3.2	Adesão celular	58
4.4	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	59
4.4.1	Peso dos animais e do fígado	59
4.4.2	Proteínas totais	61

4.4.3	Transaminases (AST e ALT)	61
4.4.4	Fosfatase alcalina	64
4.4.5	Mieloperoxidase	65
4.4.6	Fator de necrose tumoral – alfa	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>

# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, que possui 22% das espécies de plantas sobre o planeta, ainda existe uma enorme e inexplorada fonte natural de metabólitos secundários vegetais com inúmeras propriedades químicas e medicinais não reveladas (RATES, 2001). A extraordinária reserva de novas substâncias presentes no reino vegetal é ainda pouca estudada, com apenas uma pequena porcentagem das espécies vegetais investigadas quimicamente, sendo que as triagens biológica e farmacológica de seus constituintes são ainda menores (CORDELL, 2000).

Por outro lado, a descoberta de produtos naturais bioativos é constituída não apenas pela necessidade de caracterização das propriedades químicas das moléculas, mas também pela descoberta de novas substâncias que podem servir de modelos (protótipos) para o desenvolvimento de novos fármacos (MONTANARI & BOLZANI, 2001). Essa tendência, envolvendo o descobrimento de protótipos naturais, associada às metodologias de isolamento e identificação química de constituintes a partir de novas fontes botânicas, bem como da avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas dessas moléculas demonstram grandes perspectivas para o desenvolvimento racional de novos fármacos (BARREIRO, 2002; VUORELA *et al.*, 2004).

Dentro deste contexto, os produtos naturais, especialmente as plantas medicinais, possuem grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos a serem empregados na medicina humana, principalmente por meio da descoberta de substâncias pertencentes ao metabolismo secundário destas plantas.

### 1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem uma vasta e diversificada variedade de compostos orgânicos, os quais, na grande maioria, não parecem participar diretamente do crescimento e desenvolvimento destas. Além disso, há uma diferente distribuição destas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, entre limitados grupos taxonômicos dentro do reino vegetal (SIMÕES, 2007).

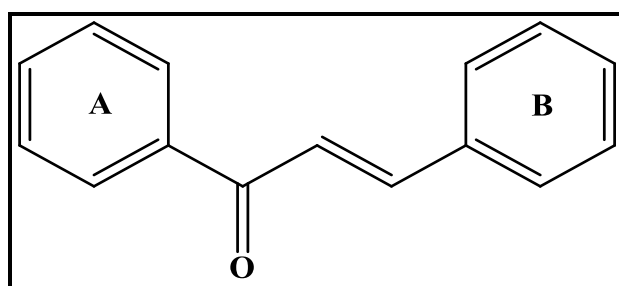
Estes metabólitos não são necessariamente produzidos sob todas as condições, e muitas de suas funções ainda permanecem desconhecidas. Alguns são, sem dúvida, produzidos por razões apreciadas, como por exemplo: materiais tóxicos, fornecendo defesa contra predadores; atrativos voláteis para as mesmas ou diferentes espécies;

corantes; agentes para atrair ou alertar as outras espécies. Mas é lógico supor que todos desempenham algum papel vital para o bem-estar do produtor, e é nesta área que as pesquisas buscam a maior parte dos produtos naturais farmacologicamente ativos (DEWICK, 2009). Dentre as várias classes de metabólitos, as chalconas tornaram-se objeto de contínuo interesse em diversas áreas de pesquisas por apresentarem diversas atividades biológicas, além de servir como protótipo para síntese e semi-síntese de novos fármacos (SAHU *et al.*, 2012).

## 1.2 CHALCONAS

As chalconas, uma das principais classes de substâncias naturais, são encontradas em plantas rasteiras e superiores, frutos, folhas e raízes. Esta ampla distribuição é justificada por serem substâncias precursoras intermediárias da rota biossintética de flavonoides e isoflavonoides. As chalconas de ocorrência natural e seus análogos sintéticos exibem um amplo espectro de atividades biológicas, e por estas razões tornou-se alvo de inúmeros estudos (SAHU *et al.*, 2012).

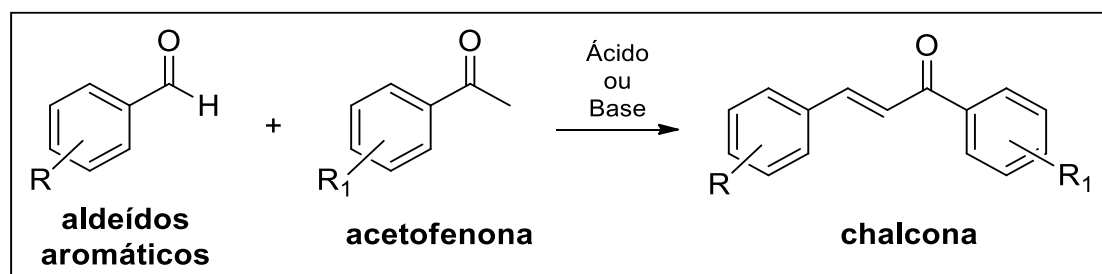
Quimicamente, as chalconas ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona são definidas como flavonoides de cadeia aberta onde os dois anéis aromáticos são ligados por um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado de três carbonos (Figura 1) (BANDGAR *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Estrutura química básica da chalcona (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O).

Elas podem existir nas formas isoméricas *cis* e *trans*, sendo a segunda a termodinamicamente mais favorável. Além disto, observa-se que o sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado está provavelmente envolvido na maioria das atividades biológicas observadas, uma vez que a remoção desta estrutura normalmente resulta em perda de sua atividade (SAHU *et al.*, 2012). Desta forma, a síntese química na busca de novas chalconas bioativas tende na preservação deste sistema e na alteração em ambos os

anéis (NI *et al.*, 2004). Em geral, a síntese das chalconas é realizada por condensação de *Claisen-Schmidt* de um aldeído e uma cetona (Figura 2) catalisada por base ou por ácido, seguido por desidratação para obtenção do produto final, as chalconas (EDDARIR *et al.*, 2003; GUIDA *et al.*, 1997; ROMANELLI *et al.*, 2011).

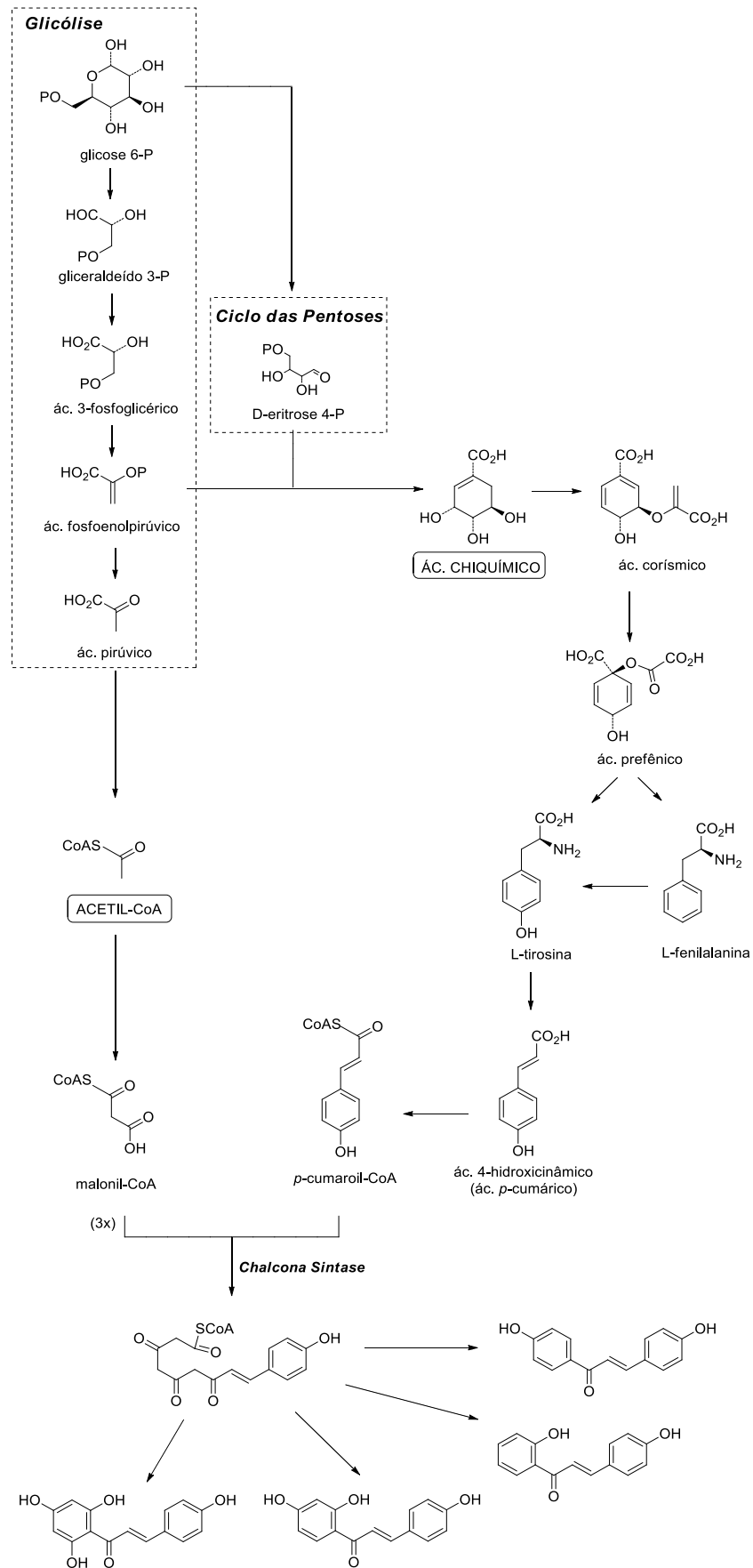


**Figura 2.** Esquema geral da reação de condensação de Claisen-Schmidt em síntese química de chalconas.

Já a biossíntese das chalcona ocorre a partir da via mista proveniente do acetato e chiquimato (Figura 3). A enzima chalcona sintase catalisa a condensação concertada de três moléculas de malonil-CoA (via do acetato) com uma molécula de 4-cumaroil-CoA (via chiquimato), formando a respectiva chalcona, um intermediário comum na formação de todos os flavonoides. Além destas, elas podem sofrer reações enzimáticas adicionais como hidroxilação, metilação, glicosilação, sulfonação, acilação/prenilação, daí a grande diversidade estrutural destas moléculas e de seus derivados (DEWICK, 2009).

As propriedades antioxidantes de compostos fenólicos, presentes em muitas chalconas, têm levantado interesse na utilização destas substâncias, ou extratos de plantas ricas em chalconas, como medicamentos ou conservantes de alimentos. Ainda, outras muitas propriedades farmacológicas têm sido descritas para estas substâncias, como: anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antimalárica, leishmanicida, citotóxica, antitumoral, hepatoprotetoras, dentre outras (NOWAKOWSKA, 2007; SAHU *et al.*, 2012).

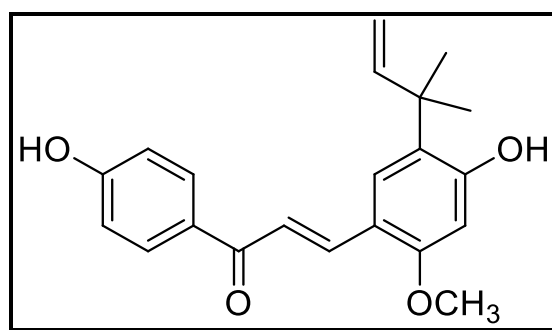




**Figura 3.** Esquema simplificado da rota biossintética das chalconas por via mista (acetato e chiquimato).  
 Fonte: Dewick (2009), com modificações.

### 1.3 LICOCHALCONA A

Dentre as chalconas, podemos destacar a licochalcona A (Figura 4), uma das principais chalconas encontrada nas raízes de *Glycyrrhiza sp* (Fabaceae), principalmente *G. inflata* (Figura 5) (FURUSAWA *et al.*; TAGO *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estrutura química da licochalcona A (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>), na forma *trans*.

As raízes de *Glycyrrhiza sp.* (conhecidas como licorice) são usadas na medicina tradicional para o tratamento da úlcera gástrica, asma brônquica e inflamação. Além disso, muitas têm sido amplamente comercializadas no Brasil e no mundo, algumas até fazendo parte da relação das plantas medicinais da Farmacopéia Brasileira 3<sup>a</sup> edição (como o alcaçuz - *Glycyrrhiza glabra*, Figura 5). O extrato destas raízes exibem várias atividades biológicas, incluindo atividade antibacteriana, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antifúngica e antiparasitária (BHATTACHARYA *et al.*; MISHRA *et al.*, 2009; NASSIRI & HOSSEINZADEH, 2008).



**Figura 5.** Foto de espécies de *Glycyrrhiza sp.* **A:** *Glycyrrhiza glabra* L.; **B:** *Glycyrrhiza inflata* Bat.  
Fonte: <http://www.fzrm.com/plantextracts/liquorice%20root>

Muitos dos efeitos biológicos das raízes de *Glycyrrhiza sp.* têm sido associado às chalconas nelas presentes, principalmente à licochalcona A, como por exemplo, atividades antibacteriana, antimicobacteriana, leishmanicida, antimalárica, imunomodulatória, antitumoral, antioxidante e inibição enzimáticas (NASSIRI & HOSSEINZADEH, 2008; SAHU *et al.*, 2012).

Haraguchi e colaboradores (1998), demonstraram a potente atividade antibacteriana da licochalcona A isolada de *Glycyrrhiza sp.*, especialmente para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 3,13 µg/mL. Posteriormente, seu efeito contra *S. aureus* resistente a meticilina foi observado com uma CIM igual a 6,25 µg/mL (HATANO *et al.*, 2000). Além do mais, foi demonstrado que o substituinte hidroxila na posição 4', no anel aromático A, é necessário para sua atividade contra o *S. aureus* e que a alteração no números de carbonos presentes no substituinte prenila também resulta em alteração de sua atividade. Se o grupo prenila for removido, tem-se a perda de sua atividade, se for trocado por um grupo propila, sua atividade é reduzida para moderada, enquanto que se for introduzido um grupo de cadeia longa (ex. seis carbonos) observa-se um aumento da atividade antibacteriana (KROMANN *et al.*, 2004). A licochalcona A também inibiu (CIM ≤ 20 µg/mL) *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. xenophii* e *M. marinum* (FRIIS-MOLLERETAL, 1998).

A atividade antimalárica de chalconas foi reportada pela primeira vez quando licochalcona A, isolada de raízes de licorice, exibiu potente atividade contra o *Plasmodium falciparum*, sendo demonstrado que esta substância inibe as enzimas ubiquinol-citocromo C redutase e a succinato-ubiquinona redutase, ambas na mitocôndria do *P. falciparum* (CHEN *et al.*, 1994).

Foi demonstrada também a eficiente inibição exercida pela licochalcona A na proliferação das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* e *L. major*, em experimentos *in vitro*, por inibição da fumarato redutase, uma enzima presente na mitocôndria deste parasita (CHEN *et al.*, 1993; KAYSER & KIDERLEN, 2001).

Já a investigação dos efeitos da licochalcona A sobre a proliferação de células sanguíneas mononucleares e sobre a produção de citocinas demonstrou seu potencial efeito imunomodulatório (BARFOD *et al.*, 2009). Ela foi capaz de inibir: a) o gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT 3), que está envolvido diretamente em doenças auto-imunes, como a esclerose múltipla; b) fator nuclear kB

(NF- $\kappa$ B), que atua na regulação da expressão de diversos genes relacionados à resposta imunológica e inflamatória; c) a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO) envolvido na resposta inflamatório (FUNAKOSHI-TAGO *et al.*, 2008; 2009; 2010).

Além disso, a licochalcona A foi capaz de aumentar a produção de fator de necrose tumoral induzido por ligante relacionado a apoptose (TRAIL- do inglês *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), apresentando assim citotoxicidade em células de câncer de próstata. O TRAIL induz uma morte programada em várias células cancerígenas sem ser tóxico para células normais (SZLISZKA *et al.*, 2010a; 2010b).

O potencial antioxidante da licochalcona A foi demonstrado em diferentes ensaios: a) captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila); b) inibição da formação do ânion superóxido; c) inibição da peroxidação lipídica de microsomas e mitocôndria do fígado de ratos. Nos dois primeiros, a licochalcona A apresentou  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ . Já a peroxidação lipídica mitocondrial demonstrou-se mais sensível à licochalcona A, com completa inibição na concentração de  $1 \mu\text{g/mL}$  (HARAGUCHI *et al.*, 1998). O estresse oxidativo pode ser um fator importante em inúmeras patologias, dentre elas nas doenças hepáticas. Os níveis de espécies reativas oxidantes são controlados por um sistema de defesa antioxidante, sendo este um dos principais mecanismos pelos quais as substâncias promovem proteção aos danos hepáticos (MAYER *et al.*, 2005; NEGI & KUMAR, 2008).

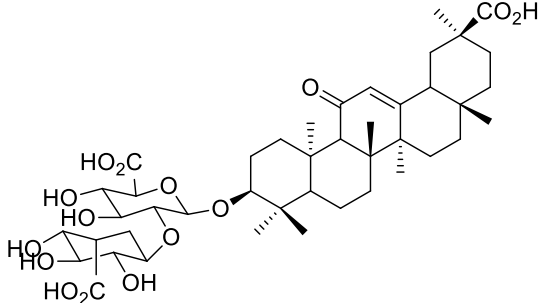
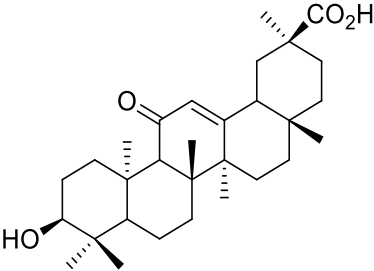
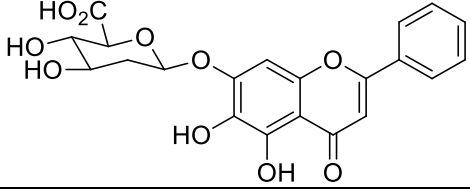
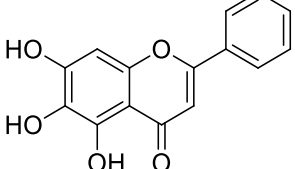
Entretanto, apesar dos indícios que as raízes de *Glycyrrhiza sp.* exibem alguma atividade hepatoprotetora (BHATTACHARYA *et al.*; MISHRA *et al.*, 2009; NASSIRI & HOSSEINZADEH, 2008), ainda não existe nenhum estudo desta atividade vinculado especificamente a licochalcona A, o que pode ser um campo para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos hepatoprotetores, assim como outros advindo de origem natural.

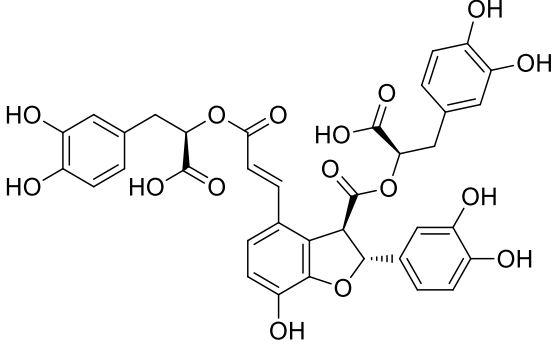
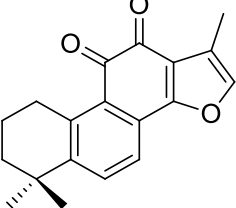
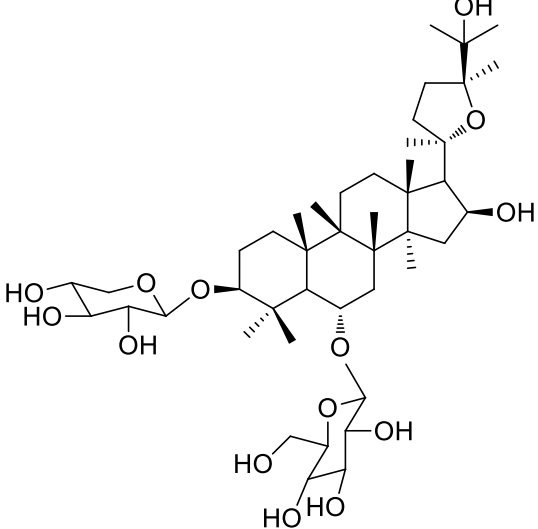
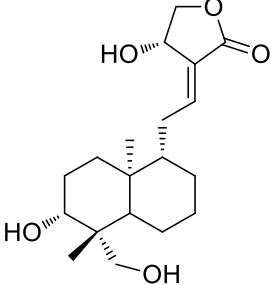
Assim, tendo em vista o potencial antioxidante da licochalcona A e sua grande capacidade de inibir a peroxidação lipídica, associado ao ineditismo de estudo que investigue sua atividade hepatoprotetora, justifica-se a presente pesquisa tendo a licochalcona A como um possível agente hepatoprotetor de origem natural.

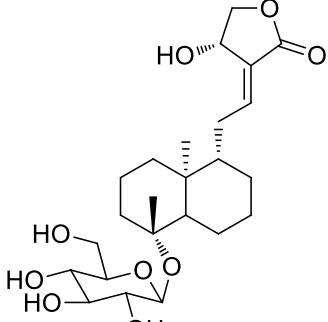
## 1.4 AGENTES HEPATOPROTETORES DE ORIGEM NATURAL

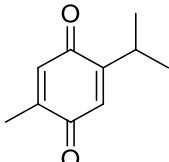
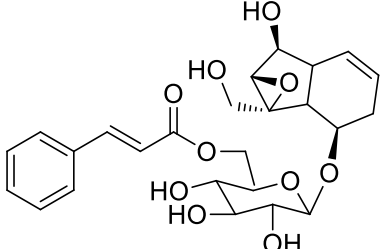
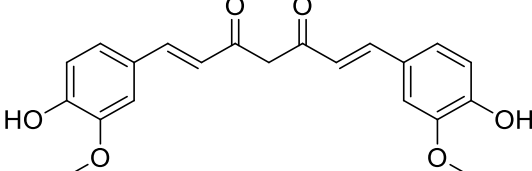
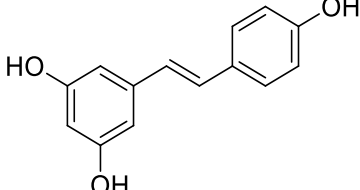
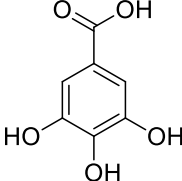
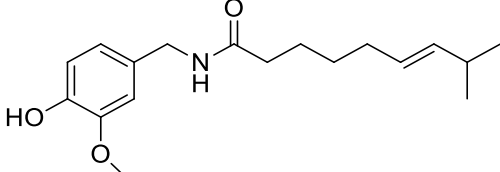
As poucas opções terapêuticas atuais para o tratamento de doenças do fígado tornou a pesquisa de agentes hepatoprotetores de origem natural uma questão importante para o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas. Assim, o isolamento e a identificação de substâncias com potencial hepatoprotetor é, hoje, uma área promissora na terapia das desordens hepáticas, uma vez que existem poucos medicamentos eficazes e capazes de reverter ou reduzir a progressão de doenças do fígado (CHIEN *et al.*, 2011). Assim sendo, várias substâncias já foram identificadas como hepatoprotetoras em diversas plantas medicinais, conforme demonstrado na quadro 1.

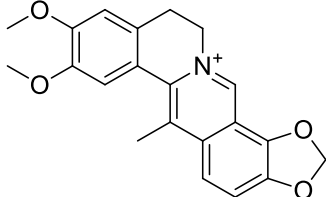
**Quadro 1.** Substâncias naturais com atividade hepatoprotetoras.

Nome	Estrutura Química	Planta
Silimarina	Figura 6	<i>Silubum matianum</i>
Glicirrizina		<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Ácido glicirrético		<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Baicalina		<i>Scutellaria baicalensis</i>
Baicaleína		<i>Scutellaria baicalensis</i>

Nome	Estrutura Química	Planta
Ácido salvianólico B		<i>Salvia miltiorrhiza</i>
Tanshinona diterpenoidica		<i>Salvia miltiorrhiza</i>
Astragalosídeo IV		<i>Astragaphis paniculata</i>
Andrografolídeo		<i>Andrographis paniculata</i>

Neoandrografolídeo		<i>Andrographis paniculata</i>
--------------------	---	--------------------------------

Nome	Estrutura Química	Planta
Timoquinona		<i>Nigella sativa</i>
Picrosídeo I		<i>Picrorrhiza kurroa</i>
Curcumina		<i>Curcuma longa</i>
Resveratrol		Uvas e vinho tinto
Ácido gálico		<i>Acacia confusa</i>
Capsaicina		<i>Piper nigrum</i>

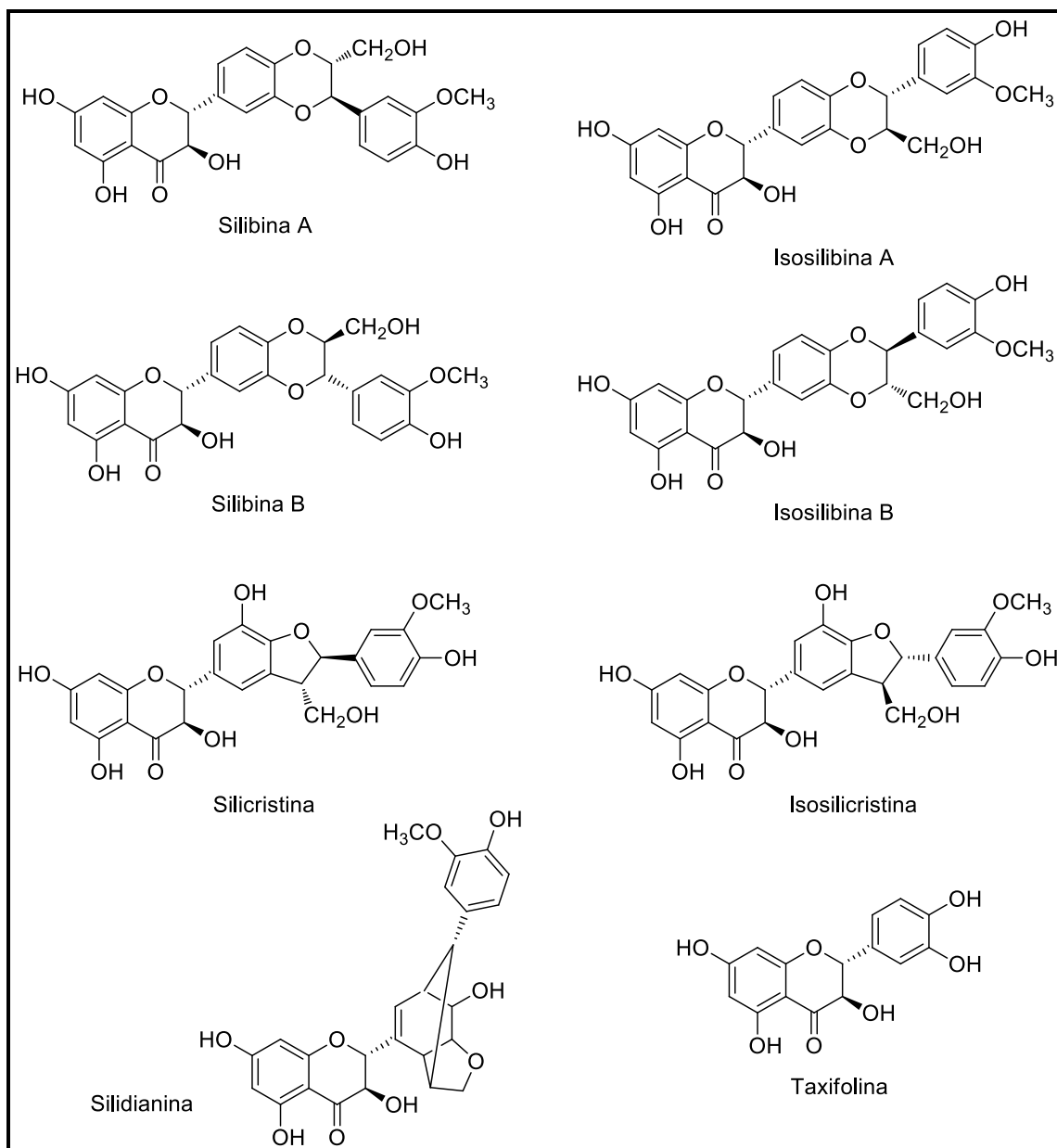
Diidrocauidina		<i>Corydalis saxicola</i>
----------------	---	---------------------------

Fontes: ADEWUSI & AFOLAYAN, 2010; CHIEN *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2012; MURIEL & RIVERA-ESPINOSA, 2008; NAGALEKSHMT *et al.*, 2011; TUNG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008.

Além destas substâncias, inúmeros outros extratos ou frações já foram testados e também apresentaram promissora ação protetora hepática. Assim sendo, um grande número de plantas e formulações já possuem reconhecidas atividades hepatoprotetora, algumas tendo sido inclusive patenteadas (VISHNU-PRIYA *et al.*, 2010).

Entre eles, destaca-se a silimarina, um medicamento utilizado pela medicina como hepatoprotetor. Na verdade, silimarina é um nome dado a um complexo com oito substâncias (Figura 6), sendo sete flavonolignanas: silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, isosilicristina, silidianina; e um diidroflavanol, taxifolina (CHIEN *et al.*, 2011).





**Figura 6.** Substâncias que formam o complexo denominado silimarina. Fonte: do Autor 2013.

Extraída do fruto da *Silybum marianum* (Figura 7) e comercializada na forma de extrato seco padronizado, a silimarina é utilizada para o tratamento de doenças hepáticas caracterizadas por necrose e prejuízo funcional, como cirrose, icterícia e hepatite (MURPHY *et al.*, 2000; NEGI & KUMAR, 2008). Outrora, a silimarina tem sido apontada como um benéfico adjuvante na quimioterapia, objetivando uma redução no dano hepático causado pelos quimioterápicos (COMELLI *et al.*, 2007).



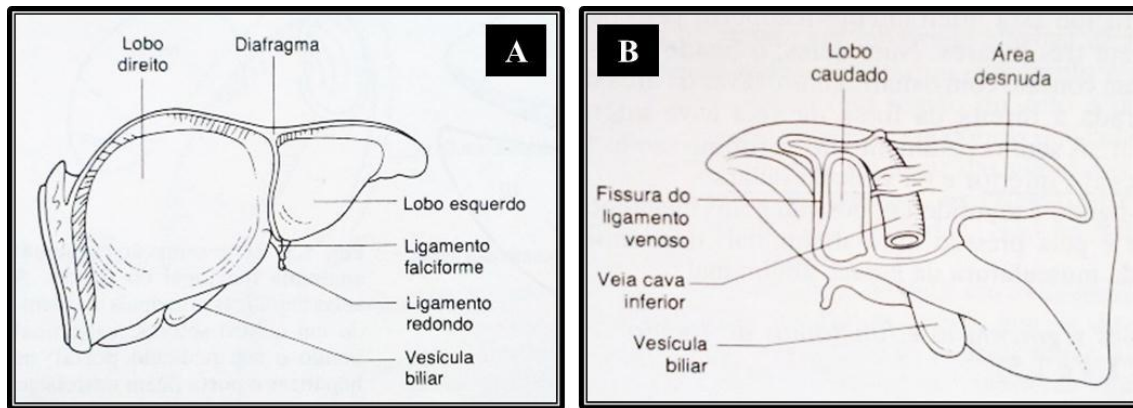
**Figura 7.** *Silybum marianum*

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Silimarina>

O mecanismo de ação da silimarina ainda não é bem esclarecido, mas possivelmente sua ação de proteção do fígado está associada ao seu potencial antioxidante e inibição da peroxidação lipídica. Mas outras hipóteses são levantadas a respeito de seu(s) mecanismo(s), como: indução da enzima superóxido dismutase nos eritrócitos e linfócitos; estabilização da estrutura da membrana dos hepatócitos, impedindo assim a entrada de toxinas; regeneração do fígado; estimulação da polimerase nucleolar; aumento da síntese proteica; manutenção dos níveis de glutathione (MAYER *et al.*, 2005; NEGI & KUMAR, 2008).

## 1.5 FÍGADO

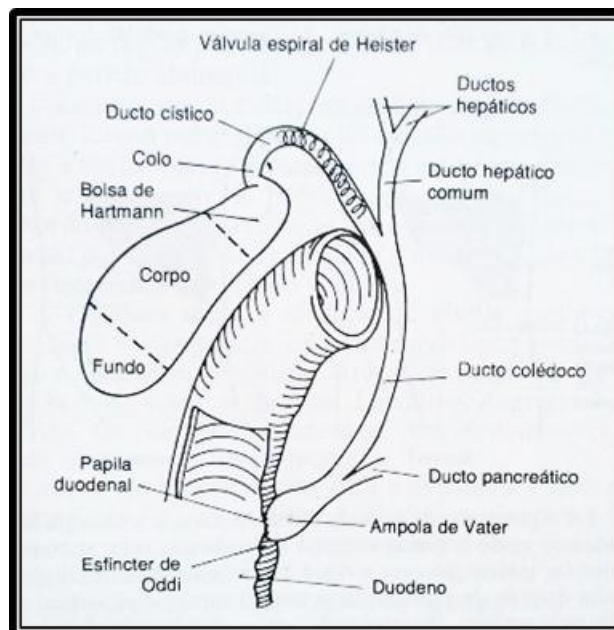
O fígado humano é o órgão mais volumoso do organismo. Consiste de dois lobos principais que juntos pesam entre 1.200 e 1.600 g no adulto normal. Está localizado no quadrante direito superior do abdome, logo abaixo do diafragma (DOOLEY & SHERLOCK, 2002).



**Figura 8.** Fígado humano. A: visão anterior; B: visão posterior. Fonte: DOOLEY & SHERLOCK 1989.

O fígado possui dupla vascularização, sendo o seu suprimento sanguíneo proveniente da veia portal e da artéria hepática. A primeira carrega o sangue venoso do sistema digestório (estômago, intestino delgado e grosso, pâncreas e baço) diretamente ao fígado, e a última (uma ramificação da aorta) fornece o sangue arterial (oxigenado). A importância fisiológica do fluxo portal deve-se ao fato de todos os nutrientes provenientes da digestão dos alimentos no sistema digestório, com exceção das gorduras, passarem inicialmente pelo fígado antes de atingir a circulação geral. No tecido hepático, estes vasos subdividem-se em numerosas ramificações para formar uma grande rede vascular (SAHU, 2007).

O fígado possui uma estrutura anatômica única. As células hepáticas estão em contato com a circulação sanguínea de um lado e com o canalículo biliar do outro. Desse modo, cada célula hepática (hepatócito) tem uma grande área em contato tanto com um sistema nutricional, proveniente dos sinusóides (“capilares” da veia portal), quanto com um sistema de escoamento, o canalículo biliar que transporta as secreções e excreções dos hepatócitos. A bile é um líquido viscoso produzido neste processo. Os ductos biliares direito e esquerdo emergem dos respectivos lobos hepáticos e se reúnem no hilo hepático para formar o ducto hepático comum. O ducto cístico, proveniente da vesícula biliar, se une a este para formar o ducto biliar comum (ducto colédoco; Figura 8), que conduzem as secreções biliares ao intestino delgado (DOOLEY & SHERLOCK, 2002).



**Figura 9.** Vesícula e vias biliares. Fonte: DOOLEY & SHERLOCK 1989.

Várias são as perturbações fisiopatológicas do sistema hepatobiliar, dentre elas a colestase é caracterizada como a incapacidade de quantidade suficiente da bile em alcançar o duodeno. O termo “colestase” vem do grego “*Chole*”, que significa “bile” e “*estase*”, igual a “parado”. Portanto, colestase é o nome dado à redução do fluxo biliar: por diminuição ou interrupção do mesmo, que pode ser o resultado de uma falha nos transportes de hepatócitos ou células ductulares; ou pelo bloqueio físico dos ductos biliares externos. O primeiro é considerado intra-hepática e o último colestase extra-hepática (CEH), que pode ser causado por uma pedra ou um tumor ao nível das vias biliares extra-hepáticas. A utilização de animais para reproduzir a doença colestática no ser humano é uma ferramenta útil para estudar a fisiopatologia da doença, bem como para testar o potencial de medicamentos que possam atuar na promoção e/ou prevenção dos danos causados por esta desordem (SILVEIRA & LINDOR, 2008).

## 1.6 MODELO DE LIGAÇÃO DO DUCTO BILIAR (BDL)

O conhecimento evolutivo das respostas metabólicas do fígado em suas perturbações fisiopatológicas, como a colestase, melhora o entendimento sobre sua resposta inflamatória e conseqüentemente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que a inibição de mecanismos de sinalização retarda a progressão da fibrose biliar e hepática. Além disso,

muitas drogas têm sido estudadas para o tratamento, incluindo agentes com propriedades anti-inflamatória e imunossupressora. Uma eficiente terapia reduziria a necessidade de transplante e aumentaria a expectativa de vida destes pacientes (SILVEIRA & LINDOR, 2008).

Os efeitos da ligação do ducto biliar convencional (BDL) sobre a morfologia hepática foram examinados extensivamente desde a publicação dos primeiros estudos histológicos, cerca de 70 anos atrás (CAMERON & OAKLEY, 1932, CAMERON & HASAN, 1958).

Kountouras e outros (1984) relataram um estudo sistemático de BDL prolongado como um modelo para a cirrose no rato, submetendo os animais à ligação do ducto biliar comum, com a seção entre as duas ligaduras e estudando-os até 52 dias após o procedimento de BDL. Nos cinco primeiros dias de BDL houve: proliferação de ductos biliares; edema leve; reação inflamatória aguda em áreas do portal; pequena fibrose e limitada às regiões de formação de novas vias biliares; infiltração de leucócitos ao redor dos ductos biliares; hepatócitos contendo numerosas figuras de mitose; e necrose tecidual. O experimento de BDL por dez dias foi acompanhado por fibrose e proliferação ducto biliar em áreas do portal, além de infartos biliares, que ocasionalmente foram observados neste local. Já a obstrução biliar por 15 dias induziu a produção de septos fibrosos nas áreas de portal em ponte estendida no lóbulo. Depois de 28 dias de obstrução do fluxo biliar, a maioria dos animais apresentaram cirrose e fibrose concêntrica, observada em torno dos ductos biliares interlobulares e septal. Todos os ratos ligados durante trinta dias ou mais mostraram cirrose com ascite.

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, 2007).

Evidências indicam que os radicais livres, o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica podem estar presentes em danos colestáticos, induzindo alterações celulares,

além de estarem 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 colestático e a terapia antioxidante é uma estratégia terapêutica recomendada (SAHU, 2007). Neste contexto, as chalconas e seus derivados apresentam, em sua maioria, características antioxidantes capazes de torná-las de grande interesse em estudos de modelos hepatoprotetores.

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 (ADEWUSI & AFOLAYAN, 2010). Além disso, vale ressaltar, novamente, que este estudo dos efeitos hepatoprotetores é inédito para a licochalcona A.

## **1.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA**

As condições fisiológicas do fígado, bem como a integridade das organelas das membranas hepatocelulares e a habilidade do órgão em realizar diversas reações de metabolismo e secreção da bile, podem ser monitoradas pela atividade de várias enzimas. Alterações podem ser seguidas ou não de manifestações clínicas ou anormalidades laboratoriais, além do diagnóstico poder ser confirmado pelo exame histopatológico de fragmentos do tecido hepático (MILLS, 2012). Entretanto, os exames laboratoriais ocupam importante papel, não apenas para esclarecimento do diagnóstico, mas também na avaliação da gravidade das hepatopatias, seu prognóstico, monitorização de conduta terapêutica e, ainda, como critério de cura ou remissão da doença hepática (GAYOTTO *et al.*, 2011).

O importante papel metabólico do fígado é a base das alterações bioquímicas precoces que o portador de uma hepatopatia aguda ou crônica apresenta, uma vez que, o metabolismo hepático está relacionado a um complexo de enzimas. A capacidade das vias metabólicas hepáticas é a função direta de sua integridade estrutural, além de diferenciar alterações extras e intracelulares (FRANÇA, 2004).

Mesmo havendo divergências, os testes de função hepática incluem a avaliação sérica das enzimas Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transaminase (ALT), Gama-Glutamil Transpeptidase (Gama-GT) e Fosfatase Alcalina (FA), além de outras avaliações laboratoriais bioquímicas (ex.: bilirrubinas), como parâmetros para fornecer informação sobre o estado do fígado de um paciente. A maioria das doenças hepáticas

apresenta apenas sintomas leves iniciais, o que torna esses testes vitais para que tais doenças sejam detectadas precocemente, uma vez que o envolvimento do fígado em algumas doenças pode ser de importância crucial. Estes testes são realizados através de amostra obtida do sangue do paciente (DOOLEY & SHERLOCK, 2002).

### **1.7.1 Avaliação da lesão hepatocelular**

A lesão ou dano dos hepatócitos, normalmente, podem ser avaliados pelas enzimas transaminases (ALT e AST). Essas enzimas catalisam inúmeras reações de síntese proteica e degradação de aminoácidos, por meio de transferência de grupo amino de um aminoácido para outras substâncias. Dentre as transaminases, duas se destacam, por terem maior interesse médico quando se trata de avaliação das condições hepáticas: alanina e aspartato transaminases (MOTTA, 2009).

A alanina transaminase (ALT), também chamada transaminase glutâmica pirúvica sérica (SGPT ou TGP) ou alanina aminotransferase (ALAT), é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo amino da alanina para o  $\alpha$ -cetoglutarato, formando glutamato e piruvato. Já a aspartato transaminase (AST), também chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (SGOT ou TGO) ou aspartato aminotransferase (ASAT), catalisa a interconversão de aspartato e  $\alpha$ -cetoglutarato em oxoacetato e glutamato (DOOLEY & SHERLOCK, 2002).

As diferentes localizações dessas duas enzimas levaram a observações e especulações com relação aos seus papéis no diagnóstico e prognóstico das alterações hepáticas. A ALT é encontrada em altas concentrações no citoplasma dos hepatócitos, enquanto que a AST, além de presente no fígado (principalmente na mitocôndria), é também encontrada nos músculos esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos (glóbulos vermelhos do sangue), ou seja, quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue (MILLS, 2012).

### **1.7.2 Avaliação do fluxo biliar e lesão de vias biliares**

Fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e bilirrubina são os principais marcadores biológicos para avaliação de alterações no fluxo biliar e lesões nestas vias.

Na verdade, fosfatase alcalina (FA), trata-se não de uma enzima, mas de uma família de enzimas fosfomonoesterases, presente em praticamente todos os tecidos. No

fígado, é encontrado principalmente nos microvilos dos canalículos biliares e na superfície sinusoidal dos hepatócitos, podendo ser liberada em condições fisiológicas e patológicas. Em condições patológicas, como obstrução biliar, o aumento da FA hepática é evidente, onde o acúmulo de sais biliares a solubilizam e a obstrução promove a sua regurgitação entre as células hepáticas até o sangue (MARTINS *et al.*, 2001).

A gama-glutamil transferase (GGT) é uma enzima encontrada principalmente no fígado, rins, pâncreas, intestino e próstata. No fígado sua função está associada com a manutenção dos níveis de glutathione reduzida (GSH), que está relacionada, entre outros, com o processo de defesa aos xenobióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Como a FA, o aumento dos níveis séricos de GGT está associado a desordens hepatobiliares, já que também está presente em células epiteliais que revestem os ductos biliares (MOTTA, 2009).

## **1.8 MIELOPEROXIDASE**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que pertence à família das hemeperoxidases, presente principalmente em neutrófilos e monócitos (PROKOPOWICZ *et al.*, 2012). 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 hipiodoso (HOI). O primeiro apresenta-se em maior proporção, devido a elevada concentração de Cl- nos fluidos biológicos (VAN DER VEEN, 2009). O aumento de MPO está condicionado a patologias, como por exemplo, a aterosclerose, fibrose pulmonar, endometriose e câncer.

Uma espécie reativa de oxigênio é mantida em equilíbrio no organismo porque um desequilíbrio pode causar dano tecidual e, para conseguir esse equilíbrio, enzimas como catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase, convertem essas espécies reativas de oxigênio em compostos atóxicos. No mais, substâncias como o ácido ascórbico, vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), glutathione, carotenoides, flavonoides e outros antioxidantes presentes na alimentação atuam impedindo o estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2007).

## **1.9 FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA**



O Fator de Necrose Tumoral-alfa (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. Ele é secretado por macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e natural killer (NK) (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 *et al.*, 2000) e em pacientes com doenças hepáticas causadas pelo alcoolismo (FELVER, *et al.* 1990).

O TNF- $\alpha$  está presente em vários modelos de lesão hepática, como induzida por álcool ou por dimetilnitrosamina (KITAMURA *et al.*, 2002; YIN *et al.*, 1999), e pode ainda ativar as células hepáticas estreladas em experimentos *in vitro*. Além disso, este fator induz a insuficiência hepática ou pode agravar a lesão hepática após exposição ao tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (CZAJA *et al.*, 1995).

Por outro lado, o TNF- $\alpha$  é necessário para regeneração do fígado após hepatectomia parcial (YAMADA *et al.*, 1997). Em experimento de BDL, os níveis de TNF-  $\alpha$  estão aumentados tanto a níveis séricos (BEMELMANS *et al.*, 1992) quanto em macrófagos hepáticos (FOX *et al.*, 1997).

# OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar a licochalcona A, a partir do extrato seco de raízes de *Glycyrrhiza inflata* e avaliar suas atividades citotóxica *in vitro* e hepatoprotetora em modelo de lesão hepática em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Isolar e purificar a licochalcona A a partir do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*;
- 2) Identificar a estrutura química da licochalcona A por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- 3) Desenvolver metodologia analítica para determinação da licochalcona A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- 4) Avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica da licochalcona A frente as linhagens celulares de carcinoma hepático humano (HepG-2) e fibroblasto (NIH/3T3);
- 5) Avaliar a influência da licochalcona A sobre a adesão celular em cultura de células de carcinoma hepático humano (HepG-2);
- 6) Avaliar o efeito hepatoprotetor da licochalcona A em modelo de lesão hepática induzida pela ligação do ducto biliar (BDL) em ratos;

# MATERIAL E MÉTODOS

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

A etapa de isolamento e purificação da licochalcona A foi realizada no Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), que dispôs dos seguintes equipamentos e materiais utilizados:

- Extrato seco comercial das raízes de *Glycyrrhiza inflata*;
- Licochalcona A padrão (*Merck*);
- Solventes de grau P.A. (pró-analítico), das marcas: *Vetec*, *Cromato Produtos Químicos LTDA*, *Quemis*, *Isofar* e *Alphatec*;
- Sílica (70 a 230  $\mu\text{m}$ , *Merck*);
- Sílica (40 a 63  $\mu\text{m}$ , *Merck*);
- Cromatofolhas para cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa, utilizando sílica gel 60 F<sub>254</sub> (espessura de 250  $\mu\text{m}$ ), em folha de alumínio (*Merck*);
- Coluna de vidro para cromatografia a vácuo (10 cm de diâmetro), contendo placa sinterizada de 2,5 cm de altura;
- Coluna de vidro para cromatografia líquida filtrante (10 cm de diâmetro), contendo placa sinterizada de 2,5 cm de altura;
- Coluna de vidro para cromatografia líquida clássica (4 cm de diâmetro);
- Rotaevaporador *Buchi* RII;
- Bomba *Buchi* V-700.

O Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da UFJF disponibilizou a utilização do espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/300 para realização dos RMN de <sup>1</sup>H e <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 microplaca;
- 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>, modelo);
- Centrífuga (Centribio);
- Banho Maria (Nova Técnica<sup>®</sup>, modelo NT 265);
- Purificador de Água Osmose Reversa (Cienlab<sup>®</sup>);
- Meio de cultura e reagentes de pureza e esterilidade adequada, dos seguintes fornecedores: Merck, Cutilab, Sigma-Aldrich, Labtest, Thermo Scientific, BioLegend.

O perfil cromatográfico da licochalcona A em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizado no Laboratório de Farmacologia do ICB da UFJF, utilizando 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, 5 $\mu$ m (Waters<sup>®</sup>, modelo X-Bridge).

O Laboratório de Hepatologia Experimental da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) disponibilizou todos os aparatos para a realização das cirurgias realizadas nos animais.

As dosagens bioquímicas foram realizadas em parceria com o Laboratório Santarosa de Análises Clínicas (Andrelândia/MG), que forneceu os kits *Labtest*<sup>®</sup> e analisador bioquímico (Labtest<sup>®</sup>, modelo Labquest) para tais dosagens.

### **3.2 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO**

O isolamento da licochalcona A, a partir do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*, foi realizado por sucessivos processos de separação utilizando diferentes tipos de cromatografia líquida em coluna, a saber: a) cromatografia líquida a vácuo; b) cromatografia líquida em coluna filtrante; c) cromatografia líquida clássica. A purificação final procedeu-se por lavagem das frações obtidas, contendo a licochalcona A, usando-se clorofórmio. Após esta etapa de purificação, a licochalcona A foi identificada e seus efeitos biológicos avaliados em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

### 3.2.1 Cromatografia líquida a vácuo

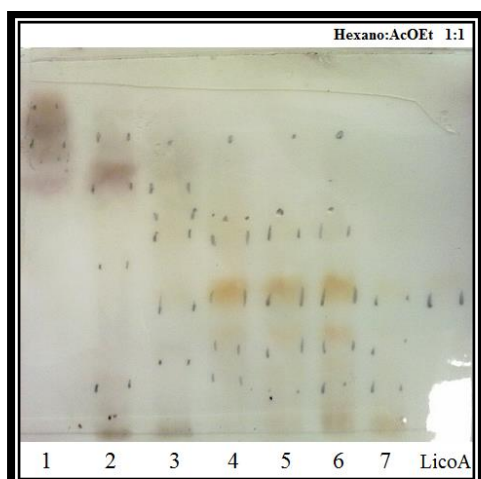
Inicialmente, o extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (50,0 g), comercialmente disponível, foi submetido à cromatografia líquida a vácuo (CLV), utilizando 500,0 g sílica (40 – 63  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária (altura=12 cm) e fases móveis com polaridades crescentes e volumes variados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Fases móveis utilizada na cromatografia líquida em coluna a vácuo do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*.

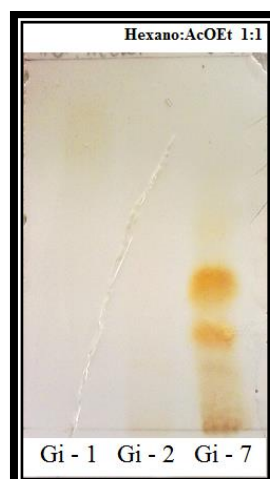
Fração	Fase Móvel*	Proporção (%)
1	Hex : AcOEt	80:20
2	Hex : AcOEt	70:30
3	Hex : AcOEt	50:50
4	Hex : AcOEt	30:70
5	AcOEt	100
6	AcOEt : MeOH	50:50
7	MeOH	100

\* Acidificada com 0,2 % de ácido acético. Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: álcool metílico.

Após eluição da CLV foram obtidas sete frações, as quais foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 10), sendo possível agrupar as frações 3 a 7 em uma única fração denominada Gi-7 (massa igual a 49,0 g) (Figura 11).



**Figura 10.** CCD das frações 1 a 7 obtidas na CLV, a partir do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*. Fase móvel: hexano:acetato de etila (AcOEt) (1:1, v/v) e ácido acético (0,2%); Revelador: anisaldeído. Fonte: NIPPAN. Foto: do Autor (2013).



**Figura 11.** CCD das frações Gi-1, Gi-2 e Gi-7 obtidas na CLV, a partir do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*, Fase móvel: hexano:acetato de etila (AcOEt) (1:1, v/v) e ácido acético (0,2%); Revelador: anisaldeído. Fonte: NIPPAN. Foto: do Autor (2013).

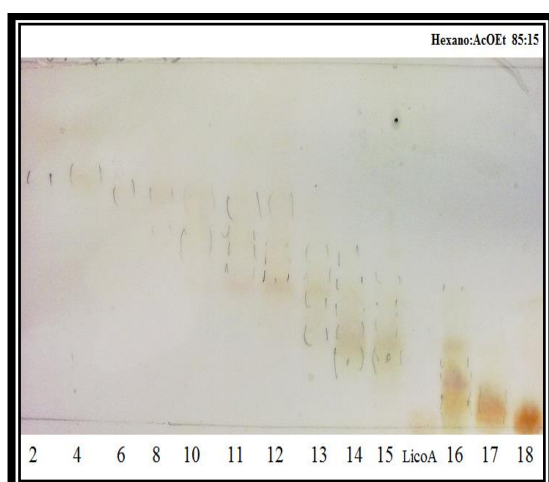
### 3.2.2 Cromatografia líquida em coluna filtrante

No intuito de melhorar a separação dos constituintes do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*, a fração Gi-7 foi submetida à cromatografia líquida em coluna filtrante, utilizando 627,0 g de sílica (70 a 230  $\mu\text{m}$ , Merck) como fase estacionária, empacotada com 25 cm de altura. A amostra foi aplicada na forma de uma pastilha, formada pela mistura de 49,0 g da fração Gi-7 e 51,0 g da mesma sílica. Em seguida, procedeu-se a eluição das fases móveis, com polaridades crescentes e volumes variados, obtendo-se 27 subfrações. Após análise destas em CCD (Figura 12 e 13) utilizando padrão de licochalcona A (Merck), foi possível agrupar algumas frações (tabela 2).

**Tabela 2.** Frações obtidas na cromatografia líquida em coluna filtrante.

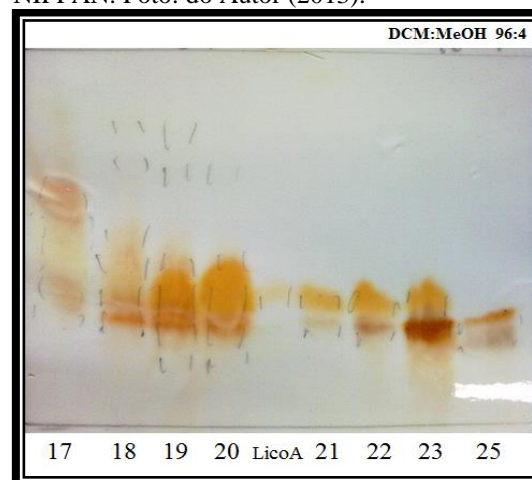
Eluentes*	Subfração	Denominação	Massa (g)
Hex : AcOEt 5, 10 e 15%	1 – 9	Gi-7-09	0,06
Hex : AcOEt 30%	10 – 12	Gi-7-12	0,16
Hex : AcOEt 30 e 45%	13 – 15	Gi-7-15	0,65
Hex : AcOEt 45%	16	Gi-7-16	1,25
Hex : AcOEt 45%	17 - 18	Gi-7-18	4,12
Hex : AcOEt 60%	19 - 20	Gi-7-20	2,46
Hex : AcOEt 60%	21 - 22	Gi-7-22	9,51
Hex : AcOEt 60 e 80%	23 - 24	Gi-7-24	4,30
Hex : AcOEt 80%	25	Gi-7-25	2,70
Hex : AcOEt 80%	26	Gi-7-26	1,96
DCM : $\text{CHCl}_3$ : MeOH	27	Gi-7-27	3,15

\* Acidificada com 0,2 % de ácido acético. Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: álcool metílico; DCM: diclorometano;  $\text{CHCl}_3$ : clorofórmio.



**Figura 12.** CCD das subfrações obtidas na cromatografia líquida em coluna filtrante da fração Gi-7 (obtidas na CLV). Fase móvel: hexano:acetato de etila (AcOEt) (85:15, v/v) e ácido acético (0,2%); Revelador: anisaldeído;

Lico A: licochalcona A padrão (Merck). Fonte: NIPPAN. Foto: do Autor (2013).



**Figura 13.** CCD das subfrações 17 – 25 obtidas na cromatografia líquida em coluna filtrante da fração Gi-7 (obtidas na CLV). Fase móvel: diclorometano:álcool metílico (DCM:MeOH,



96:4, v/v) e ácido acético (0,2%); Revelador: (Merck). Fonte: NIPPAN. Foto: do Autor (2013).  
 anisaldeído; Lico A: licochalcona A padrão

### 3.2.3 Cromatografia líquida em coluna clássica

Visando isolar a licochalcona A, a subfração Gi-7-22 foi submetida à cromatografia líquida clássica (CLC), tendo em vista que esta subfração continha a licochalcona A (por análise de CCD), e que ainda era observada uma melhor separação entre as substâncias nela presente.

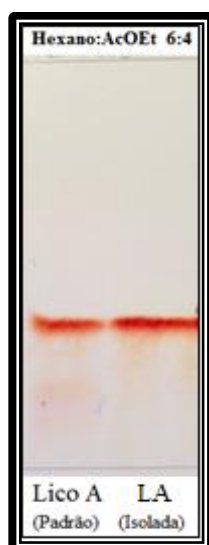
Utilizando fases móveis com polaridades crescentes e volumes variados, a CLC foi realizada em coluna de vidro empacotada com 150 g de sílica (70 a 230  $\mu\text{m}$ ), fase estacionária (25 cm de altura). Após a eluição dos sistemas-solventes através da amostra [Gi-7-22 (9,5 g), Celite (4 g) e sílica 70 a 230  $\mu\text{m}$  (4 g)] foram obtidos 48 frações, conforme demonstrado na tabela 3.

**Tabela 3.** Frações obtidas na cromatografia líquida clássica (CLC) da subfração Gi-7-22.

Eluentes*	Volume (mL)	Frações
Hex : AcOEt 5%	500	1
Hex : AcOEt 7%	500	1
Hex : AcOEt 10%	500	1
Hex : AcOEt 15%	500	1
Hex : AcOEt 20%	750	1 – 2
Hex : AcOEt 30%	750	3 – 6
Hex : AcOEt 40%	3500	7 – 35
Hex : AcOEt 45%	300	36
Hex : AcOEt 50%	750	37 – 39
Hex : AcOEt 60%	750	40 – 42
Hex : AcOEt 70%	750	43 – 45
Hex : AcOEt 80%	500	46 – 47
DCM : $\text{CHCl}_3$ : MeOH	1000	48

\* Acidificada com 0,2 % de ácido acético. Hex: hexano, AcOEt: acetato de etila, MeOH: álcool metílico,  $\text{CHCl}_3$ : clorofórmio.

Analisando estas frações por CCD e utilizando o padrão de licochalcona A como parâmetro de comparação, as frações 11 até 34 (massa total de 4,53 g) foram submetidas à purificação final, realizada por meio de lavagem sucessivas destas frações com clorofórmio. A substância purificada foi solubilizada em metanol e analisada em CCD (Figura 14).



**Figura 14.** CCD da substância purificada (LA), utilizando licochalcona A padrão (Lico A) como parâmetro de comparação. Fase móvel: hexano:acetato de etila (AcOEt) (4:6, v/v) e ácido acético (0,2%); revelador: anisaldeído. Fonte: NIPPAN. Foto: do Autor (2013).

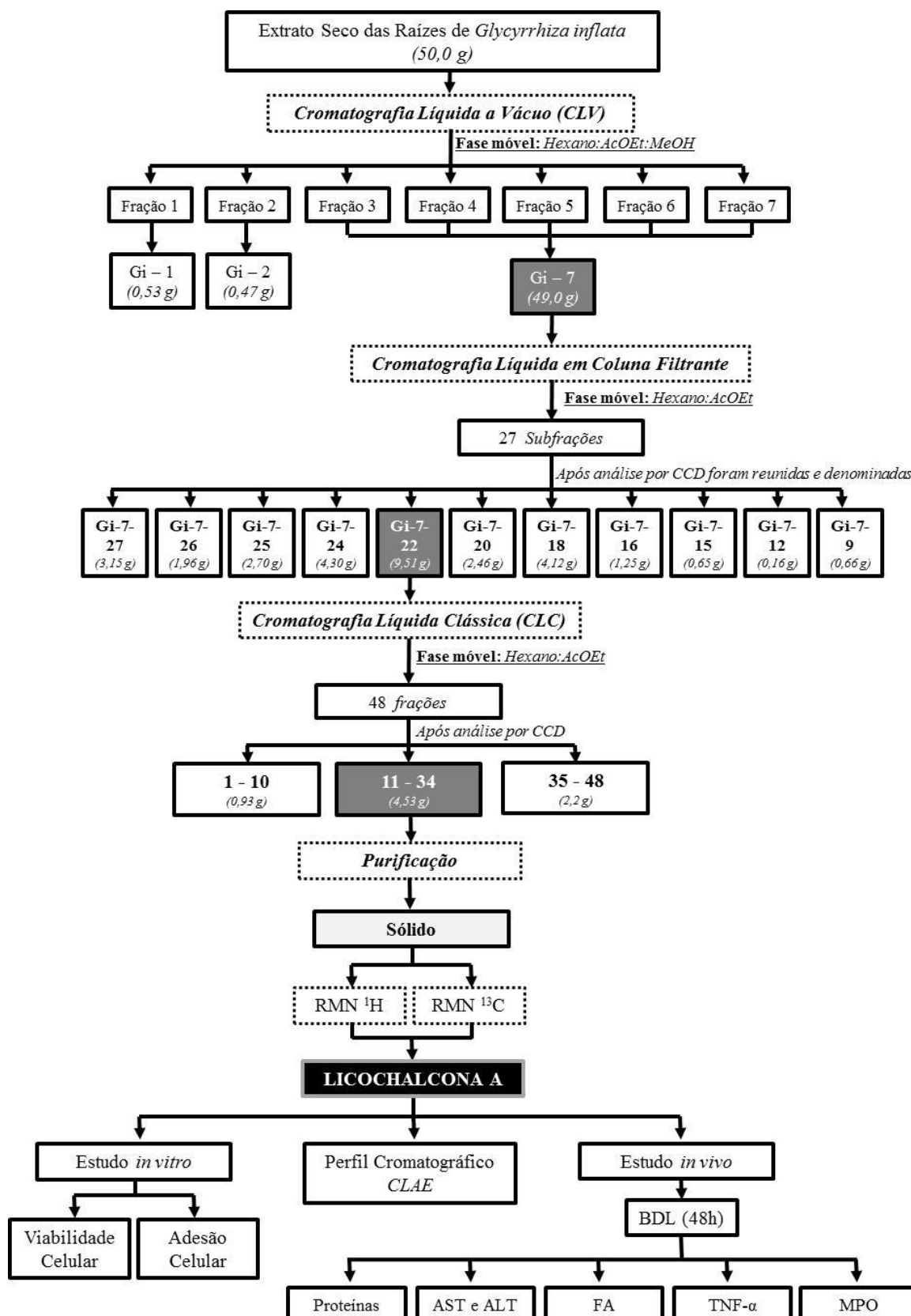
Após a evaporação do solvente, observou a formação de um sólido (Figura 15), que foi mantido em dissecadora. Este sólido foi então solubilizado em metanol deuterado e submetido a técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono 13, para identificação de sua estrutura química. A figura 16 mostra um fluxograma das etapas realizadas neste estudo.



**Figura 15.** Sólido formado após a purificação e evaporação do solvente. A: Aspecto do sólido após evaporação do solvente, sem alteração; B: Aspecto do sólido após mistura de A; C: aspecto do sólido após triturar B e mantê-lo em dessecadora. Fonte: NIPPAN. Foto: do Autor (2013).

### 3.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/300, em campo magnético de 300 e 75 MHz, respectivamente, utilizando como solvente o metanol deuterado (MeOD) (*Cambridge Isotope Laboratories*). Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm) em relação a um padrão interno de tretametilsilano (TMS).



**Figura 16.** Fluxograma das etapas realizadas.

Legenda. AcOEt: acetato de etila; ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase; BDL: ligação do ducto biliar; CCD: cromatografia em camada delgada; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência; FA: fosfatase alcalina; Gi: *Glycyrrhiza inflata*; MeOH: álcool metílico; MPO: mieloperoxidase; RMN: Ressonância Magnética Nuclear; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa.

### 3.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CLAE-UV

No Laboratório de Farmacologia do ICB/UFJF, foi desenvolvido um método para identificação da licochalcona A utilizando técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Alliance modelo 2695 (*Waters*, EUA) com detector de ultravioleta (UV) modelo 2489 de duplo comprimento de onda, no qual foi utilizado o comprimento de 372 nm para a obtenção do cromatograma. A coluna X-Bridge C<sub>18</sub>, 4,6 x 150 mm, 5 µm (*Waters*, EUA) foi utilizada para a separação cromatográfica, operando a 35 °C. A fase móvel foi composta de um sistema gradiente utilizando solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (A) e metanol (B) no seguinte gradiente (A:B): 0-5 min (50:50), 5-10 min (30:70), 10-12 min (20:80), 12-15 min (50:50). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1,1 mL/min e o volume de injeção de 20 µL, conforme técnica de Cui e outros (2009) com modificações. Para assegurar o método utilizado, foram realizados testes de linearidade, precisão, exatidão e especificidade, utilizando o software Empower 3 (*Waters*, EUA) para processamento das amostras, integração dos picos e avaliação dos cromatogramas obtidos.

### 3.4 ESTUDOS *IN VITRO*

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.

Avaliou-se a influência da licochalcona A sobre: a) viabilidade celular de fibroblasto (NIH/3T3) e célula de carcinoma hepático (HepG-2); b) adesão celular da HepG-2, (Figura 17).

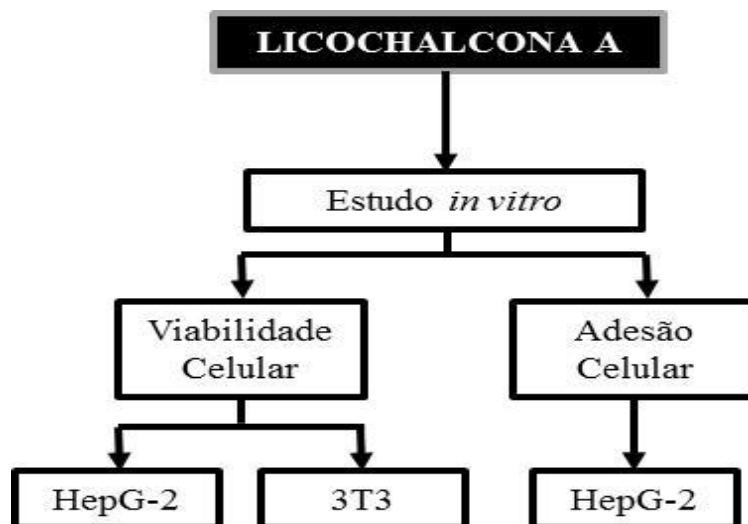


Figura 17. Fluxograma do estudo *in vitro* da licochalcona A

### 3.4.1 Cultivo das células

Células fibroblásticas (NIH/3T3) e células de carcinoma hepático (HepG-2) foram cultivadas, separadamente, por aderência em placas P100 e meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina G (100 UI/mL) e incubados em estufa a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

As células em crescimento por aderência (70 a 80% de confluência em placas P100) foram tripsinizadas (Solução 1:9 Tripsina:Meio DMEM), centrifugadas por 10 min a 2000 rpm. Após este procedimento, o pellet formado foi ressuspensão (meio DMEM com SFB 10%) e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Estas foram, então, transferidas para placas de 96 poços (10x10<sup>3</sup> células/poço) quando da realização dos experimentos.

### 3.4.2 Viabilidade celular

A influência da licochalcona A sobre a viabilidade celular das células NIH/3T3 e HepG-2, foi avaliada pelo método MTT (brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) (SIEUWERTS, 1995).

Para o experimento, as células em crescimento por aderência (70 a 80% de confluência em placas P100) foram dissociadas por desagregação enzimática (Solução 1:9 - Tripsina:Meio DMEM), transferidas para placas de 96 poços (10x10<sup>3</sup>

células/poço) com 200µL/poço de meio DMEM com 10% SFB e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após as 24 h, retirou-se o sobrenadante e adicionou diferentes concentrações de licochalcona A (10; 20; 40; 60; 80; 100; 200 µM, em meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino) e a placa foi novamente incubada, agora por 20h na mesma estufa. Decorrido este período, foi adicionado o MTT (5 mg/mL, 20 µL) e as células foram incubadas por mais 4 h.

Na sequência, foi retirado todo o líquido da placa, permanecendo apenas os cristais de formazan precipitados, os quais foram ressuspensos com 200µL 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.

Como controle negativo foi usado DMSO a 1% em meio de cultura. Além deste, um grupo controle com igual procedimento foi realizado com a concentração de 100 µM, diferenciando apenas, que neste grupo não foram colocadas as células, visando assim verificar a influência direta da licochalcona A na redução do MTT a formazan. Para todas as concentrações foram realizados sextuplicatas e o resultado expresso pela média ± desvio padrão.

### **3.4.3 Adesão celular**

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

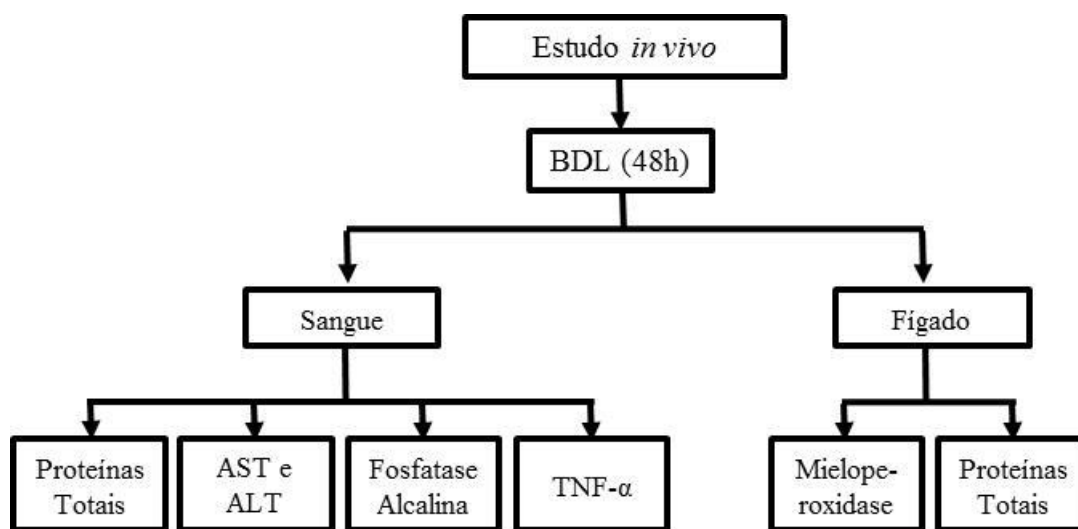
Posteriormente, as células HepG-2 foram tripsinizadas, contadas e adicionadas (10x10<sup>3</sup> células/poço) na presença de licochalcona A em diferentes concentrações (10; 20; 40; 60; 80; 100 µM). A placa foi incubada em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Decorrido 1 h, foi adicionado 20 µL de MTT (5 mg/mL) por poço e a placa foi novamente incubada, por mais 4 h. Após este período, o sobrenadante foi retirado da placa e os cristais de formazan precipitado foram ressuspensos com 200 µL de DMSO. A quantidade formazan formado foi determinada pela medida da densidade ótica (OD) a 492 nm em leitor de placas.

Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com DMSO a 1%, sem a presença de licochalcona A. O experimento foi realizado em sextuplicata e o resultado expresso pela média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.5 ESTUDOS *IN VIVO*

Os ensaios farmacológicos *in vivo* foram realizados no Laboratório de Hepatologia Experimental, na Faculdade Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Foram avaliados os efeitos da licochalcona A no modelo de ligação do ducto biliar (BDL) em ratos, em período de 48 h. O estudo verificou a alteração de: a) marcadores hepáticos, como proteína total, transaminases (ALT e AST) e fosfatase alcalina (FA); b) mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e mieloperoxidase), conforme demonstrado na figura 18.



**Figura 18.** Fluxograma do estudo *in vivo* da licochalcona A

Legenda. ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase; BDL: ligação do ducto biliar; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral-alfa.

#### 3.5.1 Animais

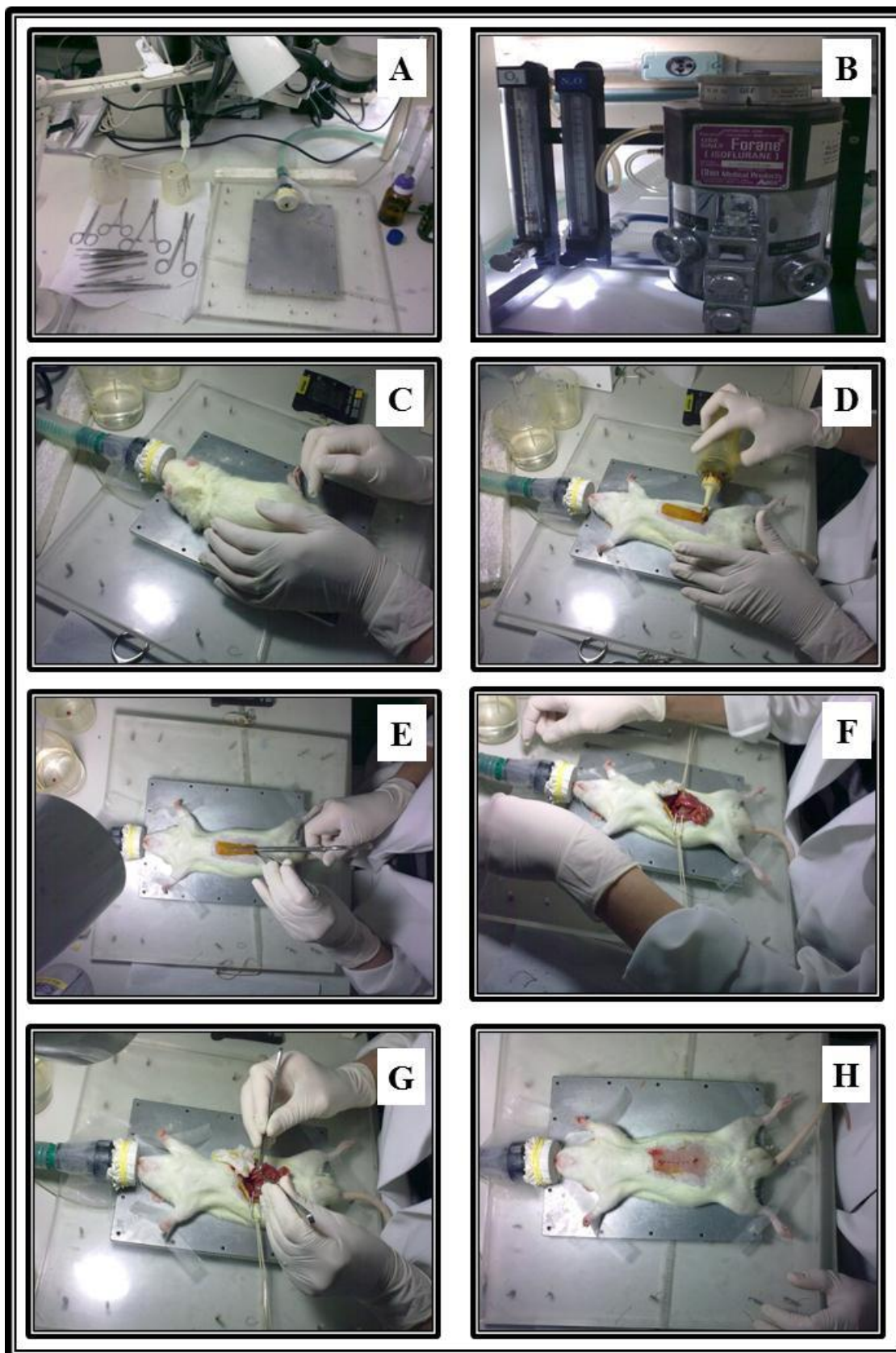
Foram utilizados ratos Wistar machos pesando 200-250 g. Eles foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm), em um número de 3 por gaiola. As gaiolas permaneceram em sala climatizada, com exaustão do ar, umidade, ventilação e temperatura (22 $\pm$ 2 °C) controladas; ração (industrial) e água (filtrada) *ad libitum*; ciclo

claro/escuro de 12 horas (claro de 06:00 às 18:00 h). Seis horas antes da realização dos experimentos, os animais foram privados de alimentação, mantendo acesso livre à água. Após a cirurgia a ração foi substituída por solução de glicose 20 % por 24 h. Os animais foram pesados no início e no final para verificar ganho ou perda de peso durante o experimento. O protocolo e procedimentos utilizados foram realizados por pessoal treinado e de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O protocolo utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFJF com o nº 088/2012.

### **3.5.2 Procedimento Cirúrgico para Ligação do Ducto Biliar (BDL)**

Primeiramente os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano, 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. Em seguida realizou-se a tricotomia do abdômen e assepsia local com solução de polivinilpirrolidona-iodo 10%. Para a laparotomia, uma incisão mediana longitudinal do abdômen foi realizada para que assim o ducto biliar comum fosse exposto e completamente ligado com fio de nylon para sutura 4-0. Após a ligadura do ducto biliar comum em dois pontos (logo abaixo da junção do canal hepático e antes da entrada do ducto no pâncreas), ele foi cortado entre estes pontos. Ao final, foi realizada a sutura cuidadosa do abdômen e a administração do analgésico (dipirona 50mg/mL, 3 gotas, dose única) (NAGAOKA *et al.*, 2006). Nos animais sham foi realizado procedimento cirúrgico semelhante, com exceção que nestes o ducto biliar não foi ligado nem cortado. O procedimento cirúrgico realizado está representado na figura 19.





**Figura 19.** Processo cirúrgico de BDL. A: preparo e assepsia do material e ambiente cirúrgico; B: aparelho de anestesia inalatória; C: anestesia do animal; D: assepsia com solução de polivinilpirrolidona-iodo 10% após tricotomia abdominal; E: laparotomia; F: exposição do ducto biliar comum; G: ligadura e corte do ducto biliar comum; H: sutura cuidadosa do abdômen. Fonte: Laboratório de Hepatologia Experimental – Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. Foto: Autor (2013).

### 3.5.3 Tratamento dos animais e preparo das amostras

Os animais foram divididos em cinco grupos de seis animais cada (n=6) e tratados três vezes com dose única diária (50 mg/Kg) por gavagem (1 mL) (Tabela 4). A primeira dose foi administrada 2 h antes do procedimento cirúrgico, a segunda 24 h após a primeira e a última 4 h antes da eutanásia.

**Tabela 4.** Esquema representativo dos grupos de animais utilizados.

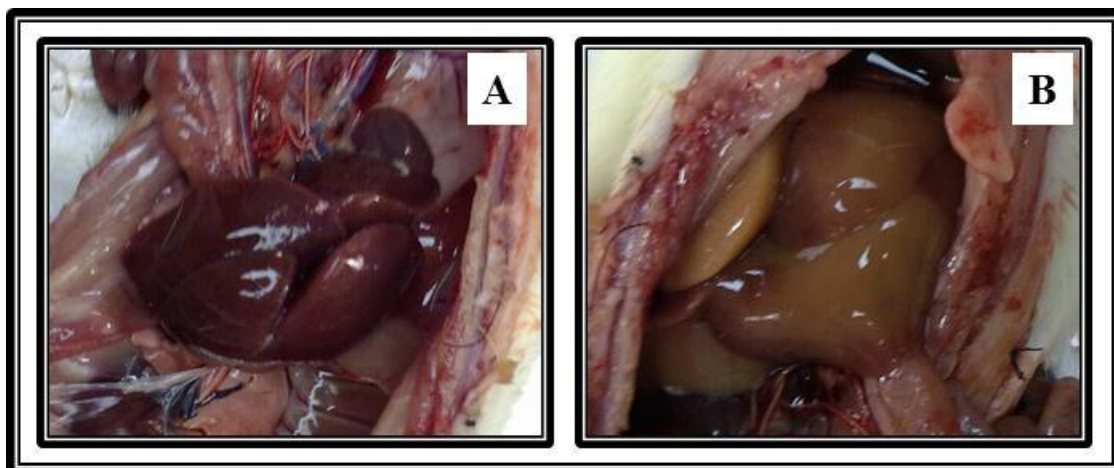
<b>Grupo</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Tratamento</b>
Sham CTRL	Sham	Solução salina e glicerina 1%
Sham LICO	Sham	Licochalcona A (50 mg/Kg)
BDL CTRL	BDL	Solução salina e glicerina 1%
BDL Lico	BDL	Licochalcona A (50 mg/Kg)
BDL Silimarina	BDL	Silimarina (50 mg/Kg)

BDL: ligação do ducto biliar; Sham: cirurgia sem a ligação do ducto biliar; Lico: licochalcona A; CTRL: controle.

Tanto a licochalcona A quanto a silimarina (*Sigma Aldrich*), usada como controle positivo, foram preparadas de forma a se obter a concentração de 12,5 mg/mL em solução salina e 1% de glicerina. Para tal, primeiramente a substância foi triturada com o auxílio de um gral e pistilo, para reduzir ao máximo o tamanho das partículas da mesma, e depois pesada. Então, foi adicionado o agente molhante (glicerina) e, feito à mistura destes, adicionou-se quantidade suficiente (q.s.) de solução salina 0,9 %.

### 3.5.4 Coleta sanguínea, retirada das amostras e eutanásia

Decorrido 48 horas do processo cirúrgico, os animais foram anestesiados com uretana 20 %, via intraperitoneal (i.p.), para a realização da retirada de material biológico (sangue e fígado). Após incisão mediana longitudinal do abdômen foram coletados cerca de 5 mL de sangue da aorta abdominal, com auxílio de uma cânula. O fígado foi perfundido com solução salina e retirado (Figura 20).



**Figura 20.** Comparação do fígado antes (A) e depois (B) da perfusão com solução salina. Fonte: Laboratório de Hepatologia Experimental – Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. Foto: Autor (2013).

O fígado foi congelado em freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) para as análises enzimáticas em tecido, como mieloperoxidase (MPO). As amostras de sangue coletadas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora e em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por mais 1 hora. Posteriormente foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min e o soro obtido foi armazenado em freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises.

### 3.5.5 Análises bioquímicas

Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: proteínas totais, alanina transaminase (ALT/TGP), aspartato transaminase (AST/TGO) e fosfatase alcalina (FA), utilizando analisador bioquímico LabQuest® (Labtest, Brasil) (Figura 21) e seguindo procedimento técnico dos kits adquiridos da empresa LabTest. Os resultados encontrados para atividade das enzimas (em unidade enzimática – UE) foram corrigidos com a quantidade de proteínas totais para apresentação dos resultados em atividade específica destas enzimas (UE/ mg de proteína).



**Figura 21.** Analisador bioquímico utilizado para avaliar os parâmetros bioquímicos no soro dos animais do experimento *in vivo*. Fonte: Laboratório Santarosa de Análises Clínicas (Andrelândia/MG). Foto: Autor (2013).

### 3.5.6 Extração de mieloperoxidase do tecido

Para a extração de mieloperoxidasas do tecido hepático, triturou-se amostras do fígado dos animais (cerca de 100 mg) em nitrogênio líquido, adicionou-se 6 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) e 0,5 % Cetavlon. Após 20 min em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (*Thermo Scientific*) por 15 min, a 15.000 rpm, em 4° C. O sobrenadante foi descartado e novamente foram adicionado 2 mL do mesmo tampão de extração. Este material foi sonicado em um disruptor de células por 20 s com 80 % de potência, posterior congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água corrente, sendo este procedimento repetido por três vezes. Novamente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi coletado para análise de mieloperoxidase e dosagem de proteína total (BRADLEY *et al.*, 1982).

### 3.5.7 Mieloperoxidase de tecido

Na dosagem de MPO extraída do tecido hepático, 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 peróxido de hidrogênio (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.

Para cada amostra, extraída do fígado dos animais, foi preparada uma curva analítica com quatro pontos por meio de diluição seriada, obtendo-se no final as seguintes concentrações (em volume): 5; 2,5; 1,25; 0,625  $\mu\text{L}$  de amostra por poço. Todas as concentrações foram realizadas em triplicata. Após a diluição seriada, obtendo volume final de 10  $\mu\text{L}$  por poço, foi adicionado 190  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho. Em seguida foram realizadas 20 leituras em leitor de microplacas (492 nm), com intervalo de 30 s entre as leituras, para obtenção da curva de absorvância (abs) *versus* tempo (min), da velocidade da reação (abs/min), da atividade enzimática (UE/mL).

Para o cálculo da atividade de MPO foi considerado que uma unidade de atividade MPO é definida como aquela capaz de degradar um  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por min, e que corresponde a uma variação 0,0113 unidades de absorvância (BRADLEY *et al.*, 1982).

Os resultados encontrados para atividade da enzima (UE/mL) foram corrigidos com a quantidade de proteínas presente nestas amostras para apresentação dos resultados em atividade específica destas enzimas (UE/ mg de proteína). Para tal, foi realizada a dosagem de proteína total pelo método de BCA, como descrito no tópico a seguir.

### **3.5.8 Dosagem de proteína total pelo método BCA**

Uma curva padrão foi construída para realização do experimento, utilizando-se padrão de Albumina a 2 mg/ mL e abrangendo a faixa de 20 a 2000  $\mu\text{g}$ / mL, contendo oito pontos (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g}$ / mL) e um branco (sem albumina). Pipetou-se 15  $\mu\text{L}$  de cada solução da curva para um determinado poço da placa de 96 poços (P96) e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho (50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B do Kit de BCA).

As amostras foram preparadas em triplicata e da seguinte maneira: em P96 adicionou 5  $\mu\text{L}$  da amostra proveniente da extração do tecido hepático, para o teste de MPO, para cada poço e adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de água destilada nos mesmos, e posteriormente acrescentou-se 200  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho. Agitou-se a placa por 30 s e a incubou por 30 min a 37°C. Após resfriá-la em temperatura ambiente procedeu-se as leituras em 540 e 590 nm.

### **3.5.9 Fator de necrose tumoral-alfa**

A dosagem do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) foi realizada a partir do kit LEGEND MAX™ (ELISA Kit with Pre-coated Plates Rat TNF- $\alpha$ , *BioLegend*), seguindo a metodologia do fabricante, sem modificações.

## **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

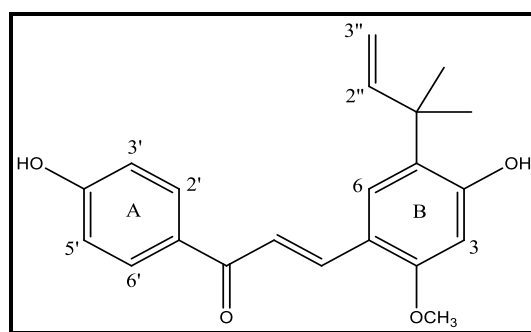
Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística em software estatístico específico (GraphPad InStat 3.0). Para análise entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças entre estes foram comparadas através do teste de Tukey. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A probabilidade de erro tipo I foi assumida como no máximo 5% em todos os testes ( $p < 0.05$ ) (ROHLF & SOKAL, 1995).

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DA LICOCHALCONA-A

A licochalcona A (Figura 22) foi isolada e purificada a partir do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata* por meio dos processos cromatográficos já descritos e, em seguida foi submetida a técnicas espectroscópicas de identificação, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 22.** Estrutura da licochalcona A ( $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou sinais, em deslocamentos químicos distintos, para no mínimo 10 hidrogênios magneticamente diferentes. Mediante a integração destes, verificou-se a presença de, no mínimo, 20 hidrogênios presentes na estrutura da molécula em estudo. Os sinais com seus deslocamentos químicos, respectivas multiplicidade, acoplamento e integrações estão demonstrados na tabela 5 e podem ser observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 23).

**Tabela 5.** Dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  da licochalcona A (300MHz:MeOD) e comparação com a literatura (Naldeman *et al.*, 1997a).

Hidrogênio	Sinal*	J (Hz)	Sinal <sub>lit.</sub> *	J <sub>lit.</sub> (Hz)
CH <sub>3</sub>	1,48 – s – (6H)	-	1,44 – s – (6H)	-
OCH <sub>3</sub>	3,87 – s – (3H)	-	3,85 – s – (3H)	-
H3''	5,02 – m – (2H)	-	4,96 – d – (1H)	10,5
H3''			4,99 – d – (1H)	17,5
H2''	6,26 – dd – (1H)	10,5 ; 17,5	6,23 – dd – (1H)	10,5 ; 17,5
H3	6,46 – s – (1H)	-	6,51 – s – (1H)	-
H3' e H5'	6,89 – d – (2H)	8,7	6,93 – d – (2H)	9,0
H6	7,49 – s – (1H)	-	7,55 – s – (1H)	-
H $\alpha$	7,57 – d – (1H)	15,6	7,59 – d – (1H)	15,5
H2' e H6'	7,95 – d – (2H)	8,7	7,95 – d – (2H)	9,0
H $\beta$	7,99 – d – (1H)	15,6	7,95 – d – (1H)	15,5

\* Sinal: deslocamento químico (partes por milhão) – multiplicidade – integração.

J: constante de acoplamento; s: simpleto; m: múltiplo; d: duplete; dd: duplo-duplete; lit: literatura.



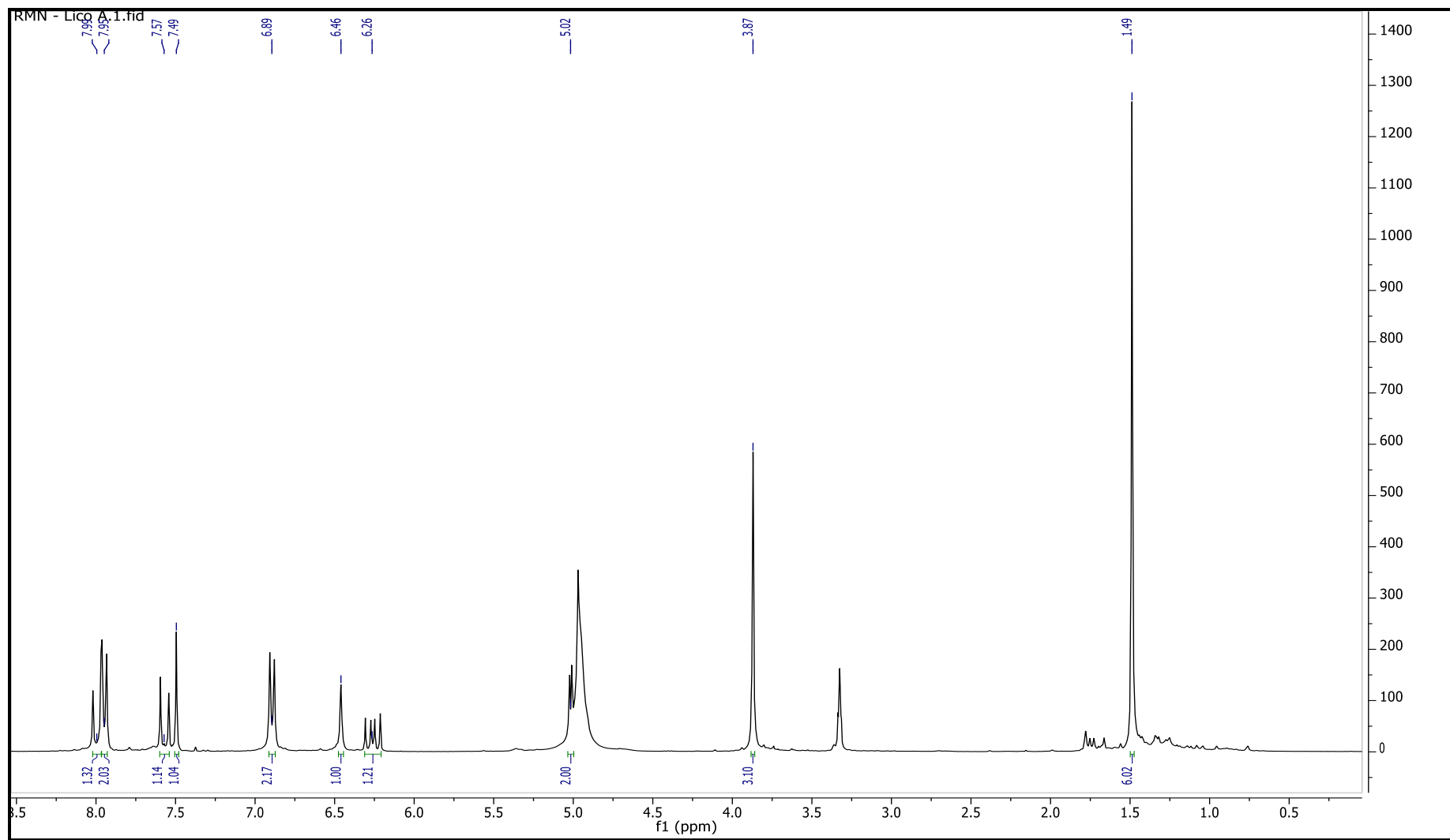
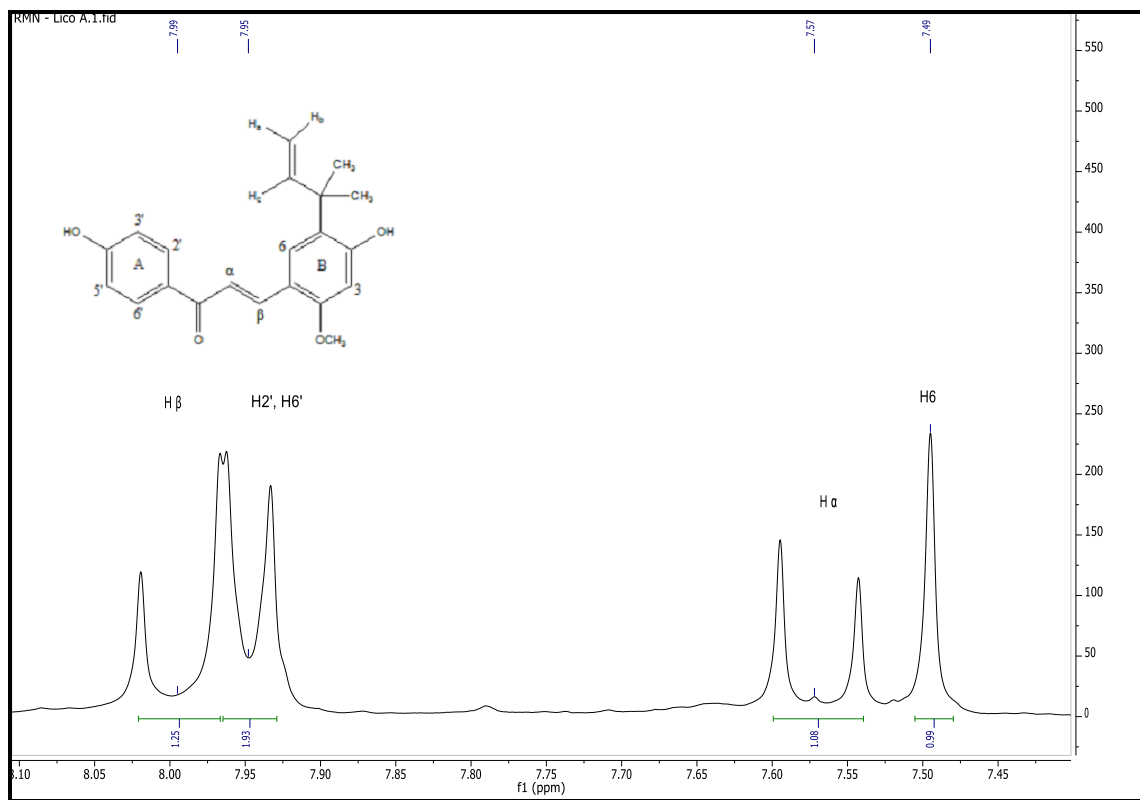


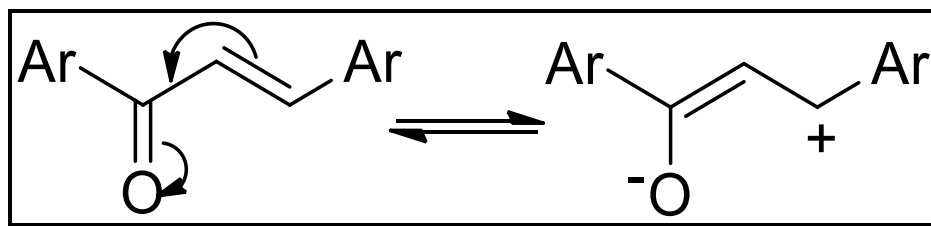
Figura 23. Espectro RMN  $^1\text{H}$  da Licochalcona A (300MHz:MeOD).

Pode-se observar os sinais típicos de hidrogênios de cetonas  $\alpha,\beta$  insaturadas, de chalconas, referentes aos hidrogênios  $\alpha$  ( $\delta$  7,57 - 1H) e  $\beta$  ( $\delta$  7,99 - 1H), os quais se apresentam como dois dupletos com constante de acoplamento ( $J$ ) igual a 15,6 (típico de configuração *trans* entre estes hidrogênios) (Figura 24).



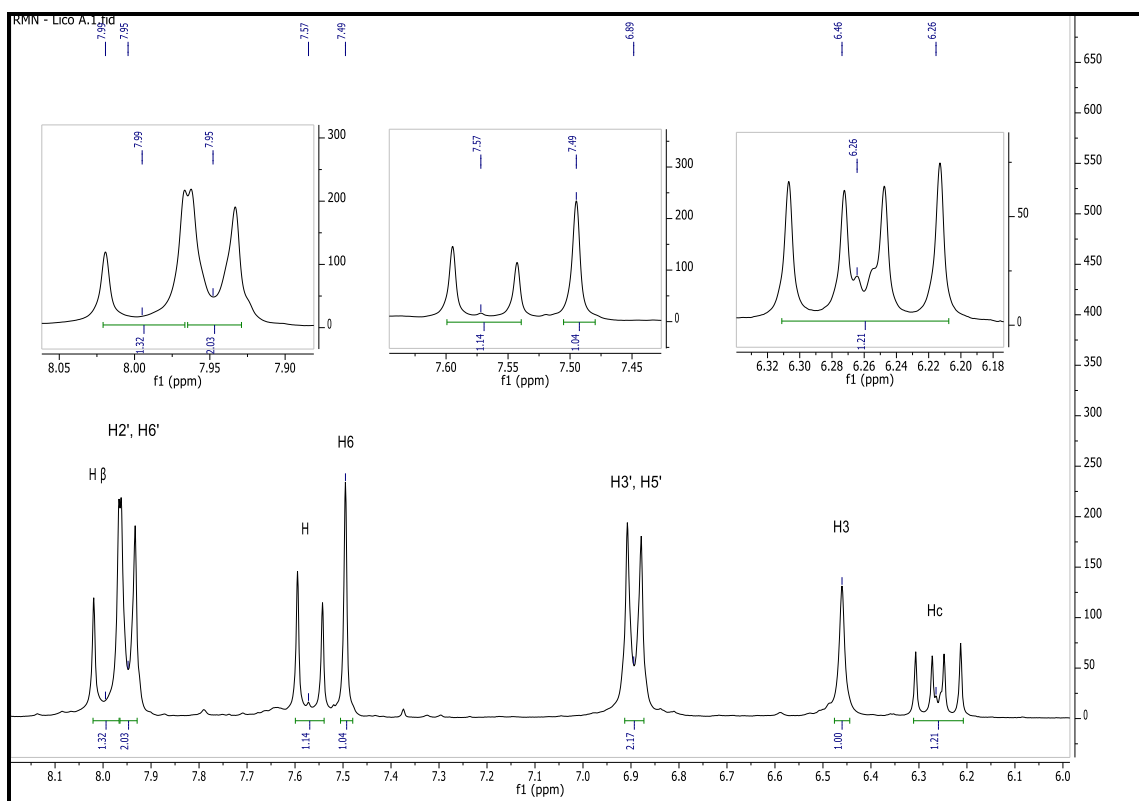
**Figura 24.** Ampliação da região 7,4 a 8,1 (ppm) do espectro RMN  $^1\text{H}$  da Licochalcona A (300MHz:MeOD).

Estes sinais, referentes aos  $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\beta$ , aparecem na região dos hidrogênios aromáticos (6 – 8 ppm), acima da região normal de hidrogênios vinila (hibridização  $sp^2$ : 4,5 -6,5 ppm), o que pode ser justificado, além da anisotropia diamagnética da ligação dupla, pelo sistema de conjugação dos elétrons da ligação  $\pi$  (ligação  $\pi$ ) presentes no Aduto de Michael, o qual ao entrar em ressonância promove maior desblindagem do  $\text{H}_\beta$  em relação ao  $\text{H}_\alpha$  (Figura 25), fazendo o primeiro aparecer em deslocamento químico maior que o último. Além disso, o  $\text{H}_\beta$  está em área desblindada do campo anisotrópico gerado pelos elétrons  $\pi$  do anel aromático B, o que também explica sua maior desblindagem em relação ao  $\text{H}_\alpha$ . No mais, o acoplamento vicinal entre estes hidrogênios ( $^3J_{HH}$ ) igual a 15,6 Hz indica a configuração *trans* entre estes hidrogênios, uma vez que é típico o valor de acoplamento entre hidrogênios *trans* ( $^3J_{trans}$ ) entre 15-18 Hz, enquanto os hidrogênios *cis* apresentariam  $^3J_{cis}$  entre 6-12 Hz (PAVIA *et al.*, 2010).



**Figura 25.** Esquema representativo da ressonância do Aduto de Michael. Ar: arila.

Na região de 7,0 ppm, os sinais dos seis hidrogênios aromáticos (anel A e B) da licochalcona A podem ser observados da seguinte forma, a saber: a) H2' e H6' ( $\delta$  7,95 - d -  $J$  8,7 - 2H); b) H3' e H5' ( $\delta$  6,89 - d -  $J$  8,7 - 2H); c) H6 ( $\delta$  7,49 - s - 1H); d) H3 ( $\delta$  6,46 - s - 1H), demonstrados na figura 26.



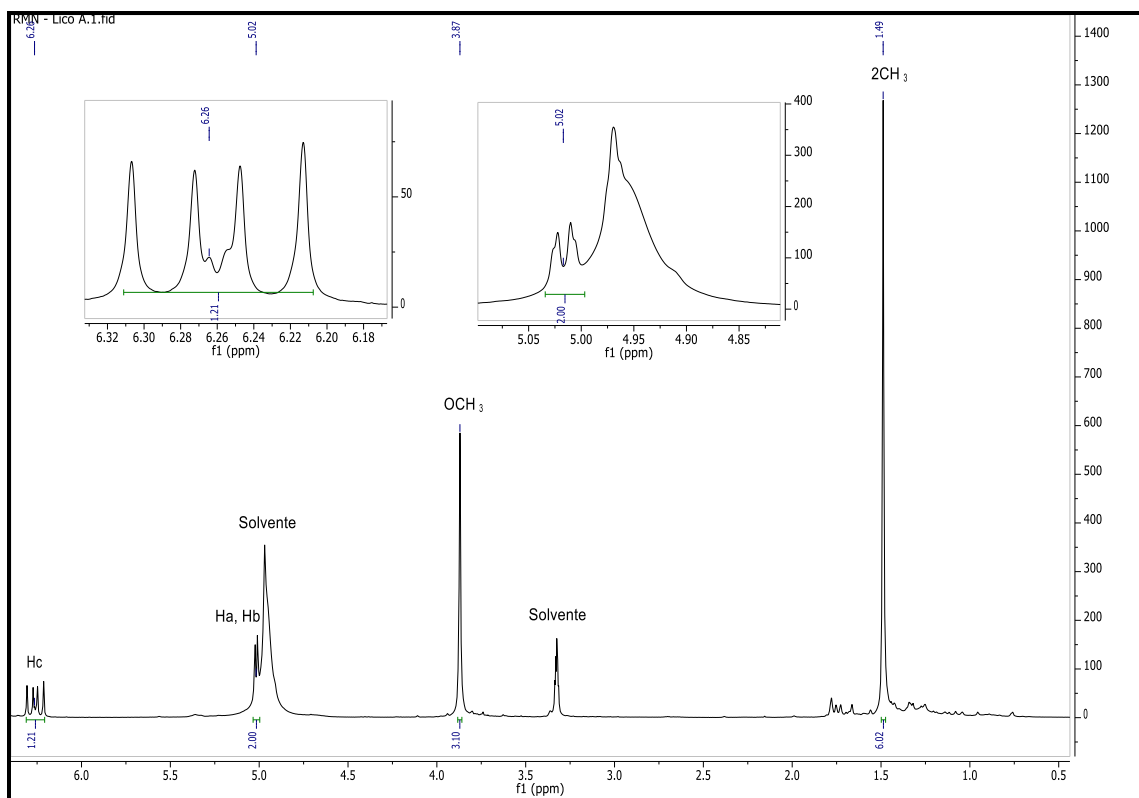
**Figura 26.** Ampliação da região 6,0 a 8,1 (ppm) do espectro RMN  $^1\text{H}$  da Licochalcona A (300MHz:MeOD).

Os sinais referentes aos hidrogênios H2' e H6' aparecem em mesmo deslocamento químico, o que também é observado para os H3' e H5'. Isto ocorre uma vez que existe um plano de simetria no anel A da licochalcona A, que torna estes pares

de hidrogênio quimicamente e magneticamente iguais entre si. Além disso, é observado que o sinal de H2' e H6' encontra-se em  $\delta$  maior que o dos hidrogênios H3' e H5', mesmo estando presentes no mesmo anel aromático (anel A). Isso pode ser explicado pelos primeiros estarem na posição orto em relação ao grupo cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, e assim sofrerem desblindagem pelo efeito de conjugação deste sistema. Os acoplamentos  $^3J_{orto}$  entre hidrogênios normalmente estão entre 7 e 10 Hz, o que pode ser observado nas constantes entre os acoplamentos do hidrogênio H2' com o H3' e do H6' com o H5', ambos com  $^3J = 8,7$  Hz (PAVIA *et al.*, 2010).

Outros sinais presentes no espectro referem-se aos hidrogênios do grupo substituinte na posição 5 da licochalcona A (Figura 29). O sinal referente as duas metilas magneticamente iguais pode ser observado no espectro  $^1H$  com o simpleto em  $\delta$  1,48 ppm, integrado para seis hidrogênios. Já os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos deste grupo, H3'' e H2'', ocorrem respectivamente em:  $\delta$  5,02 ppm, um multiplete integrado para 2 hidrogênios; e em  $\delta$  6,26 ppm, duplo-duplete integrado para 1H e constantes de acoplamento  $^3J_{cis}$  10,5 Hz e  $^3J_{trans}$  17,7 Hz. Mais uma vez, o fato de H2'' estar em maior deslocamento químico do que os H3'' por ser justificado pelo primeiro estar sofrendo desblindagem do campo anisotrópico gerado pelos elétrons  $\pi$  do anel B.

Finalmente, observa-se em  $\delta$  3,87 ppm um simpleto integrado para 3H, característico de grupo metoxila (Figura 27).



**Figura 27.** Ampliação da região 0,5 a 6,5 (ppm) do espectro RMN  $^1\text{H}$  da Licochalcona A (300MHz:MeOD).

Os dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplado de prótons estão descritos na tabela 6 e podem ser observados na figura 28.

**Tabela 6.** Comparação dos dados espectroscópicos do RMN  $^{13}\text{C}$  da licochalcona A com a literatura (Kajyama *et al.*, 1992).

Carbono	$\delta$ (ppm)	$\delta$ lit. (ppm)
$\text{CH}_3(4'' \text{ e } 5'')$	26,1	27,5
1''	39,6	41,0
$\text{OCH}_3$	54,6	56,0
3	99,4	100,8
3''	109,3	110,7
1	114,3	115,7
3' e 5'	114,9	116,3
$\alpha$	117,8	119,3
5	126,9	128,3
6	128,7	130,1
1'	130,1	131,5
2' e 6'	130,6	132,0
$\beta$	140,8	142,3
2''	147,6	149,0
2	159,1	160,5
4	160,0	161,3
4'	162,0	163,4
$\text{C}=\text{O}$	190,4	191,9

$\delta$ : deslocamento químico (partes por milhão); lit: literatura

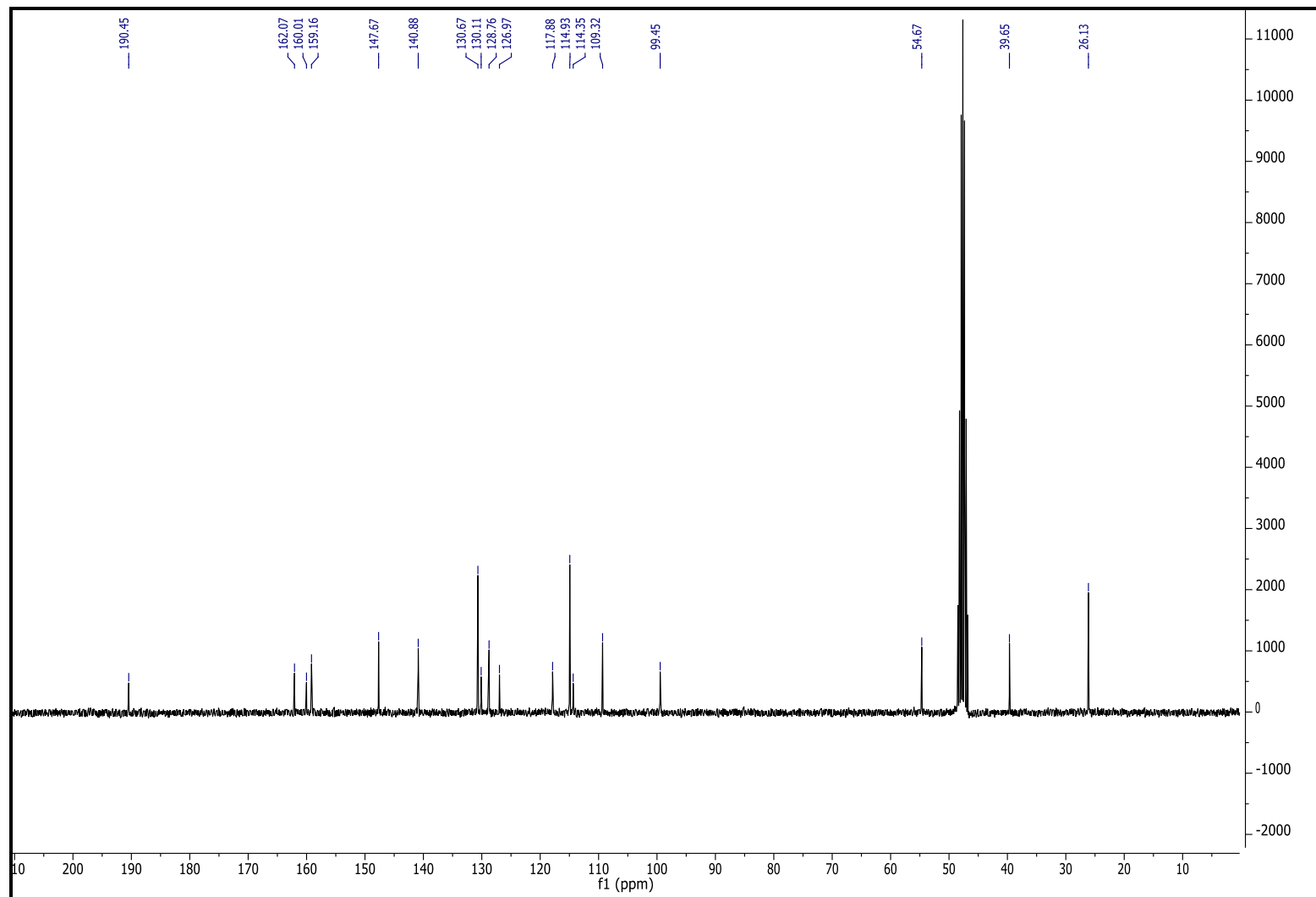


Figura 28. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da Licochalcona A (75MHz:MeOD).

A análise espectral do RMN  $^{13}\text{C}$  pode ser dividida em quatro seções. Na primeira (de 0 a 40 ppm) aparecem os átomos de carbonos saturados, no qual pode ser observado os sinais atribuídos aos carbonos: a) C4'' e C5'' ( $\delta$  26,1 ppm), referentes a duas metilas magneticamente iguais; b) C1'' ( $\delta$  39,6 ppm), carbono metina. A seção seguinte (de 40 a 60 ppm) demonstra o efeito dos átomos eletronegativos sobre o carbono, na qual observa-se o sinal do carbono da metoxila ( $\text{OCH}_3$ ) em  $\delta$  54,6 ppm.

A terceira seção do espectro (de 100 a 175 ppm) inclui os sinais dos carbonos aromáticos e dos alcenos. Nesta região estão presentes os sinais assim atribuídos: C3 ( $\delta$  99,4), C3'' ( $\delta$  109,3), C1 ( $\delta$  114,3), C3' e C5' ( $\delta$  114,9), C $\alpha$  ( $\delta$  117,8), C5 ( $\delta$  126,9), C6 ( $\delta$  128,7), C1' ( $\delta$  130,1), C2' e C6' ( $\delta$  130,6), C $\beta$  ( $\delta$  140,8), C2'' ( $\delta$  147,6), C2 ( $\delta$  159,1), C4 ( $\delta$  160,0) e C4' (162,0).

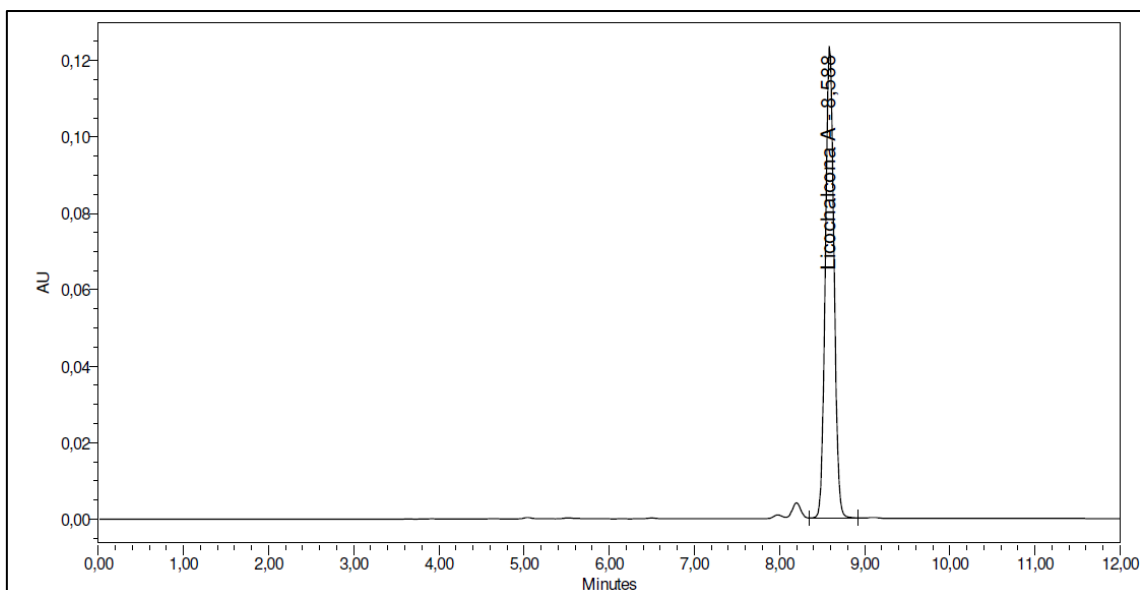
Enfim, a quarta seção do espectro contém carbonos de carbonila, que aparecem nos valores de campo mais baixos (de 155 a 220 ppm), como também é observado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da licochalcona A, em deslocamento químico de 190,4 ppm.

A eletronegatividade, a hibridização e a anisotropia afetam o deslocamento químico dos  $^{13}\text{C}$  praticamente da mesma maneira que afetam os do  $^1\text{H}$ , porém os sinais do  $^{13}\text{C}$  são aproximadamente 20 vezes maiores (MACOMBER, 1991).

Os dados espectroscópicos obtidos e comparados àqueles previamente publicados (KAJYAMA *et al.*, 1992; NADELMANN *et al.*, 1997a) confirmam a estrutura química da substância isolada e purificada como a licochalcona A.

## 4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA LICOCHALCONA A

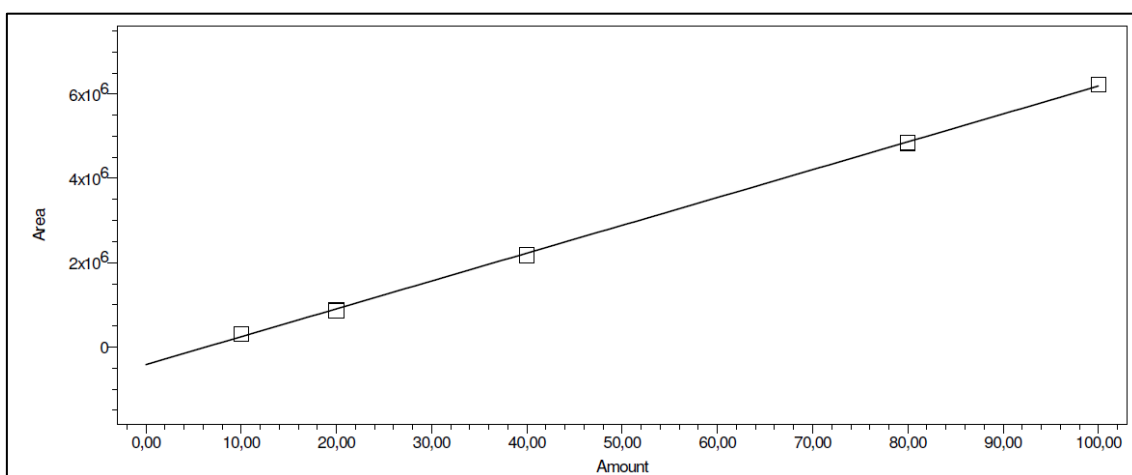
A figura 29 representa o cromatograma da licochalcona A obtido em CLAE-UV. Utilizando fase móvel composta por gradiente de água acidificada (0,1% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e solvente orgânico (MeOH) (50:50 a 20:80), detecção em comprimento de onda de 372 nm, observou-se uma resposta cromatográfica satisfatória. O tempo de retenção da licochalcona A nestas condições cromatográficas foi de 8,6 minutos.



**Figura 29.** Cromatograma obtido a partir da análise da licochalcona A (20 µg/mL) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em Ultravioleta (CLAE-UV). Detecção em 372 nm. Tempo de retenção 8,6 minutos.

#### 4.2.1 Linearidade

A linearidade do método para identificação da licochalcona A por CLAE-UV foi avaliada por regressão linear dos dados plotados entre a área do pico e a concentração do analito, utilizando-se cinco concentrações (10, 20, 40, 80 e 100 µg/ mL), realizadas em cinco replicatas cada, e está demonstrada na figura 30.



**Figura 30.** Linearidade do método cromatográfico para licochalconaA. Concentrações 10 - 100 µg/ mL.  $R^2 = 0,999621$ .

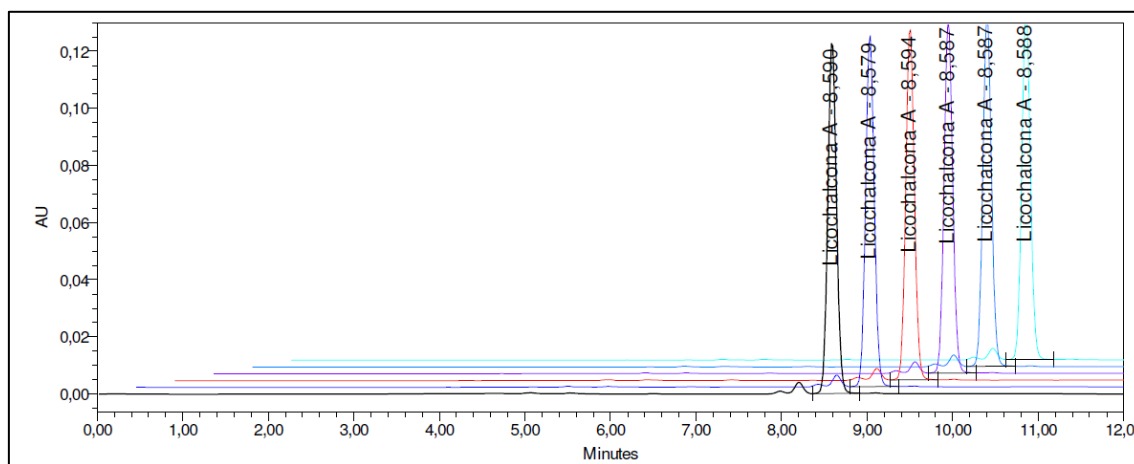
A análise de regressão linear dos dados resultou em coeficiente de correlação igual ou melhor que 0,999, o qual comprova que a linearidade obtida está adequada para os valores contidos dentro desta faixa de concentração (10 – 100 µg/ mL). A relação



entre a concentração do analito ( $x$ ) e a área do pico ( $y$ ) foi expressa como equação de regressão:  $y = 6,60 e^{+4} x - 4,14 e^{+5}$ .

#### 4.2.2 Precisão

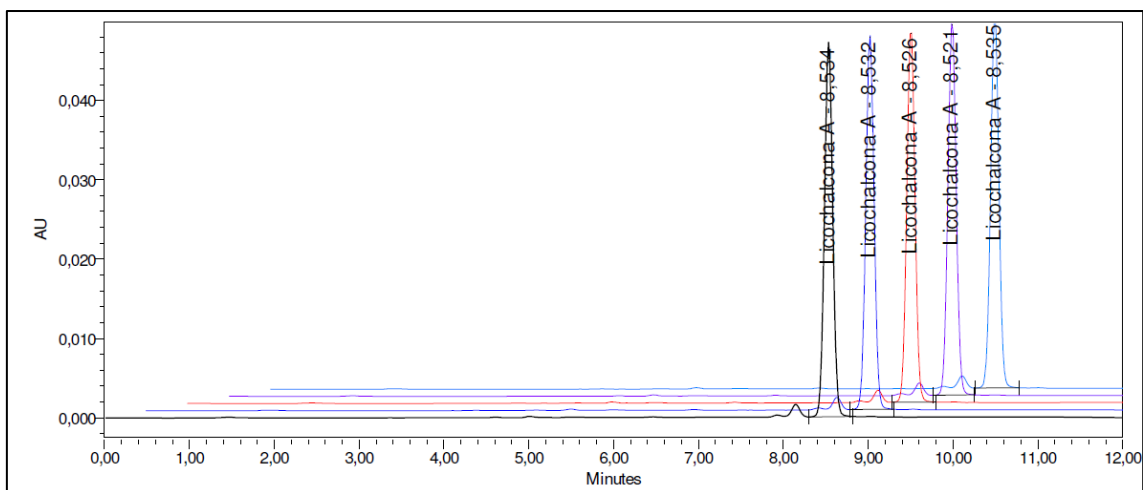
A precisão (ou repetibilidade) do método foi avaliada por meio de seis replicatas da licochalcona A (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e pela variação da área do pico ( $871.040,6 \pm 475,4$  AU). O desvio padrão relativo da área obtida entre as replicatas (Figura 31) foi de 0,05%, no tempo de retenção da amostra, conferindo uma ótima precisão do método para a análise da licochalcona A.



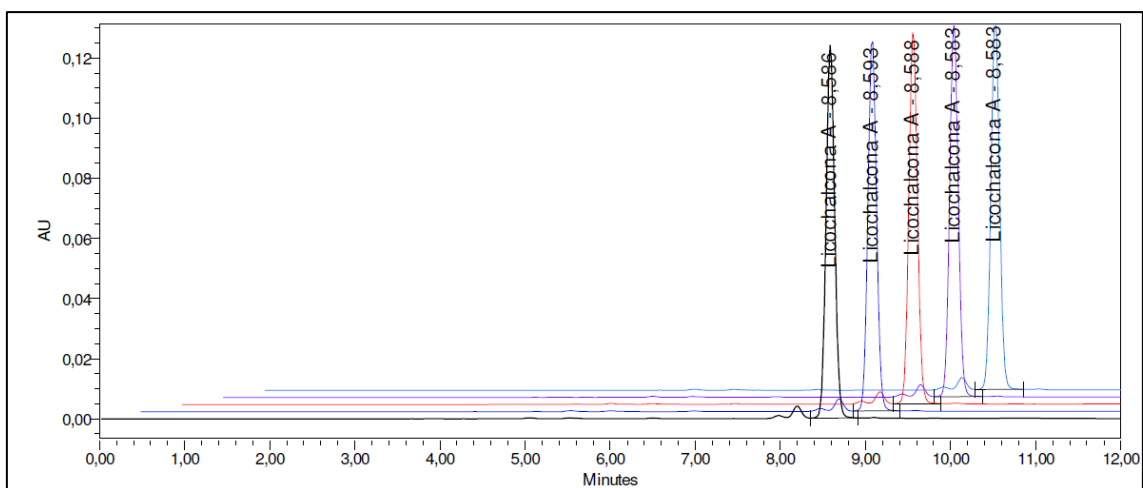
**Figura 31.** Precisão do método cromatográfico para licochalcona A (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4.2.3 Exatidão

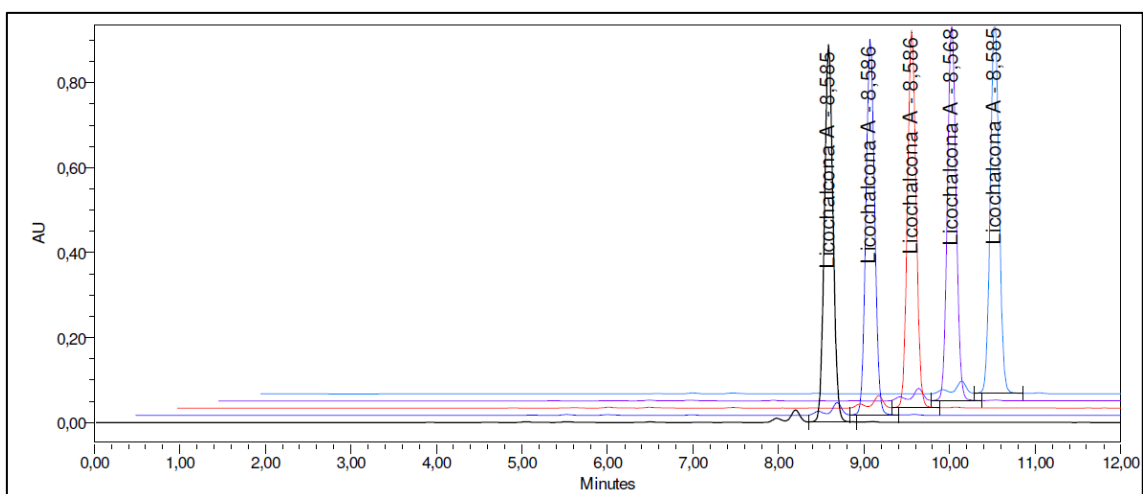
A avaliação da exatidão do método procedeu-se com cinco replicatas das soluções de licochalcona A de 10, 20 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , demonstrados nas figuras 32, 33 e 34, respectivamente.



**Figura 32.** Exatidão do método cromatográfico para licochalcone A (10 µg/ mL).



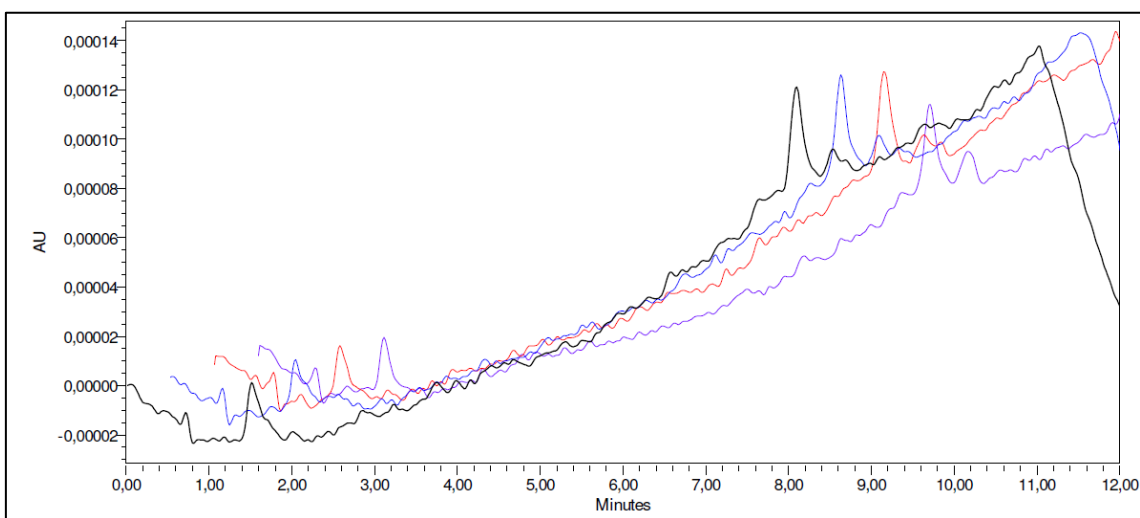
**Figura 33.** Exatidão do método cromatográfico para licochalcone A (20 µg/ mL).



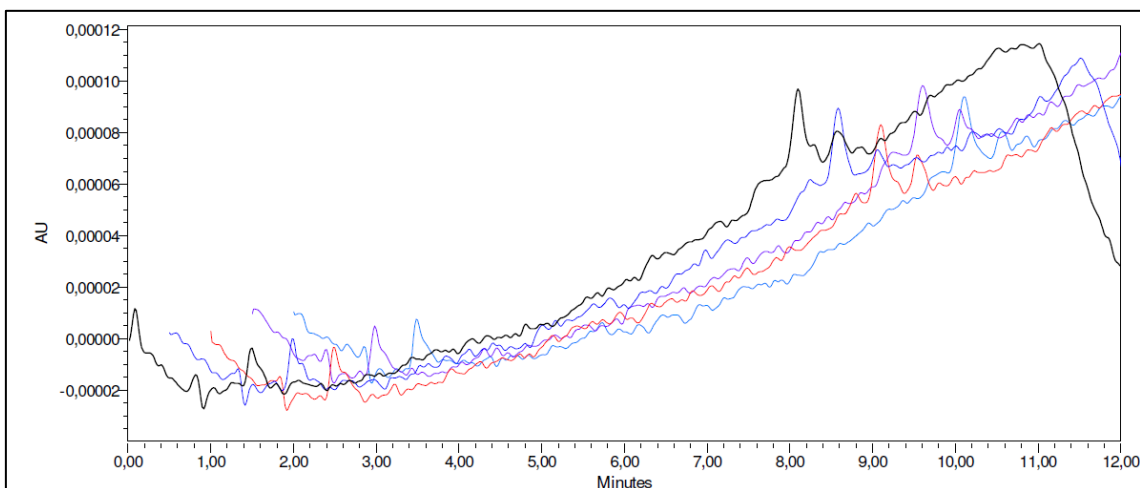
**Figura 34.** Exatidão do método cromatográfico para licochalcone A (100 µg/ mL).

#### 4.2.4 Especificidade

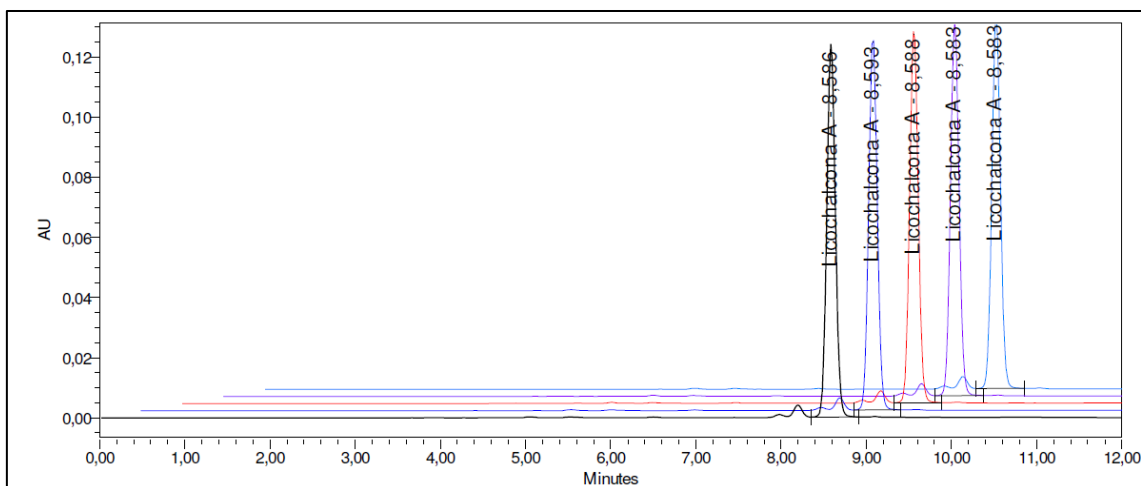
A especificidade foi realizada injetando-se cinco replicatas do diluente, fase móvel e solução de licochalcona A (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), demonstrados nas figuras 35, 36 e 37, respectivamente. Não foi observado nenhum interferente ou pico no mesmo tempo de retenção da licochalcona A nestes cromatogramas. Vale ressaltar a diferença na escala de AU entre os dois primeiros cromatogramas ( $10^{-4}$ ) para com o último ( $10^{-1}$ ).



**Figura 35.** Especificidade do método. Cromatograma do diluente.



**Figura 36.** Especificidade do método. Cromatograma da fase móvel.



**Figura 37.** Especificidade do método cromatográfico para licochalcona A (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna  $\text{C}_{18}$  e gradiente de eluição com eluente consistindo em metanol e ácido fosfórico foi reportada para análise de várias chalconas (CASTILLO *et al.*, 1991), como por exemplo, na determinação de chalconas presentes nas raízes de licorice (SEGIET-KUWAJA *et al.*, 1990). Estudos também descrevem metodologia para quantificação de licochalcona A em extrato desta planta, usando-se: coluna  $\text{C}_{18}$  e fase móvel isocrática de acetona e ácido acético (OKADA *et al.*, 1989); coluna *Hypersil ODS2* e fase móvel isocrática de metanol, água e ácido acético (CUI *et al.*, 2009).

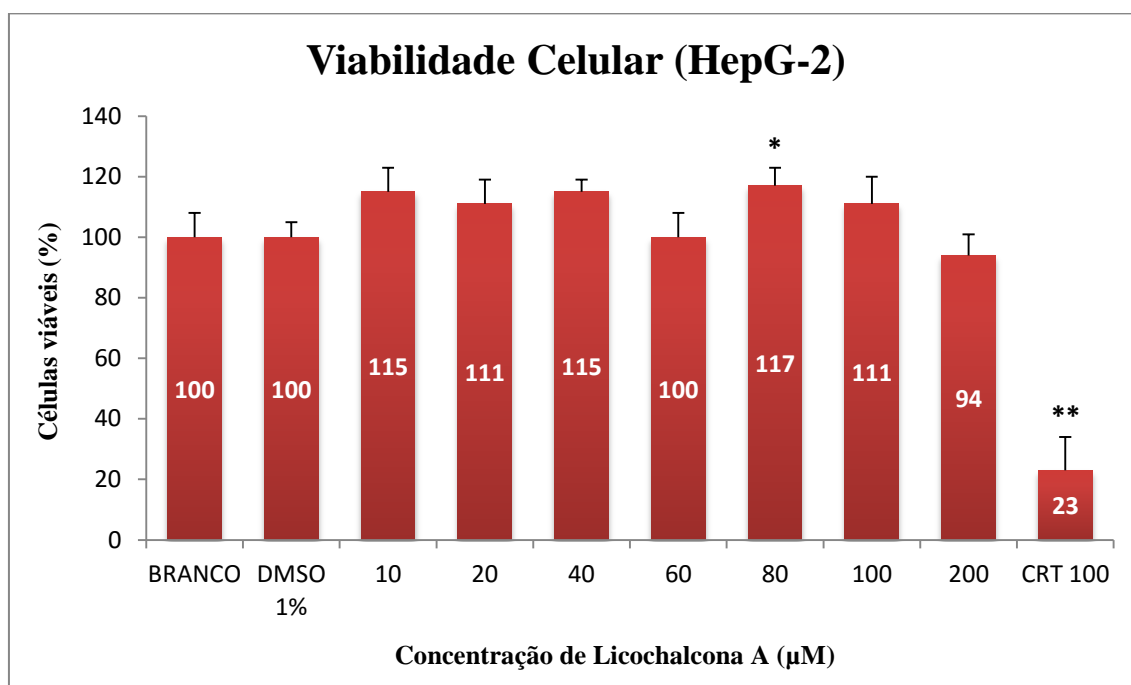
Nadelmann e colaboradores (1997b) foram os únicos a descreverem, até hoje, um método de quantificação de licochalcona A em fluidos biológicos. Após injeção intraperitoneal, a licochalcona A foi quantificada no sangue e na urina em ratos por CLAE-UV utilizando como fase móvel um gradiente de acetonitrila e ácido acético. Este método foi seletivo, reprodutivo, sensível e linear nas concentrações de 0,2 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto que em concentrações acima destas não foram obtidas respostas lineares. Assim sendo, a nossa metodologia apresenta uma alternativa para a quantificação de licochalcona A em valores acima de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , uma vez que demonstrou linearidade, precisão, exatidão e especificidade adequadas para concentrações entre 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , podendo ter aplicabilidade para quantificação desta substância tanto em extratos quanto em fluidos biológicos.

### 4.3 ESTUDOS *IN VITRO*

#### 4.3.1 Viabilidade celular

A influência da licochalcona A sobre a viabilidade celular *in vitro* das células de fibroblasto (NIH/3T3) e carcinoma hepatocelular humano (HepG-2) foi avaliada pelo método MTT (brometo de tetrazólio 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil) (SIEUWERTS, 1995).

Os resultados do efeito da licochalcona A na viabilidade celular frente à linhagem HepG-2 estão apresentados na figura 38.



**Figura 38.** Efeito da licochalcona A sobre a viabilidade de células HepG-2.

\* Diferença significativa quando comparado ao DMSO 1% ( $p < 0,05$ ), controle negativo.

\*\* Diferença significativa quando comparado ao DMSO 1% ( $p < 0,001$ ), controle negativo.

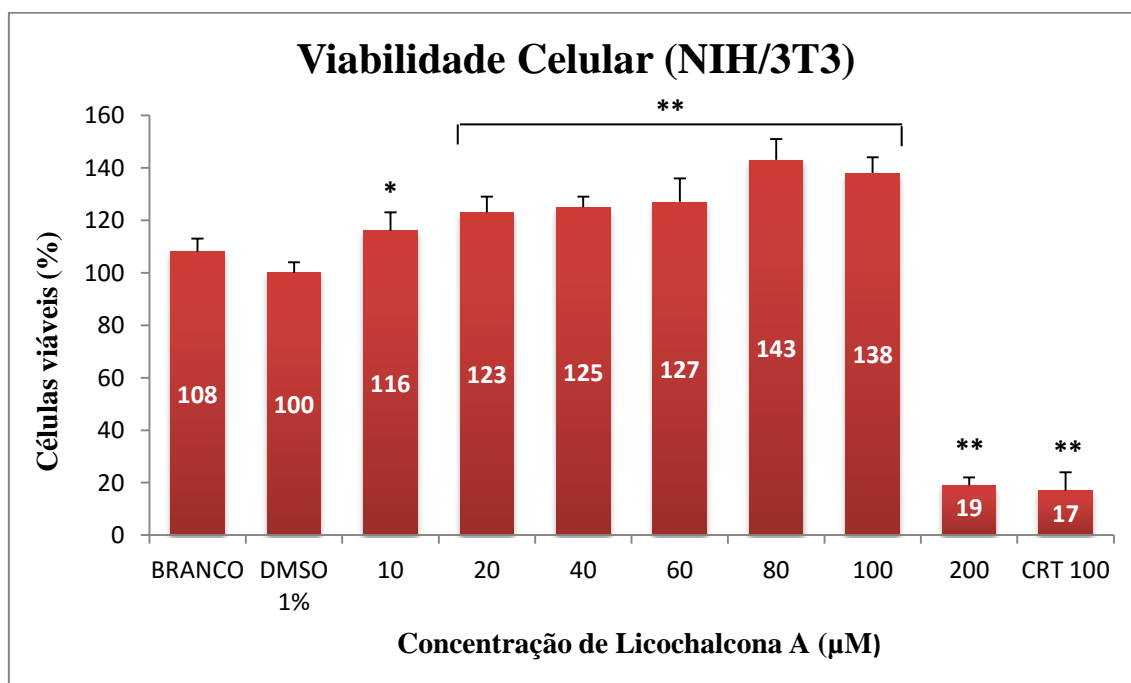
CRT 100: Licochalcona A (100 µM) sem presença de células.

Os resultados demonstram que a licochalcona A não apresentou redução significativa ( $p > 0,05$ ) na viabilidade das células de carcinoma hepatocelular (HepG-2) em todas as concentrações testadas (10 – 200 µM), após exposição de 24 h, quando comparados ao grupo controle negativo (DMSO 1%). De acordo com o programa de investigação de plantas do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, uma substância pura é considerada um ativo com potente efeito citotóxico quando o  $IC_{50}$  é igual a 4 µg/mL ou menor (apud MALEK *et al.*, 2011). Assim sendo, os resultados

encontrados sugerem que a licochalcona A não apresenta citotoxicidade importante, frente a esta linhagem celular.

Estudos com o uso de HepG-2 sugerem que esse sistema pode detectar hepatotoxicidade celular humana com até 80% de sensibilidade e até 90% de especificidade (O'BRIEN *et al.*, 2006). Com isso, os resultados encontrados sugerem, *in vitro*, que a licochalcona A não apresenta potencial tóxico hepatocelular. Entretanto, vale ressaltar, que estes resultados não descartam a possibilidade de atividade inibitória na viabilidade de outras linhagens celulares.

Resultados semelhantes foram observados no efeito da licochalcona A na linhagem de fibroblasto (NIH/3T3), que não apresentou redução da viabilidade destas células nas concentrações até 100  $\mu\text{M}$  (Figura 39). Entretanto, na concentração de 200  $\mu\text{M}$  houve uma redução de 81% do número de células vivas quando comparada com o grupo controle negativo (DMSO 1%), sendo considerada estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Estes dados demonstram que na concentração de 200  $\mu\text{M}$  de licochalcona A, ocorre citotoxicidade para esta linhagem celular, devendo, portanto, ser utilizado concentrações abaixo de 100  $\mu\text{M}$  em futuros experimentos de investigação de atividade farmacológica desta substância.



**Figura 39.** Efeito da licochalcona A sobre a viabilidade de células NIH/3T3.

\* Diferença significativa quando comparado ao DMSO 1% ( $p < 0,01$ ), controle negativo.

\*\* Diferença significativa quando comparado ao DMSO 1% ( $p < 0,001$ ), controle negativo.

CRT 100: Licochalcona A (100  $\mu\text{M}$ ) sem presença de células.

O ensaio de viabilidade celular baseia-se na medida do dano induzido pela substância/extrato em estudo no metabolismo celular, usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (SLATER *et al.*, 1963; MOSMANN, 1983).

Contudo, já foi demonstrada a capacidade de fatores extracelulares, como extratos e antioxidantes, em reduzir o MTT a formazan, a qual tem se dado pouca atenção (BRUGGISER *et al.*, 2002). Este efeito pode ser observado em ambos os experimentos, tanto frente à HepG-2 quanto à NIH/3T3, nos quais um controle contendo apenas licochalcona A em 100  $\mu\text{M}$  (CRT 100), nas mesmas condições que os demais, mas sem a presença de células, foi capaz de reduzir diretamente o MTT a formazan, levando a um resultado falso positivo de 23 e 17 % de células viáveis, respectivamente. Este “ponto crítico” do método ainda deixa obscuro se a licochalcona A na concentração de 200  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir apenas 81 % do número de células NIH/3T3 viáveis, ou realmente os 100 % destas, uma vez que, a quantidade de formazan formada, o equivalente a 19 % de células vivas, não foi estatisticamente diferente da quantidade de formazan formada diretamente pelo CRT 100 ( $p > 0,05$ ).

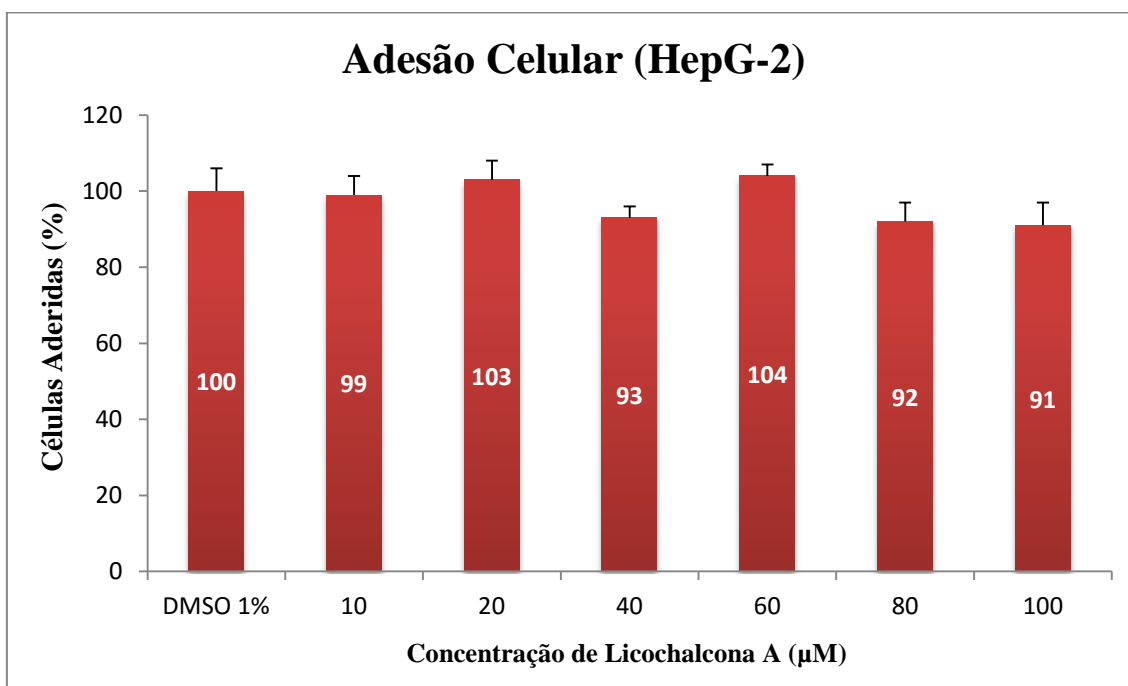
Esta possível redução direta do MTT pela licochalcona A poderia ainda, dentre outros, explicar o porquê da quantidade de formazan formado em algumas concentrações serem maiores que o equivalente a 100 % de células viáveis.

#### **4.3.2 Adesão celular**

Adesão celular consiste num processo complexo envolvido na embriogênese, migração, invasão e remodelagem tissular. Para tal, as células precisam aderir aos componentes da matriz extracelular (via receptores de adesão), formando complexos com os componentes do citoesqueleto, a qual afeta a motilidade celular, diferenciação, proliferação e sobrevivência (GUMBINER, 1996; ALBERTS *et al.*, 2004).

O ensaio de adesão celular *in vitro* permitiu determinar que a licochalcona A não interferiu neste processo de adesão de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG-2), no qual a quantidade de células aderidas foi quantificada pelo MTT. Os

resultados (Figura 40) demonstram que a licochalcona A não reduziu significativamente o número de células aderidas em nenhuma concentração testada (10 – 100  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 40.** Efeito da licochalcona A sobre a adesão de células HepG-2.

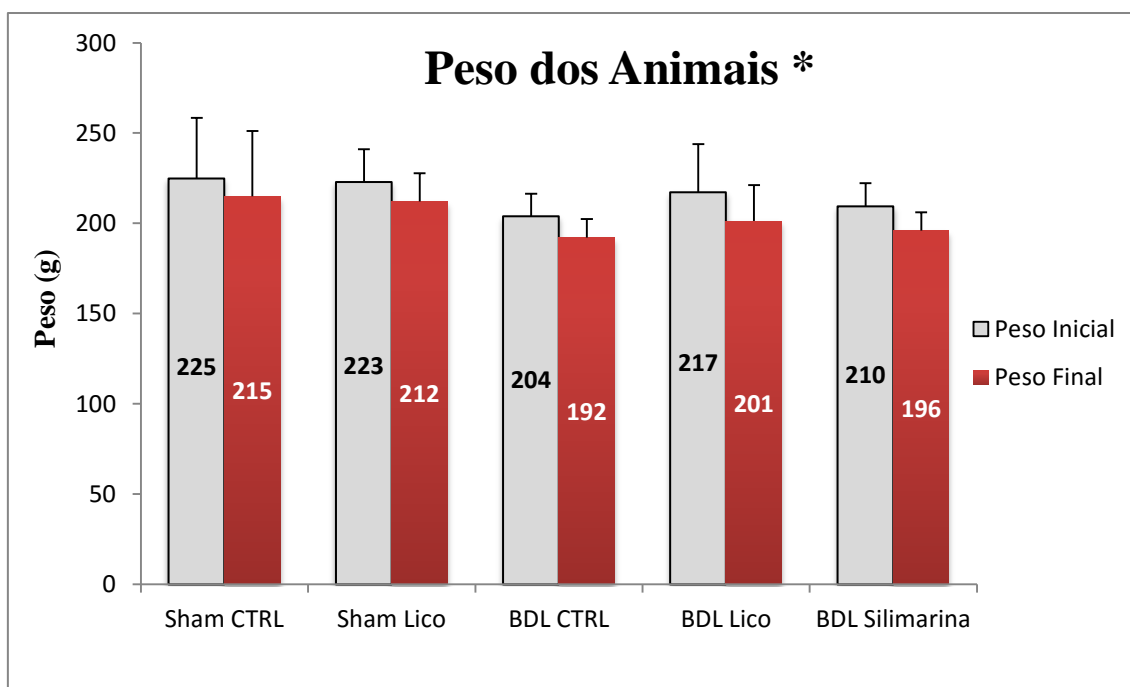
#### 4.4 ESTUDOS *IN VIVO*

##### 4.4.1 Peso dos animais e do fígado

Nos experimentos *in vivo* foram utilizados ratos Wistar (200 – 250 g), sendo que houve uma redução significativa entre os pesos dos animais antes da cirurgia (Peso inicial) e no dia da eutanásia (Peso final) ( $p < 0,01$ ), como demonstrado na figura 41.

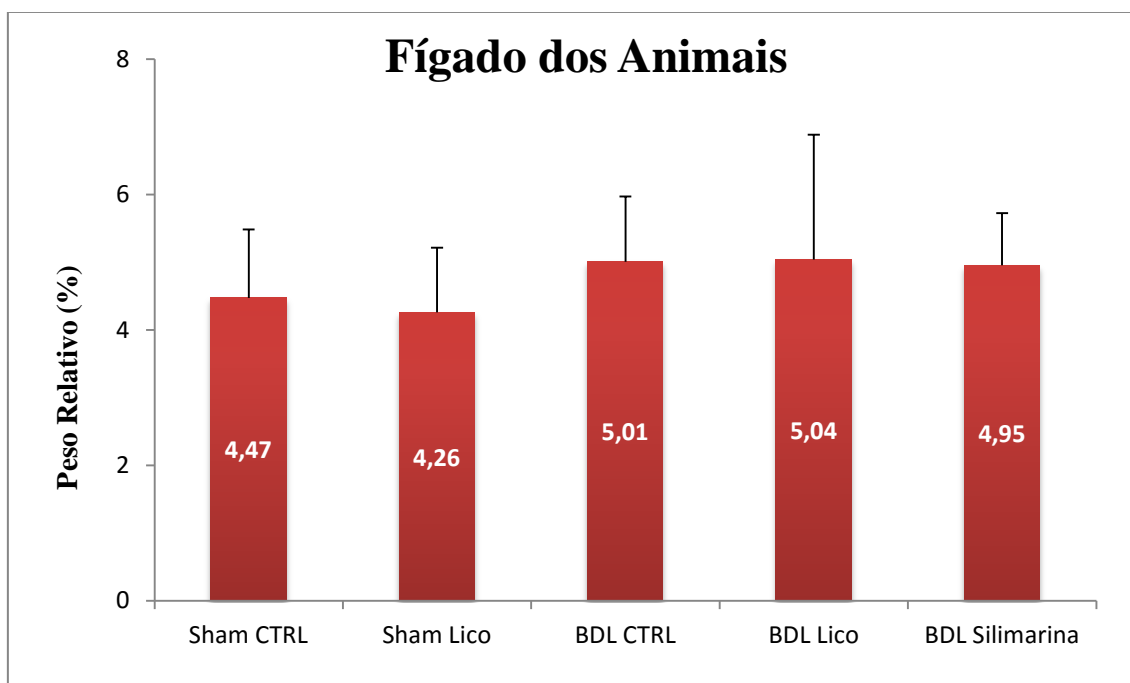
Já o peso realtivo do fígado dos animais, quando comparados entre os diferentes grupos não demonstraram redução (Figura 42).





**Figura 41.** Pesos médios iniciais e finais dos animais.

\* A diferença entre o Peso inicial e o Peso final de todos os grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

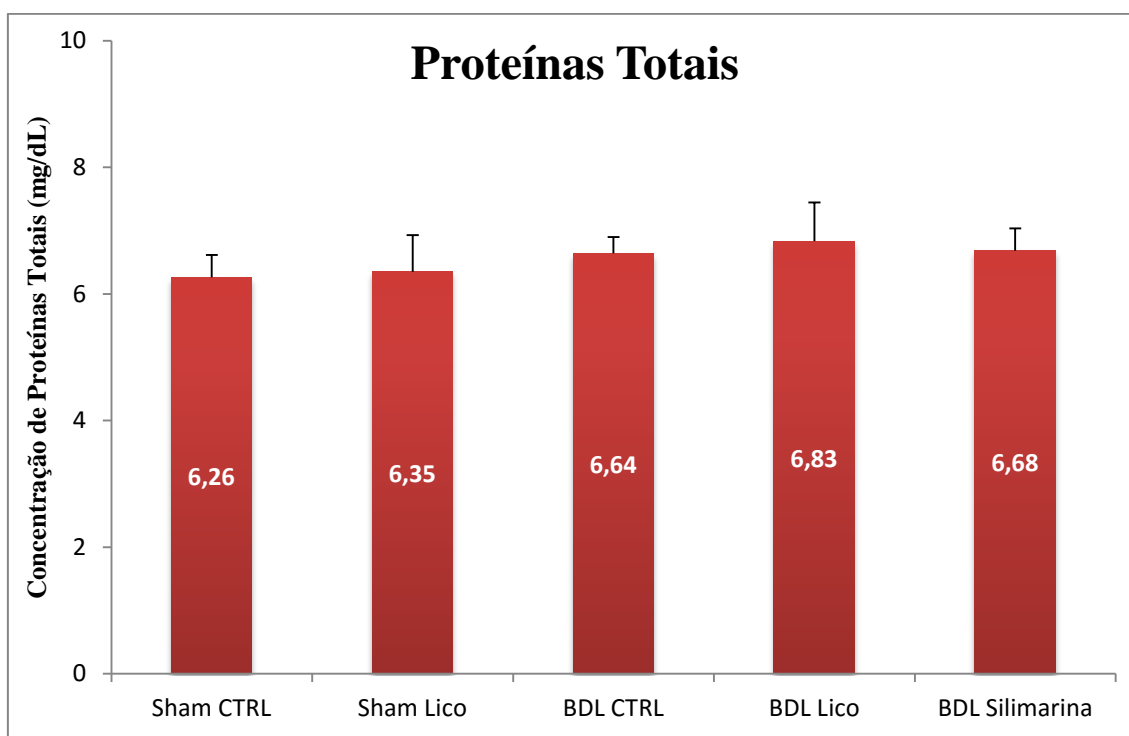


**Figura 42.** Peso médio dos fígados em relação ao peso dos animais. ( $p > 0,05$ )

#### 4.4.2 Proteínas totais

O fígado é o responsável pela produção da maioria das proteínas plasmáticas, sendo algumas dotadas de atividade enzimática, enquanto outras desempenham a função de transporte. Dentre elas, a albumina, uma proteína sintetizada exclusivamente pelo fígado, é o principal constituinte da proteína total, sendo a fração restante chamada de globulina (incluindo as imunoglobulinas) (MILLS, 2012).

O resultado de proteína total presente no soro dos animais está demonstrado na figura 43, na qual puderam ser observados valores muito próximos entre todos os grupos, não havendo diferença significativa entre eles ( $p>0,05$ ). Isto demonstra que o modelo de lesão hepática por BDL em apenas 48 h não foi capaz de alterar a capacidade de síntese proteica dos animais.

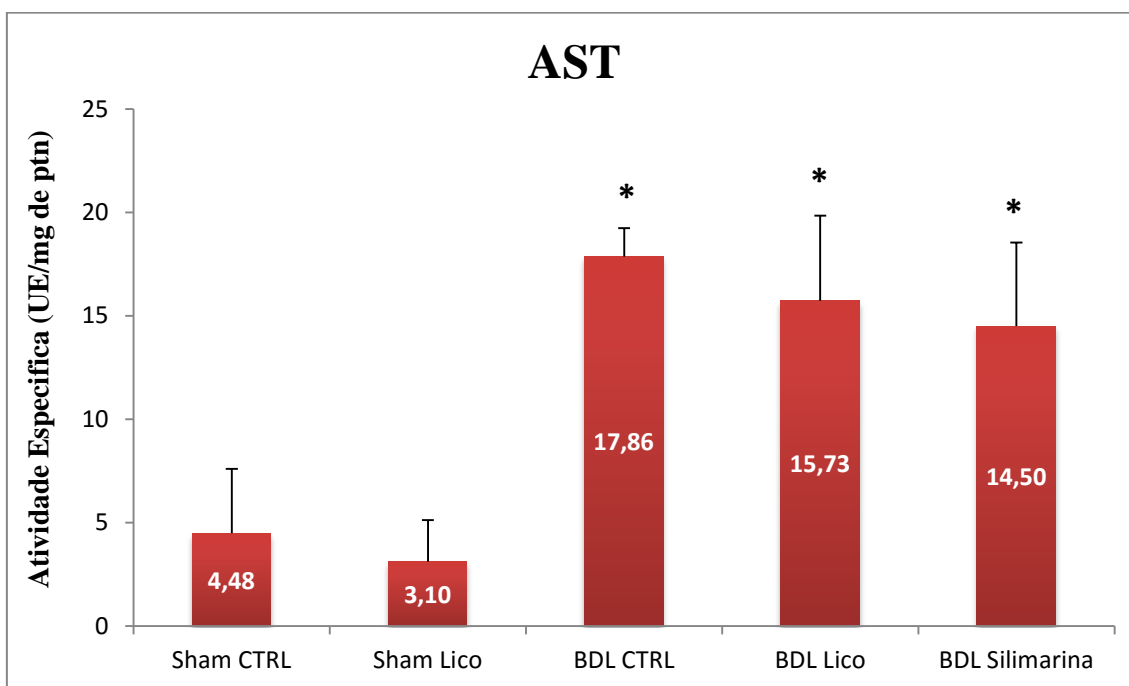


**Figura 43.** Níveis séricos de proteínas totais. ( $p>0,05$ ).

#### 4.4.3 Transaminases (AST e ALT)

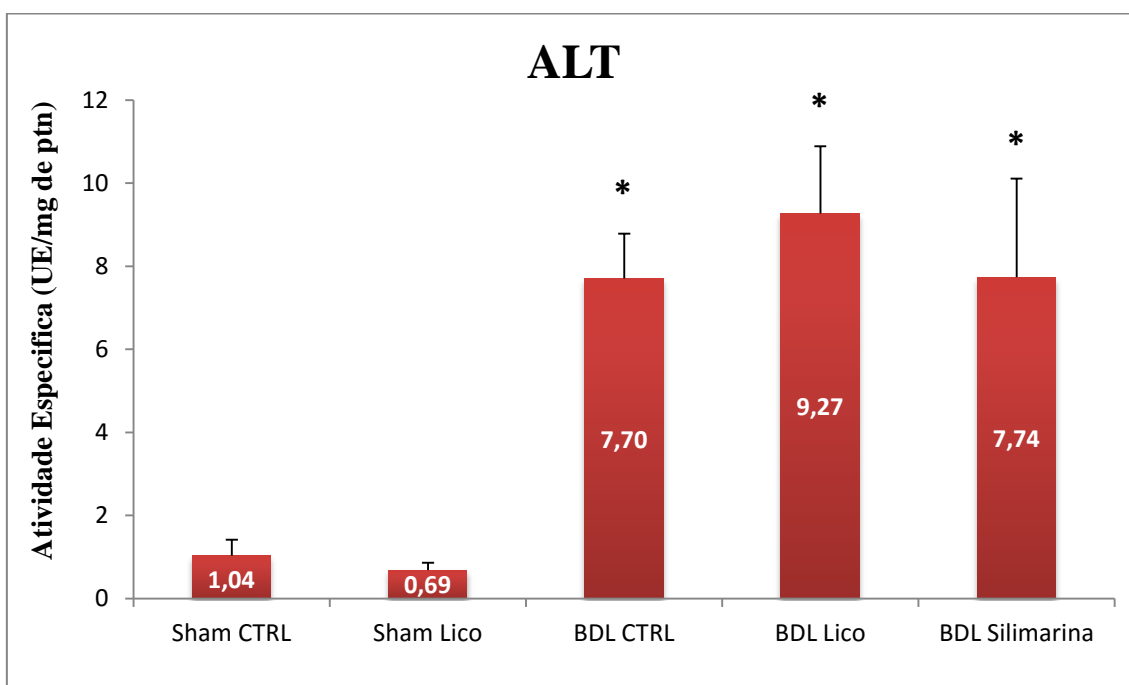
As enzimas AST (ou TGO) e ALT (ou TGP) catalisam a transferência reversível dos grupos amino de aminoácidos para o  $\alpha$ -cetoglutarato, formando ceto-ácido e ácido glutâmico.

Nas figuras 44 e 45 encontram-se os resultados referentes às atividades específicas da AST e ALT presente no soro dos animais, respectivamente.



**Figura 44.** Níveis séricos de AspartatoTransaminase (AST).

\* Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado aos grupos Sham CTRL (controle) e Sham Lico.



**Figura 45.** Níveis séricos de Alanina Transaminase (ALT).

\* Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado aos grupos Sham CTRL (controle) e Sham Lico.

De acordo com os resultados bioquímicos encontrados pode-se verificar que houve um aumento de AST e ALT plasmática após a ligadura do ducto biliar. Esta diferença foi significativa quando se comparam os valores médios da atividade específica destas enzimas dos grupos BDL com os grupos Sham ( $p < 0,001$ ). Este dado sugere que existe uma lesão hepatocelular após o impedimento do fluxo biliar por 48 h.

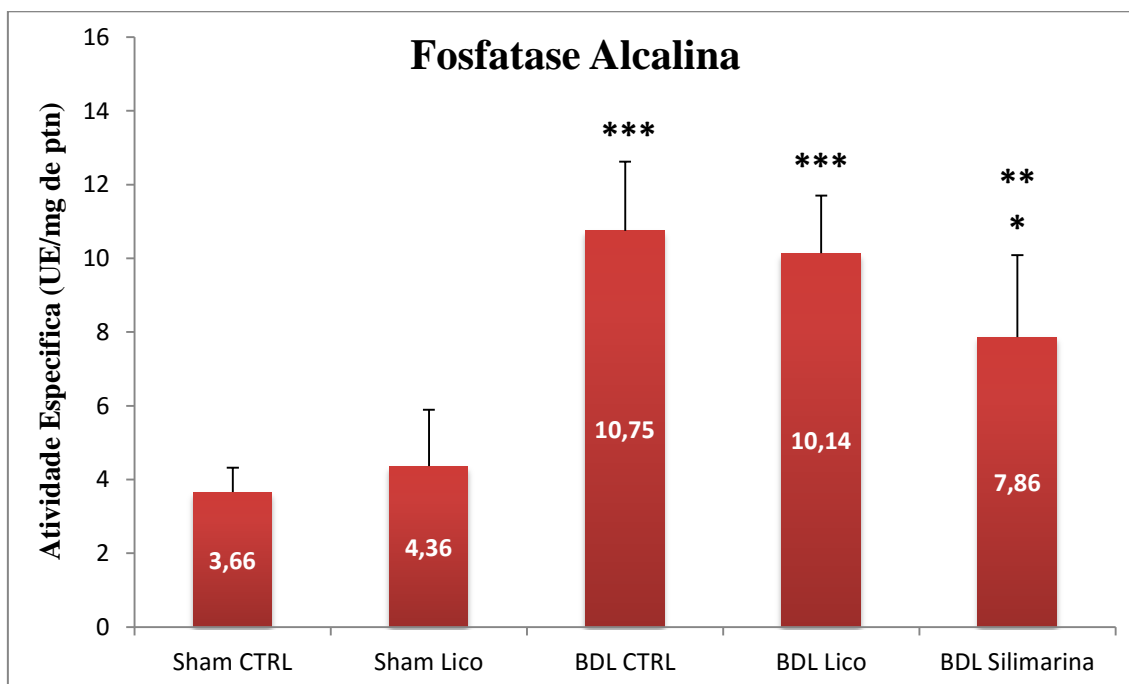
A AST e a ALT são enzimas intracelulares, presentes em grandes quantidades nos hepatócitos, e lesões ou destruição destas células liberam estas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST estão presentes na mitocôndria, assim sendo, em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a primeira, enquanto que em lesões graves há também liberação da enzima mitocondrial. Entretanto, a AST é encontrada também em músculos esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos (glóbulos vermelhos do sangue), logo, quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não existe um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa de seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada (MILLS, 2012).

Em outra análise, pode ser observado ainda, que não houve diferença significativa na atividade específicas das enzimas do grupo *Sham Lico* quando comparado ao grupo *Sham CTRL* ( $p > 0,05$ ), demonstrando que a licochalcona A não causou dano nas células hepáticas capaz de aumentar a liberação destas enzimas para a corrente sanguínea. Este resultado vai ao encontro daqueles encontrados nos experimentos *in vitro*, no qual se demonstrou que a licochalcona A não teve citotoxicidade em cultura de células HepG-2. Isto demonstra certa segurança na utilização desta substância para pesquisas de suas atividades biológicas, entretanto requer mais estudos sobre sua toxicidade.

Por outro lado, os resultados também não demonstraram diferença significativa entre os grupos BDL tratados com licochalcona A ou silimarina quando comparados com o grupo BDL controle ( $p > 0,05$ ). Estes resultados sugerem que talvez o tempo de tratamento (48 h) possa não ter sido suficiente para a promoção do efeito protetor relacionado ao dano hepatocelular causado pelo BDL.

#### 4.4.4 Fosfatase alcalina

Os resultados da atividade específica para fosfatase alcalina (FA) presente no soro dos animais estão demonstrado na figura 46.



**Figura 46.** Níveis séricos de Fosfatase Alcalina (FA).

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo Sham Lico.

\*\* Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) quando comparado aos grupos Sham CTRL (controle).

\*\*\* Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado com ambos os grupos Sham (controle e Lico).

Na análise dos resultados encontrados para FA, observa-se o aumento desta enzima nos animais com ligação do ducto biliar, sendo estatisticamente diferentes em todos os grupos BDL quando comparados com os grupos Sham. Como aqueles das transaminases, estes dados demonstram que existe uma lesão hepatocelular após a estase do fluxo biliar por 48 h.

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta. A forma predominante no soro em adultos normais origina-se, principalmente, do fígado e esqueleto. No fígado, a FA está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, e nas desordens do trato biliar, como o impedimento do fluxo biliar, sua concentração sérica atinge 2-3 vezes os valores de referência (podendo chegar a 10-15 vezes), dependendo do grau de estase biliar. Os

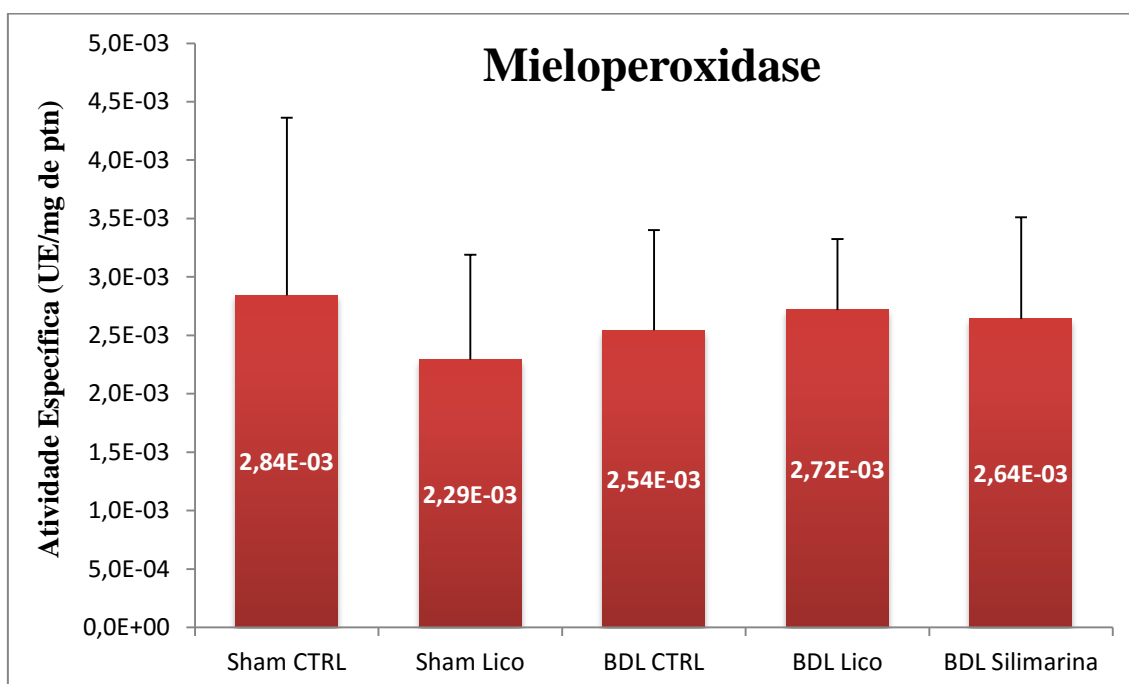
motivos destes aumentos podem ser por diversos fatores, a saber: a) incremento na síntese da enzima; b) retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a FA e a removem da membrana plasmática dos hepatócitos; c) regurgitação da enzima para a circulação pelo impedimento de sua excreção (KASPER *et al.*, 2005).

Mais uma vez, não houve diferença significativa entre o grupo Sham Lico (4,36 UE/mg de proteína) quando comparado ao grupo Sham CTRL (3,66 UE/mg de proteína) ( $p > 0,05$ ), sugerindo que a licochalcona A não causou dano nas células hepáticas capaz de aumentar os níveis séricos de FA, o que corrobora para demonstração de sua baixa hepatotoxicidade.

Entretanto, novamente, no tempo de tratamento do experimento realizado, a licochalcona A não demonstrou proteção do fígado, uma vez que o resultado de FA do grupo BDL Lico (10,14 UE/mg de proteína) foi estatisticamente igual ao grupo BDL controle (10,75 UE/mg de proteína) ( $p > 0,05$ ). O grupo BDL silimarina (7,86 UE/mg de proteína), mesmo demonstrando tendência de redução nos níveis de FA, também não apresentou significância estatística quando comparada ao BDL ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4.5 Mieloperoxidase

Os resultados de atividade específica de mieloperoxidase (MPO) extraída do tecido hepático retirado dos animais estão expostos na figura 47.



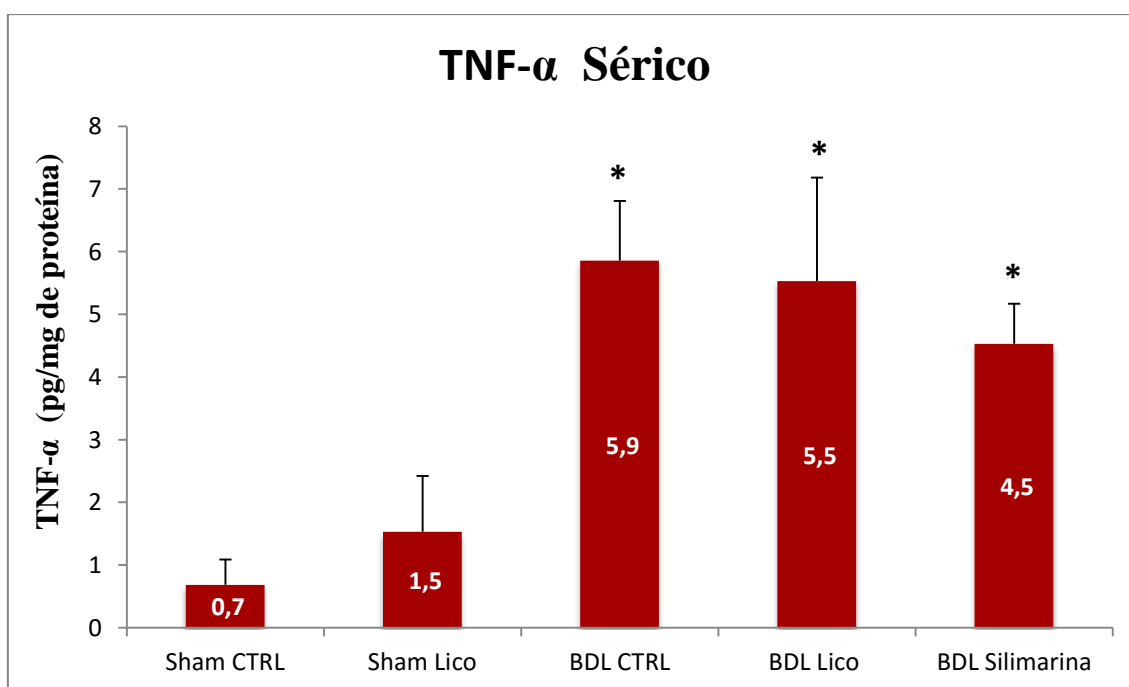
**Figura 47.** Atividade específica de Mieloperoxidase (MPO) extraída de tecido hepático. ( $p>0,05$ ).

Analisando os resultados encontrados para MPO do tecido hepático dos animais, visualiza-se que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos experimentais ( $p>0,05$ ). Estes dados demonstram que o procedimento de ligadura do ducto biliar não teve como resposta um aumento da expressão de mieloperoxidases neste tecido, já que não houve diferença entre os grupos Sham e BDL.

A mieloperoxidase é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes. Além de integrantes da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante inflamação. A principal função atribuída à MPO é microbicida, por produção de HOCl, embora já se reconheça sua participação mais ampla na bioquímica dos neutrófilos e monócitos, como sinalização da apoptose em vários tipos celulares, incluindo células do sistema imune, e ativação de produção de citocinas (VAN DER VEEN, 2009; PROKOPOWICZ, 2011).

#### 4.4.6 Fator de necrose tumoral – alfa

Os resultados de Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ) presente no soro dos animais está representado na figura 48.



**Figura 48.** Níveis séricos de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).

\* Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado com ambos os grupos Sham (controle e Lico).

Estes resultados demonstram um aumento de TNF- $\alpha$  nos grupos com ligação do ducto biliar, sendo estatisticamente diferentes quando comparados com os grupos Sham, sem obstrução deste ducto ( $p < 0,001$ ). Resultados em consonância com a literatura, que descrevem níveis de TNF-  $\alpha$  aumentados tanto a níveis séricos (BEMELMANS *et al.*, 1992) quanto em macrófagos hepáticos (FOX *et al.*, 1997) nos modelos de BDL.

Todavia, os grupos BDL Lico e BDL Silimarina não conseguiram reduzir significativamente os níveis séricos de TNF- $\alpha$  quando comparados ao BDL controle ( $p > 0,05$ ).

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*. Além disso, o TNF- $\alpha$  induz a insuficiência hepática ou pode agravar a lesão hepática após exposição a CCl<sub>4</sub> (CZAJA *et al.*, 1995). Por outro lado, o TNF-  $\alpha$  é necessário para regeneração do fígado após hepatectomia parcial (YAMADA *et al.*, 1997).



# CONCLUSÕES

## 5 CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados, podemos concluir que a metodologia de isolamento e purificação de licochalcona A, a partir do extrato seco das raízes de *Glycyrrhiza inflata*, foi satisfatória, obtendo-se grande quantidade de licochalcona A isolada e purificada. Além de demonstrar que os métodos de identificação utilizados (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) apresentaram-se confiáveis e reprodutíveis, já que os dados espectroscópicos obtidos foram facilmente confirmados com aqueles da literatura.

Conclui-se também que a metodologia proposta para quantificação desta substância por CLAE-UV foi adequada ao se utilizar concentrações entre 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrando linearidade, precisão, exatidão e especificidade adequadas.

Já os dados encontrados nos estudos *in vitro* demonstraram que a licochalcona A ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) não possui citotoxicidade relevante frente às linhagens celulares estudadas, assegurando sua utilização em estudos para investigação de atividades biológicas, em cultura dessas células. Este resultado foi confirmado no estudo em ratos, ao se comparar as análises bioquímicas do grupo sham tratado com licochalcona A (50 mg/Kg) e grupo sham controle (tratado apenas com veículo), não apresentando diferença significativa.

Os dados obtidos com a avaliação dos efeitos hepatoprotetores demonstram que a licochalcona A não foi capaz de promover proteção aos danos agudos do fígado provocados pela colestase extra-hepática induzida pelo modelo de ligação do ducto biliar em 48 horas. Todavia, vale ressaltar que os resultados obtidos não descartam a possibilidade do efeito hepatoprotetores da licochalcona A, tanto em outros modelos, quanto no próprio modelo de ligação do ducto biliar por um período maior.

Assim sendo, mediante os resultados obtidos, novas etapas podem ser planejadas:

- avaliar a aplicabilidade da metodologia de quantificação de licochalcona A por CLAE-UV em matrizes biológicas, como soro de ratos;
- desenvolver a validação completa desta metodologia segundo os critérios estabelecidos pelas agências reguladoras;
- verificar os efeitos da licochalcona A sobre o modelo de BDL prolongado (14 e/ou 28 dias).

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- ADEWUSI, E.A.; AFOLAYAN, A.J. A review of natural products with hepatoprotective activity. **J. Med. Plants Res.**, v. 4, n. 13, p. 1318-1334, 2010.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 1133.
- BANDGAR, B.P.; PATIL, S.A.; KORBAD, B.L.; BIRADAR, S.C.; NILE, S.N.; KHOBRAGADE, C.N. Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated aurone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 3223-3227, 2010.
- BARFOD, L.; KEMP, K.; HANSEN, M.; KHARAZMI, A. Chalcones from Chinese liquorice inhibit proliferation of T cells and production of cytokines. **Int. Immunopharm.**, v. 2, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de um novo agente cardioativo. **Quim. Nova**, v. 25, p. 1172-1180, 2002.
- BEMELMANS, M.H.; GOUMA, D.J.; GREVE, J.W.; BUURMAN, W.A. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. **Hepatol.**, v. 15, p. 1132-1136, 1992.
- BHATTACHARYA, A., MISHRA, L.C., SHARMA, M., AWASTHI, S.K., BHASIN, V.K. Antimalarial pharmacodynamics of chalcone derivatives in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum* in vitro. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, n. 9, p. 3388-3393, 2009.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med.**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.
- CAMERON, G.R.; HASAN, S.M. Cholagogues and liver necrosis. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 76, p. 592-593, 1958.
- CAMERON, G.R.; OAKLEY, C.L. Ligation of the common bile duct. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 35, p. 369-99, 1932.
- CARVALHO, A.A. **Estudo da atividade antimetastática da Biflorida, uma o-naftoquinona isolada das raízes da *Caprapria biflora***. Dissertação (Mestrado de farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CASTILLO, J.; BNAVENTE, O.; BORREGO, F.; DEL RIO, J.A. Analysis of commercial hesperidin methyl chalcone by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 555, p. 285-290, 1991.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K. Lic A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 2550–2556, 1993.

CHEN, M.; THEANDER, T.G.; CHRISTENSEN, S.B.; HVIID, L.; ZHAI, L.; KHARAZMI, A. Lic A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 1470–1475, 1994.

CHIEN, C.F.; WU, Y.T.; TSAI, T.H. Biological analysis of herbal medicines used for treatment of liver diseases. **Biomed. Chromatog.**, v. 25, p. 21-38, 2011.

COMELLI, M.C.; MENGES, U.; SCHNEIDER, C.; PROSDOCIMI, M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. **Integr. Cancer Ther.**, v. 6, n. 2, p. 120-129, 2007.

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. **Phytochem.**, v. 55, p. 463-480, 2000.

CUI, Y.; SHI, Y.; CHEN, W.; ZENG, Q.; YU, L. HPLC determination of licochalcone A in licorice. 2009.

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

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3<sup>a</sup> ed., New York: Wiley, 2009.

DOOLEY, J.; SHERLOCK, S. **Doenças do Fígado e do Sistema Biliar**. 11 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

DOOLEY, J.; SHERLOCK, S. **Doenças do Fígado e do Sistema Biliar**. 8 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

EDDARIR, S.; COTELLE, N.; BAKKOUR, Y.; ROLANDO, C. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. **Tetrahedron. Lett.**, v. 44, p. 5359- 5363, 2003.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 3<sup>a</sup> edição. 1977.

FOX, E.S.; KIM, J.C.; TRACY, T.F. NF-kappaB activation and modulation in hepatic macrophages during cholestatic injury. **J. Surg. Res.**, v. 72, n. 2, p. 129-134, 1997.

FRANÇA, R.F. **Avaliação do efeito de veneno de *Crotatus durissus terrificus* e diltiazem em fígado de ratos Wistar**: estudo histopatológico e bioquímico. 84 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Vale Paraíba, São José dos Campos, 2004.

FRIIS-MOLLER, A.; CHEN, M.; FUURSTED, K.; CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A. *In vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. **Planta Med.**, v. 68, p. 416-419, 2002.

FUNAKOSHI-TAGO, M. *et al.* Licochalcone A is a potente inhibitor of TEL-Jak-2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Biochem. Pharm.**, v. 76, p. 1681-1693, 2008.

FUNAKOSHI-TAGO, M. *et al.* The structure of licochalcone A by  $\alpha,\beta$  unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF- $\kappa$ B factor activation. **Intern. Immunopharm.**, v. 10, p. 562-571, 2010.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; TANABE, S.; TAGO, K.; ITOH, H.; MASHINO, T.; SONODA, Y.; KASAHARA, T. Licochalcone A potently inhibits tumor necrosis factor- $\kappa$ B Kinase activation through the direct inhibition of  $\kappa$ B kinase complex activation. **Mol. Pharm.**, v. 76, n. 4, p. 745-753, 2009.

FURUSAWA, J.I.; FUNAKOSHI-TAGO, M.; TAGO, K.; MASHINO, T.; INOUE, H.; SONODA, Y.; KASAHARA, T. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation at serine 276. **Cell Signal.**, v. 21, p. 778-785, 2009.

GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F.; MELLO, E.S. Fígado e vias biliares. *In*: FILHO, G.B. **Bogliolo patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011. p. 643-699.

GUIDA, A.; LHOUTY, M. H.; TICHIT, D.; FIGUERAS, F.; GENESTE, P. Hydroxaldehydes as base catalysts. Kinetics of Claisen-Schmidt condensation, intramolecular condensation of acetylacetone and synthesis of chalcone. **Appl. Catal. A.**, v. 164, p. 251-264, 1997.

GUMBINER, B.M. Cell Adhesion: Review The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. **Cell. Press.**, v. 84, p. 345-357, 1996.

HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; YUKIYOSHI, T.; MIZUTANI, K.; KINOSHITA, T. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochem.**, v. 48, p. 125-129, 1998.

HASSAN, M.H.; EDFAWY, M.; MANSOUR, A.; HAMED, A.A. Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Toxic. Indust. Health**, v. 28, n. 5, p. 428-438, 2012.

KAJYAMA, K. *et al.* Two prenylated retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochem.**, v. 31, n. 9, p. 3229-3232, 1992.

KASPER, L.D., *et al.* **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 16 ed. McGraw-Hill: Medical Publishing Division, 2005

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 148-152, 2001.

KINNMAN, N.; ANDERSSON, U.; HULTCRANTZ, R. In situ expression of transforming growth factor-beta 1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 35, p. 1294-1300, 2000.

KITAMURA, T. *et al.*. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 12, p. 1839-1847, 2002.

KOUNTOURAS J, BILLING BH, SCHEUER PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 65, p. 305-311, 1984.

KROMANN, H.; LARSEN, M.; BOESEN, T.; SCHØNNING, K.; NIELSEN, S.F. Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 39, p. 993-1000, 2004.

MACOMBER, R. Proton-Carbon Chemical Shift Correlations. **J. Chem. Educ.**, v. 68, p. 284-285, 1991.

MALEK, S.N.; PHANG, C.W.; IBRAHIM, H.; NORHANOM, A.W.; SIM, K.S. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. **Molecules**, v. 16, n. 1, 583-589, 2011.

MARTINS, M.J.; NEGRÃO, M.R.; HIPÓLITO-REIS, C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clin. Biochem.**, v. 34, n. 6, p. 463-468, 2001.

MAYER, K.E.; MYERS, R.P.; LEE, S.S. Silymarin treatment of viral hepatitis: a systemic review. **J. Viral Hepat.**, v. 12, n. 6, p. 559-567, 2005.

MILLS, S.E. **Histology for pathologists**. 4 ed. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 1328.

MISHRA, L.C., BHATTACHARYA, A., BHASIN, V.K. Phytochemical licochalcone A enhances antimalarial activity of artemisinin *in vitro*. **Acta. Tropic.**, v. 109, n. 3, p. 194-198, 2009.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1963.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ: Medbook, 2009. p. 90-120.

- MURIEL, P.; RIVERA-ESPINOSA, Y. Benfical drugs for liver diseases. **J. App. Toxic.**, v. 28, n. 2, p. 93-103, 2008.
- MURPHY, J.M.; BABAN, M.; KEMPER, K. Milk thistli (*Silybum marianum*). **The Longwood Herbal Task Force**, p. 1-25, 2000.
- NADELMANN, L.; TJORNELUND, J.; CHRISTENSEN, E.; HANSEN, S.H. High-performance liquid chromatographic determination of licochalcone A and its metabolites in biological fluids. **J. Chromatogr.**, v. 695, p. 389-400, 1997b.
- NAGALEKSHMT, R.; MEMON, A.; CHANDRASEKHARAN, D.K.; NAIR, C.K.K. Hepatoprotective activity of *Andrographis apiculata* and *Swertia chirayita*. **Food and Chem. Toxic.**, v. 49, n. 12, p. 3367-3373, 2011.
- NAGAOKA, M.R. *et al.* Is the expression of kinin B1 receptor related to intrahepatic vascular response? **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 1760, p. 1831-1836, 2006.
- NADELMANN, L. *et al.* Synthesis, isolation and identification of glucuronides and mercapturic acids of a novel antiparasitic agent, licochalcone A. **Xenobiotica**, v. 27, n. 7, p. 667-680, 1997a.
- NASSIRI, M., HOSSEINZADEH, H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza sp.* and its bioactive compounds. **Phytotherapy Res.**, v. 22, n. 6, p. 709-724, 2008.
- NEGI, A.S.; KUMAR, J.K. Recent advances in plant hepatoprotectives: a chemical and biological profile of some important leads. **Med. Res. Reviews**, v. 28, n. 5, p. 746-772, 2008.
- NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert. Opin. Ther. Pat.**, v. 14, p. 1669-1691, 2004.
- NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p. 125-137, 2007.
- 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.**, v. 80, p. 580-604, 2006.
- OKADA, K. *et al.* Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjiang origin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 2528, 1989.
- OLIVEIRA, I.M.V.; FUJIMORI, E.; PEREIRA, V.G.; LIMA, A.R. Relationship between liver GGT activity and glutathione content in chronic-malnourished pups of adolescent rats. **Nut. Res.**, v. 20, n. 1, p. 103-111, 2000.
- PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; LAMPMAN, G.M. **Introdução À Espectroscopia - Tradução da 4ª Edição Norte-americana.** São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PROKOPOWICZ, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KATZ, D.R.; CHAIN, B.M. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 60, n. 1, p. 43-54, 2012.



- RATES, S. M. K. Plants of source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- REICHEL, C. *et al.* Elevated soluble tumour necrosis factor receptor serum concentrations and short-term mortality in liver cirrhosis without acute infections. **Digestion**, v. 62, n. 1, p. 44-51, 2000.
- ROHLF, F. J., SOKAL, R. R. **Statistical tables**. 3. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman and Co., 1995. p. 199.
- ROMANELLI, G.; PASQUALE, G.; SATHICQ, A.; THOMAS, H.; AUTINO, J.; VÁZQUEZ, P. Synthesis of chalcones catalyzed by aminopropylated silica sol-gel under solvent-free conditions. **J. Mol. Catal. A. Chem.**, v. 340, p. 24-32, 2011.
- SAHU, N.K.; BALBHADRA, S.S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D.V. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, p. 209-225, 2012.
- SAHU, S.C. **Hepatotoxicity from genomics to *in vitro* and *in vivo* models**. John Wiley & Sons, 2007.
- SEGIET-KUWAJA, E.; DROZDZYNSKA, M.; MICHALOWSKA, A.; JASTRZAB, B. **Herba Polonica**, v. 36, p. 33, 1990.
- SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures *in vitro* for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **Eur. J. Clin. Chem. and Clin. Biochem.**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.
- SILVEIRA, M.G.; LINDOR, K.D. Treatment of primary biliary cirrhosis: therapy with choleretic and immunosuppressive agents. **Clin. Liver Dis.**, v. 12, p. 425-443, 2008.
- SIMÕES, C.M.A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.
- SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRAUCHLI, U. Studies on succinate tetrazolium reductase system III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.
- SZLISZKA, E.; CZUBA, Z.P.; MAZUR, B.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells. **Molecules**, v. 15, p. 5336-5353, 2010b.
- SZLISZKA, E.; CZUBA, Z.P.; MAZUR, B.; SEDEK, L.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalcones enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, p. 1-13, 2010a.
- TAGO, M.F.; TAGO, K.; NISHIZAWA, C.; TAKAHASHI, K.; MASHINO, T.; IWATA, S.; INOUE, H.; SONODA, Y.; KASAHARA, T. Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Bioch. Pharmacol.**, v. 76, p. 1681-1693, 2008.

TRAUNER, M. *et al.* The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. **Gastroenterol.**, v. 113, p. 255–264, 1997.

TUNG, Y.T.; WU, J.H.; HUANG, C.C.; PENG, H.C.; CHEN, Y.L.; YANG, S.C.; CHANG, S.T. Protective effect of *Acacia confuse* bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. **Food and Chem. Toxic.**, v. 47, n. 6, p. 1385-1392, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DER VEEN, B.S.; DE WINTHER, M.P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxid. Redox Signal**, v. 11, n. 11, p. 2899-2937, 2009.

VISHNU-PRIYA, V.; NIVEDA, S.; PRATIKSHA, G.; GAYATHRI, R. A review of epatoprotective natural products. **Biochem.**, v. 2, n. 11, p. 49-52, 2010.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J. P.; WENNERBERG, T. VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1375-1389, 2004.

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

YAMADA, Y.; KIRILLOVA, I.; PESCHON, J.J.; FAUSTO, N. Initiation of liver growth by tumour necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumour necrosis factor receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 1441–1446

YIN, M. *et al.* Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury. **Gastroenterol.**, v. 117, p. 942–952, 1999.