



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas – CCET

**DANIELA PEREIRA DA SILVA ALVES**

**AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA REDUÇÃO DE  
DANOS HEPÁTICOS INDUZIDO POR CCl<sub>4</sub>**

**ANAPÓLIS**

**2018**

**DANIELA PEREIRA DA SILVA ALVES**

**AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA REDUÇÃO DE  
DANOS HEPÁTICOS INDUZIDO POR CCl<sub>4</sub>**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Goiás como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Ma. Dorcas Fernandes dos Anjos Melo

**ANAPÓLIS**

**2018**

## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

**Título do Trabalho:** AÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA REDUÇÃO DE DANOS HEPÁTICOS INDUZIDOS POR CCL4

**Autora:** DANIELA PEREIRA DA SILVA ALVES

**Orientadora:** M.a DORCAS FERNANDES DOS ANJOS DE MELO

A autora apresentou em sessão pública o Trabalho de Curso, às 10 horas, de 19 de novembro de 2018, segunda-feira, no curso de Farmácia do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo da Universidade Estadual de Goiás. Em seguida, cada membro da Banca Examinadora fez suas considerações e arguições. A Banca examinadora, em reunião fechada, realizou a avaliação do trabalho e da apresentação, proclamando o seguinte resultado:

- ( ) aprovado
- aprovado com correções
- ( ) reprovado.

A presidência encerrou a sessão pública de defesa do Trabalho de Curso.

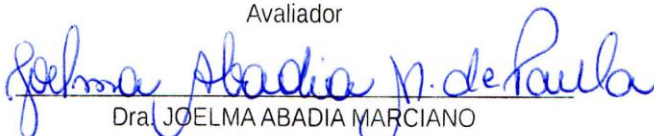
Anápolis, 08 de Novembro de 2018.



M.a DORCAS FERNANDES DOS ANJOS DE MELO  
Orientador/ Presidente da Banca Examinadora



Dra. ELISA FLÁVIA BAILÃO  
Avaliador



Dra. JOELMA ABADIA MARCIANO  
Avaliador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado o dom da vida, ter iluminado meu caminho, proporcionado proteção, saúde e força para enfrentar as dificuldades, e auxiliar-me na tomada das minhas decisões.

Sou grata aos meus pais, Antônio Pereira da Silva e Silvânia Alves Pereira, que me deram todo suporte e não mediram esforços para a conclusão deste sonho. Pai e mãe, obrigado por vocês terem me ensinado a importância do amor e respeito com o próximo. Obrigado por se fazerem tão presentes e necessários, me ajudando gradativamente a ser a pessoa que eu sou. Obrigada por serem a minha luz nos momentos de indecisões.

Agradeço pela dedicação de tantas noites mal dormidas, sem reclamar. Vocês são um presente de Deus para mim, agradeço a Ele por ter pais maravilhosos como vocês. À vocês dois, minha eterna gratidão.

À minha irmã, Gabriela Pereira da Silva Aves, pelo incentivo e confiança. Agradeço pela compreensão, companheirismo e carinho concedido.

À professora Ma. Dorcas Fernandes dos Anjos Melo por ter me acolhido na unidade de Anápolis. Agradeço pela orientação, incentivo e amizade. Por ter me possibilitado uma vivência científica e um compartilhamento de experiências.

A todos os professores, incluindo os que participaram da minha alfabetização. Agradeço aos professores de Itumbiara, que foram os responsáveis pela base do meu conhecimento. E também aos de Anápolis, os quais tive o prazer de conviver por um período maior. Estes ensinaram, educaram e me auxiliaram na caminhada, demonstraram suas experiências e abordaram meus conhecimentos, fatores que garantiram trocas de experiências.

Aos amigos que conquistei durante esses cinco anos, pelos momentos de dificuldades, alegrias e aprendizado.

À meus familiares, que torceram pela realização do meu sonho, acreditaram e foram importantes durante a caminhada.

Agradeço aos meus avôs, que infelizmente não estão mais presentes. No entanto, foram peças cruciais para a minha existência. À eles dedico este trabalho, como forma de agradecimento.

Ao professor Dr. Luiz Carlos da Cunha pela oportunidade e confiança na realização desse projeto. Juntamente com o Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-

Farmacológicas (NEPET), que garantiu a realização dos nossos ensaios através da disponibilização de infraestrutura.

À banca examinadora, por dedicar seu tempo, a fim de apresentar críticas construtivas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

## RESUMO

O ácido rosmarínico (AR) é um metabólito secundário que apresenta efeitos biológicos, como atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade hepatoprotetora do ácido rosmarínico (AR), em ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas, após intoxicação com tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Este estudo teve aprovação da Comissão em Ética no uso de Animais sob nº. 128/14. Os animais apresentavam de 8 a 12 semanas de vida, sendo adultos jovens, com peso entre 180 a 240 g, foram alojados em gaiolas de polipropileno, um total de 5 grupos contendo 5 animais cada, grupo 1 controle Basal (sem tratamento); grupo 2 controle intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas; grupo 3 controle tratado com Silimarina 25 mg/Kg p.c +  $\text{CCl}_4$ ; grupo 4 tratado com AR 30 mg/Kg p.c +  $\text{CCl}_4$ ; grupo 5 tratado com AR 50 mg/Kg p.c +  $\text{CCl}_4$ , com dieta normal. Dados fisiológicos (peso, consumo de água, consumo de ração, produção de fezes e urina) e alterações comportamentais anormais durante o estudo, foram observados. Parâmetros hepáticos foram analisados em todos os grupos: aminotransferases – AST (aspartato-aminotransferase) e ALT (alanina-aminotransferase) e malondialdeído (MDA, marcador da atividade oxidativa). Os dados fisiológicos apresentados não demonstraram diferenças significativas comparadas ao grupo basal, contudo os animais do grupo intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas reduziram a produção de excretas de forma significativa,  $p < 0,05$ , comparada ao grupo basal, provavelmente devido à presença de lesões gastrointestinais. O tetracloreto de carbono  $\text{CCl}_4$  (2,0 mL/kg i.p.) demonstrou seu efeito tóxico ao provocar intoxicação nas células hepáticas aumentando significativamente os biomarcadores de lesão tanto para a enzima AST como ALT com  $p < 0,05$  em relação ao controle Basal. O ácido rosmarínico na dose de 30 mg/kg diminuiu para ambas as enzimas ( $p < 0,05$ ). Mas para a dose de 50 mg/kg, houve redução estatística ( $p < 0,05$ ) somente para a enzima AST. O grupo controle tratado com silimarina 25 mg/kg confirmou seu efeito protetor, ao reduzir os níveis de AST, com significância estatística de  $p < 0,05$  comparada ao grupo intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas. O aparecimento de necrose tecidual é o limite às alterações celulares, por ser uma consequência frequente de processos inflamatórios, degenerativos e infiltrativos. Essa morte tecidual pode ser caracterizada pela incapacidade de restauração do equilíbrio homeostático. Por conseguinte, de acordo com a metodologia empregada o ácido rosmarínico demonstrou ser hepatoprotetor em lesões hepáticas induzidas por tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), principalmente na dosagem de 50 mg/kg.

Palavras-chave: Antioxidante. Hepatoproteção. Lipoperoxidação. Tetracloreto de carbono.

## ABSTRACT

Rosmarinic acid (RA) is a secondary metabolite that has biological effects, such as antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and antioxidant activity. The main goal of this study was to analyse the hepatoprotective capacity of rosmarinic acid (RA) in female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) after carbon tetrachloride poisoning ( $\text{CCl}_4$ ). This study was approved by the Commission on Ethics in the use of Animals under nos. 128/14. The animals had 8 to 12 weeks of life. Young adults, weighing between 180 and 240 g, were housed in polypropylene cages, with a total of 5 groups containing 5 animals each, group 1 Basal control (without treatment); group 2 control intoxicated with  $\text{CCl}_4$  2 mL / kg for 12 hours; group 3 control treated with Silymarin 25 mg / kg p.c. +  $\text{CCl}_4$ ; group 4 treated with AR 30 mg / kg p.c. +  $\text{CCl}_4$ ; group 5 treated with AR 50 mg / kg p.c. +  $\text{CCl}_4$ , with normal diet. Physiological data (weight, water consumption, feed intake, feces production and urine) and abnormal behavioral changes during the study were observed. Hepatic parameters were analyzed in all groups: aminotransferases - AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase) and malondialdehyde (MDA, marker of oxidative activity). The physiological data presented did not show significant variation compared to the basal group, but the animals of the  $\text{CCl}_4$  group 2 mL / kg for 12 hours significantly reduced excreta production,  $p < 0.05$ , compared to the basal group, probably due to the presence of gastrointestinal lesions. Carbon tetrachloride  $\text{CCl}_4$  (2.0 mL / kg i.p.) demonstrated its toxic effect by causing intoxication in liver cells by significantly increasing the lesion biomarkers for both AST and ALT with  $p < 0.05$  compared to the Basal control. Rosmarinic acid at the dose of 30 mg / kg decreased for both enzymes ( $p < 0.05$ ). But at the dose of 50 mg / kg, there was a statistical reduction ( $p < 0.05$ ) only for the AST enzyme. The control group treated with silymarin 25 mg / kg confirmed its protective effect by reducing AST levels, with a statistical significance of  $p < 0.05$  compared to the 2 mL / kg  $\text{CCl}_4$  group for 12 hours. The appearance of tissue necrosis is the limit to cellular alterations, being a frequent consequence of inflammatory, degenerative and infiltrative processes. This tissue death can be characterized by the inability to restore the homeostatic balance. Therefore, according to the methodology used rosmarinic acid was shown to be hepatoprotective in hepatic lesions induced by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ), mainly in the dosage of 50 mg / kg.

Keywords: Antioxidant. Hepatoprotection. Lipoperoxidation. Carbon tetrachloride.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura molecular do ácido rosmarínico. ....	23
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do tetracloreto de carbono. ....	27
<b>Figura 3</b> - Mecanismo de toxicidade do CCl <sub>4</sub> no organismo. ....	28
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do desenho experimental ....	33
<b>Figura 5</b> - Níveis plasmáticos das transaminases.....	35
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografias de amostras de fígado de ratos.....	38
<b>Figura 7</b> - Níveis hepáticos de MDA. ....	39



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros fisiológicos dos ratos, durante os cinco dias de experimentação. ....	39
---	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies vegetais que contém ácido rosmarínico.....	23
Quadro 2 - Substâncias utilizadas nos modelos experimentais.....	26
Quadro 3 - Distribuição dos grupos de animais e detalhes dos procedimentos experimentais.....	31

## LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variação
AR	Ácido rosmarínico
AST	Aspartato aminotransferase
BFF	Biotério da Faculdade de Farmácia
CCl <sub>3</sub>	Triclorometil
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CYP2E1	Subunidade 2E1
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DL50	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido/ Sulfóxido de dimetilo
ERO	Espécies reativas ao oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama-glutamilttransferase
i.p	Intraperitoneal
MDA	Malondialdeído
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas
NIEHS	Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental
OOCCl <sub>3</sub>	Triclorometilperoxil
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório

SIL	Silimarina
UEG	Universidade Estadual de Goiás
UFG	Universidade Federal de Goiás
v.o	Via oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 Geral .....	18
3.2 Específicos.....	18
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
4.1 Produtos naturais .....	19
4.2 Plantas medicinais .....	20
4.3 Metabólitos vegetais .....	21
4.4 Ácido rosmarínico .....	22
4.5 Fígado.....	25
4.6 Doenças hepáticas.....	25
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	30
5.1 Ética no uso de animais. ....	30
5.2 Descrição dos Animais.....	30
5.3 Descrição do alojamento e manejo .....	30
5.4 Teste de Hepatoproteção e Antioxidação.....	31
5.5 Método de Eutanásia .....	32
5.6 Desenho experimental .....	33
5.7 Protocolo para determinação da atividade de AST e ALT e dosagem de proteínas totais .....	33
5.8 Protocolo para determinação do malondialdeído (MDA) hepático .....	34
5.9 Análise estatística .....	34
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	42
<b>ANEXOS</b> .....	46
<b>APÊNDICE</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos vivem em constantes desafios na luta pela sobrevivência, seja por uma vida financeira melhor, capacidade psíquica ideal e mesmo por uma estrutura física saudável (DENMARK; MAYER, 2014). No entanto, as doenças têm afrontado a humanidade oferecendo desânimos, cansaços, distúrbios mentais e morte. O ser humano tem procurado reduzir as enfermidades através da busca incessante por tratamentos terapêuticos ou profiláticos. Para certas comunidades, as plantas medicinais são de grande valia, pois além de ser um recurso terapêutico antigo, acaba sendo a única medida de tratamento e cura. Porém, para as regiões mais desenvolvidas as plantas exercem uma conexão para o início de uma nova geração na terapêutica (ZHONG, 2011).

Segundo Pereira e Cardoso (2012) ingerir nutrientes essenciais e nutracêuticos contribuem para um estilo de vida saudável, assim como ajuda na prevenção e/ou cura das enfermidades crônicas não transmissíveis como as doenças cardiovasculares, o *diabetes mellitus* e diferentes tipos de câncer. Isto se deve, principalmente pela combinação de micronutrientes, antioxidantes, substâncias fitoquímicas e fibras presentes nos alimentos ricos em substâncias bioativas.

As substâncias bioativas são sintetizadas pelos vegetais e são capazes de lhes proporcionarem diversas atividades biológicas em resposta aos estímulos do meio ambiente. Estes compostos também são denominados de metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, de baixo peso molecular e, diferentemente dos metabólitos primários (conjunto de processos metabólicos que desempenham funções vitais para o vegetal, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos), apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (KIM et al., 2013). Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Alguns sintomas, ou mesmo a própria patologia têm sido reduzidos ou curados pelo uso popular de vegetais apropriados. O reino vegetal ainda constitui uma fonte valiosa de novos agentes terapêuticos (PEREIRA; CARDOSO, 2012; WOLFENDER et al., 2013). Adicionalmente, os metabólitos secundários isolados, a

própria planta ou suas partes têm respondido com eficácia quando usados em animais de laboratório no tratamento de algumas enfermidades induzidas. Estudos das plantas medicinais permitiram um rápido desenvolvimento dos campos específicos da química e da medicina moderna, pois muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (KIM et al., 2013).

Estes compostos pertencem a diferentes classes químicas, o que aumenta a probabilidade de descoberta de novos agentes terapêuticos no combate às enfermidades. São conhecidas várias classes de metabólitos secundários, as quais podem ser agrupadas em três grandes grupos: terpenos, alcalóides e compostos polifenólicos (WOLFENDER et al., 2013).

Neste estudo destacaremos apenas os compostos polifenólicos, mais precisamente o ácido rosmarínico (AR). Os compostos polifenólicos são substâncias, muitas vezes derivadas dos ácidos cinâmico e benzóico, que apresentam atividades biológicas variadas, dentre elas a atividade antioxidante, benéfica para a saúde humana (MILES et al., 2005; WOLFENDER et al., 2013).

O AR é um éster do ácido caféico encontrado em várias espécies de plantas. Segundo Miles et al. (2005), o ácido caféico é capaz de diminuir a produção de interleucina 1 (IL-1), citocina envolvida no início do processo inflamatório, enquanto o AR exibe uma multiplicidade de efeitos biológicos, como atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante. Plantas medicinais, ervas e espécies ricas em ácido rosmarínico são conhecidas por seus efeitos benéficos nas doenças humanas (COSTA et al., 2013).

Outras atividades ainda podem ser destacadas, como anti-angiogênico (HUANG; ZHENG, 2006); neuroprotetora (VENKATACHALAM et al., 2013); indutor de apoptose (HUR et al., 2007); fotoproteção de queratinócitos, observada por Psotova et al. (2006) e confirmada mais tarde por Vostálová et al. (2010), ao promoverem alterações induzidas por UVB em queratinócitos humanos HaCaT. O AR impediu o aparecimento de ferimentos nestas células; no entanto este experimento foi realizado apenas *in vitro*, devendo sua eficácia ser demonstrada, a *posteriore, in vivo*. Ademais, o AR também reduziu a dermatite atópica (DA), doença inflamatória da pele, nos 21 pacientes com DA leve que participaram de um estudo (LEE et al., 2008). Outro estudo recente sugere que o AR pode prevenir a doença de Alzheimer através da inibição de amilóide  $\beta$ - neurotoxicidade induzida pela remoção

das espécies reativas de oxigênio (HAMAGUCHI et al., 2009; DÖRING et al., 2014), destacando como principal propriedade sua, a marcada atividade antioxidante.

O AR é conhecido por possuir ação antioxidante como um limpador de espécies reativas e inibidor da peroxidação lipídica. Acredita-se que a atividade antioxidante do AR possa ser explicada pela presença de duas porções catecol em sua estrutura química, sendo que uma porção fica no grupo cafeoil e a outra no grupo 2-oxifenilpropanoil, entretanto, o mecanismo ainda não está totalmente compreendido (KARTHIKKUMAR et al., 2012).

Desta feita, uma avaliação do ácido rosmarínico isolado é importante para garantir a sua utilização segura em humanos, assim como sua eficácia na hepatoproteção associada ao seu teor antioxidante *in vivo*.



## 2 JUSTIFICATIVA

O fígado é um órgão do corpo humano que realiza funções vitais, auxiliando nas reações fisiológicas. Em contrapartida, existem doenças que são capazes de comprometer seu funcionamento. Para remediar, há no mercado farmacêutico uma múltipla variedade de formulações, com efeito protetor e/ou reparador (KALANTARI et al., 2009).

Em paralelo à crescente utilização das plantas medicinais, a comunidade científica tem demonstrado interesse em expandir o uso e a aplicação desses vegetais. Estudos estão surgindo para avaliar a capacidade de hepatoproteção dos metabólitos vegetais, principalmente, dos compostos fenólicos. O intuito é conseguir remediar danos hepáticos e proporcionar um aumento na qualidade de vida dos portadores de doenças hepáticas (COSTA et al., 2013).

Neste sentido, vimos à oportunidade de avaliar a capacidade hepatoprotetora do ácido rosmarínico, a partir de intoxicações induzidas em animais de laboratório. Para possibilitar um aumento do conhecimento científico e o interesse de novos estudos por outros pesquisadores. Essas análises são importantes para o desenvolvimento de estudos clínicos, posteriormente, que poderão evoluir para a síntese de novos medicamentos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a capacidade hepatoprotetora do ácido rosmarínico em ratos *Wistar* (*Rattus norvergicus*).

#### 3.2 Específicos

- Realizar avaliação comportamental em ratos, fêmeas (*screening* hipocrático), para o ácido rosmarínico;
- Observar os dados fisiológicos (peso, consumo de água, consumo de ração, produção de fezes e urina) ao longo de vinte dias.
- Determinar a melhor dose capaz de provocar hepatoproteção, em ratos fêmeas.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Produtos naturais

Em virtude de uma melhoria na qualidade de vida, há uma tendência crescente na propagação de hábitos saudáveis. A população tem buscado a substituição de alimentos e medicamentos sintéticos, por produtos naturais, tendo como justificativa a necessidade da minimização dos efeitos ocasionados a curto e longo prazo. Levando em consideração o aumento da procura e consumo dos produtos naturais, tem-se uma elevação nas pesquisas científicas para o desenvolvimento de uma nova geração terapêutica (MELO, 2018).

Os produtos naturais são únicos para certas comunidades no tratamento e cura de suas enfermidades. Produtos naturais são compostos químicos obtidos de plantas, micro-organismos e organismos marinhos (ZHONG, 2011). Dentre os registros históricos, os produtos naturais são um dos componentes de maior destaque, pois desde os tempos imemoriais já era imprescindível o desejo de aliviar e curar doenças até então desconhecidas (JUNIOR; BOLZANI, 2006).

No que tange aos aspectos medicinais, a utilização das plantas é comumente viabilizada, pois além de existir uma diversidade estrutural e química, há à inserção de um contexto cultural que possibilita avanços de conhecimentos e técnicas. No cenário brasileiro, a comercialização de medicamentos sintéticos ainda é o de maior impacto. Mas os produtos naturais já representam cerca de 25 a 50% dos medicamentos existentes no mercado. Fator este justificado pelo aumento de descobertas sobre o potencial terapêutico encontrado em cada vegetal (NASCIMENTO, 2016).

A comunidade científica tem favorecido para a amplificação do conhecimento, através da execução de ações que levam ao reconhecimento e isolamento de novos constituintes ativos, possibilitando o progresso para novas formulações e a redução dos efeitos colaterais, encontrados nos medicamentos sintéticos. Apesar de se ter iniciado uma troca no cenário comercial, é notável que os produtos naturais podem oferecer um conjunto de possibilidades na produção de novas moléculas ativas, úteis no tratamento das mais variadas patologias. O Brasil tem como diferencial a biodiversidade, afinal, apresenta vários biomas importantes e dentro destes

encontram-se inseridas espécies mundialmente reconhecidas e estudadas diariamente. Fator que leva à visualização do país, com destaque de interesses econômicos, principalmente, no quesito industrial farmacêutico (NASCIMENTO, 2016).

#### 4.2 Plantas medicinais

Por meio dos documentos herdados, a sociedade atual pode conhecer um pouco da história do homem primitivo. Sabe-se que o homem procurava recursos básicos para sanar suas necessidades, como alimentação, moradia, proteção e reprodução. Os antepassados deixaram evidências de sabedoria, afinal, conseguiram realizar descobertas sobre o benefício das ervas para o melhor condicionamento físico e mental. As plantas ganharam um espaço social de destaque e interesse, merecimento este validado e reconhecido pela definição de plantas medicinais (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

As plantas medicinais apresentam compostos ativos, que ao serem administrados em doses adequadas, exercem efeitos benéficos em humanos e animais doentes (ALEXANDRA, 2015). De acordo com os historiadores, as nações que mantiveram maior consumo e conhecimento sobre essas plantas foram os romanos, hebreus, chineses, indianos, árabes, gregos e os egípcios. No Brasil, esse uso foi perceptível antes mesmo da colonização, pois os indígenas já detinham conhecimentos fundamentais. Posteriormente, esse aprendizado foi passado para os portugueses, que colonizaram o país, desenvolvendo neste contexto a medicina caseira. No primeiro momento, a síntese dos medicamentos era realizada pela coleta dos materiais vegetais. Estes eram processados na sua forma bruta, ou seja, da maneira que eram encontrados no meio ambiente. Com o aprimoramento das técnicas e o avanço do conhecimento, as comunidades perceberam que ao concentrar os vegetais, melhoravam a sua atividade terapêutica (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O progresso da química orgânica ocorreu por volta do século XIX, em paralelo obtiveram-se conceitos científicos sobre o reino vegetal. Com os avanços, as substâncias ativas puderam ser identificadas e isoladas (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Após o conhecimento das estruturas químicas e das propriedades biológicas, houve a intensificação no avanço da ciência, da tecnologia e propriamente da química moderna, incentivando também mudanças sociais e comerciais (JUNIOR; BOLZANI, 2006).

O desenvolvimento social trouxe consigo preocupações, desafios, e consequentemente barreiras à existência humana. Mudanças climáticas, fenômenos naturais e o provável descobrimento de novas doenças levaram os cientistas a uma tentativa de compreender as leis naturais. Evidentemente, a erudição dos povos primitivos e indígenas contribuíram significativamente para os avanços científicos e tecnológicos, possibilitando a criação de novos fármacos ao longo dos anos (JUNIOR; BOLZANI, 2006).

Pelo fato do Brasil ser um país rico em biodiversidade, esta nação ganhou maiores benefícios quando comparado aos demais países. A gama de variedades florestais permite uma reserva de conhecimentos e uma maior exploração dos produtos advindos do metabolismo vegetal. Como exemplo, tem-se os metabólitos, os quais podem ser divididos em primários e secundários. Estes metabólitos agregam possibilidades terapêuticas para a população, por meio das formas farmacêuticas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

#### 4.3 Metabólitos vegetais

O metabolismo vegetal é compreendido como um conjunto de reações que ocorrem no interior das células, sendo mediadas por enzimas que possibilitam a biossíntese dos metabólitos primários e secundários (ALEXANDRA, 2015). A especificidade da enzima leva ao direcionamento das rotas metabólicas e ocasiona o aproveitamento dos nutrientes e das necessidades funcionais da célula (PEREIRA; CARDOSO, 2012). No metabolismo primário um concomitante processo metabólico é executado para o bom funcionamento do vegetal. A realização contínua e prolongada das reações promove a fotossíntese, respiração e o transporte de solutos (ALEXANDRA, 2015). Essa etapa é responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais. Neste sentido, os metabólitos primários encontram-se distribuídos universalmente na estrutura do vegetal (ALEJANDRO; JORGE; ENRIQUE, 2017).

Em contrapartida os metabólitos secundários não são encontrados em todo o corpo da planta. O metabolismo secundário é resultante de várias reações anabólicas e catabólicas das estruturas celulares (MEDINA; BARRERA, 2016). Esses metabólitos executam funções de interação com o meio ambiente durante o ciclo de vida relativo à planta e, são sintetizados a partir dos metabólitos primários.

No entanto, apresentam-se em pequenas quantidades e a sua distribuição está restringida à determinadas famílias de vegetais (ALEXANDRA, 2015).

Os metabólitos secundários exercem papéis fundamentais para a sobrevivência da planta. Alguns atuam diretamente nas funções ecológicas auxiliando nos processos de defesa contra predadores ou condições climáticas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Há espécies vegetais que apresentam particularidades metabólicas com funções bastante distintas, como atraentes e repelentes de animais e ainda com características indigestas e venenosas para combater patógenos. Alguns metabólitos propagam a existência da espécie, pois atraem animais polinizadores, e auxiliam na reprodução vegetal pela dispersão das sementes (ANGEL et al., 2016).

As substâncias bioativas são oriundas do metabolismo secundário (MEDINA;BARRERA, 2016). Exemplos deste grupo são compostos fenólicos, cumarinas, saponinas, esteroides, alcaloides dentre outros (ALEJANDRO; JORGE; ENRIQUE, 2017). As substâncias polifenólicas exercem atividades de defesa em favor do vegetal contra predadores e em condições de estresse, como exemplo, nos casos de radiação ultravioleta e precipitação. Como característica principal, apresentam um ou mais anéis fenólicos, com uma ou mais substituições hidroxil e conseguem sofrer alterações estruturais quando há substituição de radicais na estrutura principal (MEDINA; BARRERA, 2016). De acordo com Nascimento (2016), os polifenóis são capazes de exercer múltiplas atividades biológicas, como antioxidante, antialérgico, anti-inflamatório, anticâncer, anti-hipertensivo e antimicrobiano.

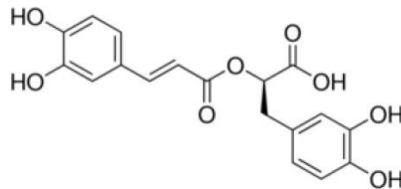
Com o objetivo de expandir as possibilidades de utilização dos polifenóis, vários estudos (PEREIRA; CARDOSO, 2012; NASCIMENTO, 2016; LAURINDO, 2017;) avaliaram a capacidade de prevenção de doenças crônicas, como as cardiovasculares, *diabetes mellitus*, doenças neurodegenerativas e protetoras. Dentro deste grupo, o ácido rosmarínico é um polifenólico que apresenta alguns relatos na literatura e que tem ganhado espaço em pesquisas e discussões científicas (NASCIMENTO, 2016).

#### 4.4 Ácido rosmarínico

Em uma pesquisa realizada no ano de 1958, Scarpati e Oriente, químicos italianos descobriram a estrutura do ácido rosmarínico (AR) (Figura 1) a partir das

folhas do *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim). O ácido rosmarínico pode ser encontrado em diversas espécies pertencentes às famílias *Lamiaceae*, *Boraginaceae*, *Blechnaceae*, *Zosteraceae*, *Potamogetonaceae* e *Cannaceae* (LAURINDO, 2017).

**Figura 1** - Estrutura molecular do ácido rosmarínico.



Legenda: O AR é classificado como polifenol, sendo um éster derivado dos ácidos caféico e 3,4-dihidroxifenilático. Tem fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_8$  e pode ser designado pelos nomes ácido  $\alpha$ -O-cafeoil-3,4-di-hidroxifenilático; ácido  $\alpha$ -[3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]-3,4-di-hidroxi benzenopropanóico; ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-[3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-oxo 2-propeniloxi]-propanóico; ácido rosemárico.

Fonte:(SOUZA, 2017).

Atualmente, há uma variedade de exemplares de plantas documentadas como possíveis fontes do ácido rosmarínico. O Quadro 1 apresenta as espécies vegetais que contém o AR.

Quadro 1 - Espécies vegetais que contém ácido rosmarínico.

Nome científico	Família	Nome popular
<i>Anethum graveolens</i> L.	Apiaceae	Endro
<i>Artemisia dracunculus</i> L.	Asteraceae	Estragão
<i>Betonica officinalis</i> L.	Lamiaceae	Betônica
<i>Borago officinalis</i> L.	Boraginaceae	Borragem
<i>Glechoma hederacea</i> L.	Lamiaceae	Ervaterrestre
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Hissopo
<i>Lavandula angustifolia</i> M.	Lamiaceae	Alfazema
<i>Lycopus europaeus</i> L.	Lamiaceae	Licopus
<i>Majorana hortensis</i> M.	Lamiaceae	Manjerona
<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	Erva cidreira
<i>Mentha arvensis piperascens</i> H.	Lamiaceae	Hortelã
<i>Mentha pulegium</i> L.	Lamiaceae	Poejo

<i>Mentha spicata</i> L.	Lamiaceae	Hortelã-peluda
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Melão-de-são-caetano
<i>Monarda didyma</i> L.	Lamiaceae	Bergamota
<i>Nepeta cataria</i> L.	Lamiaceae	Gataria
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Manjeriço
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano
<i>Orthosiphon aristatus</i> B.	Lamiaceae	Ortosifão
<i>Petroselinum crispum</i> M.	Apiaceae	Salsinha
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Brunela
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Alecrim
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	Sálvia
<i>Satureja hortensis</i> L.	Lamiaceae	Segurelha
<i>Satureja montana</i> L.	Lamiaceae	Segurelha
<i>Symphytum officinalis</i> L.	Boraginaceae	Confrei
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Lamiaceae	Serpilho
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Tomilho

FONTE: Própria Autora, 2018.

O ácido rosmarínico ganhou destaque no meio popular e acadêmico em virtude de suas atividades biológicas. Seu potencial terapêutico já é conhecido no tratamento e/ou prevenção de uma gama de patologias, dentre elas asma brônquica, úlcera péptica, doenças inflamatórias e quadros de hepatotoxicidade (MELO, 2018). Desde o descobrimento do AR, existe um crescimento significativo no interesse das avaliações sobre as atividades biológicas desempenhadas por esta substância. São comumente encontrados relatórios científicos das funções terapêuticas, bem como da atuação promissora como um produto farmacêutico. O AR é sintetizado por células vegetais, no entanto, estudos já comprovaram a possibilidade de reproduzir essa substância em escala laboratorial (NASCIMENTO, 2016).

A atividade hepatoprotetora do ácido rosmarínico é proveniente da presença de quatro grupos hidroxila, pois o conjunto estrutural desta molécula possibilita ações contra a atividade oxidativa. Sua ação protetora é viabilizada pelo sequestro das espécies reativas de oxigênio (ERO) e por sua efetividade como antiapoptótico (LAURINDO, 2017).



#### 4.5 Fígado

O organismo humano é constituído por órgãos que trabalham em conjunto e exercem funções vitais para a sobrevivência do homem. O fígado é um dos órgãos mais importantes para a regulação dos processos fisiológicos, bem como, o segundo maior órgão do corpo humano (VIEIRA, 2014). De modo didático, é possível classificar as funções hepáticas em duas classes, a primeira consiste no processamento das substâncias absorvidas e nas reações de síntese, enquanto que a segunda está fundamentada na secreção e excreção de compostos (LOPES, 2009).

Ao avaliar os aspectos anatômicos, o fígado encontra-se situado na parte alta da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. É formado por três superfícies: superior ou diafragmática, inferior ou visceral e posterior. Apresenta-se dividido em lóbulos e tem como característica a presença de um tecido fibroso. Sua coloração é vermelho-escuro, tendendo ao marrom arroxeadado. O fígado é um órgão altamente irrigado e apresenta múltiplas funções, obtendo destaque no metabolismo, na síntese e nos processos de detoxificação (SILVA, 2015).

O desempenho do fígado na ação de desintoxicação pode ocorrer por duas vias distintas, sendo elas a endógena e exógena. Na via endógena, a operação ocorre através do metabolismo de resíduos, já no exógeno o processo depara-se com os compostos tóxicos (MARMITT et al., 2016). Dentre as funções metabólicas, é perceptível o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Acontece também a secreção da bile e sais minerais, o armazenamento e a biotransformação de substâncias, bem como a eliminação de fármacos e toxinas (VIEIRA, 2014).

#### 4.6 Doenças hepáticas

As doenças são desencadeadas em virtude da perda de homeostasia do organismo. Evidentemente, o ser humano tem contribuído de forma direta ou indireta para o aparecimento de novas doenças. Inúmeros cidadãos chegam ao óbito pelo fato de não haver tratamento destinado à sua patologia ou por não conseguir um tratamento efetivo pelo sistema de saúde governamental (SILVA, 2017). Em meio às enfermidades existentes, as doenças hepáticas estão entre as de maior realce, em virtude da sua capacidade de disseminação etiológica. As doenças hepáticas podem

ser desencadeadas por variados mecanismos, como infecção viral, excesso de álcool e até mesmo a exposição de alguns fármacos (MARMITT et al., 2016).

As doenças hepáticas estão correlacionadas à indução de danos pela peroxidação lipídica e atividades oxidativas. Esses danos podem ser reproduzidos nos modelos experimentais por meio de procedimentos químicos. Atualmente, há uma variedade de substâncias capazes de ocasionar hepatotoxicidade, incluindo neste propósito medicamentos e alguns produtos químicos, conforme Quadro 2 (SILVA, 2017). No entanto, frequentemente são usados o tetracloreto de carbono, o paracetamol e a tiocetamida. A desenvoltura dos intoxicantes é crucial para levar a ocorrência de lesões agudas, proporcionar o entendimento das lesões hepáticas e visualizar o potencial antioxidante e hepatoprotetor dos compostos bioativos (VIEIRA, 2014).

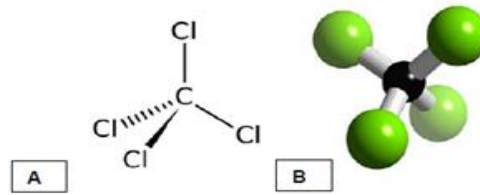
Quadro 2 - Substâncias utilizadas nos modelos experimentais.

<b>Medicamento</b>	<b>Toxina</b>	<b>Droga</b>
Paracetamol	Tetracloreto de Carbono	Esteroides anabolizantes
Metildopa	Clorofórmio	Cocaína
Carbamazepina	Dimetilformamida	Ecstasy
Fluconazol	Hidrazina	Fenciclidina
Heparina	2-Nitropropano	*****
Nitrofurantoína	Tricloroetileno	*****
Alguns AINES	Tolueno	*****
Fenitoína	*****	*****
Sulfonamidas	*****	*****
Ácido Valproico	*****	*****
Vitamina A	*****	*****
Anticoncepcionais	*****	*****

Fonte: SILVA, 2017.

O tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Figura 2) é um produto químico, caracterizado como líquido, límpido, volátil e tem aroma adocicado (RODRIGUES; SILVA; PEREIRA, 2011).

**Figura 2** - Estrutura química do tetracloreto de carbono.



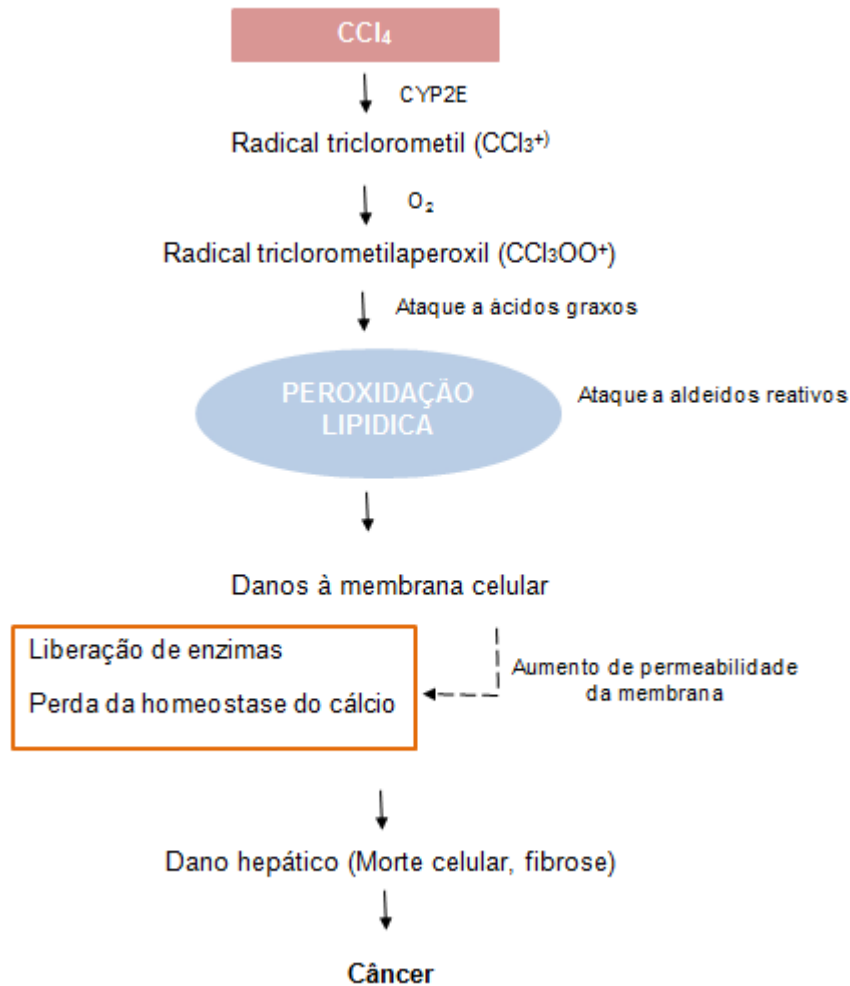
Legenda: A: Fórmula química do tetracloreto de carbono. B: Representação em 3D da molécula de tetracloreto de carbono.

Fonte: PEGORARO, 2018.

Na comunidade acadêmica, sobretudo nas investigações científicas o  $\text{CCl}_4$  ganha um título de reconhecimento por tratar-se de uma hepatotóxina. A partir de 1930 o  $\text{CCl}_4$  passou a ser estudado como um composto hepatotóxico, de grande valia para as análises de hepatotoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo (VIEIRA, 2014). Atualmente, é um composto de escolha na realização de avaliações para agentes hepatoprotetores, por ser um estressor comumente usado para a realização de investigações em estudos *in vivo* e *in vitro* (RODRIGUES et al., 2011).

As lesões hepáticas pela administração do  $\text{CCl}_4$  são propiciadas pela formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO), triclorometil ( $\text{CCl}_3$ ) e o triclorometilperoxil ( $\text{OOCCl}_3$ ) (Figura 3). O metabolismo do tetracloreto de carbono inicia-se no fígado pela atuação da enzima citocromo P-450, subunidade 2E1 (CYP2E1). Primeiramente, o  $\text{CCl}_4$  é convertido em um radical livre, triclorometil ( $\text{CCl}_3$ ), em virtude do oxigênio presente este radical é transformado em triclorometilperoxil ( $\text{OOCCl}_3$ ). Esses radicais conseguem ligar-se na membrana celular dos hepatócitos, diminuir à atividade das enzimas antioxidantes e causar a peroxidação lipídica das membranas, levando à lesão hepática (SILVA, 2015). O rompimento da membrana gera à liberação de enzimas hepáticas e íons cálcio ( $\text{Ca}_2^+$ ) no meio extracelular (VIEIRA, 2014).

**Figura 3** - Mecanismo de toxicidade do  $\text{CCl}_4$  no organismo.



Legenda: Alterações proliferativas no órgão resultam em esteatose hepática, necrose celular, fibrose e cirrose, podendo levar ao câncer.

Fonte: VIEIRA, 2014.

De acordo com Torres (2016), os metabólitos tóxicos oriundos do tetracloreto de carbono são capazes de instigar as células de Kupffer a secretar citocinas inflamatórias, dentre elas a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Sob um efeito de cascata, essas podem intensificar a produção de fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), logo inibir a formação de óxido nítrico e provocar inflamação e fibrose hepática. Proporcionalmente, à medida que aumenta os danos hepáticos tem-se o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses radicais são capazes de interagir com moléculas de DNA, levando a quadros de mutações, inativação celular e apoptose (SILVA, 2015).

Ao avaliar as consequências geradas pelas EROs, pesquisas estão em progresso para entender a riqueza da flora brasileira e encontrar metabólitos viáveis para exercer a proteção e tratamento dos quadros de hepatopatias (SILVA, 2015). Na literatura, há descrito estudos de avaliações com compostos bioativos contra os danos causados pelo CCl<sub>4</sub> (VIERA, 2014). Avaliações de hepatoproteção com extratos vegetais tornam-se cada vez mais impactantes para a sociedade acadêmica. O intuito sem dúvidas é trazer para a medicina moderna um campo de maiores oportunidades, para que futuramente haja tratamento para as doenças que hoje encontram-se sem cura, as quais castigam a população e levam ao desencadeamento de problemas sociais (RODRIGUES et al., 2011).

A avaliação e o acompanhamento das hepatopatias está baseado na verificação de parâmetros bioquímicos. Portanto, o comprometimento hepático pode ser avaliado pelas seguintes enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT) e pela dosagem do malondialdeído (MDA), marcador plasmático do estresse oxidativo (SILVA, 2017).

No tratamento de hepatopatias, torna-se frequente a utilização de substâncias naturais. Dentre os compostos bioativos, em específico no grupo dos polifenóis, o ácido rosmarínico tem apresentado significantes resultados como antioxidante, por ser uma molécula natural e ter características físico-químicas que agregam valor medicinal. Em um contexto geral, os pesquisadores através de modelos experimentais tem conseguido apresentar evidências da sua múltipla capacidade terapêutica (LAURINDO, 2017).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Ética no uso de animais.

Este estudo foi realizado em parceria com a Universidade Federal de Goiás (UFG), como parte do projeto: “Avaliação farmacológica do Ácido Rosmarínico, in vivo”, já aprovado pela Comissão em Ética no uso de Animais sob nº. 128/14.

### 5.2 Descrição dos Animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas oriundas do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG), sendo animais adultos jovens com 8 a 12 semanas de vida e o peso entre 180 a 240 g, não excedendo 20% da média do grupo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, de forma coletiva (5 animais por grupo).

Os procedimentos envolvendo o manejo e cuidados dos animais foram baseados no *Niehs Handbook for Investigators and Technicians, do National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)* nos Estados Unidos da América (EUA), de setembro de 2007 e “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, proposta pelo COBEA, visando minimizar o sofrimento dos animais através da realização correta de todos os procedimentos que envolvam os mesmos, segundo preceitos legais encontrados na “Lei Arouca”, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

### 5.3 Descrição do alojamento e manejo

Para a realização dos experimentos, os animais, após serem adquiridos do Biotério Central da UFG, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia (BFF) da UFG, onde permaneceram por um período de adaptação (aclimatização) de sete a quatorze dias antes do início dos experimentos. As salas onde os animais ficaram alojados foram mantidas sob condições ambientais controladas (temperatura ambiente de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de 50-60% e ciclo claro/escuro de 12h), com água filtrada e ração Labina Presence®.

Todos os critérios de bioética aplicados a animais de experimentação preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) foram observados, a

fim de proporcionar condições de vida adequadas às espécies, contribuindo para sua saúde, conforto e bem-estar.

#### 5.4 Teste de Hepatoproteção e Antioxidação

O experimento foi conduzido de acordo com o método de Kalantari; Aghel; Bayati (2009) modificado. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n = 5), conforme Quadro 3, com dieta normal.

Quadro 3 - Distribuição dos grupos de animais e detalhes dos procedimentos experimentais.

<b>Grupo 1</b>	<b>Basal, sem tratamento:</b> Este grupo esteve destinado para a comparação dos resultados, tanto dos animais tratados com AR e silimarina, como para os intoxicados com CCl <sub>4</sub> ,
<b>Grupo 2</b>	<b>Tetracloroeto de carbono (CCl<sub>4</sub>) dissolvido em azeite de oliva 50%:</b> 5 animais receberam uma dose de 2,0 mL para cada kilograma (kg) de peso, por via intraperitoneal, no quinto dia.
<b>Grupo 3</b>	<b>Silimarina dissolvida em Dimetilsulfóxido 3%:</b> 5 animais receberam uma dose de 25 mg/Kg, por gavagem (via oral). Esse antioxidante foi administrado 1 vez ao dia por 5 dias. E doze horas após intoxicação, todos os animais foram anestesiados (descrição abaixo) para impedir dores e realizar coleta do sangue e eutanásia.
<b>Grupo 4</b>	<b>Ácido Rosmarínico dissolvido em Dimetilsulfóxido 3% nas doses de 30 mg/kg:</b> 5 animais receberam uma dose de 30 mg/kg durante 5 dias, com apenas uma administração diária, por gavagem (via oral). No quinto dia receberam uma dose de CCl <sub>4</sub> intraperitoneal 1 hora (h) após tratamento. E doze horas após intoxicação, todos os animais foram anestesiados (descrição abaixo) para impedir dores e realizar coleta do sangue e eutanásia.

<b>Grupo 5</b>	<b>Ácido Rosmarínico dissolvido em Dimetilsulfóxido 3% nas doses de 50 mg/kg:</b> 5 animais receberam uma dose de 50 mg/kg durante 5 dias, com apenas uma administração diária, por gavagem (via oral). No quinto dia receberam uma dose de CCl <sub>4</sub> intraperitoneal 1 hora (h) após tratamento. E doze horas após intoxicação, todos os animais foram anestesiados (descrição abaixo) para impedir dores e realizar coleta do sangue e eutanásia.
----------------	--

Fonte: Própria Autora, 2018.

Dados fisiológicos (peso, consumo de água, consumo de ração, produção de fezes e urina) e alterações comportamentais anormais durante o estudo, foram observados e anotados. Parâmetros hepáticos foram analisados em todos os grupos: aminotransferases – AST (aspartato-aminotransferase) e ALT (alanina-aminotransferase) e malondialdeído (MDA, marcador da atividade oxidativa).

#### 5.5 Método de Eutanásia

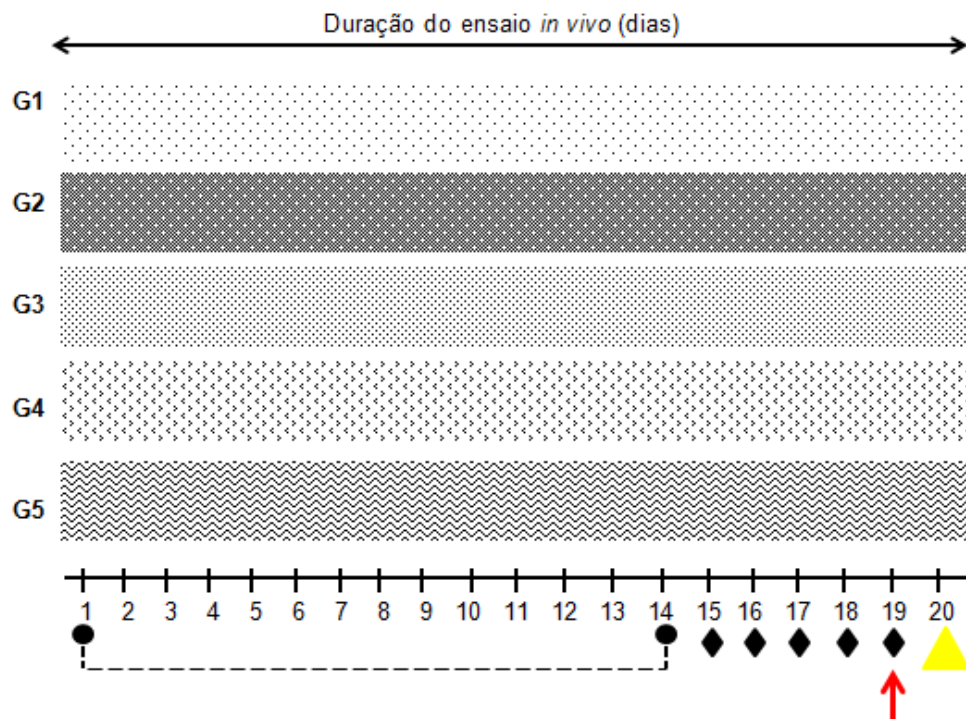
Ao final dos experimentos todos os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g (8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education*, para impedir dores e realizar coleta do sangue, eutanásia (FLECKNELL, 1996) e retirada do fígado, que foi mantido em solução de formaldeído a 10% tamponada, até a realização dos cortes histológicos. Os cortes histológicos foram realizados no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP).



## 5.6 Desenho experimental

Na Figura 4 está representado todo o desenho experimental desenvolvido no estudo.

**Figura 4** - Representação esquemática do desenho experimental



Legenda: Os animais foram aclimatizados durante 14 dias, de acordo com a Figura 4. Conforme estabelecido no Quadro 3, as respectivas substâncias foram administradas nos grupos a partir do 15º dia, estendendo-se até o dia 19º. Os animais foram intoxicados com CCl<sub>4</sub> no 19º dia, após 1 hora do tratamento. E no 20º todos os grupos foram anestesiados, posteriormente, passaram pelo processo de eutanásia para a retirada do fígado.

●.....● = Período de aclimatização

◆ = Administração 1x/dia

↑ = Dose de CCl<sub>4</sub>

▲ = Anestesia e eutanásia

Fonte: Própria autora, 2018.

## 5.7 Protocolo para determinação da atividade de AST e ALT e dosagem de proteínas totais

As proteínas totais foram analisadas em sobrenadante de triturado de fígado e a atividade das enzimas AST e ALT foram medidas em plasma. Todas pelo método espectrofotométrico de kit Doles® em aparelho Bioplus 2000®.

### 5.8 Protocolo para determinação do malondialdeído (MDA) hepático

O tecido hepático (0,50g) foi triturado em 2,5 mL de tampão base tris pH 7,4 (sacarose 0,2 M e ditioneitol 5 mM) com auxílio de um bastão de vidro, centrifugados a 10.000g por 30 minutos a 4°C; 50 µL de sobrenadante do triturado foi adicionado a 200 µL de NaOH 1,5 M (banho-maria a 60°C por 30 minutos); 200 µL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) a 20 % foi adicionados e agitados em vórtex por 30 se centrifugados a 14.500 g em 4° C por 10 min. Posteriormente, 250 µL do sobrenadante foi adicionado a vials âmbar contendo 25 µL de DNPH. As amostras foram alocadas no auto-amostrador doHPLC-PDA (Shimadzu Prominence® modelo 20AT), com volume de injeção de 50 µL. As concentrações de MDA foram expressas em nmol/g de proteínas. Uma curva de calibração foi desenvolvida em albumina com padrão de MDA (TEP): 0,5; 0,75; 1,5; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0 e; 40,0 µM a partir de 100 µmol/L, em ácido sulfúrico.

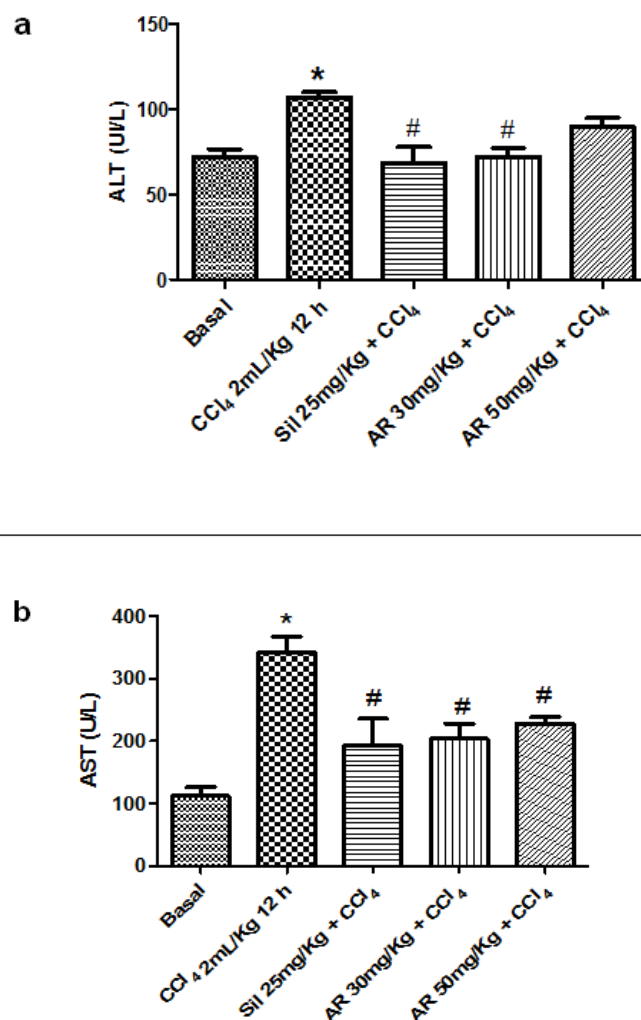
### 5.9 Análise estatística

Para os dados obtidos aplicaram-se os testes de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido de teste Tukey (teste de múltipla comparação) e teste T, em *software* GraphPad Prism® versão 6.0. Consideraram-se diferenças estatísticas significativas para  $p < 0,05$ , sendo os resultados expressos pela média ± erro padrão da média (Média ± EPM).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, o  $\text{CCl}_4$  (Grupo 2 - 2,0 mL/kg i.p.) demonstrou seu efeito tóxico ao provocar intoxicação nas células hepáticas aumentando significativamente os biomarcadores de lesão tanto para a enzima AST (Figura 5a) como ALT (Figura 5b), com  $p < 0,05$  em relação ao controle Basal.

**Figura 5** - Níveis plasmáticos das transaminases.



Legenda: Níveis plasmáticos das transaminases. ALT (a) e AST (b) em UI/L, nos grupos de ratos fêmeas. Basal - sem tratamento (grupo 1); intoxicados com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas (grupo 2); e grupos tratados com silimarina 25 mg/Kg (grupo 3), ácido rosmarínico nas doses de 30 mg/Kg (grupo 4) e 50 mg/Kg (grupo 5), nos ensaio de hepatoproteção. Valores expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (n = 5 animais em cada grupo).

\*  $p < 0,05$  em relação ao controle Basal .

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo intoxicado com tetracloreto de carbono 2mg/Kg 12 h

Este resultado também foi observado no estudo de Silva (2015), pois o  $\text{CCl}_4$  comprovou seu efeito tóxico através do aparecimento de lesões e do estresse oxidativo nos animais, ocasionando o aumento das transaminases. Essa substância é capaz de promover reações que levam a produção de radicais livres, favorecendo o aparecimento de lesões, principalmente, no fígado conforme apresentado na Figura 6B.

Os resultados ilustrados na Figura 6B estão condizentes com Satyam e Bairy (2015) e Mohamed et al. (2016) que induziram fibrose hepática permanente em ratos utilizando  $\text{CCl}_4$ . Pois o aparecimento de necrose tecidual é o limite às alterações celulares, por ser uma consequência frequente de processos inflamatórios, degenerativos e infiltrativos caracterizado pela incapacidade de restauração do equilíbrio homeostático (AKTER e KOTTER, 2018).

A silimariana é composto natural usualmente indicado para o tratamento de lesões hepáticas, por apresentar ação anti-oxidante. Sua capacidade de proteção no fígado faz com que a mesma seja amplamente comercializada. Essa substância foi escolhida no presente trabalho como modelo comparativo, ao pesquisarmos e conhecermos sobre a sua funcionalidade. Como era esperado, o grupo controle tratado com a silimarina (Grupo 3 - 25 mg/kg) confirmou seu efeito protetor, ao reduzir os níveis de AST, com significância estatística de  $p < 0,05$  comparada ao grupo intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas (Figuras 5a e 5b).

Os grupos 4 e 5 após os cinco dias de tratamento com o AR nas respectivas doses de 30 e 50 mg/kg p.o, protegeram o fígado dos animais do processo de lipoperoxidação produzido pelo  $\text{CCl}_4$  após 12 h de intoxicação (Figuras 5a e 5b), com significância de  $p < 0,05$  comparado ao grupo intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2mg/Kg por 12 horas. Estes resultados estão de acordo com Pegoraro (2018), ao afirmar que a função hepatoprotetora do ácido rosmarínico é proveniente da inibição da peroxidação lipídica por aumentar o sistema antioxidante.

Melo (2018) sustenta essa afirmação, justificando que o ácido rosmarínico atua nas membranas como antioxidante, impedindo quadros de inflamações no fígado e demais órgãos..

Souza (2017) acrescenta que a capacidade anti-inflamatória do ácido rosmarínico em conjunto com a facilidade de regulação do metabolismo lipídico, pode favorecer no tratamento da aterosclerose. Além das ações farmacológicas descritas, Melo (2018) também conduziu um levantamento sobre o potencial do

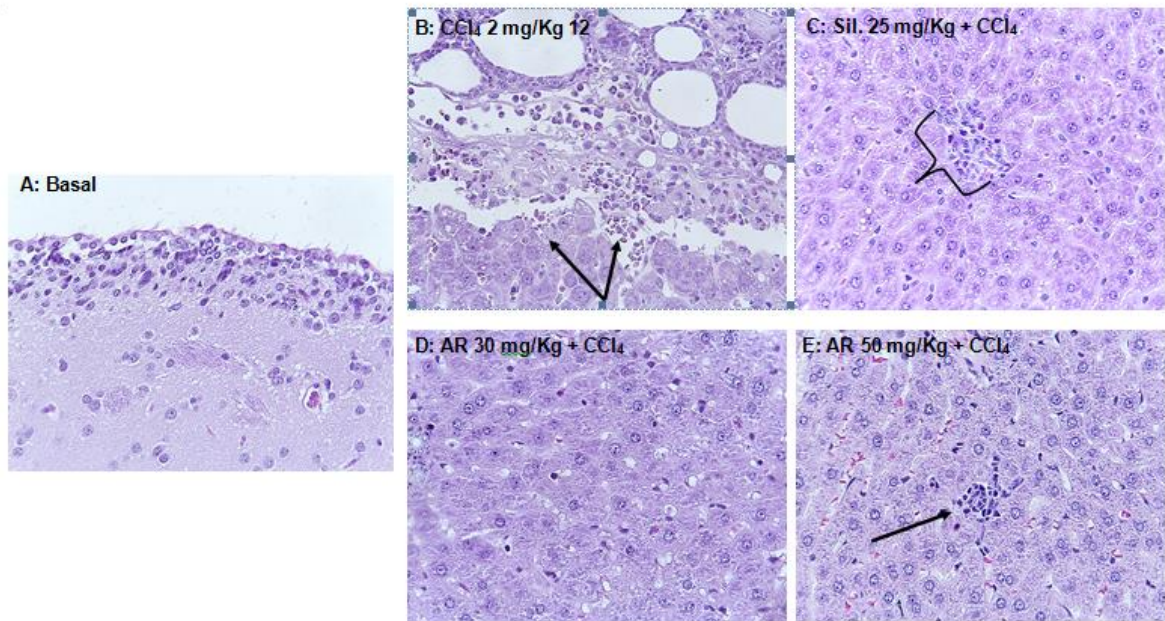
ácido rosmarínico no tratamento da hipertensão. Para os autores, todas as atividades farmacológicas são decorrentes da atuação direta do ácido rosmarínico na bicamada lípida, após modificar a fluidez e a propagação dos radicais livres, e pela presença estrutural dos grupamentos de catecol.

O ácido Rosmarínico na dose de 30 mg/kg (Grupo 4) foi significativa para ambas as enzimas ( $p < 0,05$ ), comparadas ao grupo 2 de  $\text{CCl}_4$  (2,0 mL/kg), respectivamente (Figuras 5a e 5b). Mas para a dose de 50 mg/kg (Grupo 5), houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) somente para a enzima AST (Figura 5b). Ao comparar os dados bioquímicos com os resultados histológicos (Figuras 6D e 6E), há a confirmação hepatoprotetora do ácido rosmarínico em ambas as dosagens. Evidentemente, o AR (Figura 6D) conseguiu evitar sinais degenerativos, havendo conservação da membrana nas células hepáticas e somente indícios de inflamações, características atribuídas nos tratamentos que utilizam de compostos fenólicos.

O ácido rosmarínico reduziu os níveis sanguíneos das enzimas AST e ALT aumentados pelo  $\text{CCl}_4$  (Figuras 5a e 5b), atestando que a diminuição sérica e/ou plasmática das aminotransferases é um indicativo de que houve redução ou impedimento de inflamação hepática (SCHAFFER et al., 2016, TASCI et al., 2008). Pegoraro (2018) ao realizar um experimento com a espécie *Coreopsis tinctoria* N. demonstrou resultados significativos ao conseguir diminuir os níveis plasmáticos de ALT e AST nos animais avaliados. Segundo o autor, entre os metabólitos secundários produzidos por este vegetal, o ácido rosmarínico talvez seja o de maior destaque, em função, da versatilidade de oportunidades terapêuticas.

O ácido rosmarínico por meio de estudos científicos encontra-se validado como anti-inflamatório, antidiabético, antioxidante e citoprotetor. Mas, por essa substância ser uma molécula promissora, torna-se necessário verificar seus compostos bioativos e avaliar se estes estão aptos para outras finalidades terapêuticas. Para que um fármaco seja comercializado, estudos clínicos e não clínicos devem ser realizados, permitindo assim a comprovação da sua segurança, eficácia e qualidade (NASCIMENTO, 2016).

**Figura 6** - Fotomicrografias de amostras de fígado de ratos



Legenda: Fotomicrografias de amostras de fígado de ratos, coradas H & E. A: Grupo controle Basal (sem tratamento – grupo 1): aspecto normal; B: Grupo controle intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas (grupo 2): presença de degeneração necrótica com inflamação da cápsula; C: Grupo controle tratado com Silimarina 25 mg/Kg p.c +  $\text{CCl}_4$  (grupo 3): início do processo inflamatório; D: Grupo tratado com AR 30 mg/Kg p.c +  $\text{CCl}_4$  (grupo 4): presença de inflamação; E: Grupo tratado com AR 50 mg/Kg p.c +  $\text{CCl}_4$  (grupo 5): presença de inflamação. (n = 5 animais / grupo).

Entretanto, as avaliações histológicas realizadas por Melo (2018) condizem com os dados encontrados neste estudo, pois em ambos houveram redução das lesões hepáticas a partir dos tratamentos realizados com metabólitos secundários. O ácido rosmarínico preservou a estabilidade da membrana dos hepatócitos, isolando a possibilidade de lesionamento dessas células bem como a ocorrência de apoptose. O AR conseguiu manter a homeostasia do fígado, atendendo os requisitos esperados quando comparado aos resultados histológicos do grupo tratado com silimarina.

Os dados fisiológicos apresentados pelos animais referentes aos devidos grupos (Tabela 4), não demonstraram diferenças significativas comparadas ao grupo basal, contudo os animais do grupo intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg por 12 horas (grupo 2) reduziram a produção de excretas (urina e fezes) de forma significativa,  $p < 0,05$ , comparada ao grupo basal, provavelmente devido à ação tóxica do mesmo.

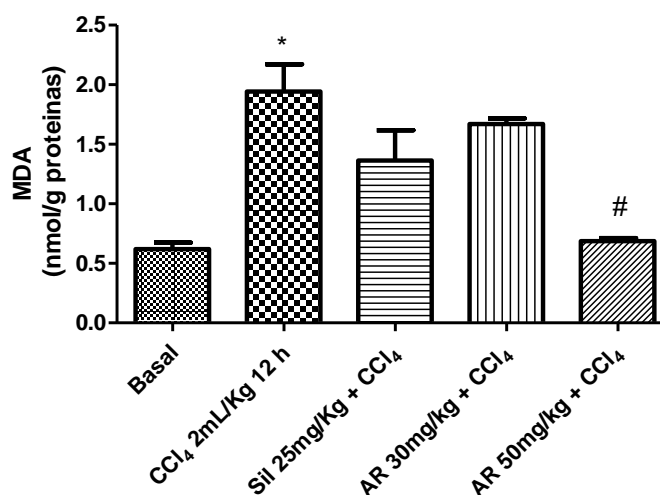
Tabela 1 - Parâmetros fisiológicos dos ratos, durante os cinco dias de experimentação.

Grupos	Consumo de Água (mL/dia)	Consumo de Ração (g/dia)	Produção de Excretas (g/dia)
Basal	128,3 ± 9,80	72,4 ± 2,48	44,96 ± 3,45
CCl <sub>4</sub> 2mg/Kg 12 h	121,0 ± 15,9	62,8 ± 8,00	29,78 ± 0,90*
Sil. 25mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	118,3 ± 11,9	67,0 ± 6,18	36,38 ± 1,27
AR 30mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	117,3 ± 8,92	60,2 ± 6,17	36,98 ± 2,08
AR 50mg/Kg + CCl <sub>4</sub>	143,3 ± 8,42	64,2 ± 9,83	44,38 ± 2,49

Legenda: Valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média (n = 5 animais/grupo). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle negativo – (Basal – sem tratamento).

Conforme os resultados observados na Figura 7, os níveis de MDA (marcador de intoxicação) diminuiram no fígado para o grupo tratado com o AR, em contrapartida para o grupo 2 (intoxicado pelo CCl<sub>4</sub> 2 mL/Kg por 12 horas) aumentou os níveis de MDA ( $p < 0,05$  comparado ao grupo basal), como era esperado. Enquanto os grupos de animais que receberam AR, principalmente na dose de 50 mg/kg (grupo 5) conseguiram reduzir a intoxicação produzida pelo CCl<sub>4</sub> pela observação de níveis baixos de MDA,  $p < 0,5$  (Figura 7).

Figura 7 - Níveis hepáticos de MDA.



Legenda: Níveis hepáticos de MDA hepático, em nmol / g de proteínas, nos grupos de ratos fêmeas Basal - sem tratamento (grupo 1); intoxicados com CCl<sub>4</sub> 2 mL/Kg por 12 horas (grupo 2); e grupos tratados com silimarina 25 mg/Kg (grupo 3), ácido rosmarínico nas doses de 30 mg/Kg (grupo 4) e 50 mg/Kg (grupo 5), nos ensaio de hepatoproteção.

Valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média (n = 5 animais em cada grupo).

\*  $p < 0,05$  em relação ao controle Basal.

# $p < 0,05$  em relação ao grupo intoxicado com tetracloreto de carbono 2mg/Kg 12 h

Ao realizar uma análise detalhada dos níveis de MDA (Figura 7) e compará-los com os resultados encontrados por Silva (2015), percebemos que os dados estão em concordância. Pois, ambos identificaram níveis de MDA semelhantes para os grupos, basal e controle que não receberam a administração do  $\text{CCl}_4$ . ZHANG et al., (2015) também detectou uma diminuição nos níveis de MDA para os animais tratados com ácido rosmarínico. O autor afirma que obteve aumento das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-px). Resultados equivalentes, com significativa redução do MDA foram visualizados no trabalho de Melo (2018).

As avaliações serviram para a simulação de um perfil patogênico hepático, e possibilitaram uma análise precisa sobre a melhor dosagem terapêutica com o ácido rosmarínico. Os testes bioquímicos e os dados fisiológicos contribuíram para o desenvolvimento do trabalho, pois favoreceram no aumento da confiabilidade dos resultados encontrados. Esta avaliação fez uso de animais que se adaptaram perfeitamente durante o experimento, pois não apresentaram alterações estranhas ou incomuns durante a exposição das substâncias em teste. As perspectivas estão fundamentadas no aprimoramento dos dados, na formulação de novas situações, e consequente, na validação dos resultados com inserção de novos trabalhos para averiguação de possibilidades terapêuticas com o uso do ácido rosmarínico.



## 7 CONCLUSÃO

O ácido rosmarínico demonstrou ser protetor de lesões hepáticas induzidas por tetracloreto de carbono em todos os ensaios realizados. Os grupos avaliados não tiveram alterações comportamentais ao serem expostos ao ácido rosmarínico.

Em relação aos dados fisiológicos, mantiveram-se ponderados, não havendo alterações significativas no consumo de água e ração. Estatisticamente, foram perceptíveis diferenças apenas para o grupo intoxicado com o CCl<sub>4</sub> na produção de excretas. O modelo experimental proporcionou uma avaliação satisfatória, pois possibilitou a visualização de uma intoxicação aguda e posteriormente, a confirmação da atividade hepatoprotetora do ácido rosmarínico.

No presente estudo, o efeito hepatoprotetor foi visualizado com o ácido rosmarínico de 50 mg/kg, uma vez que houve diferenças significativas apenas para a enzima AST. Dessa forma, os resultados encontrados serão úteis para o avanço do ácido rosmarínico como um candidato a fármaco para as doenças hepáticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTER, F.; KOTTER, M., Pathobiology of Degenerative Cervical Myelopathy. **Neurosurgery Clinics of North America**, Cambridge, v. 29, n° 01, p.13-19, 2018.

ALEJANDRO, Á.H.C.; JORGE, M.T.; ENRIQUE, R.C.; Es hplc una alternativa para la cuantificación de metabolitos secundarios: cuantificación de ácido salicílico en árboles silvestres de la familia salicaceae ubicados en el estado de guanajuato. **Revista de divulgacion científica**, Guanajuato, v. 3, n° 02, p. 294-299, 2017.

ALEXANDRA, O.C.M. **Extracción, purificación e identificación de metabolitos secundarios de la planta escama de pescado (*Drymaria ovata*)**. 2015. 91F. Dissertação (Graduação em Bioquímica Farmacêutica) - Escola Superior Politécnica de Chimborazo: Facultad Ciencias, Riobamba, 2015.

ANGEL, R.G.M.; ANTONIO, A.J.; FRANCISCO, R.F. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* P.). **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud**, México, v. 18, n° 03, p. 3-8, 2016.

BALOGUN, F.O.; ASHAF, A.O.T. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Dicoma anomala* Sond. aqueous root extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in *Wistar* rats. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, Africa, v. 36, n° 04, p. 504-513, 2016.

COSTA, P. et al. Protective effects of *Lavandula viridis* L. extracts and rosmarinic acid against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line. **Industrial Crops and Products**, Portugal, v. 50, n° 01, p. 361– 365, 2013.

DENMARK, V.K.; MAYER, L. Inflammatory Bowel Diseases. **The Autoimmune Diseases**, Nova lorque, v. 5, n° 01, p. 873-888, 2014.

DÖRING, A.S. et al. How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis* L.?. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 171, n° 05, p. 35– 41, 2014.

FLECKNELL, P. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals. **Laboratory Animal Anesthesia**, Oxford, v.30, n° 03, p. 293-316, 1996.

HAMAGUCHI, T. et al. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. **American Journal of Pathology**, Kanazawa, v. 175, n° 06, p. 2557–2565, 2009.

HUANG, S.S.; ZHENG, R.L. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer Lett**, Lanzhou, v. 239, n° 02, p. 271–280, 2006.

HUR, Y.G. et al. Rosmarinic acid induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients via mitochondrial pathway. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n° 01, p. 36–45, 2007.

JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 29, nº 02, p. 326-337, 2006.

KALANTARI, H.; AGHEL, N.; BAYATI, M. Hepatoprotective effect of *Morus alba* L. in carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in mice. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, v. 17, nº 01, p. 90-94, 2009.

KARTHIKKUMAR, V. et al. Modulatory efficacy of rosmarinic acid on premalignant lesions and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Environmental toxicology and pharmacology**, Tamilnadu, v, 34, nº 03, p. 949–958, 2012.

KIM, Y.B. et al. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* K. treated with methyl jasmonate. **Plos one**, Turquia, v. 8, nº 05, p. 1-8, 2013.

LAURINDO, L.R. **Ácido rosmarínico inibe a resposta neuroinflamatória autoimune e comportamento tipo depressivo em camundongos**. 2017. 62f. Dissertação (Graduação em fisioterapia) - Universidade Federal de Santa Catarina: Departamento de Ciências da Saúde, Araranguá, 2017.

LEE, J. et al. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. **Journal of Dermatology**, Dangjung Dong, v. 35, nº 12, p. 768–771, 2008.

LOPRES, A.C. **Tratado de Clínica Médica**, v I, 2ed. São Paulo: Rocca, 2009.

MARMITT, D.J. et al. Potencial hepatoprotetor das plantas medicinais da renisus: revisão sistemática. **Revista de Atenção à Saúde**, São Caetano do Sul, v. 14, nº 49, p. 84-91, 2016.

MEDINA, K.S.; BARRERA, E.C. Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad em el metabolismo secundario. **Revista facultad de ciências básicas**, Nueva Granada, v.12, nº2, p. 252-269, 2016.

MELO, J.M.L. **Efeitos antioxidantes do ácido rosmarínico sobre sistema renina angiotensina em modelo experimental de Parkinson**. 2018. 50f. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo : Centro de Ciências da Saúde, Vitória, 2018.

MILES, E.A.; ZOUBOULI, P.; CALDER. PC. Effects of polyphenol on human Th1 and Th2 cytokine production. **Clinical Nutrition Journal**, Southampton, v. 24, nº 05, p. 780-784, 2005.

MOHAMED, M.A. et al. Effects of *Lawsonia inermis* L. (Henna) leaves' methanolic extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, Estados Unidos da América, v.5, nº 01, p. 22-26, 2016.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 24, nº 01, p.105-111, 2001.

NASCIMENTO, R.F. **Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido rosmarínico em modelos animais**. 2016. 167f. Dissertação (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba: Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, 2016.

PEGORARO, C.M.R. **Efeito Bidens pilosa contra intoxicação induzida por tetracloreto de carbono em ratos Wistar**. 2018. 94f. Tese (Doutorado em fisiopatologia e saúde animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente .2018.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Revista de Biotecnologia e Biodiversidade**, Palmas, v. 3, nº 04, p. 146-152, 2012.

RODRIGUES, S.; SILVA, H.; PEREIRA, M.L. Avaliação terapêutica de *Inula crithmoides* L. em órgãos reprodutores de ratinhos expostos a tetracloreto de carbono. **Ciência e ambiente para todos**, Santiago, v. 3, nº 01, p. 15-29, 2011.

SATYAM S.M.; BAIRY, K.L. Zincovit Drop Reduces Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, Karnataka, v. 3, nº 05 p. 469-474, 2015.

SCHAFFER T.K. et al. Evaluation of antioxidant activity of grapevine leaves extracts (*Vitis labrusca* L.) in liver of *Wistar* rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Caxias do Sul, v. 88, nº 01, p. 187-196, 2016.

SILVA, J.B. **Análise do perfil químico e investigação da atividade hepatoprotetora *in vivo* e da citotoxicidade e das atividades anti-inflamatória e antibacteriana *in vitro* de *Vernonia condensata* B. (Asteracea Bencht. & Presl)**. 2017. 145f.Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

SILVA, M.A.C. **Atividade hepatoprotetora do extrato hidroalcolico do resíduo agroindustrial de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* O.), e do extrato etanólico das folhas de fruta-pão (*Artocarpus altilis* F.(Parkinson)), em camundongos**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia ,2015.

SOUZA, M.L.M. **Estudo da citotoxicidade do ácido rosmarínico em modelos *in vitro* de câncer humano**. 2017. 82f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

TASCI, I. et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal compilation: Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 28,nº 02, p. 266-268, 2008.

TORRES, L.R.O. **Avaliação físico-química de óleos da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* C.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de ratos**

**submetidos à toxicidade aguda por tetracloreto de carbono.** 2016. 95f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos ) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

VENKATACHALAM, K. et al. The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Tamilnadu, v. 65, nº 04, p. 409-418, 2013.

VIEIRA, B.M. **Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos *wistar*.** 2014. 59f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

VOSTÁLOVÁ, J.; ZDAŘILOVÁ, A.; SVOBODOVÁ, A. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, p. 171-181, 2010.

WOLFENDER, J.L. et al. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, nº08, p. 1056-1090, 2013.

ZHONG, J.J.; Plant Secondary Metabolites. *Comprehensive Biotechnology* (second edition). **Comprehensive Biotechnonology**, Shanghai, v. 3, nº 02, p. 299-308, 2011.

## ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 13 de abril de 2015.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE  
PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 128/14**

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

1. **Título do projeto:** Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, da farmacocinética e das atividades hepatoprotetoras e antioxidante do ácido rosmarínico, *in vivo*
2. **Pesquisador Responsável:** Dorcas Fernandes dos Anjos Melo
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** FF/UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** Luiz Carlos da Cunha FF/UFG
5. **Unidade onde será realizado:** FF/UFG
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 19/12/2014
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 30/03/2015

**II - Parecer da CEUA:**

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **APROVOU** o projeto acima referido e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Substantiado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em NOVEMBRO DE 2016.



**III - Data da reunião: 13 de abril de 2015**

RENATA  
MAZARO:12343522812  
2015.05.03 18:02:45

DR. RENATA MAZARO  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Portfólio de plantas que apresentam o ácido rosmarínico.

Nome científico	Nome popular	Figura
<p style="text-align: center;"><i>Anethum graveolens</i> L. (Apiaceae)</p>	<p style="text-align: center;">Endro</p>	 <p style="text-align: center;">FONTE: (CARVALHO, 2006)</p>
<p style="text-align: center;"><i>Artemisia dracunculus</i> L. (Asteraceae)</p>	<p style="text-align: center;">Estragão</p>	 <p style="text-align: center;">FONTE: (WERNCKE, 1995)</p>

<p><i>Betonica officinalis</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Betônica</p>	 <p>FONTE: (ROQUE, 1840)</p>
<p><i>Borago officinalis</i> L. (Boraginaceae)</p>	<p>Borragem</p>	 <p>FONTE: (PLOWMAN, 1987)</p>

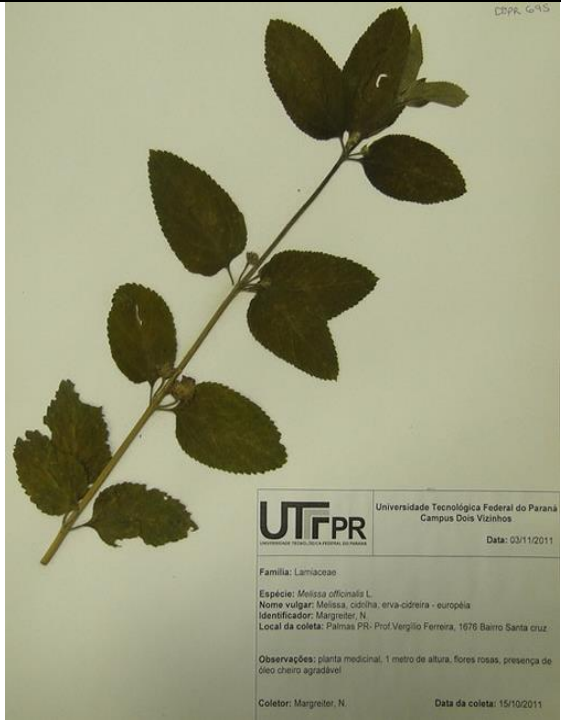
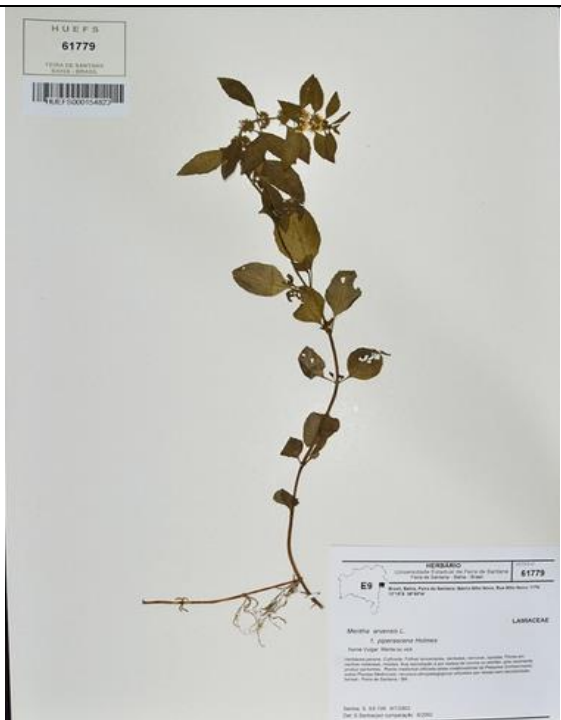


<p><i>Glechoma hederacea</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Ervaterrestre</p>	 <p>FONTE: (ROQUE, 1838)</p>
<p><i>Hyssopus officinalis</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Hissopo</p>	 <p>FONTE: (KIEHL, 1944)</p>

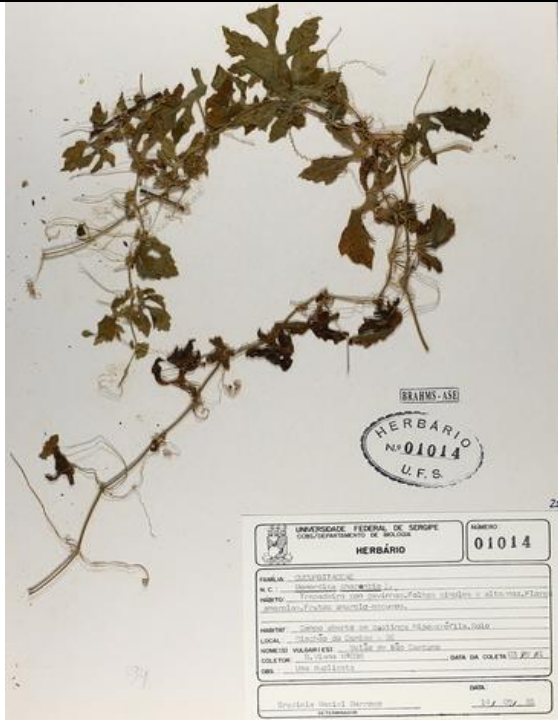

<p><i>Lycopus europaeus</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Licopus</p>	 <p>HERB. OSS. GERM. <i>Lycopus europaeus</i> L. Chevreton 1826</p> <p>DIGITADA 13758</p>
<p><i>Majorana hortensis</i> M. (Lamiaceae)</p>	<p>Manjerona</p>	 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS HERBÁRIO n.º 25282</p> <p>Nome Científico: <i>Majorana hortensis</i> Família: LAMIACEAE Espécie: <i>Majorana hortensis</i> Nome popular: Manjerona Proveniência: Brasil Coleção: Coleção de Plantas Observações: Cultivada n.º 25282 em 22.X.82</p>

FORNE: (ROQUE, 1826)

FORNE: (CLÁUDIO; ELIANE, 1982)



<p><i>Melissa officinalis</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Erva cidreira</p>	 <p>Fonte: (MARGREITE, 2011)</p>
<p><i>Mentha arvensis</i> f. <i>piperascens</i> H. (Lamiaceae)</p>	<p>Hortelã</p>	 <p>Fonte: (SANTOS, 2002)</p>

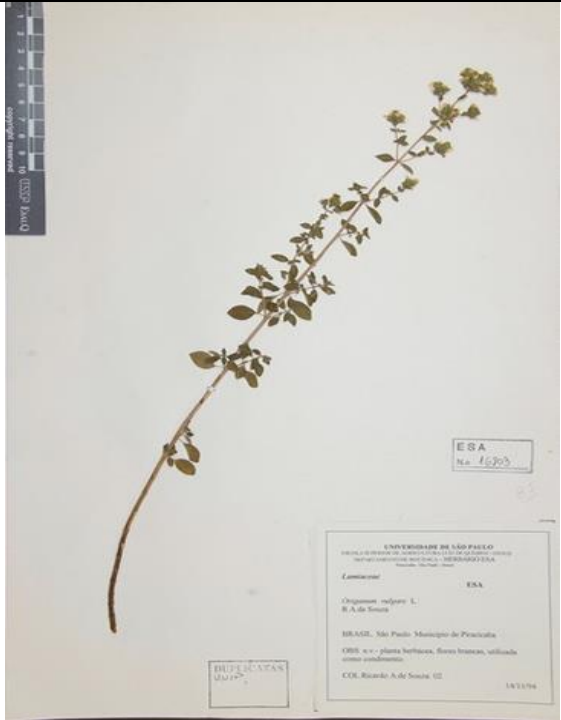

<p><i>Mentha pulegium</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Poejo</p>	 <p>Fonte: (MARANHÃO, 1915)</p>
<p><i>Mentha spicata</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Hortelã-peluda</p>	 <p>Fonte: (SANTANA, 1983)</p>


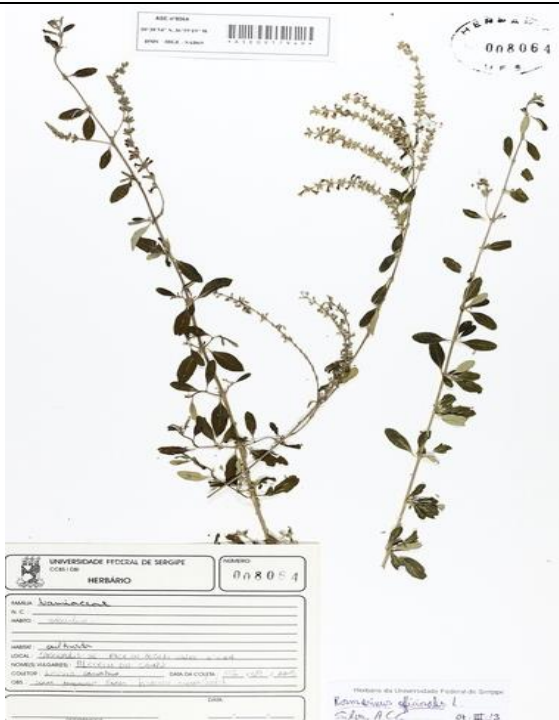
<p><i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)</p>	<p>Melão-de-são-caetano</p>	 <p>BRAMS-ASB HERBÁRIO Nº 01014 U.F.S.</p> <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDADE HERBÁRIO</p> <p>FAMÍLIA: Cucurbitaceae N.º: 01014 NOME: Melão-de-são-caetano LOCAL: Serra da Ilha, Serra da Ilha, Serra da Ilha HABITAT: Serra da Ilha, Serra da Ilha, Serra da Ilha COLLECTOR: Haroldo Mendes DATA DA COLHEITA: 10/10/81 ESP.: Frut. imat.</p> <p>24</p>
<p><i>Monarda didyma</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Bergamota</p>	 <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA UCC 70630 HERBÁRIO UCC</p> <p>FOTOGRAFADO</p> <p>Fam: Labiatae Esp: Monarda Esp: didyma L. = Monarda fistulosa L. Var: (sem nome) Obs: Material do U.S.A., enviado de A. J. Mendes em Outubro de 1937 P. folha na herbaria Collec. em Ilha, S. J., por A. J. Mendes Dat. por A. J. Mendes Confirmando pp. A. J. Mendes Junho 1938</p> <p>10</p>

FONTE: (VIANA, 1981)

FONTE: (MENDES, 1937)

<p><i>Nepeta cataria</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Gataria</p>	 <p>FONTE: (BLACK, 1938)</p>
<p><i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Manjeriçao</p>	 <p>FONTE: (ZORZZI, 2014)</p>

<p><i>Origanum vulgare</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Orégano</p>	 <p>Herbarium specimen of <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano). The specimen is a single stem with small, opposite, ovate leaves and a terminal spike of small flowers. A ruler is visible on the left side of the specimen. Labels include: 'ESA No. 4625', 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'Lamiaceae ESA', 'Origanum vulgare L. R.A. de Souza', 'BRASIL - São Paulo - Município de Piracicaba', 'ORB. n.º - planta herbácea, frutos brancos, utilizada como condimento', 'CCB, Ricardo A. de Souza 02', and '18/1/94'.</p> <p>FONTE: (SOUZA, 1994)</p>
<p><i>Petroselinum crispum</i> N. (Apiaceae)</p>	<p>Salsinha</p>	 <p>Herbarium specimen of <i>Petroselinum crispum</i> N. (Salsinha). The specimen consists of several stems with finely dissected, feathery leaves and umbels of small flowers. Labels include: 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIS DE QUEIROZ"', 'Instituto de Botânica', 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'Departamento de Botânica', 'Formosa, 1962', 'Luz, E. C. - Botânica - Universidade Federal de São Carlos - São Carlos - Minas Gerais - 13127-000', 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIS DE QUEIROZ"', 'Instituto de Botânica', 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'Departamento de Botânica', 'Formosa, 1962', 'Luz, E. C. - Botânica - Universidade Federal de São Carlos - São Carlos - Minas Gerais - 13127-000', 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIS DE QUEIROZ"', 'Instituto de Botânica', 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO', 'Departamento de Botânica', 'Formosa, 1962', 'Luz, E. C. - Botânica - Universidade Federal de São Carlos - São Carlos - Minas Gerais - 13127-000'.</p> <p>FONTE: (PIRACICABA, 1962)</p>

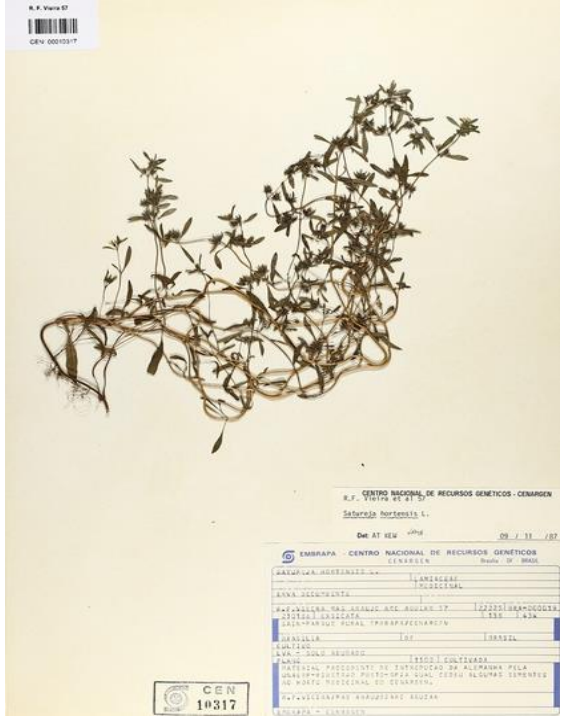

<p><i>Prunella vulgaris</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Brunela</p>	 <p>Herbário ESA</p> <p>008064</p>
<p>FORTE: (SOUZA ET AL., 2007)</p>		
<p><i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Alecrim</p>	 <p>008064</p> <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE HERBÁRIO</p> <p>008064</p> <p><i>Rosmarinus officinalis</i> L.</p>
<p>FORTE: (CARVALHO, 2003)</p>		



<p><i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Sálvia</p>	 <p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE PLANTAS ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA, ZOOLOGIA E GARDENIA INSTITUTO DE BOTÂNICA RUA DO MATÃO, 255 CAMPUS DE USP CAMPUS DE SÃO CARLOS</p> <p>COLHEITA: SALVIA OFFICINALIS L.</p> <p>DATA: _____</p> <p>LOCAL: São Carlos, Foz de Iguazú - Santa Catarina - Paraná de Foz de Iguazú</p> <p>DATA: 20/03/95</p> <p>COL.: A.C. CERVI, M. S. FERRELLI, J. FERRELLI</p> <p>ESP.: HERBÁRIO, FLORES, FRUTOS</p>
<p><i>Salvia sclarea</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Sálvia- esclaréia</p>	 <p>UPCB 0034411</p> <p>INSTITUTUM BOTANICUM BARCINONENSE (BC)</p> <p>Lindosmo</p> <p><i>Salvia sclarea</i> L.</p> <p>HAUTAT: 2m arbor de flores amio</p> <p>A.C. Cerri 5601a. Rome, I. August 2. 1995</p> <p>1995. A. Yano 22/4/95</p>

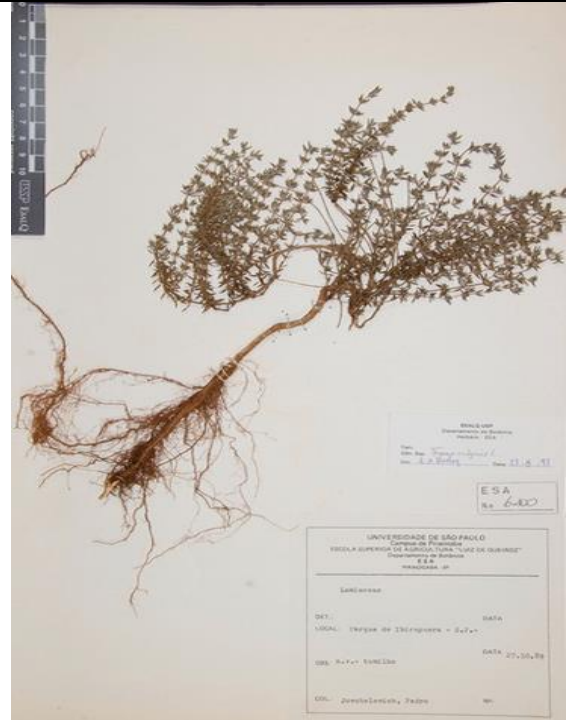
FONTE: (ANGERAMI, 1989)

FONTE: (CERVI, 1995)

<p><i>Satureja hortensis</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Segurelha</p>	 <p>Fonte: (Vieira, 1986)</p>
<p><i>Thymus serpyllum</i> L. (Lamiaceae)</p>	<p>Serpilho</p>	 <p>Fonte: (Roque, 1844)</p>

*Thymus vulgaris* L.  
(Lamiaceae)

Tomilho



FONTE:(JOVCHALEVICH, 1989)