



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Eduardo Antonio Ferreira

**EFEITOS HIPOLIPEMIANTE E HEPATOPROTETOR DA
2',4',6'-TRIHIDROXIACETOFENONA ISOLADA DE
*MYRCIA MULTIFLORA***

Florianópolis
2010

Eduardo Antonio Ferreira

**EFEITOS HIPOLIPEMIANTE E HEPATOPROTETOR DA
2',4',6'-TRIHIDROXIACETOFENONA ISOLADA DE
*MYRCIA MULTIFLORA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F383e Ferreira, Eduardo Antonio

Efeito hipolipemiante e hepatoprotetor da 2'4'6'-trihidroxiacetofenona isolada de *Myrcia multiflora* [tese] / Eduardo Antonio Ferreira ; orientador, Rozangela Curi Pedrosa. - Florianópolis, SC, 2010.
100 p.: il., grafs., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Compostos bioativos. 3. Inibidores enzimáticos. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

“Efeitos Hipolipemiante e Hepatoprotetor da 2’,4’,6’-trihidroxiacetofenona isolada de *Myrcia multiflora*”

Por

Eduardo Antonio Ferreira

Tese julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (UFU – Membro Titular)

Prof. Dr. Geraldo Picheth (UFPR – Membro Titular)

Prof. Dr. Arício Treitinger (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 27 de setembro de 2010.

“Sei que para tudo há uma razão. Talvez na hora não tenhamos o discernimento nem a percepção para compreendê-la, porém, com tempo e paciência, ela acaba por se revelar.”

Brian Weiss.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre, por permitir que meus sonhos se transformassem realidade, por me transformar numa pessoa feliz e realizada.

À Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, pela oportunidade oferecida, pela orientação, preocupação, seriedade, competência, paciência e pelos ensinamentos que me possibilitaram realizar este trabalho.

Aos componentes da banca examinadora Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, Prof. Dr. Geraldo Picheth, Prof. Dr. Arício Treitinger, Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e Prof. Dr. Celso Spada pelas considerações, sugestões e pela disponibilidade na avaliação e correção deste trabalho.

Aos amigos de laboratório e aos colegas, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que tornaram os momentos de trabalho bem mais prazerosos.

Aos meus pais e meu irmão por respeitarem as minhas escolhas e sempre me apoiarem e incentivarem na realização de meus objetivos.

Especialmente a Eliana, minha adorável e eterna companheira, obrigado pelo amor, paciência e dedicação demonstrados nestes anos.

À todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, e aos que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que ajudaram de alguma forma na conquista de mais um sonho. A todos vocês fica a minha mais profunda admiração e eterna gratidão.

RESUMO

A *Myrcia multiflora*, popularmente conhecida como “pedra-ume-caá” ou “planta insulina”, é utilizada na medicina popular sul-americana no tratamento de diabetes, diarreia, enterite, hemorragia e aftas. Dentre os compostos biologicamente ativos isolados desta planta, destaca-se a mirciafenona A, uma acetofenona glicosilada (2-O-β-D-glicopiranosil-2',4',6'-trihidroxiacetofenona), que apresenta três hidroxilas em sua estrutura básica, quando aglicosilado (2',4',6'-trihidroxiacetofenona - THA). O presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vivo* a possível atividade antiobesidade, hipolipemiante e hepatoprotetora da THA. Os efeitos antiobesidade e hipolipemiante da THA foram avaliados *in vivo* em um ensaio agudo (induzida pela administração de Triton WR-1339) e um ensaio crônico (induzida pela dieta hipercalórica). Além disso, avaliamos a relação da THA com absorção intestinal de triglicerídeos (TG), bem como a inibição da atividade das lipases gastrointestinais. A atividade hepatoprotetora da THA foi avaliada pelo modelo de hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄, verificando seu efeito sobre a concentração sérica dos biomarcadores de danos hepáticos (aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH)), indicadores de estresse oxidativo e aspecto histológico da lesão hepática. Os resultados mostraram que a THA causou uma redução significativa nos níveis de colesterol total (CT) (37%) e TG (46%) sendo tão efetivo quanto à Lovastatina (32 e 1%) ou Orlistate (26 e 34%). No ensaio crônico com dieta hipercalórica, a THA reduziu os níveis séricos de CT e TG (32 e 61%), enquanto a Lovastatina diminuiu em 35 e 49%, respectivamente. Em relação ao ganho de peso, a THA causou uma redução semelhante ao Orlistate (40 e 38%, respectivamente) mostrando também uma contínua atividade inibitória das lipases gastrointestinais associada a uma redução significativa dos níveis séricos de triglicérides. A atividade antioxidante da THA foi avaliada *in vitro* em comparação com Silimarina (SIL), um conhecido agente hepatoprotetor. Os resultados obtidos mostraram que a THA e a SIL foram capazes de estabilizar o radical DPPH e de capturar os radicais ânion superóxido (O₂^{•-}) e hidroxil (•OH). Os ensaios *in vivo* mostraram que o pré-tratamento com a THA ou SIL preveniram significativamente (*p*<0,01) a elevação da atividade das enzimas AST, ALT e LDH. Prevenindo também o aumento dos níveis de lipoperoxidação da membrana plasmática induzida pela administração

do CCl₄, restabelecendo o funcionamento mitocondrial e sua permeabilidade em 49,5 e 47,7%, respectivamente. Também é importante notar que o conteúdo de proteína carbonilada e o dano oxidativo ao DNA foram significativamente diminuídos nos camundongos pré-tratados com a THA ou SIL, demonstrando também uma eficácia em prevenir a depleção de GSH, bem como na normalização das atividades enzimáticas antioxidantes (SOD, CAT e GPx). Em conclusão, a THA apresentou uma atividade antiobesidade e um efeito hipolipemiante misto, devido à sua capacidade de impedir a elevação do peso corporal dos animais submetidos a uma dieta rica em gordura e também pela redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos, possivelmente pelo bloqueio da absorção de triglicerídeos, devido ao seu efeito inibidor sobre a atividade das lipases gastrointestinais. Exibindo também um efeito hepatoprotetor *in vivo*, protegendo os danos causados pelo CCl₄, provavelmente resultante do seu potencial antioxidante.

Palavras-chave: 2',4',6'-trihidroxiacetofenona – THA, Antiobesidade, Hipolipemiante, Hepatoprotetor.

ABSTRACT

Myrcia multiflora, a plant popularly known as "pedra hume caá" or "insulin plant", is used in traditional medicine in South America for treatment of diabetes, diarrhea, enteritis, hemorrhage and ulcers. Among the biologically active compounds isolated from this plant, we highlight the myrciaphenone A, a glycosylated acetophenone (2-*O*- β -D-glucopyranosyl-2',4',6'-trihydroxyacetophenone) which has three hydroxyl groups in its basic structure, when aglycosylated (2',4',6'-trihydroxyacetophenone - THA). This study aimed to evaluate *in vivo* the anti-obesity, hypolipidemic and hepatoprotective effects of THA. The anti-obesity and hypolipidemic effects of THA were evaluated *in vivo* by an acute assay (induced by administration of Triton WR-1339) and a chronic assay (induced by a high-fat diet). In addition, we evaluated the relationship of THA with the intestinal absorption of triglycerides (TG), as well as inhibition of the activity of gastrointestinal lipases. The hepatoprotective activity of THA was evaluated by model of hepatotoxicity induced by CCl₄, verifying its effect on serum biomarkers of liver damage, such as aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH), indicators of oxidative stress and histological aspects of liver injury. The results showed that THA caused a significant reduction in total cholesterol (TC) (37%) and TG (46%) acting as effectively as Lovastatin (32 and 1%) or Orlistat (26 and 34%). In the chronic assay under a high-fat diet, THA reduced the serum levels of TC and TG (32 and 61%), while Lovastatin caused a decrease of 35 and 49%, respectively. In addition, THA caused a reduction in the weight gain similar to Orlistat (40 and 38%, respectively) also showing a strong and continuous inhibitory activity of the gastrointestinal lipases associated with a significant reduction of the serum levels of triglycerides. The antioxidant activity of THA was evaluated *in vitro* in comparison to Silymarin (SIL), a known hepatoprotective agent. The results showed that THA and SIL were able to stabilize DPPH radical and scavenge superoxide anion (O₂^{•-}) and hydroxyl radical ([•]OH). The assays *in vivo* showed that the pre-treatments done with THA or SIL prevented significantly (*p*<0.01) the elevation of AST, ALT and LDH activities, as well as preventing the increase of levels of plasma lipid peroxidation induced by the CCl₄ administration, reestablishing mitochondrial function and permeability in 49.5 and 47.7%, respectively. It is

important note also that the content of carbonyl proteins and DNA oxidative damage were significantly decreased in mice pre-treated with THA or SIL, being also effectiveness in preventing the depletion of GSH and normalization of the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx). In conclusion, THA presented an anti-obesity and a mixed hypolipidemic effects, due to its ability in prevent the elevation of body weight of animals submitted at a high-fat diet and also by reducing cholesterol and triglyceride levels, possibly by the blocking of the absorption of triglycerides because of its inhibitor the activity of the gastrointestinal lipases. Besides, THA presented a hepatoprotective effect *in vivo*, protecting damage by CCl₄, probably resulting to their antioxidant potential.

Keywords: 2',4',6'-trihydroxyacetophenone – THA, Anti-obesity, Hypolipidemic, Hepatoprotective.

LISTA DE FIGURA

CAPÍTULO 1

Figura 1. Folhas, frutos e tronco da <i>Myrcia multiflora</i>	8
Figura 2. Estruturas químicas da 2-O- β -D-glicopiranosil-2',4',6'-trihidroxiacetofenona (A) e 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (B).	9
Figura 3. Representação esquemática da síntese da THA.	11
Figura 4. Características do desenvolvimento da placa aterosclerótica.	15
Figura 5. Mecanismo de ação da lipase gastrointestinal.	19
Figura 6. Seis principais mecanismos de danos ao fígado induzido por medicamentos.	22
Figura 7. Vias envolvidas no metabolismo energético mitocondrial. (Ácidos graxos (FA), o ciclo do ácido cítrico, ácido tricarbóxico ou de Krebs e a cadeia respiratória).	24
Figura 8. Esquema representativo da mitocôndria (A) e dos componentes da respiração mitocondrial (B).	25
Figura 9. Estrutura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial – PTP. (VDAC - canal aniônico voltagem dependente; HK - hexoquinase; CK - creatina quinase; ANT - translocador de nucleotídeos de adenina; CypD - ciclofilina D).	26
Figura 10. Esquema de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT). VDAC - canal aniônico voltagem dependente; ANT - translocador de nucleotídeos de adenina.	27
Figura 11. Esquema de ligação da proteína Bax com a VDAC (canal aniônico voltagem dependente), promovendo alteração das suas propriedades para permitir a liberação do citocromo c.	28
Figura 12. Esquema de formação de ERO na mitocôndria.	30
Figura 13. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da lipoperoxidação.	32
Figura 14. (A, B, C, D) - Estruturas químicas dos isômeros flavonolignana da silimarina.	36

CAPÍTULO 2

Figure 1. Chemical structure of 2',4',6'-trihydroxyacetophenone – (THA) - (phloracetophenone) (A) and 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone (B)..... 42

Figure 2. Triglyceride levels (mg/dL) in treated mice only with olive oil; pre-treated with THA and 30 min after with olive oil; pre-treated with Orlistat – specific inhibitor of pancreatic lipase and 30 min after with olive oil and determined at 2, 4 and 6 hours after handling. 48

Figure 3. Activity of the lipase pancreatic (UI) in mice treated only with olive oil; pre-treated with THA and 30 min after with olive oil; pre-treated with Orlistat – specific inhibitor of pancreatic lipase and 30 min after with olive oil determined at 2, 4 and 6 hours after handling. 48

CAPÍTULO 3

Figure 1. Chemical structure of 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (phloracetophenone, THA)..... 58

Figure 2. Effect of THA or Silymarin on hepatic lipid peroxidation (A), protein carbonylation (B), and DNA damage Index (C) in CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. 61

Figure 3. Effect of THA or Silymarin on Ca²⁺-induced mitochondrial swelling. 62

Figure 4. Histological analyses of liver in control mice (A), mice treated with THA (B), mice treated with CCl₄ (C), mice pre-treated with THA followed by CCl₄ (D), and mice pre-treated with Silymarin followed by CCl₄ (E). Liver tissue was stained with trichromic Cason's staining (100 x, bar = 100 μ m). Photomicrographs F and G show histocytological details of normal and abnormal livers, respectively (Cason's staining 1000 x, bar = 10 μ m). Dashed lines separate the number of hepatocytes with different staining and arrows showed the nucleus and reticular fibers..... 63

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.....	31
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1. Effect of THA, Orlistat and Lovastatin on serum total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) levels after 8 h of treatment with Triton WR1339 and control group in acute hypolipidemic assays.	46
Table 2. Lowering effect of THA, Orlistat and Lovastatin on serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) levels and body weight gain after 30 days of treatment with standard commercial diet and induced hyperlipemic-diet in Wistar-EPM-M1 rats.....	47

CAPÍTULO 3

Table 1. <i>In vitro</i> antioxidant activity of THA and Silymarin measured by scavenging of DPPH, O ₂ [•] and [•] OH radicals, and protection against lipid peroxidation (LPO) (levels of thiobarbituric acid reactive substances) in hepatic homogenates.....	60
Table 2. Effects of THA and Silymarin on CCl ₄ -induced liver damage in mice.....	61
Table 3. Effects of THA and Silymarin on GSH levels and antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, and GPx) in livers of treated mice and of control mice.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato	ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
AG livres	Ácidos graxos livres	ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
AIF	Fator Indutor de Apoptose	GPx	Glutationa Peroxidase
ALT	Alanina aminotransferase	GSH	Glutationa reduzida
ANT	Translocador de Nucleotídeos de Adenina	GSSG	Glutationa oxidada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	GST	Glutationa S-transferase
AST	Aspartato aminotransferase	H ₂ O	Água
ATP	Adenosina trifosfato	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Ca ²⁺	Cálcio	HDL	Lipoproteínas de alta densidade
CAT	Catalase	HK	Hexoquinase
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono	HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
•CCl ₃	Radical triclorometil	IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
•O ₂ CCl ₃	Radical peroxi-triclorometil	IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
CK	Creatina Quinase	K ⁺	Potássio
CoQH ₂	Co-enzima QH ₂	LDH	Lactato Desidrogenase
CT	Colesterol Total	LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
CYP ₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀	LDL-ox	Lipoproteínas de baixa densidade oxidada
CypD	Ciclofilina D	LH	Ácidos graxos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil	L [•]	Radical livre de ácido graxo centrado no carbono
EDTA	Ácido etileno-diaminotetraacético	LOOH	Hidroperoxido de ácido graxo

Lista de Figura

LPO	Peroxidação lipídica	PTP	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
MG	2-monoglicerídeos	QM	Quilomícrons
Mg ²⁺	Magnésio	RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
MnSOD	Superóxido Dismutase Mitocondrial	RE	Reticulo Endoplasmático
Na ⁺	Sódio	RL	Radical livre
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida	RO [•]	Radical alcoxil
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida	RO ₂ [•]	Radical peroxil
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato	RS	Reticulo Sarcoplasmático
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido	SIL	Silimarina
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III	SOD	Superóxido Dismutase
NF-κB	Fator Nuclear κB	SUS	Sistema Único de Saúde
O ₂	Oxigênio molecular	TBA	Ácido tiobarbitúrico
¹ O ₂	Oxigênio singlete	TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido	TG	Triglicerídeos
[•] OH	Radical hidroxil	THA	2',4',6'-trihidroxiacetofenona
OMS	Organização Mundial da Saúde	TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
P _i	Fosfato inorgânico	VDAC	Canal Aniônico Voltagem Dependente
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares	VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares	WHO	World Health Organization
		ΔΨ _m	Potencial Elétrico de Membrana

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
-------------------------	---

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS	5
1. PLANTAS MEDICINAIS	6
1.1 <i>Myrcia multiflora</i>	7
1.2 THA – 2',4',6' -trihidroxiacetofenona	10
2. OBESIDADE	11
3. SÍNDROME METABÓLICA	12
4. DOENÇA CARDIOVASCULAR E ATROSCLEROSE	13
5. DISLIPIDEMIA	16
5.1 Lipase gastrointestinal	18
6. HEPATOTOXICIDADE	20
6.1 Mitocôndrias	23
6.1.1 Poro de transição de permeabilidade mitocondrial – PTP	26
6.1.2 Canal Aniônico Voltagem Dependente – VDAC	28
6.1.3 Homeostase de Cálcio (Ca^{2+})	29
6.1.4 Mitocôndria e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	30
7. HEPATOPROTETORES	34
7.1 Silimarina	35
8. OBJETIVO GERAL	37
8.1 Objetivos Específicos	37

CAPÍTULO 2

THE 2',4',6'-TRIHIDROXYACETOPHENONE ISOLATED FROM <i>MYRCIA MULTIFLORA</i> HAS A ANTI-OBESITY AND MIXTE HYPOLIPIDEMIC EFFECT BY DECREASE OF LIPID INTESTINAL ABSORPTION	38
Abstract	40
Introduction	41
Materials and Methods	42
Chemicals	42

Plant material and isolation of phloracetophenone glucoside	42
Animals	43
Acute hypolipidemic assay	44
Gain weight and chronic hypolipidemic assay	44
Inhibition of pancreatic lipids absorption assay	44
Measurement of pancreatic lipase activity	45
Statistical analysis	45
Results	45
Acute hypolipidemic effect of THA	45
Gain weight and chronic hypolipidemic effect of THA	46
Evaluation of the activity of pancreatic lipase	47
Discussion	49
References	52

CAPÍTULO 3

POTENT HEPATOPROTECTIVE EFFECT IN CCL₄-INDUCED HEPATIC INJURY IN MICE OF PHLOROACETOPHENONE FROM *MYRCIA MULTIFLORA*

Abstract	57
Introduction	57
Materials and Methods	58
Chemicals	58
Plant material and isolation of phloracetophenone glucoside	58
<i>In vitro</i> antioxidant activity	58
Animals	59
Hepatoprotective activity	59
Determination of biochemical markers of hepatic injury	59
Oxidative damage biomarkers	59
Detection of DNA damage	59
Antioxidant enzymes	60
Determination of mitochondrial swelling	60
Histological analyses	60
Statistical analysis	60
Results	60
<i>In vitro</i> antioxidant activity	60

Biochemical markers of hepatic injury	60
Oxidative damage biomarkers and DNA fragmentation	61
Glutathione (GSH) content and antioxidant enzymes	61
Mitochondrial swelling	61
Histological analyses	62
Discussion	62
References	65
DISCUSSÃO GERAL	67
CONCLUSÕES GERAIS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO	99

INTRODUÇÃO

Na busca de melhores condições de vida os seres humanos sempre procuraram na natureza os meios necessários tanto para a sobrevivência quanto para a cura de doenças (BRASIL, 2006a; CARVALHO et al., 2007; CHIN et al., 2008). A busca foi direcionada à utilização de plantas medicinais capazes de amenizar, prevenir e até mesmo curar várias patologias como: diabetes, câncer, infecções, inflamação, doenças hepáticas, dor, entre outros que estão associada a evolução humana. (BALUNAS; KINGHORN, 2005; TRIGGLE, 2005; LAM, 2007).

O uso e investigação de plantas medicinais como forma alternativa no tratamento de várias doenças vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas, principalmente nos países em desenvolvimento, como Brasil (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; COUTINHO et al., 2004; GIULIETTI et al., 2005; BRASIL, 2006a). Essas investigações em geral envolvem pesquisas multidisciplinares que buscam elucidar os mecanismos de ação, além de caracterizar substâncias capazes de atuarem farmacologicamente contra inúmeras doenças, o que possibilita a descoberta de compostos bioativos e o desenvolvimento de novos fármacos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; TRIGGLE, 2007; LAM, 2007). Dessa forma, grande parte dos fármacos comercializados atualmente tem origem em produtos naturais ou são sintéticos cujos modelos são de produtos naturais (MACÍAS; GALINDO; GALINDO, 2007).

Por outro lado, a sociedade moderna com todo seu arsenal tecnológico tem modificado de forma acelerada seus padrões comportamentais com reflexos imediatos nos hábitos de vida. Promovendo mudanças nos padrões nutricionais e terapêuticos do homem ocidental. Dessa forma, essas mudanças vem ocasionando distúrbios metabólicos como doenças hepáticas e obesidade relacionados ao consumo inadequado ou excessivo de medicamentos e alimentos tornaram-se problemas de saúde pública mundial. Assim, a prevalência desses distúrbios vem crescendo acentuadamente, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, chegando a proporções de epidemia (UNGER, 2002; WANG; BEYDOUN, 2007; KARALIS et al., 2009).

A obesidade é considerada uma doença crônica, complexa e multifatorial, envolvida na integração social, comportamental e cultural,

bem como em fatores fisiológicos, bioquímicos, metabólicos e genéticos (LANG; FROELICHER, 2006; WANG; BEYDOUN, 2007; KARALIS et al., 2009). Associada também, como importante fator de risco para o desenvolvimento de patologias que estão direta ou indiretamente relacionadas, tais como: dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, alguns tipos de câncer e síndrome metabólica (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005; MEDINA-GOMEZ; GRAY; VIDAL-PUIG, 2007; SITNICK; BODINE; RUTLEDGE, 2009).

As alterações no metabolismo de lipídeos, resultantes de distúrbios metabólicos, ocasionam alterações nas concentrações séricas das lipoproteínas, caracterizando a dislipidemia. Essas alterações são consideradas um importante fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, que por sua vez é responsável pelo grande aumento das doenças cardiovasculares e por quase todos os casos de mortes relacionadas (BAMBA; RADER, 2007; ZALESIN et al., 2008; LAVIE; MILANI; VENTURA, 2009). Assim, a redução ou a prevenção do aumento da concentração plasmática desses lipídeos reduzem o risco dos distúrbios mencionados e da mortalidade por causas cardiovasculares (GRUNDY, 2003; SEVER et al., 2003).

Dentro desse contexto, acreditando que a diminuição dos níveis lipídicos possa minimizar alguns dos fatores de riscos causados pela obesidade. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório com uma série de acetofenonas sintéticas (dados não publicados) indicaram também uma possível atividade hipotrigliceridêmica, principalmente para o composto 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THA), sugerindo que essa acetofenona poderia ter um efeito hipolipemiante misto. Uma vez que, a hiperlipidemia, particularmente a hipertrigliceridemia, é um dos principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da obesidade (XIE et al., 2007; RAJANI; ASHOK, 2009).

A elevação nos níveis lipídicos, comuns nas dislipidemias, pode causar lipotoxicidade e, conseqüentemente, promover o desenvolvimento de danos hepáticos (BUGIANESI; MCCULLOUGH; MARCHESINI, 2005; LORIA; LONARDO; TARGHER, 2008; GRAIER; MALLI; KOSTNER, 2009).

Em geral, as doenças hepáticas estão associadas à grande exposição dos seres humanos a produtos químicos, viral e ao acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos. Assim, as hepatopatias também representam um importante problema de saúde pública, uma vez que grande parte dos xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) são absorvidos pelo organismo e transportados até o fígado, onde

normalmente os xenobióticos são biotransformados, para que possam ser distribuídos ou eliminados. Esse órgão é considerado um importante alvo da toxicidade (hepatotoxicidade) de produtos químicos, uma vez que a sua arquitetura funcional garante um grande contato entre o plasma e os hepatócitos (MATOS; MARTINS, 2005; BERTOLAMI, 2005; PILLAI; RINELLA, 2009).

A hepatotoxicidade induzida por xenobióticos, destacando-se os fármacos, vem despertando interesse nos últimos anos, principalmente após a constatação de que o paracetamol, um fármaco largamente utilizado como analgésico e antitérmico, foi considerado uma das principais causas de insuficiência hepática aguda nos Estados Unidos e em outros países ocidentais (JAMES; MAYEUX; HINSON, 2003; LARSON et al., 2005; LEE, 2007).

Curiosamente, apesar dos recentes avanços da ciência, não existem muitos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento tanto da obesidade quanto das hepatopatias. Essa constatação tem chamado a atenção de pesquisadores de áreas multidisciplinares que buscam descobrir as multifacetadas dessas epidemias mundiais e tentar desenvolver medidas de prevenção e tratamento, mediante novas terapias farmacológicas mais eficazes, a fim de evitar os casos de mortes prematuras (BECKMAN; HAWLEY; BISHOP, 2006; KUMANYIKA, 2007; YASKIN; TONER; GOLDFARB, 2009).

Igualmente à silimarina, a THA apresenta um interesse farmacológico, por possuir importantes atividades biológicas, como regulador do metabolismo lipídico e antioxidante (FAVIER et al., 1998; SHAILAJAN et al., 2005). Estudos preliminares realizados em nosso laboratório com a série de acetofenonas sintéticas indicaram um provável efeito antioxidante e proteção à hepatotoxicidade induzida por radicais livres para alguns compostos dessa série, particularmente a THA (Anexo A). Portanto, seria interessante realizar um estudo comparativo a respeito do possível efeito hepatoprotetor dessa acetofenona e evidenciar os possíveis mecanismos envolvidos nessa hepatoproteção, uma vez que esta aparentemente apresenta atividades biológicas semelhantes à silimarina.

Assim, no presente trabalho, buscamos caracterizar a atividade hipolipidêmica mista da THA isolada de *Myrcia multiflora* e correlacionar com a possível atividade antiobesidade, utilizando modelos experimentais *in vivo*. Bem como a caracterização da atividade hepatoprotetora, pela prevenção dos danos ocasionados no fígado por composto químico *in vivo*.

A presente tese é apresentada na forma de capítulos, onde o primeiro capítulo apresenta uma breve revisão bibliográfica sobre plantas medicinais, e em específico sobre a *Myrcia multiflora* e o composto isolado, a 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THA) além dos problemas desencadeados pela obesidade, hiperlipidemia e hepatotoxicidade.

Já os demais capítulos foram elaborados no formato de artigos científicos que relatam os resultados desta pesquisa. O capítulo 2 apresenta o artigo submetido ao periódico *Planta Medica*, relatando a atividade antiobesidade e hipolipemiante da THA. O capítulo 3 apresenta o artigo publicado no periódico *Libyan Journal of Medicine*, relatando os resultados das análises da capacidade hepatoprotetora e antioxidante da THA. Após esses capítulos faz-se uma breve discussão sobre os resultados obtidos, finalizando com as conclusões gerais.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica e Objetivos

1. PLANTAS MEDICINAIS

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), principalmente nos países em desenvolvimento, aproximadamente 80% da população mundial confiam e utilizam a medicina tradicional e, conseqüentemente, as plantas medicinais, uma vez que não possuem acesso ao atendimento primário de saúde (WHO, 2002; BRASIL, 2006a; CARVALHO et al., 2007). Pode-se destacar como exemplo o Brasil, onde o uso de plantas medicinais é considerado elevado em decorrência da dificuldade de acesso da população ao sistema de saúde, associado ao elevado custo dos medicamentos industrializados (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

Em 2002, a OMS publicou o documento de Estratégia de Medicina Tradicional para 2002-2005, em que procurou aprimorar e estimular em seus países membros o uso da medicina tradicional, da medicina complementar e alternativa, utilizando plantas medicinais e fitoterápicas como uma estratégia mundial para o desenvolvimento dos sistemas de saúde (WHO, 2002; BRASIL, 2006a;). Já em 2006, por meio da Portaria n.º 971, o Ministério da Saúde brasileiro aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), inserindo a fitoterapia como um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b). Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC n.º 10, 2010), que esclarece quando e como as plantas medicinais devem ser usadas para alcançarem os efeitos benéficos à saúde. Essa Resolução preocupa-se em apresentar quais plantas são utilizadas para minimizar os sintomas de determinadas doenças, bem como sobre os possíveis problemas à saúde decorrentes de uso incorreto (BRASIL, 2010).

Segundo a OMS, as plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, capazes de biossintetizar substâncias ativas que são responsáveis por efeitos terapêuticos, causando alterações no funcionamento do sistema biológico e órgãos, promovendo a restauração do equilíbrio homeostático nos casos de doenças (WHO, 2002; CARVALHO et al., 2007).

Estudos químicos, bioquímicos e farmacológicos, relacionados com as várias espécies vegetais, têm se tornado de grande importância no cenário científico mundial, devido principalmente à caracterização de

substâncias bioativas, que permite a seleção de protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Portanto, as plantas medicinais podem ser uma fonte de matéria prima para novos fármacos ou para fornecer modelos para síntese ou modificações químicas (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; FOGLIO et al., 2006; MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; CHIN et al., 2008). Por essa razão, estima-se que pelo menos 23% dos medicamentos utilizados atualmente são de origem vegetal ou derivados de protótipos isolados de plantas (LIU; WANG, 2008).

Nesse contexto, 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THA) isolado da *Myrcia multiflora* (Lam.) DC, uma espécie vegetal de larga distribuição na América do Sul e utilizada popularmente para o tratamento de distúrbios metabólicos como diabetes, foi selecionado como objeto de estudo do presente trabalho.

1.1 MYRCIA MULTIFLORA

A *Myrcia multiflora* (Figura 1), conhecida popularmente como “pedra-ume-caá” e “planta insulina”, é utilizada na medicina popular sul-americana para o tratamento de diabetes, diarreia, enterite, hemorragia e aftas, sendo as folhas e cascas as partes mais utilizadas dessa planta (ALMEIDA, 1993; YOSHIKAWA et al., 1998; JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000; MATSUDA; NISHIDA; YOSHIKAWA, 2002). Também identificada como *Myrcia uniflora*, *Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia salicifolia* ou *Eugenia multiflora*, essa planta tem ampla distribuição no Brasil, ocorrendo do norte brasileiro até o Rio Grande do Sul (RUSSO et al., 1990; PEPATO et al., 1993; MORAIS; LOMBARDI, 2006; SOUZA et al., 2007; DUKE et al., 2008).

A *Myrcia multiflora* pertence à família Myrtaceae, uma importante família da flora brasileira. No ponto de vista econômico são produtoras de madeiras, de frutos comestíveis e utilizadas como plantas decorativas. Já do ponto de vista medicinal algumas espécies apresentam importantes atividades biológicas (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000; SOUZA; LORENZI, 2008).



Figura 1. Folhas, frutos e tronco da *Myrcia multiflora*.
Fonte: Flora Digital RS, fotografada por Martin Molz.

Segundo Barroso (1984), a família Myrtaceae inclui cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies, distribuídas predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Já de acordo com Souza e Lorenzi (2008), essa família possui aproximadamente 130 gêneros e 4.000 espécies. Desses, há 26 gêneros e em torno de 1.000 espécies que fazem parte da flora brasileira, destacando-se como uma das famílias mais comuns na formação das vegetações brasileiras.

Dentre os gêneros da família Myrtaceae, destaca-se o *Myrcia*, em que se encontra a *M. multiflora*. Esse gênero é considerado um dos maiores dessa família, com mais de 300 espécies distribuídas desde a América Central até o sul brasileiro (LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2004; MORAIS; LOMBARDI, 2006; SOUZA et al., 2007).

Estudos já demonstraram a atividade hipoglicemiante da *M. multiflora* tanto dos extratos brutos e infusões como de algumas substâncias isoladas, podendo-se citar principalmente os trabalhos de YOSHIKAWA et al., 1998 e MATSUDA; NISHIDA; YOSHIKAWA, 2002. Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *M. multiflora* caracterizaram a presença de flavanonas (mirciatricina I, II, III, IV e V), acetofenas (mirciafenonas A e B) e flavonóis (mirciatricina, mearnsitrina, quercitrina, desmantina-1 e guaiajaverina). E estudos biológicos demonstraram que, dentre esses compostos isolados, as mirciatricinas e as mirciacetofenonas apresentaram atividade hipoglicemiante via inibição da atividade da enzima aldose redutase e α -glicosidase (MATSUDA; NISHIDA; YOSHIKAWA, 2002;

LIMBERGER; SOBRAL; HENRIQUES, 2004; BNOUHAM et al, 2006).

A *M. multiflora* também foi estudada pela Central de Medicamentos do Brasil (CEME), que avaliou as possíveis ações antidiabética, hipoglicemiante e toxicidade da infusão ou decoção das folhas da planta (BRASIL, 2006a). Esse estudo validou o uso popular da *M. multiflora* sob a forma de chá no tratamento do diabetes. Por outro lado, o isolamento e a caracterização das substâncias ativas dessa planta, tais como as mirciatricinas e as mirciacetofenonas, demonstraram a necessidade de mais investigações científicas, com objetivo de caracterizar e desenvolver novos fármacos mais seguros e eficazes no tratamento da diabetes (BRASIL, 2006a).

Dentre os compostos isolados da *M. multiflora*, destaca-se a mirciafenona A, uma acetofenona glicosilada (2-*O*- β -D-glicopiranosil-2',4',6'-trihidroxiacetofenona) (Figura 2A), que apresenta três hidroxilas em sua estrutura básica (FAVIER et al., 1998). Estudo realizado por Mathiesen e colaboradores (1997) demonstrou que tal composto, quando aglicosilado (2',4',6'-trihidroxiacetofenona - THA; Figura 2B), apresentou uma atividade antioxidante *in vitro*, devido à capacidade de estabilizar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

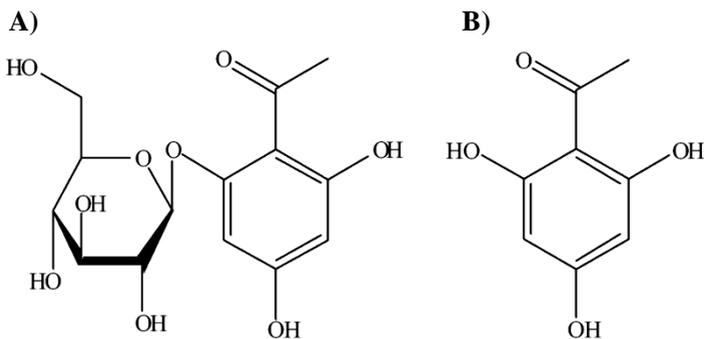


Figura 2. Estruturas químicas da 2-*O*- β -D-glicopiranosil-2',4',6'-trihidroxiacetofenona (A) e 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (B).

Fonte: Adaptada de Yoshikawa et al., 1998 e Kanchanapou et al., 2006.

1.2 THA – 2',4',6'-TRIHIDROXIACETOFENONA

A 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (Figura 2B) é a parte aglicona de um glicosídeo que já foi extraído da *M. multiflora* e da *Curcuma comosa* Roxb (YOSHIKAWA et al., 1998; SUKSAMRARN et al., 1997). Essa acetofenona é um composto de ocorrência natural que também pode ser obtido via síntese orgânica. A literatura especializada indica várias fontes para a obtenção de derivados da THA, mas a forma livre desse acilfloroglucinol é extremamente rara (LEE et al., 1996; CHOSSON et al., 1998; DAI et al., 2008). Cabe salientar que os fenóis livres são relativamente raros em plantas, e o floroglucinol “foi relatado somente em algumas espécies vegetais” (HARBORNE, 1998).

A THA, como as acetofenonas de maneira geral, apresentam interesse farmacológico por possuírem importantes atividades biológicas, como anti-inflamatória (FAVIER et al., 1998), antiespasmódica (CECHINEL FILHO; MIGUEL; CALIXTO, 1995), antibacteriana (NIERO et al., 1996) e antifúngica (CECHINEL FILHO et al., 1996). Estudos realizados por Suksamrarn et al. (1997) e Piyachaturawat et al., (1998; 2000; 2002a,b) demonstraram que essa hidroxiaacetofenona, extraída da *C. cumosa*, possui uma baixa toxicidade, bem como um efeito colerético, devido à sua capacidade de estimular o fluxo da biliar e excreção biliar, além de reduzir as concentrações de colesterol do plasma. A THA exerce o efeito hipocolesterolêmico, por induzir a atividade da enzima colesterol 7 α -hidroxilase, que aumenta o catabolismo hepático do colesterol a ácidos biliares, para que possam ser eliminados pela secreção biliar (PIYACHATURAWAT et al., 2002a)

Niumsakul e colaboradores (2007) demonstraram também que frações de extrato da *C. cumosa* contendo a THA glicosilada apresentaram atividade antioxidante, pelo ensaio do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) e atividade citotóxica sobre as células HeLa.

A THA pode ser sintetizada pela reação do floroglucinol com acetoneitrila na presença de ácido clorídrico, cloreto de zinco e usando dietil éter como solvente, sob baixa temperatura (Figura 3). Como resultado dessa reação, forma-se o cloridrato de cetimina do floroglucinol, o qual é hidrolisado com água em ebulição por algumas horas para obtenção da THA (GULATI; SETH; VENKATARAMAN, 1942; VOGEL, 1988).

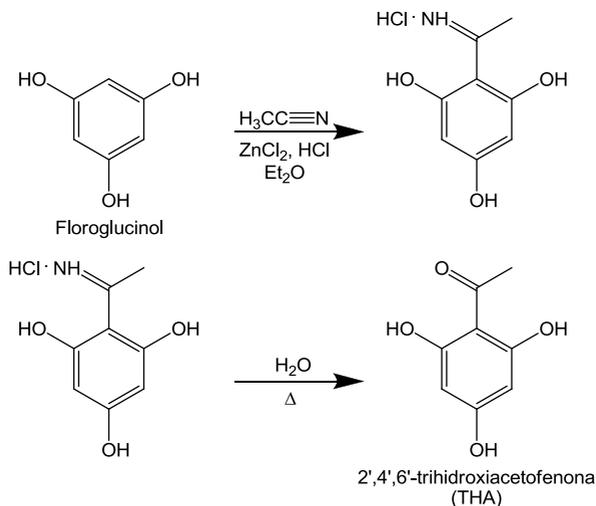


Figura 3. Representação esquemática da síntese da THA.
 Fonte: Adaptado de Gulati et al., 1942.

2. OBESIDADE

Nos últimos anos, a obesidade tornou-se uma preocupação mundial. Em 2006, a OMS estimou 400 milhões de obesos e mais de 1,6 bilhões de adultos com excesso de peso no mundo, projetando quase dobrar esses valores para 2015. Assim como nos demais países em desenvolvimento, no Brasil também se verificou que nas últimas décadas ocorreu uma rápida evolução do excesso de peso da população (IBGE, 2004). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mediante a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2002-2003, demonstrou-se que o excesso de peso atingiu cerca de 40% das pessoas com 20 anos ou mais, e que a obesidade teve uma prevalência de 8,9% nos homens e 13,1% nas mulheres, destacando-se a Região Sul, onde os dados indicaram as maiores proporções de excesso de peso (89,6%) e obesidade (25,2%) (IBGE, 2004).

Acredita-se que o aumento drástico da prevalência de sobrepeso, obesidade e doenças crônicas associadas, deve-se em grande parte ao atual estilo de vida da sociedade, cada vez mais sedentária e com hábitos alimentares inadequados (ZALESIN et al., 2008; FRIEDMAN, 2009; LENZ; RICHTER; MÜHLHAUSER, 2009).

O sobrepeso e a obesidade são definidos como o ganho anormal ou excessivo de peso, devido ao acúmulo de gordura localizado ou generalizado, principalmente no tecido adiposo, provocado por um desequilíbrio nutricional ou não, associado a distúrbios genéticos ou metabólicos (FRAYN, 2005; WHO, 2006; WEAVER, 2008). Esse acúmulo de lipídeos pode levar à alteração no funcionamento mitocondrial e desencadear algumas disfunções celulares ou até mesmo à morte celular. Isso pode ser decorrente do fenômeno conhecido como lipotoxicidade, a qual está associada ao desenvolvimento de várias patologias (MEDINA-GOMEZ; GRAY; VIDAL-PUIG, 2007; GRAIER; MALLI; KOSTNER, 2009; SØRENSEN; VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010).

De acordo com o Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira e do Conselho Federal de Medicina (2006), para o tratamento da obesidade não há nenhum tratamento farmacológico que não envolva mudanças do estilo de vida. A intervenção medicamentosa vai depender de critérios de avaliação que inclui a determinação do grau de obesidade e a avaliação do estado geral de saúde do paciente. Após essa avaliação, fica definido que o tratamento farmacológico só será realizado quando o indivíduo apresentar Índice de Massa Corpórea (IMC) $> 30 \text{ kg/m}^2$; ou quando o indivíduo apresentar IMC $> 25 \text{ kg/m}^2$ associado a comorbidades, ou falha em perder peso com o tratamento não farmacológico.

Tanto o sobrepeso como a obesidade aumentam substancialmente os fatores de risco de morbidade e mortalidade associada a várias patologias, tais como: diabetes, doenças hepáticas, hipertensão arterial, doenças coronarianas, dislipidemia, aterosclerose e síndrome metabólica, (POIRIER et al., 2006; BARSHOP et al., 2008; MARINOU et al., 2010).

3. SÍNDROME METABÓLICA

Segundo as diretrizes para identificação da síndrome metabólica e alguns relatos na literatura, a obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento dessa síndrome, caracterizando-se como uma condição essencial para diagnóstico dessa síndrome (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; SPOSITO et al., 2007, GINSBERG; MACCALLUM, 2009).

A síndrome metabólica é caracterizada por um conjunto de fatores de risco que aceleram o aparecimento de doenças cardiovasculares, doenças coronarianas e diabetes *mellitus* tipo 2. Essa síndrome também está associada às alterações do metabolismo de glicose (resistência insulínica, intolerância à glicose), aumento da pressão arterial (hipertensão), estado pró-coagulante, pró-inflamatório, aumento dos níveis séricos de lipídeos (dislipidemia) e principalmente à obesidade abdominal (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; KAHN, 2007; GINSBERG; MACCALLUM, 2009).

As alterações dos perfis lipídicos caracterizam a dislipidemia, em que ocorrem aumento dos níveis séricos de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Sendo que, concentrações elevadas de TG e baixas de HDL-C são outros dois importantes critérios para o diagnóstico da síndrome metabólica (BAMBA; RADER, 2007; DAVIDSON, 2008; KUO et al., 2009).

Assim como na obesidade, em conformidade com as “Diretrizes da Associação Médica Brasileira e do Conselho Federal de Medicina” (2006), para o tratamento da síndrome metabólica a utilização de medicamentos deve estar associada à modificação comportamental, a fim de minimizar os fatores de risco, principalmente a dislipidemia, as alterações do metabolismo de glicose e o estado pró-trombótico. Os medicamentos utilizados atualmente para o tratamento dessa síndrome são aqueles destinados aos fatores de risco individuais: ansiolíticos, hipolipemiantes, anti-hipertensivos, hipoglicemiantes, antiplaquetários e redutores de peso (DAS; VASUDEVAN, 2006; CORNIER et al., 2008; DAVIDSON, 2008).

4. DOENÇA CARDIOVASCULAR E ATEROSCLEROSE

Nas últimas décadas, em países em desenvolvimento tem se observado uma rápida elevação nos índices de mortalidade por doenças cardiovasculares associados principalmente à obesidade (GINSBERG, 2002; SPOSITO et al., 2007; ZALESIN et al., 2008). Entretanto, admite-se de maneira geral que não existe uma única causa para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, e sim fatores que aumentam as chances de sua ocorrência (KILBOURNE et al., 2007; LAVIE; MILANI; VENTURA, 2009; SAITO et al., 2010).

Os principais fatores de risco cardiovascular são: hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, idade avançada, diabetes *mellitus*, resistência à insulina, sedentarismo, a obesidade, o histórico familiar (fatores genéticos), o estresse, a inflamação, a trombose e a síndrome metabólica (KILBOURNE et al., 2007; ZALESIN et al., 2008; LENZ et al., 2009).

Entre as doenças cardiovasculares, a aterosclerose é responsável pela maior parte dos casos de morte e pelo desenvolvimento de processo patológico que leva à doença arterial coronariana, doença arterial cerebral e doença arterial periférica (CHAPMAN, 2003; MALLIKA; GOSWAMI; RAJAPPA, 2007; RADER; DAUGHERTY, 2008). A velocidade da progressão da aterosclerose e suas manifestações clínicas são influenciadas por fatores de risco, tais como: uso do tabaco, dieta pouco saudável, inatividade física, pressão arterial elevada (hipertensão), aumento da glicemia (diabetes) e principalmente pelas alterações dos níveis plasmáticos de lipídeos (dislipidemia) (SPOSITO et al., 2007; WHO, 2007).

A aterosclerose é uma doença complexa que se desenvolve lentamente por décadas. Definida como doença inflamatória crônica de origem multifatorial, inicia-se com uma agressão ao endotélio vascular, proveniente do acúmulo de lipídeos oxidados na camada íntima da artéria (SPITELLER, 2005; PACKARD; LIBBY, 2008; BADIMÓN; VILAHUR; PADRÓ, 2009). A progressão da aterosclerose começa com o espessamento progressivo da parede arterial, formando uma placa fibrosa aterosclerótica, que resulta no estreitamento da luz da artéria e diminuição do fluxo sanguíneo (Figura 4). Os danos desenvolvidos nas artérias podem desencadear complicações como calcificações e ulcerações na superfície do endotélio que, ao entrarem em contato com o sangue, podem causar a ruptura da superfície da placa. Como consequência, pode ocorrer à formação de um coágulo sanguíneo devido à hemorragia ou hematoma, terminando por causar microembolias e trombose, que podem fechar a artéria e, conseqüentemente, desencadeiam o infarto do miocárdio ou um derrame cerebral. Em casos graves, a aterosclerose enfraquece de tal maneira as paredes dos vasos, que provoca dilatação arterial ou aneurisma (SPOSITO et al., 2007; MALLIKA; GOSWAMI; RAJAPPA, 2007; RADER; DAUGHERTY, 2008).

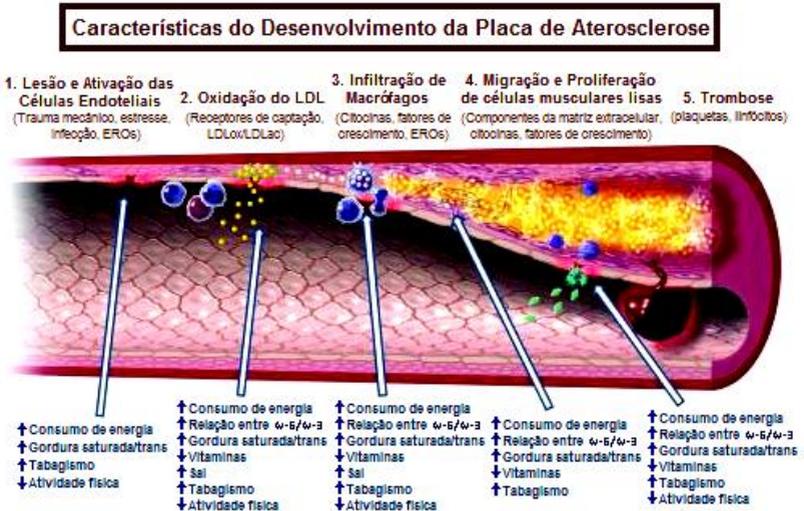


Figura 4. Características do desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Fonte: Adaptada de Lamon e Hajjar, 2008.

As lipoproteínas têm uma função relevante na aterogênese (formação da placa aterosclerótica). O depósito dessas lipoproteínas na parede arterial é o processo-chave do início da aterogênese, ocorrendo de maneira proporcional à sua concentração plasmática (SPPOSITO et al., 2007). Inicialmente, concentrações elevadas de LDL plasmático atravessam a camada endotelial, especialmente nos locais onde o endotélio encontra-se lesionado ou susceptível, aumentando sua velocidade de adesão na parede arterial, onde sofrem processos de oxidação mediante o ataque de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) transformando-se em LDL oxidada (LDL-ox). O processo de oxidação da LDL é complexo, uma vez que tanto as proteínas quanto os lipídeos sofrem alterações oxidativas e formam produtos complexos, decorrente da ação das espécies reativas que desencadeiam uma série de reações químicas denominadas de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (SPITELLER, 2005; MALLIKA; GOSWAMI; RAJAPPA, 2007; LAMON; HAJJAR, 2008).

A peroxidação lipídica contribui para a destruição dos componentes lipídicos da membrana plasmática e aumenta a liberação de ácidos graxos por meio da fragmentação e formação de espécies reativas intermediárias, denominadas de lipoperoxídeos (SPITELLER,

2005). Esses são tóxicos para as membranas plasmáticas e reagem com as duplas ligações dos ácidos graxos reorganizando a estrutura química. A LDL sofre acetilação para uma forma oxidada, que é incapaz de se ligar aos receptores específicos (SPITELLER, 2005; MALLIKA et al., 2007).

Por outro lado, é importante ressaltar que dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose encontra-se a dislipidemia, em especial a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia, em que os níveis elevados de colesterol e principalmente das LDLs são considerados potencialmente aterogênicos (RADER; DAUGHERTY, 2008; FUJIOKA; ISHIKAWA, 2009). Já a elevação de triglicérides está associada com o aumento das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) e remanescentes de seu catabolismo, e das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). A concentração das lipoproteínas de alta densidade (HDL) está inversamente associada ao desenvolvimento de aterosclerose, apresentando um efeito protetor, inibindo a oxidação da LDL e danos membranares (RADER; DAUGHERTY, 2008; BADIMÓN; VILAHUR; PADRÓ, 2009; FUJIOKA; ISHIKAWA, 2009).

5. DISLIPIDEMIA

As dislipidemias podem ser classificadas em primárias e secundárias, de acordo com sua origem. As primárias são associadas a fatores genéticos, desencadeada a partir da hipercolesterolemia familiar, da dislipidemia familiar combinada, da hipercolesterolemia poligênica, da hipertrigliceridemia familiar e da síndrome de quilomicronemia. Já as secundárias são ocasionadas por outras doenças (hipotireoidismo, diabetes *mellitus*, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, obesidade, alterações hepáticas, etc.), uso de medicamentos (anabolizantes, anticoncepcionais, anti-hipertensivos, corticosteróides, inibidores de proteases, etc.) ou como consequência dos hábitos de vida inadequados (alcoolismo, sedentarismo e tabagismo) (CHAPMAN, 2003; HANEY et al., 2007; SPOSITO et al., 2007).

A maioria das dislipidemias é caracterizada pela elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicérides (TG), e uma diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (GINSBERG, 2006; BAMBIA; RADER, 2007; KUO et al., 2009).

De acordo com os perfis lipídicos, as dislipidemias podem ser classificadas como: hipercolesterolemia isolada (elevação isolada do LDL); hipertrigliceridemia isolada (elevação isolada dos TG); hiperlipidemia mista (valores aumentados de LDL e triglicérides) e a dislipidemia por diminuição do HDL, que pode ser isolada ou associada ao aumento de TG ou de LDL (CHAPMAN, 2003; SPOSITO et al., 2007).

Tanto a hipercolesterolemia (devido a elevados níveis de LDL), como a hipertrigliceridemia (frequentemente associada com baixos níveis de HDL) e hiperlipidemias são importantes fatores de risco, especialmente quando estão associados com o risco aumentado de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (WALLDIUS; JUNGNER, 2004). Além disso, representam um importante precursor para o desenvolvimento da esteatose hepática, devido à deposição de lipídeos no fígado (LORIA; LONARDO; TARGHER, 2008; PARDINA et al., 2009), já que esse órgão desempenha um papel central na manutenção da homeostase lipídica sistêmica (LORIA; LONARDO; TARGHER, 2008).

A hipertrigliceridemia pode ser classificada em dois tipos: primária e secundária. A primária está relacionada aos fatores genéticos, já a secundária está ligada ao estilo de vida, a algumas doenças ou condições patológicas e à utilização de medicamentos. O aumento dos níveis de triglicérides poderá ser desencadeado pelo aumento da produção de lipoproteínas ricas em triglicérides (endógena-VLDL ou exógenas-QM), ou redução do catabolismo de VLDL e quilomícrons (QM) e principalmente pela diminuição da atividade da enzima lipase lipoproteica (YUAN; AL-SHALI; HEGELE, 2007; FERNS; KETI; GRIFFIN, 2008).

Segundo o National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III, 2002), clinicamente, a normalização dos níveis de TG é muito difícil, principalmente se não ocorrer uma mudança do estilo de vida e dieta do paciente. Mas, caso não ocorrer à normalização dos níveis plasmáticos das lipoproteínas com as mudanças de estilo de vida, medicamentos são recomendados, principalmente para aqueles com risco moderado a elevado de doenças cardiovasculares.

De acordo com a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, todos os indivíduos com dislipidemias devem ser orientados a realizar modificações no estilo de vida, como exercício, dieta e perda de peso, como a primeira medida de tratamento.

Entretanto, essas intervenções, às vezes, não são suficientes. Assim, o tratamento farmacológico com agentes hipolipemiantes deve ser empregado onde a escolha de qual classe terapêutica a ser utilizada dependerá do tipo de dislipidemia presente (SPOSITO et al., 2007).

5.1 LIPASE GASTROINTESTINAL

A lipase é uma enzima lipolítica, essencial no metabolismo de gorduras. Essa enzima catalisa a hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos livres, 2-monoglicerídeos e glicerol, a fim de serem mais facilmente absorvidos (lipase gástrico-pancreática) ou armazenados nos adipócitos ou usados como fonte de energia (lipase lipoproteica) (MEAD; IRVENE; RAMJI, 2002; SPOSITO et al., 2007; SCHITTMAYER; BIRNER-GRUENBERGER, 2009).

A digestão dos triglicerídeos provenientes da dieta inicia-se pela ação da lipase lingual (secretadas pelas glândulas salivares), passando pelo estômago, onde são hidrolisados pela lipase gástrica (secretado pela mucosa gástrica), continuando seu processo no duodeno, pela ação sinérgica da lipase gástrica e colipase, que é dependente da lipase pancreática e secreção de sais biliares (PAFUMI et al., 2002; MUKHERJEE, 2003; VAN GAAL et al., 2004; REIS et al., 2008). Os triglicerídeos hidrolisados em ácidos graxos livres, 2-monoglicerídeos e glicerol associam-se com fosfolipídios, sais biliares e ao colesterol, formando um aglomerado denominado de miscela, que atuam como transportadores fisiológicos dos produtos formados da hidrólise, promovendo a absorção do lúmen intestinal (MUKHERJEE, 2003; VAN GAAL et al., 2004; REIS et al., 2008). Após a absorção, no interior das células epiteliais, os ácidos graxos e monoacilgliceróis são reesterificados, para formar novamente os triglicerídeos, reunindo-se em quilomícrons, são transportados na linfa e segregados na circulação venosa sistêmica (VAN GAAL et al., 2004) (Figura 5).

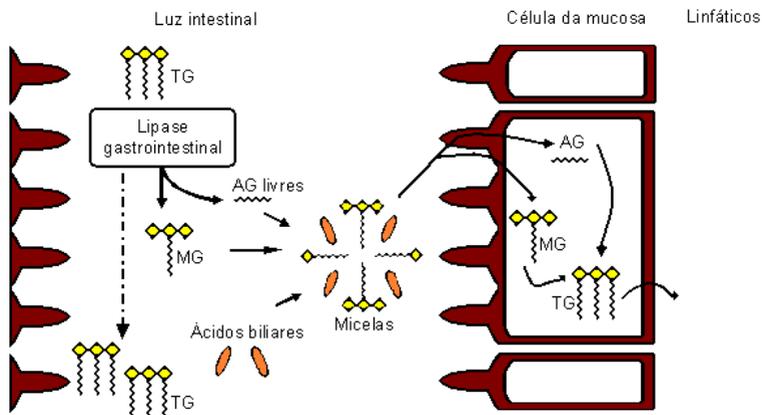


Figura 5. Mecanismo de ação da lipase gastrointestinal. Ácidos graxos livres (AG livres); 2-monoglicerídeos (MG) e Triglicerídeos (TG).

Fonte: Adaptada de Van Gaal et al, 2004.

A lipase gástrica é uma isoforma da família das lipases pré-duodenal, que apresenta uma massa molecular de 50 kDa e vários sítios potenciais de glicosilação. Hidrolisa cerca de 10-30% dos triglicerídeos ingerido, gerando principalmente ácidos graxos livres e diacilgliceróis, que promovem a ativação da enzima lipase pancreática e facilita a hidrólise da gordura, permitindo sua emulsificação. (PAFUMI et al., 2002; WHITCOMB; LOWE, 2007; VAN AKEN, 2010). A atividade típica das lipases pré-duodenal está correlacionada, principalmente, com a capacidade hidrolítica sobre as ligações éster da posição sn-3 dos triglicérides, levando à formação de um ácido graxo e diacilglicerol, podendo agir também sobre as ligações sn-1 (WHITCOMB, LOWE, 2007; VAN AKEN, 2010). Normalmente, a hidrólise dos triglicerídeos é um processo rápido, liberando aproximadamente 50-70% dos ácidos graxos no duodeno, terminando seu processo no intestino delgado (VAN AKEN, 2010).

A isoforma mais conhecida e estudada da lipase gastrointestinal é a lipase pancreática. Produzida e secretada pelo pâncreas, possui uma massa molecular de 48 kDa, sendo essencial para a digestão e absorção das gorduras provenientes da dieta no lúmen intestinal. Sua atividade enzimática está ligada à forte preferência por hidrolisar as posições sn-1 e sn-3, resultando na formação de duas moléculas de ácido graxo e uma de monoglicerídeo, a partir de uma única molécula de triglicerídeo (MUKHERJEE, 2003; WHITCOMB; LOWE, 2006; VAN AKEN,

2010). Essa enzima age em conjunto com a colipase, uma proteína pancreática, que atua como um cofator para atividade enzimática. A colipase estabiliza a lipase pancreática, proporcionando um aumento da capacidade de adesão às partículas de lipídeos, bem como impedindo a inibição da atividade enzimática, desencadeadas por substâncias inibidoras (MUKHERJEE, 2003; WHITCOMB; LOWE, 2006; REIS et al. 2009).

Alguns estudos relatam que as lipases lipoproteicas possuem efeito antiaterogênico, agindo indiretamente na redução dos níveis de triglicerídeos plasmáticos, devido sua ação catalítica, e também aumentando as concentrações de HDL. Entretanto os mecanismos envolvendo esse segundo efeito ainda não estão bem esclarecidos (STEIN; STEIN, 2003; XIE et al, 2010). Por outro lado, a manipulação da absorção de gordura por ação de compostos sobre a atividade da lipase gástrico-pancreática poderia ser um alvo molecular importante para terapia hipolipemiante e terapêutico na prevenção ou tratamento de obesidade (STEIN; STEIN, 2003), uma vez que o excesso de ingestão de gordura é considerado uma das principais causas do desenvolvimento da obesidade e outros distúrbios.

6. HEPATOTOXICIDADE

A síndrome metabólica leva a alterações no metabolismo basal por estímulo da lipólise, conseqüentemente elevando os níveis de ácidos graxos livres, reduzindo a sinalização de insulina, o que resulta em aumento da produção hepática de glicose e lipídeos, podendo causar hepatotoxicidade e desencadear doenças hepáticas crônicas, (BUGIANESI; MCCULLOUGH; MARCHESINI, 2005; LORIA; LONARDO; TARGHER, 2008; GRAIER; MALLI; KOSTNER, 2009).

O fígado é um órgão que possui um papel essencial para a manutenção do equilíbrio biológico, regulando várias funções metabólicas importantes; assim, o dano hepático está associado a alterações dessas funções (WOLF, 1999). Dentre as funções executadas por esse órgão tem-se: a biotransformação de xenobióticos; metabolismo dos lipídeos, dos carboidratos e das proteínas, além de participar na síntese de substâncias que atuam na coagulação sanguínea e imunomodulação.

Segundo McNally (1996), na maioria das vezes em que ocorre a agressão hepática, mais de um mecanismo de lesão estão envolvidos. Os

efeitos mais observados são o aumento da atividade enzimática, promovido por alterações reversíveis ou irreversíveis da permeabilidade membranar, indução enzimática microssomal ou lesão estrutural hepática resultante de isquemia hepatobiliar, necrose, neoplasia ou colestase.

Existem seis tipos de alterações hepáticas possíveis (Figura 6) de serem induzidas por medicamentos (JAESCHKE et al., 2002; LEE, 2003, BERTOLAMI, 2005), podendo ocorrer:

- Reações envolvendo as enzimas do citocromo P₄₅₀, que podem promover alteração da homeostase do cálcio intracelular, desencadeando na superfície do hepatócito a ruptura das fibrilas de actina, levando à lise celular (Figura 6 A);
- Alterações nas proteínas de transporte membranar que podem interromper o fluxo biliar. Ocorre a ruptura dos filamentos de actina nas células responsáveis pela excreção biliar. Esse processo causa colestase, uma síndrome similar à cirrose biliar, produzindo pouca agressão celular (Figura 6 B);
- Reação com resposta imunológica, em que a biotransformação pode resultar na formação de produtos inativos ligados a proteínas que podem migrar para a superfície do hepatócito e induzir a formação de anticorpos (Figura 6 C);
- Indução de respostas citolíticas diretas das células T; como consequência, respostas secundárias das citocinas podem causar inflamação e hepatotoxicidade mediada por neutrófilos (Figura 6 D);
- A morte celular programada pela agressão imunomediada, com a destruição de hepatócitos pelas vias do TNF- α e Fas. Essas vias de sinalização estão associadas aos chamados receptores de morte, responsáveis pela recepção do estímulo externo e sinalização da célula para iniciar e ativar a cascata das caspases, desencadeando o processo de apoptose (Figura 6 E);
- Toxicidade às mitocôndrias por inativação ou ligação a enzimas da cadeia respiratórias, fosforilação oxidativa ou ao DNA mitocondrial, desregulação da oxidação dos ácidos graxos e produção de energia celular, resultando no estresse oxidativo das células (Figura 6 F).

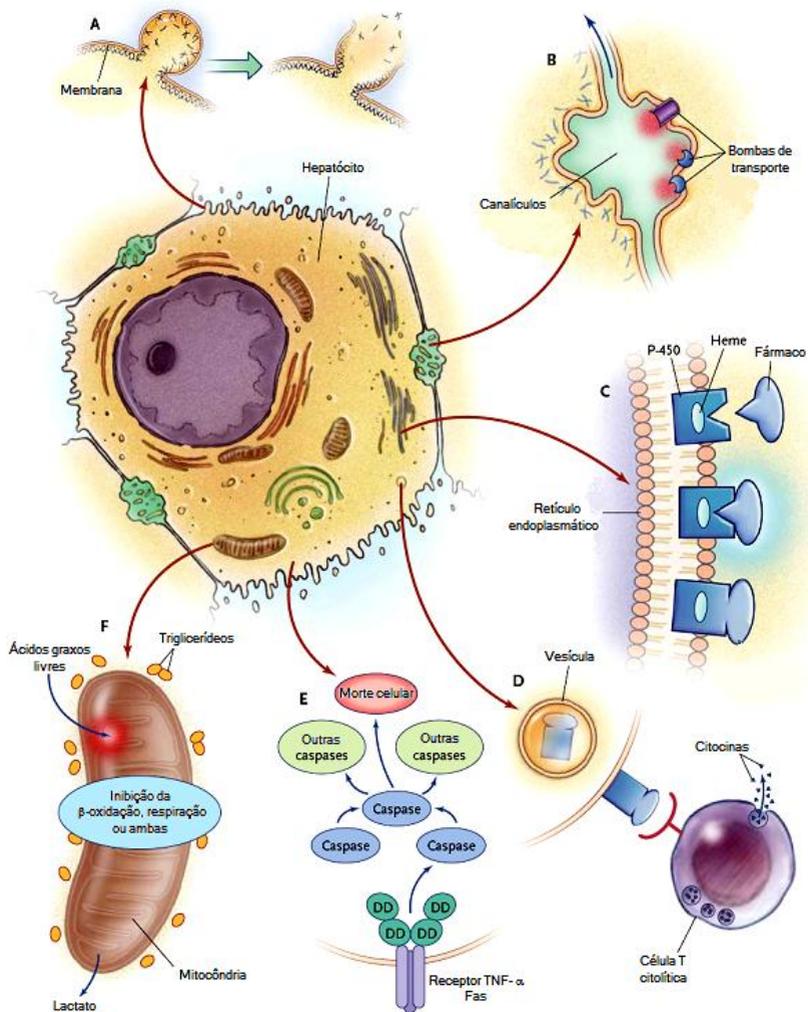


Figura 6. Seis principais mecanismos de danos ao fígado induzido por medicamentos. A - Reações envolvendo as enzimas do citocromo P₄₅₀; B - Alterações nas proteínas de transporte membranas; C - Reação com resposta imunológica; D - Indução de respostas citolíticas diretas das células T; E - morte celular programada (Apoptose) e F - Toxicidade mitocondrial.

Fonte: Adaptada de Lee, 2003.

O entendimento do mecanismo molecular e bioquímico de hepatotoxicidade é de capital importância para a aplicação de medidas preventivas e terapêuticas. Entre os mecanismos gerais mais conhecidos de ação hepatotóxica estão os efeitos sobre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondrial (MASSICOTTE et al., 2005; DELGADO et al., 2006).

Existem muitos compostos capazes de desenvolver efeitos tóxicos sobre a estrutura mitocondrial. Por exemplo, a utilização de oxigênio pelos tecidos é bloqueada pelo cianeto, sulfeto e azida, devido à sua afinidade pela citocromo oxidase (MASSICOTTE et al., 2005). A formação de adenosina trifosfato (ATP) via oxidação de carboidratos pode ser bloqueada também em outros locais. Por exemplo, a rotenona e a antimicina A interferem com enzimas específicas na cadeia transportadora de elétrons; os nitrofenóis desacoplam a fosforilação oxidativa. Assim, a depleção significativa de energia leva à perda de funções celulares. O desacoplamento aumenta o consumo de oxigênio e produção de calor (MASSICOTTE et al., 2005; DELGADO et al., 2006; MARTINS et al., 2008).

As mitocôndrias são as organelas onde ocorre o transporte de elétrons e onde é sintetizada a maior parte do ATP produzido pelas células (NEWMAYER; FERGUSON-MILLER, 2003; PAGLIARINI; DIXON, 2006; DEMAUREX; POBURKO, 2009). Já a disfunção mitocondrial resulta em uma menor produção de ATP, uma maior geração de ERO (como superóxido, peróxido de hidrogênio) o que pode ativar a apoptose (BEAL, 1998). Também, evidências crescentes de que a disfunção mitocondrial está relacionada ao envelhecimento celular, o que pode estar envolvido no desencadeamento de enfermidades como as hepatopatias (BEAL, 1998).

Finalmente, independente dos mecanismos pelos quais podem ocorrer a hepatotoxicidade, a nível celular, a organela que sofre o primeiro impacto desta toxicidade é a mitocôndria.

6.1 MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias são organelas fundamentais para a sobrevivência ou morte de uma célula, uma vez que participam dos processos de respiração celular, da β -oxidação de ácidos graxos, do ciclo do ácido cítrico, além do equilíbrio energético, mediante a síntese de ATP (Figura 7) (DIMAURO; SCHON, 2003; HUSS; KELLY, 2005; FEISSNER et al., 2009; WALLACE; FAN, 2010).

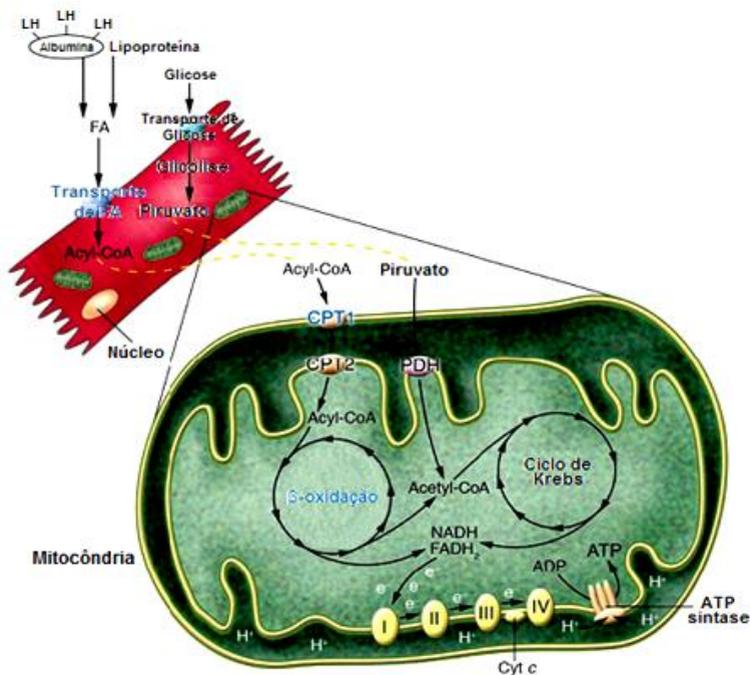


Figura 7. Vias envolvidas no metabolismo energético mitocondrial. (Ácidos graxos (LH), o ciclo do ácido cítrico, ácido tricarbóxico ou de Krebs e a cadeia respiratória).

Fonte: Adaptada de Huss e Kelly, 2005.

A mitocôndria é composta por uma dupla camada de membrana, uma externa e outra interna, divididas em dois compartimentos; o espaço entre as duas membranas é denominado de espaço intermembranar e o espaço interno, matriz. O sítio de contato entre as duas membranas é formado por um canal transmembranar chamado de Poro de Transição de Permeabilidade mitocondrial (PTP). Esse canal regula a permeabilidade mitocondrial, permitindo a passagem de pequenas moléculas. Na membrana interna localizam-se os componentes enzimáticos da cadeia respiratória, os transportadores específicos de ATP/ADP, fosfato inorgânico (P_i) e canais seletivos para cátions inorgânicos com potássio (K^+), sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) (Figura 8) (NICHOLLS, 2002; SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002; GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2008).

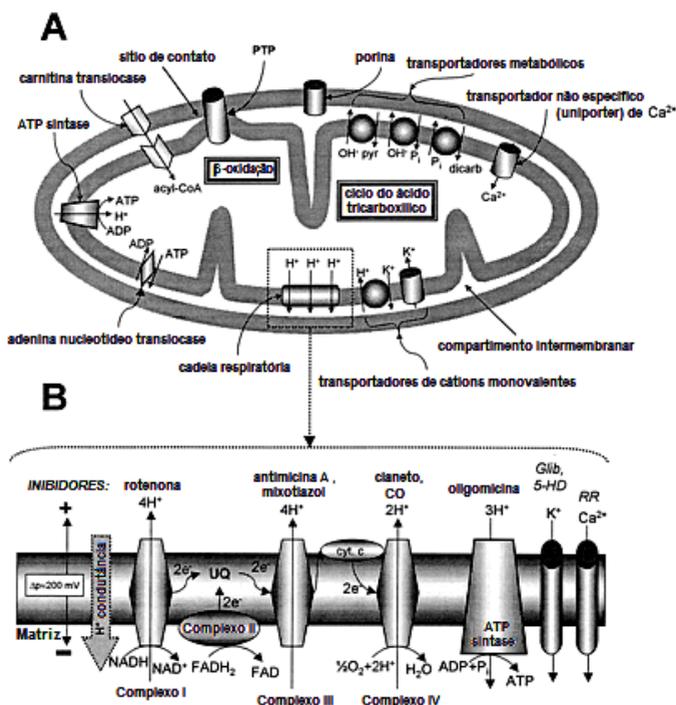


Figura 8. Esquema representativo da mitocôndria (A) e dos componentes da respiração mitocondrial (B).

Fonte: Adaptada de Szewczyk e Wojtczak, 2002.

O processo de morte celular pode ser desencadeado pela abertura dos poros PTP, ocasionando um colapso do potencial de membrana e um aumento do volume da mitocôndria, culminando frequentemente em morte celular por necrose (WALLACE, 2005; GARLID et al., 2009), ou por estímulos que aumentam a permeabilidade da membrana externa mitocondrial, promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas que ativam caspases, como citocromo c, Smac/Diablo e fator indutor de apoptose (AIF), nesse caso, causando a morte celular por apoptose (NEWMAYER; FERGUSON-MILLER, 2003; WALLACE, 2005; GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2008).

6.1.1 Poro de transição de permeabilidade mitocondrial – PTP

O PTP é um canal de voltagem dependente de alta condutância, com um diâmetro médio de 3 nm, que permite somente a passagem de moléculas menores que 1,5 kDa, propiciando um rápido equilíbrio celular. Um desequilíbrio na abertura do PTP pode induzir a despolarização membranar, que leva a um aumento do volume ou intumescimento mitocondrial, contribuindo para o colapso do potencial transmembranar e a libertação de fatores pró-apoptóticos (KIM; HE; LEMASTERS, 2003; WEISS et al., 2003; GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2008).

O poro é formado por um complexo proteico contendo um canal aniônico voltagem dependente (VDAC), localizado na membrana externa mitocondrial, um translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), localizado na membrana interna, a ciclofilina D na matriz mitocondrial e outras proteínas, que atuam em conjunto, constituindo um sítio de ligação para moléculas ativadoras ou inibidoras que regulam a abertura e fechamento do PTP (Figura 9) (WEISS et al., 2003; WALLACE, 2005; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). O VDAC torna a membrana externa permeável a metabólitos, permitindo sua entrada e a saída da organela durante o metabolismo. Já o ANT é essencial para que ocorram as trocas de ADP/ATP durante o processo de fosforilação oxidativa. (MCSTAY; CLARK; HALESTRAP, 2002; KIM; HE; LEMASTERS, 2003; WALLACE, 2005).

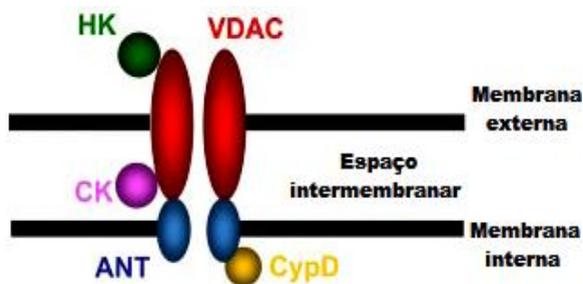


Figura 9. Estrutura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial – PTP. (VDAC - canal aniônico voltagem dependente; HK - hexoquinase; CK - creatina quinase; ANT - translocador de nucleotídeos de adenina; CypD - ciclofilina D).

Fonte: Adaptada de Kroemer, Galluzzi e Brenner, 2007.

O PTP é sensível ao potencial redox, à concentração de Ca^{2+} , voltagem, nucleotídeos de adenina, acúmulo de fosfato inorgânico (P_i) e também ao pH (WALTER et al., 2002; KIM; HE; LEMASTERS, 2003; WALLACE, 2005; SZABADKAI; DUCHEN, 2008). Em condições normais, a membrana interna da mitocôndria é impermeável, exceto para alguns íons e prótons que possuem mecanismos específicos de transporte. Essa regulação é necessária para que a mitocôndria mantenha seu pH e potencial de membrana, possibilitando assim que o complexo I a IV da cadeia respiratória localizado na membrana interna acumule um gradiente de prótons necessário para o processo de fosforilação oxidativa (GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2008; SZABADKAI; DUCHEN, 2008).

A membrana interna mitocondrial apresenta um gradiente eletroquímico, que forma o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi_m$). Caso ocorra um desequilíbrio no balanço eletroquímico, haverá um colapso do gradiente de prótons ou do $\Delta\Psi_m$, promovendo a abertura do PTP e uma redução da fosforilação oxidativa, que posteriormente causa redução do conteúdo de ATP e morte celular (WALLACE, 2005; GUSTAFSSON; GOTTLIEB, 2008; FEISSNER et al., 2009). Como consequência, ocorre um aumento da pressão osmótica da matriz mitocondrial, ocasionando num influxo de água para o interior, aumentando o volume e a expansão da membrana interna da mitocôndria, resultando na ruptura da membrana externa, liberação do citocromo c e outras proteínas de pró-apoptóticas no citosol (Figura 10) (CROW et al., 2004; WALLACE; FAN, 2010).

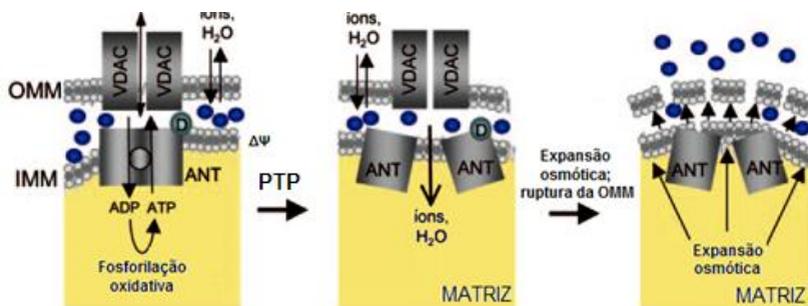


Figura 10. Esquema de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). VDAC - canal aniônico voltagem dependente; ANT - translocador de nucleotídeos de adenina; $\Delta\Psi$ – potencial elétrico de membrana.

Fonte: Adaptada de Crow et al. 2004.

6.1.2 Canal Aniônico Voltagem Dependente – VDAC

O VDAC, também conhecido como “porina”, é a proteína mais abundante da membrana externa da mitocôndria. Essa proteína possui uma função primordial no gerenciamento da energia celular, pois é o canal responsável pela troca de metabólitos e íons entre a mitocôndria e outros compartimentos celulares, facilitando também o transporte de ATP/ADP (Figura 11) (CROW et al. 2004; WALLACE, 2005). A família do VDAC apresenta três isoformas (VDAC1, 2, e 3), que possuem estruturas e funcionamentos semelhantes, mas, dependendo da isoforma, podem atuar como um canal ou como uma proteína fixa (BAINES et al., 2007; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; PASTORINO; HOEK, 2008).

Na mitocôndria, o VDAC associa-se com ANT criando um complexo macromolecular que transporta ATP/ADP, liberando o ATP produzido na matriz mitocondrial para o citosol e permitindo a entrada do ADP resultante do consumo de ATP no citosol para o interior da mitocôndria (WALLACE, 2005; KROEMER, GALLUZZI; BRENNER, 2007) (Figura 11). Essa proteína também vem sendo associada com a liberação de proteínas pro- e antiapoptóticas, uma vez que a VDAC se liga a proteína Bax, promovendo a abertura do poro e liberação do citocromo c (Figura 11) (CROW et al., 2004; WALLACE, 2005; TSUJIMOTO; NAKAGAWA; SHIMIZU, 2006).

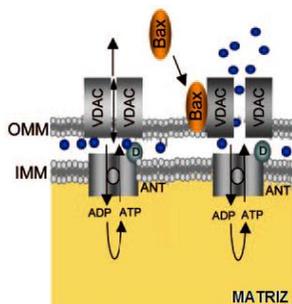


Figura 11. Esquema de ligação da proteína Bax com a VDAC (canal aniônico voltagem dependente), promovendo alteração das suas propriedades para permitir a liberação do citocromo c.

Fonte: Adaptada de Crow et al. 2004.

6.1.3 Homeostase de Cálcio (Ca^{2+})

Grande parte do Ca^{2+} celular é armazenada e liberada pelo retículo sarcoplasmático/endoplasmático (RS/RE). O posicionamento da mitocôndria próximo aos locais de liberação de Ca^{2+} pelo RS/RE pode promover a captura substancial do Ca^{2+} por essa organela, prevenindo o excesso de cálcio no citosol, bem como a depleção pela recaptura via RS/RE (HAJNÓCZKY et al., 2006; SPÁT et al., 2008; CSORDÁS; HAJNÓCZKY, 2009).

A mitocôndria possui um papel fundamental na regulação da homeostase de cálcio, principalmente devido sua habilidade em acumular o Ca^{2+} . Essa propriedade permite a captura de grandes quantidades de Ca^{2+} , podendo, assim, manter a concentração fisiológica citoplasmática e proteger a célula de grandes variações na concentração deste íon (GARCÍA et al., 2006; ANTIGNY et al., 2009; DEMAUREX; POBURKO, 2009).

A entrada e saída de Ca^{2+} na matriz mitocondrial são controladas pelo canal transportador não específico (*uniporter*), no caso de influxo, e pelo canal de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no caso de efluxo. A atividade do canal de efluxo $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ é saturada com elevadas concentrações de Ca^{2+} na matriz da mitocôndria, ao passo que a ação do canal *uniporter* não se altera com o aumento de concentração (HAJNÓCZKY et al., 2006; DEDKOVA; BLATTER, 2008; DEMAUREX; POBURKO, 2009).

A homeostase de Ca^{2+} na mitocôndria regula o metabolismo energético e sincroniza a geração de ATP para o bom funcionamento da célula. Isso porque a absorção de Ca^{2+} resulta na ativação de três desidrogenases na matriz mitocondrial, que leva a um aumento da relação NADH/NAD^+ e desencadeia um aumento de energia disponível para funções mitocondriais. Além disso, tem sido sugerido que o Ca^{2+} na matriz mitocondrial está envolvido na ativação da síntese de ATP por efeito direto sobre os canais específicos de prótons (F_0) e o complexo F_1 associado com F_0 (F_0F_1 -ATPase) (NEWMAYER; FERGUSON-MILLER, 2003; GUNTER et al., 2004; FEISSNER et al., 2009).

Entretanto, o aumento excessivo de Ca^{2+} na matriz promove um desequilíbrio mitocondrial, resultando numa sobrecarga na mitocôndria, que leva a alterações estruturais da membrana que promove a abertura do PTP, ao aumento da geração de ERO e, como consequência, a desencadear a morte celular (WALLACE, 2005; DEMAUREX; POBURKO, 2009; FEISSNER et al., 2009).

6.1.4 Mitocôndria e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O metabolismo mitocondrial é a principal fonte geradora de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas a partir da atividade de transferência de elétrons mitocondriais. Cerca de 2% do oxigênio molecular (O_2) consumido pelas mitocôndrias durante a respiração é convertido em radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) principalmente pelos complexos I e III. O oxigênio molecular é altamente eletrofílico, e a produção do $O_2^{\bullet-}$ ocorre quando O_2 captura um elétron resultante do complexo I ou do complexo III (Figura 12) (WALLACE, 2005; FEISSNER et al., 2009; WALLACE; FAN, 2010).

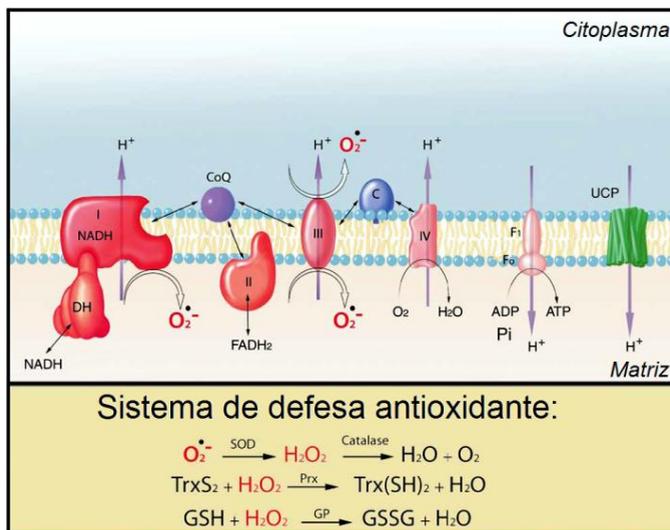


Figura 12. Esquema de formação de ERO na mitocôndria.

Fonte: Adaptada de Balaban, Nemoto e Finkel, 2005.

Como a geração de $O_2^{\bullet-}$ é um processo fisiológico, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante. Normalmente o $O_2^{\bullet-}$ é neutralizado pela atividade combinada de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase mitocondrial, que contém manganês no seu sítio ativo (MnSOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). O ânion superóxido é rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela MnSOD, que é convertida à água (H_2O) pela CAT e GPx. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante,

promovendo um dano potencial (SIES, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WALLACE, 2005), como: oxidação de proteínas, lipídeos, e DNA, culminando na disfunção da mitocôndria e consequente morte celular (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005; WALLACE, 2005; WALLACE; FAN, 2010).

Os radicais livres (RLs) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na órbita externa, geralmente formados por perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em meio biológico, a maioria das moléculas não se encontra na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados. Entretanto, em determinadas situações, os RLs melhor denominados em termos biológicos de espécies reativas, são formados e podem causar efeito fisiológico e patológico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas, que compreendem as EROs, bem como as ERNs (Tabela 1), são substâncias produzidas no organismo; podem reagir com biomoléculas, gerando outras espécies reativas ou causando um determinado dano (HALLIWELL, 2001).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.

Espécies reativas de oxigênio - ERO	
Radicais	Não radicais
Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxil ($\cdot OH$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxil (RO_2^{\cdot})	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxil (RO^{\cdot})	Ozônio (O_3)
Hidroperoxil (HO_2^{\cdot})	Oxigênio singlete (1O_2)
Espécies reativas de nitrogênio - ERN	
Radicais	Não radicais
Óxido nítrico ($\cdot NO$)	Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$)
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot})	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

Fonte: Adaptada de Halliwell, 2001.

As espécies reativas podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (HALLIWELL;

GUTTERIDGE, 1999; MEAGHER; FITZGERALD, 2000). Os RLs podem reagir diretamente com as biomoléculas, ou podem reagir com os lipídeos e carboidratos, gerando produtos que, por sua vez, podem reagir com as proteínas. Tanto a ligação peptídica quanto as cadeias laterais podem ser o alvo do ataque oxidativo de espécies reativas (LEVINE, 2002).

Com respeito ao DNA, os RLs podem causar modificação oxidativa nas bases nitrogenadas, o que resulta em mutação, ao passo que a oxidação das unidades de desoxirribose induz a liberação de bases ou quebra nas fitas de DNA (ZWART et al., 1999). Considera-se que a fragmentação do DNA sob condições de depleção de GSH ocorre por dois mecanismos: a) Radicais livres lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) podem diretamente atacar o DNA presente na cromatina do núcleo; b) a lipoperoxidação em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular, podendo tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA por outros tipos de radicais de oxigênio. O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pode inicialmente causar quebra da fita simples do DNA, e posteriormente levar à quebra da fita dupla do DNA (HIGUCHI, 2003).

No processo de oxidação de lipídeos por RLs, um átomo de hidrogênio é sequestrado do ácido graxo contendo ao menos duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), originando um RL centrado no carbono (radical lipídico, $\text{L}\cdot$) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos), seguido pela interação do $\text{L}\cdot$ com o oxigênio molecular (O_2), para formar um radical peróxido ($\text{LOO}\cdot$). Esse último pode, então, retirar um átomo de hidrogênio, tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio, como, por exemplo, um antioxidante (Figura 13). Em ambas as circunstâncias, um hidroperóxido de ácido graxo (LOOH) é formado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

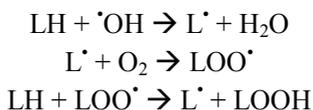


Figura 13. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da lipoperoxidação.

Fonte: Adaptada de Hermes-Lima et al., 1995.

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação dos RLs, os organismos aeróbicos foram dotados ao longo do

tempo evolutivo de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes produzidos pelo corpo são definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos como SOD, CAT e GPx, ou não enzimáticos, tais como peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido dihidrolipóico, co-enzima QH₂ (CoQH₂) e GSH. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta, como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e compostos fenólicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VALKO et al., 2007).

As enzimas SOD, CAT e GPx constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs, pois minimizam os efeitos deletérios associados à constante formação dessas espécies reativas, por serem capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis (BOVERIS; CADENAS, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VALKO et al., 2007). Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do O₂^{•-} e de H₂O₂, evitando assim a formação do [•]OH, que, embora tenha um tempo de meia vida curta, na fração de segundos, e em reduzida concentração, é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS; CADENAS, 1997).

A SOD, uma metaloenzima, é considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das EROs e está presente praticamente em todos os organismos eucarióticos, sendo responsável pela conversão do O₂^{•-} em H₂O₂ e O₂ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). As células humanas apresentam duas isoformas da SOD, uma mitocondrial, que contém manganês no seu sítio ativo (MnSOD), e outra citosólica, com cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALLIWELL, 2001; STEHBENS, 2003).

Embora o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não seja um radical livre, pode causar dano celular grave devido à geração de radical hidroxil ([•]OH) na presença de íons ferro ou cobre (reação de Fenton). O radical [•]OH é altamente agressivo, resultando na oxidação de macromoléculas celulares. Portanto, o H₂O₂ deve ser rapidamente detoxificado pela ação da CAT ou GPx, convertendo-o a H₂O e O₂ (SCHÄFER; WERNER, 2008).

A CAT, que atua especificamente sobre o H₂O₂, está presente na maioria das células aeróbicas, especialmente concentradas nos hepatócitos e eritrócitos, estando localizada principalmente em organelas subcelulares chamadas peroxissomos. Essa enzima é composta de quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um

grupo heme (FeIII-protoporfirina) ligado ao sítio ativo. Já a GPx, uma das poucas classes de enzimas humanas que requer selênio para sua ação, remove H₂O₂ e outros hidroperóxidos, oxidando a glutatona reduzida à glutatona oxidada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A GSH é o principal regulador intracelular da homeostase das reações de oxirredução, agindo via oxidação reversível do grupamento tiol ativo, constituindo-se num dos principais constituintes dos mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, por atuar diretamente, ou via GPx nas reações *scavenger* de EROs. O conteúdo intracelular de GSH e GSSG normalmente é mantido elevado, mediante a redução da GSSG à GSH pela enzima glutatona redutase (GR). Isso permite que haja uma quantidade considerável de GSH para atuar como uma substância antioxidante no organismo (DRÖGE, 2002; HADDAD, 2002). Quando ocorre a redução dos níveis intracelulares de GSH, pressupõe-se que o consumo de GSH ocorreu devido a estado de estresse oxidativo.

Finalmente, o estresse oxidativo pode resultar em três diferentes processos: a) adaptação por regulação do sistema de defesa antioxidante; b) injúria tecidual, podendo causar dano a qualquer biomolécula alvo; 3) morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL, 2001). Dessa forma, o estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas de dano celular. Segundo Lee e colaboradores (2001), o estresse oxidativo tem um papel fundamental na ativação da célula estrelada hepática, através da indução do fator de transcrição NF-κB (fator nuclear κB) e, conseqüentemente, a fibrogênese hepática (LEE et al., 2001). O reconhecimento do envolvimento das ERO em diversas enfermidades tem levado à implementação da terapia antioxidante, que pode apresentar significante resultados no tratamento de determinadas doenças, como a aterosclerose e cirrose hepática, entre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

7. HEPATOPROTETORES

As doenças hepáticas representam um problema de saúde de âmbito mundial, e são desencadeadas principalmente por vírus, doenças metabólicas ou compostos químicos (NEGI et al., 2008; GRAIER; MALLI; KOSTNER, 2009; LENS et al., 2010). O tratamento dessas doenças é realizado convencionalmente com fármacos de origem sintética, ou, secundariamente, mediante a utilização de compostos

isolados ou partes de plantas medicinais utilizadas na medicina popular (DHIMAN; CHAWLA, 2005; GIRISH; PRADHAN, 2008; NEGI et al., 2008).

Entretanto, a quantidade de medicamentos que são utilizados no tratamento de doenças hepáticas e que apresentam resultados expressivos em seres humanos ainda é pequena (MURIEL; RIVERA-ESPINOZA, 2008). Assim, as plantas medicinais utilizadas para o tratamento de distúrbios hepáticos que apresentam atividade hepatoprotetora ou curativa tornam-se alvos importantes de estudos que buscam elucidar seu mecanismo de ação, bem como caracterizar compostos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos hepatoprotetores (GIRISH; PRADHAN, 2008).

Na literatura existem estudos com plantas medicinais e compostos isolados que são utilizados no tratamento de doenças do fígado. Entre essas plantas e seus compostos tradicionalmente utilizados com essa finalidade, podemos destacar a silimarina, extraída da *Silybum marianum*, a curcumina (*Curcuma longa*), a filantina e a hipofilantina (*Phyllanthus amarus*), a glicirrizina (*Glycyrrhiza glabra*), picrolive (*Picrorhiza kurroa*), entre outras (GIRISH; PRADHAN, 2008; MURIEL; RIVERA-ESPINOZA, 2008; NEGI et al., 2008).

Atualmente diversas substâncias estão sendo utilizadas clinicamente como hepatoprotetoras. Dentre estas destacam-se estimulantes do metabolismo hepático, como complexos vitamínicos e, mais recentemente, foram incorporados ao arsenal terapêutico os antioxidantes. Os hepatoprotetores antioxidantes como silimarina, cujo uso terapêutico foi aprovado no Brasil pela ANVISA (Resolução RDC n.º 41, 2003) (BRASIL, 2003), têm apresentado eficácia terapêutica devido ao seu efetivo bloqueio da geração de radicais livres (HAKOVÁ; MISUROVÁ, 1996; PRADHAN; GIRISH, 2006).

7.1 SILIMARINA

A silimarina é uma mistura complexa de quatro isômeros flavonolignana (silibina, silidianina, isosilibina e silicristina) (Figura 14 A, B, C e D, respectivamente), extraídos da *Silybum marianum*. A silibina é o principal constituinte (70–80%) isolado dessa planta e é usada por décadas na medicina popular da região mediterrânea europeia, na terapia de hepatopatias (FLORA et al., 1998; GAZAK et al., 2007). Vários trabalhos relatam que essas flavonolignanas possuem ação anti-

inflamatória, citoprotetora e anticarcinogênica, uma vez que inibem a via de sinalização do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) induzido pela EROs e pela peroxidação lipídica e aumenta os níveis de antioxidantes no sangue e fígado (CARINI et al., 1992; MANNA et al., 1999; SKOTTOVÁ et al., 2004).

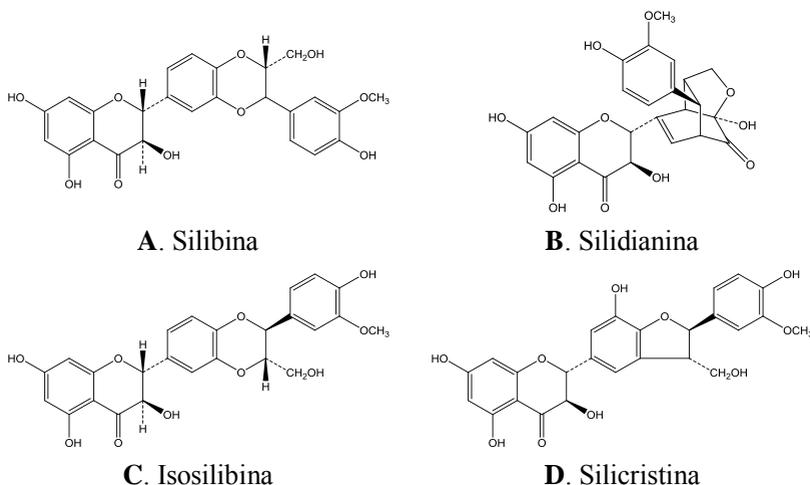


Figura 14. (A, B, C, D) - Estruturas químicas dos isômeros flavonolignana da silimarina.

Fonte: Adaptada de Pradhan e Girish, 2006.

Segundo Wellington e Jarvis (2001), a silimarina é um potente antioxidante que protege vários tipos celulares do organismo, tais como hepatócitos e astrócitos de compostos geradores de radicais livres. Assim, o efeito da silimarina contra o dano hepático causado pelo CCl_4 já está bem estabelecido, razão pela qual esta é usada como fármaco de referência em vários estudos de hepatotoxicidade (ACHLIYA; WADODKAR; DORLE, 2004; SHAILAJAN et al., 2005).

8. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vivo* o potencial hipolipemiante misto e hepatoprotetor da 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THA) isolado da *Myrcia multiflora* e seus possíveis mecanismos de ação.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial hipolipemiante misto *in vivo* da THA, utilizando o modelo de hiperlipemia aguda induzida pela administração de Triton WR-1339 e o modelo de hiperlipemia crônica induzida pela dieta hipercalórica, verificando seu efeito sobre a concentração sérica de colesterol total e triglicerídeos;
- Avaliar a influência da THA na diminuição do sobrepeso e obesidade dos animais com a dieta hipercalórica;
- Avaliar o possível efeito hipotrigliceridêmico da THA, mediante ensaios de inibição da absorção intestinal de triglicerídeos e o possível mecanismo de ação da THA como agente hipotrigliceridêmico, mediante a inibição da atividade da lipase pancreática;
- Avaliar *in vivo* o possível efeito hepatoprotetor da THA, em modelo de hepatotoxicidade induzida pelo agente estressor CCl₄, verificando seu efeito sobre a concentração sérica dos biomarcadores de danos hepáticos (AST, ALT e LDH) e o aspecto histológico da lesão hepática;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da THA, utilizando o ensaio de dano oxidativo à membrana lipídica de fígado de camundongos induzido por ascorbato e cloreto ferroso (FeCl₂.4H₂O) e a capacidade de captação dos radicais DPPH, O₂^{•-} e [•]OH;
- Avaliar um dos prováveis mecanismos de hepatoproteção da THA, associado a atividade antioxidante *in vivo*, mediante o modelo de hepatotoxicidade induzida pelo agente estressor CCl₄, que gera o estresse oxidativo, verificando seu efeito sobre os biomarcadores de dano oxidativo (lipoperoxidação de membranas, carbonilação de proteínas e fragmentação do DNA), as defesas antioxidantes (concentração de GSH, atividade da CAT, SOD e GST) e verificar os efeitos da THA sobre propriedades da membrana mitocondrial utilizando a técnica de inchamento mitocondrial.

Capítulo 2

The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isolated from *Myrcia multiflora* has a anti-obesity and mixte hypolipidemic effect by decrease of lipid intestinal absorption

Artigo Submetido Para Publicação
Periódico – Planta Medica

Nota: A formatação deste artigo não corresponde exatamente à forma submetida ao periódico uma vez que as figuras foram inseridas no meio do texto a fim de facilitar a leitura e compreensão.

The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isolated from *Myrcia multiflora* has a anti-obesity and mixte hypolipidemic effect by decrease of lipid intestinal absorption

Eduardo Antonio Ferreira¹, Eliana Fortes Gris¹, Jussara Matos Rebello¹, João Francisco Gomes Correia¹, Luis Flávio Souza de Oliveira¹, Danilo Wilhelm Filho², Rozangela Curi Pedrosa^{1,*}.

Affiliation

¹Departament of Biochemistry, CCB, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, and ²Department of Ecology and Zoology, CCB, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Correspondence

Rozangela Curi Pedrosa, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis - SC - Brazil, 88040-900, e-mail: roza@ccb.ufsc.br - Tel. (00-55)483721-5048 FAX: (00-55)483721-9672.

Abbreviations

2,3-dimercaptopropan-1-ol (BAL); 2,3-dimercaptopropan-1-ol tributyratoate (BALB); 2',4',6'-trihydroxyacetophenone, phloracetophenone (THA); 2-nitrobenzoate (TNB); 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB); High-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C); Total cholesterol (TC); Triglycerides (TG).

Abstract

This study evaluated the hypolipidemic and anti-obesity effects of phloroacetophenone (2',4',6'-trihydroxyacetophenone, THA) isolated from *Myrcia multiflora* and their relationship with triglyceride (TG) intestinal absorption and pancreatic lipase activity inhibition. The hypolipidemic effect of THA were evaluated by acute (Triton WR-1339 treatment) and chronic assay (high-fat diet treatment) and the anti-obesity effect was evaluated by chronic assay (high-fat diet treatment). In addition, inhibition of enzymatic activity of pancreatic lipase was measured in intestinal tissue of mice treated with high olive oil concentration. In the acute assay THA caused greater total cholesterol (37%) and triglyceride (46%) serum levels reduction than lovastatin (32 and 1%), HMG-CoA reductase inhibitor or orlistat (26 and 34%), a gastrointestinal lipase inhibitor. Also, in the chronic assay with a high fat diet THA reduced cholesterol and triglyceride levels (32 and 61%, respectively) whereas lovastatin showed a decrease of 35 and 49%, respectively. In addition, THA caused a reduction in weight gain very similar to orlistat (40 and 38%, respectively) when the animals were treated with high fat diet. Also, THA showed a stronger and continuous pancreatic lipase inhibitory activity when compared with orlistat, because it caused inhibition of this enzyme during 6 hours associated to a significant reduction of triglycerides serum levels. The anti-obesity effects and hypolipidemic *in vivo* of THA may be partly mediated through delaying the intestinal absorption of dietary fat by inhibiting pancreatic lipase activity.

Key words

Anti-obesity effect; mixed hypolipidemic activity; pancreatic lipase inhibitor; 2',4',6'-trihydroxyacetophenone

INTRODUCTION

Obesity is a serious public health problem both in developed and developing countries [1], and has increasing dramatically in recent years. Characterized by excessive accumulation of body fat, resulting from an imbalance between energy intake and expenditure [2,3], causing damage and compromising the health of individuals, such as locomotion, breathing difficulties and metabolic alterations [3-5].

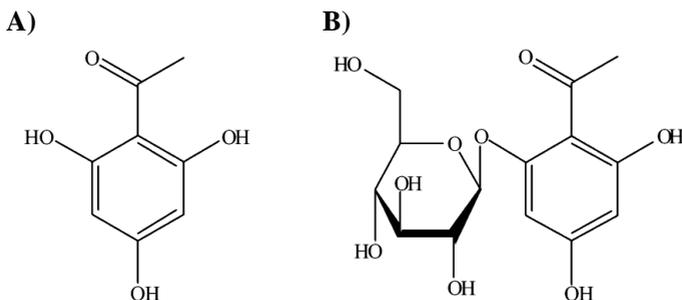
Overweight and obesity are associated with multiple coexisting conditions, including hypertension, glucose intolerance, obstructive sleep apnea, and dyslipidemia [6]. Moreover, obesity is an important risk factor, associated with the increased of death from cardiovascular disease, diabetes, chronic kidney disease and some types of cancers [2,7,8].

Obesity is closely associated with modern lifestyle, with an abundant nutrient supply and reduced physical activity, has resulted in dramatic increases in obesity and associated diseases [9,10]. Thus, a high-fat intake diet can contribute to the development of obesity and hyperlipidemia, increasing body fat mass and / or visceral and changing levels of lipids in plasma and tissues [11]. These changes are associated with elevated levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and in decreased high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) [12,13]. And this increased plasma level of lipids has been associated with increased atherosclerosis, which is closely associated as a major cause of death in the Western society [14].

Accordingly, efforts towards the development of new and more effective hypolipemic drugs have led to the discovery of some natural and synthetic therapeutics agents. The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THA) is the aglycone part of a glycoside from *Myrcia multiflora* (family Myrtaceae) is a plant popularly known as 'insulin plant' and has been used in the traditional medicine in South America for diabetes. The literature cites several sources for obtaining phloracetophenone derivatives, but the free form of acylphloroglucinol is rare [15-17]. Isolated flavanone and flavonol glucosides have been reported to possess aldose reductase inhibition, α -glucosidase inhibition and potential for hypoglycemic activity in alloxan-induced diabetic animals [18,19]. However, scientific research on the efficacies and mechanisms of this acetophenone as anti-obesity and mixed hypolipidemic agents is still very limited.

Hence, the aim of this work was to investigate potential effect in the management of obesity and correlated conditions, such as hyperlipidemia, with 2,4,6-trihydroxyacetophenone (Fig. 1A) in rodents fed with a high-fat diet and treated with Triton WR-1339, as well to investigate the possible relation between lowering plasmatic lipid and changes in mechanism absorption.

Fig. 1 Chemical structure of 2',4',6'-trihydroxyacetophenone – (THA) - (phloracetophenone) (A) and 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone (B).



Materials and Methods

Chemicals

The synthetic standard 2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate was purchased from Fluka (purity $\geq 98\%$); orlistat (purity $\geq 98\%$) and lovastatin (purity $\geq 98\%$) from Sigma-Aldrich. Diagnostic kits for total cholesterol, triglyceride and lipase determinations were purchased from Labtest-Diagnostic kit (Lagoa Santa, MG, Brazil). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Plant material and isolation of phloracetophenone glucoside

Myrcia multiflora (Lam.) DC. was purchased from Albano Ferreira Martins, Ltd., São Paulo. The plant was identified by Dr. Luiza Sumiko Kinoshita and the voucher specimen (133.966) was deposited at the Herbarium of the Institute of Botany, State University of Campinas, Brazil). The dried leaves of *M. multiflora* were subjected to the methods

of extraction and isolation of phloracetophenone glucoside according to Suksamraran and collaborators [20]. The compound isolated by preparative TLC, analyzed by $^1\text{H-NMR}$ and IR, showed that the data were consistent with those reported for the compound mentioned, the 4,6-dihydroxy-2-*O*-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone (Fig. 1B). It is possible, by hydrolysis of this derivative, to obtain the compound 2',4',6'-trihydroxyacetophenone.

In order to obtain phloracetophenone, the compound 4,6-dihydroxy-2-*O*-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone (200 mg) were treated with 3 N HCl in methanol (200 ml) at reflux temperature of 100°C for 30 min [20-22]. After neutralization by careful addition of 20 % aqueous NaHCO_3 and elimination of methanol under vacuum and controlled temperature, the phloracetophenone was extracted with CH_2Cl_2 , followed by evaporation of solvent and recrystallization with boiling water, affording crystals of colorless needles, and later was submitted to $^1\text{H NMR}$, IR and TLC analysis with synthetic standard of 2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate. Analytical TLC was carried out on silica gel 60 F₂₅₄, 0.2 mm plates (Merck, Darmstadt). For separation and identification of compounds, the following mobile phases (a,b) and a spray reagent (c) were used. (a) AcOet- H_2CO_2 -HOAc- H_2O (500:5:5:2); (b) CHCl_3 -(CH_3)₂CO- H_2CO_2 (150:33:17) and (c) vanillin/ H_2SO_4 (10% vanillin in EtOH 99,5%-conc. H_2SO_4 , 2:1), followed by heating for development of colors.

Animals

Male Wistar-EPM-M1 rats were weighted 180 ± 10 g (chronic hypolipidemic activity) and 120 ± 6 g (acute hypolipidemic activity), and male Swiss mice 25 ± 3 g (inhibition of intestinal lipids absorption) were housed under controlled conditions (12 hour light-dark cycle, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and 60% air humidity) and had free access to standard laboratory chow and water. All animal were allowed to acclimatize for at least 7 days prior to the first treatment. Animals were fasted for 12 hours before experiments and allowed water *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with legal requirements appropriate to the species (Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication #85.23, revised in 1985) and with the local Committee (149/CEUA and 23080.009607/2002-88/UFSC).

Acute Hypolipidemic assay

Rats were fasted throughout this experiment period, although water was provided *ad libitum*. The animals were divided into five groups by body weight (6 animals each group): non-treated group (normal control); Triton WR-1339-treated group (negative control); Triton WR-1339-treated plus THA (6.0 mg/kg b.w.); Triton WR-1339-treated group plus lovastatin (inhibitor of HMG-CoA reductase) (6.0 mg/kg b.w.) and orlistat (specific inhibitor of pancreatic lipase) (6.0 mg/Kg, b.w). THA was preliminarily evaluated at 3, 6 and 12 mg/kg body weight, and the dose of 6 mg/kg was selected because it was the lowest dose that caused any toxicity and had a good solubility. Immediately after the oral administration of compounds to rats by gavage, Triton WR-1339 was administered intraperitoneally (i.p.) (400 mg/kg, body weight, b.w.) except in the non-treated group. Eight hours after the administration of Triton WR-1339, blood was collected and used for the determination of lipid profile.

Gain weight and Chronic Hypolipidemic assay

The high fat diet composed of normal diet (standard commercial diet) supplemented with cholesterol 2%, sodium chlorate 2%, vitamin mixture 2%, oligoelements 0.2%, salt mixture 5.8%, fat 20%, cellulose 4%, sucrose 44%, casein 5%, and protein 15% [23] was used to induce weight gain and hyperlipidemia. Male Wistar-EPM-M1 rats were divided into six groups (6 animals each group): normal diet; normal diet plus THA; normal diet plus orlistat; normal diet plus lovastatin; high fat-diet control group; high-fat diet plus THA; high-fat diet plus orlistat; high-fat diet plus lovastatin. THA, lovastatin and orlistat (6.0 mg/Kg, b.w.) were administered by oral gavage for 30 days. The weight of animal was measured in time zero and after 30 days. After 30 days of treatment blood samples were collected for lipid determinations. Total serum cholesterol (TC), triglyceride (TG) levels were measured by enzymatic methods [24,25].

Inhibition of pancreatic lipids absorption assay

Male Swiss mice were divided in groups of 6 animals: normal control; control negative treated with olive oil (0.5 ml by gavage); pre-treated with THA (6.0 mg/kg b.w. by gavage) and 30 min after with olive oil (0.5 ml by gavage); pre-treated with orlistat and 30 min after

with olive oil (0.5 ml by gavage). Then, at 2, 4 and 6 hours after administration of olive oil blood was collected to measure triglyceride levels and then mice were killed and the entire gut was removed, homogenized in phosphate buffer (pH 7.8) and after centrifugation the supernatants were utilized for determination of pancreatic lipase activity.

Measurement of pancreatic lipase activity

Pancreatic lipase activity was determined by enzymatic method [26]. The serum lipase hydrolyzes 2,3-dimercaptopropan-1-ol tributyrato (BALB) to give 2, 3-dimercaptopropan-1-ol (BAL) and butyric acid. The liberated BAL reacts with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to release 2-nitrobenzoate (TNB) anions which color intensity at 412 nm is proportional to the pancreatic lipase activity.

Statistical analysis

All the biochemical parameters mentioned above were measured in duplicate. Data are presented as means \pm SD and were analyzed by ANOVA complemented with the Tukey-Kramer multiple comparison test. P-values less than 1% ($p < 0.01$) were considered to be statistically significant.

Results

Acute hypolipidemic effect of THA

The lipid profiles of animals treated with THA or lovastatin showed a statistical significant reduction in total serum cholesterol levels and triglycerides in relation to the group treated only with Triton WR-1339 (Table 1). The THA-treated group showed a more important hypolipidemic effect in the acute hiperlipidemic experimental model compared to animals treated with the inhibitor of cholesterol syntheses (lovastatin) or lipid absorption (orlistat), reducing in 37% and 46% the serum levels of total cholesterol and triglycerides, respectively.

Table 1 Effect of THA, orlistat and lovastatin (6.0 mg/kg, b.w.) on serum total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) levels after 8 hours of treatment with Triton WR1339 and control group in acute hypolipidemic assays.

Compounds	TC (mg/dL)	% TC reduction	TG (mg/dL)	% TG reduction
Normal control	108.59 ± 7.4*	–	96.5 ± 12.4*	–
Triton WR-1339	205.4 ± 10.3	–	641.6 ± 23.9	–
Triton WR-1339 + THA	129.8 ± 13.5*	37	345.1 ± 21.9*	46
Triton WR-1339 + lovastatin	140.9 ± 3.4*	32	632.5 ± 25.3	1
Triton WR-1339 + orlistat	152.3 ± 11.5*	26	427.1 ± 18.9*	34

Note: All values were expressed in term of means ± SD, n=6. (*) indicate statistical significance $p < 0.01$ in relation to Triton WR-1339 control group.

Gain weight and Chronic Hypolipidemic effect of THA

After 30 days animals treated with the high-fat diet, serum levels of total cholesterol, triglycerides and body gain weight (Table 2) increased significantly ($P < 0.01$) when compared with animals treated with the normal diet. The treatment with THA was capable to cause a decrease of cholesterol and specially triglyceride levels and this reduction was very similar with that obtained with orlistat treatment. In addition, THA and orlistat treatments significantly ($p < 0.01$) prevented the body gain weight. Lovastatin caused a more discrete triglyceride reduction and a more pronounced gain weight than THA and orlistat.

Table 2 Lowering effect of THA, orlistat and lovastatin (6.0 mg/Kg, b.w.) on serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) levels and body weight gain after 30 days of treatment with standard commercial diet and induced hyperlipemic-diet in Wistar-EPM-M1 rats.

	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)	Weight gain (g)
Normal diet	118.20 ± 2.69	67.45 ± 2.67	51 ± 5
Normal diet + THA	108.41 ± 2.33	66.06 ± 0.89	52 ± 4
Normal diet + orlistat	105.42 ± 3.91	64.18 ± 2.88	52 ± 3
Normal diet + lovastatin	98.11 ± 2.43*	69.74 ± 1.57	53 ± 7
High-fat diet	167.87 ± 3.63	188.70 ± 4.32	104 ± 6
High-fat diet + THA	114.51 ± 2.81 [†]	74.42 ± 0.59 [†]	62 ± 4 [†]
High-fat diet + orlistat	109.43 ± 2.36 [†]	96.59 ± 3.67 [†]	64 ± 2 [†]
High-fat diet + lovastatin	100.23 ± 3.46 [†]	169.11 ± 5.06	91 ± 2

Note: All values were expressed in term of means ± SD, n=6. (*) Indicate statistical significance ($p < 0.01$) when compared to normal diet group ([†]) indicate statistical significance ($p < 0.01$) when compared to high-fat diet group.

Evaluation of the activity of pancreatic lipase

Animals treated with olive oil significantly (120%) increased serum triglycerides levels (Fig. 2) after 2 hours of treatment, whereas the pre-treatment with THA or orlistat prevented such increase. Curiously, after 4 and 6 hours, the levels of triglycerides in animals treated with THA remained slow but steady, whilst orlistat decreased such levels. Fig. 3 shows that THA showed an inhibitory effect on the pancreatic lipase activity after 4 and 6 hours of treatment, and this effect was more pronounced after 6 hours. It is important to note that orlistat, a specific inhibitor of this enzyme, presented a profile of enzymatic inhibition different of the THA, which was kept enhanced throughout the experimental time.

Fig. 2 Triglyceride levels (mg/dL) in treated mice only with olive oil (0.5 ml by gavage); pre-treated with THA (6.0 mg/kg b.w. by gavage) and 30 min after with olive oil; pre-treated with orlistat (6.0 mg/Kg, b.w.) – specific inhibitor of pancreatic lipase and 30 min after with olive oil and determined at 2, 4 and 6 hours after handling. All of the values were express as means \pm SD, n = 6. (*) Indicate statistical significance ($p < 0.01$) when compared to olive oil group.

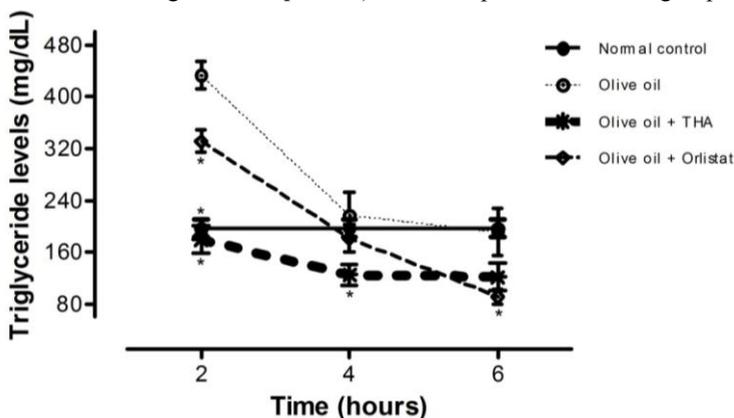
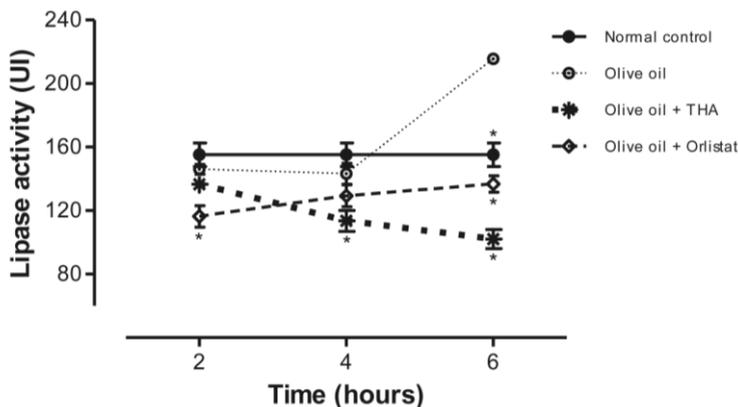


Fig. 3 Activity of the lipase pancreatic (UI) in mice treated only with olive oil (0.5 ml by gavage); pre-treated with THA (6.0 mg/kg b.w. by gavage) and 30 min after with olive oil; pre-treated with orlistat (6.0 mg/Kg, b.w.) – specific inhibitor of pancreatic lipase and 30 min after with olive oil determined at 2, 4 and 6 hours after handling. All the values were expressed as means \pm SD, n = 6. (*) Indicate statistical significance ($p < 0.01$) when compared to olive oil-treated group.



Discussion

Phloracetophenone (2',4',6'-trihydroxiacetophenone, THA) is the aglycone part of glycoside extracted from *M. multiflora* and *Curcuma comosa* Roxb, which can be produced by organic syntheses, has a hypocholesterolemic activity [18,20,27,28]. It is possible that this cholesterol lowering effect exerted by THA is associated to increasing hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity, which increases the hepatic conversion of cholesterol to a bile acid for disposal via biliary secretion [29-31].

In the present study the anti-obesity activity and mixed hypolipidemic effect of THA *in vivo* model isolated from *Myrcia multiflora* were evaluated. The high fat intake may contribute to the development of obesity and hyperlipidemia in humans and rodents by altering levels of cholesterol and triglycerides in plasma and tissues [11]. According to Ito and collaborators [32] the excessive accumulation of body fat would be related to abnormal levels of lipids, especially triglyceride levels elevation [33].

Triton WR-1339 is a detergent used to induce hyperlipidemia to detect and to select compounds with hypocholesterolemic activity. The i.p. administration of Triton WR-1339 in adult rats promoted hyperlipidemia through the cholesterol levels, and also triglycerides and phospholipids as well [34-36]. THA presented a significant (36%) reduction in total cholesterol levels, a percentage near that presented by lovastatin (32%) (Table 1). Also, trygliceride levels in animals pre-treated with THA showed a more pronounced reduction than orlistat, suggesting a mixed hypolipidemic effect of this acetophenone.

From these data we hypothesize that, in addition to the hepatic induction of cholesterol 7 α -hydroxylase, THA could have an effect on the availability of peripheral cholesterol. This change in availability of peripheral cholesterol might also be associated with a decreased absorption of lipids, although THA appears to have an effect on the absorption of nutrients, because it caused a substantial reduction in serum concentrations of two main lipid nutrients (cholesterol and triglycerides) in high mammals.

In the chronic assay regarding the inhibition of hyperlipidemia under the high-fat diet, the sera concentrations of triglycerides were significantly lower in animals treated with THA after 30 days of treatment, when compared to the untreated group (Table 2). In a similar way animals treated with THA and a standard diet also presented a

significant reduction ($p < 0.01$) in levels of blood triglycerides after 30 days of treatment. In addition, the gain weight was lower in animals treated with a high-fat diet together with THA or orlistat (reducing 40% and 38%, respectively) compared to the untreated group.

Among the variety of indications used for the treatment of hyperlipidemia and obesity, dietary restriction is the most appropriate [37,38]. However, if the diet prescription indicated in adequate reduction of cholesterol concentration and/or triglyceride levels does not work, then there is no need for the administration of drugs with hypolipidemic activity and/or anti-obesity associated with food restriction. A time that therapy with hypolipidemic or anti-obesity agents, reduced the rate of atherosclerosis progression and, in some cases, induce the regression of existing lesions [37-39]. In addition, there is plenty evidence that hypertriglyceridemia is a risk factor for coronary heart disease, associated with conditions where elevated levels of triglycerides accelerate obesity and atherosclerosis [40]. Thus inhibitors of triglyceride absorption might be a promising strategy for the prevention of atherosclerosis and obesity [37,38].

It is important to stress out that in the present study THA caused a strong reduction in the absorption of triglycerides (Fig. 2) within 2 hours of treatment with olive oil, which was partially prevented by orlistat, thereby suggesting that THA has a direct and immediate effect on lipid absorption. It is also important to note that THA, at least initially, has a better inhibitory effect on intestinal absorption of lipids than orlistat, which was used as a positive control.

Orlistat ((S)-1-[[[(S,2S,3S)-3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl]methyl]dodecyl-(S)-2-formamido-4-methylvalerate) is a gastrointestinal lipase inhibitor, however, when via oral administration, its effect is restricted to the gastrointestinal interval [41]. Orlistat is being used for the treatment of obesity because it causes gastrointestinal inhibition of lipase, leading to reduction of local fat absorption [42]. In patients with hyperlipidemia, orlistat reduces the concentration of triglycerides in the plasma [43]. Consequently, orlistat is able to reduce the progression of atherosclerotic injury, as a consequence of triglyceride reduction, through the inhibition of fat absorption [37,44]. Therefore, this drug could be an appropriate agent for the moderation of obesity relatively morbid, especially when used together with appropriate diets, physical modification of alimentary habits and exercises [45].

In higher mammals lipase is an enzyme that degrades triglycerides, liberating fatty acids and glycerol, and presents a great clinical relevance, mainly in relation to atherosclerosis hyperlipidemia and obesity. Some flavonoid compounds have been investigated regarding the property of reduction of the blood concentration of lipids [46]

It is also important to note that THA, although caused a strong reduce plasma levels of triglycerides, apparently did not have an effect on lipase 2 hours after administration of olive oil, in contrast to orlistat, suggesting that THA might have another effect on intestinal absorption, which not might be unrelated to lipase. However, after 6 hours of the administration of olive oil, THA showed a strong inhibitory effect on lipase, which was bigger than that of orlistat. Curiously, in our experimental model after 6 hours lipase was more active in the control group treated with olive oil, suggesting that THA might be a powerful inhibitor of lipase. Therefore, THA possibly presents at least two temporarily distinct mechanisms of action on lipid absorption, an unspecific (up to 2 hours of administration) and another one on lipase activity (up to 6 hours).

In conclusion, THA presented an anti-obesity and hypolipidemic effects, being capable to prevent the increase in body weight in animals treated with a high-fat diet, to reduce free cholesterol and triglyceride levels induced by a high caloric diet, therefore revealing as a powerful agent that inhibits the absorption of triglycerides in animals treated with olive oil, which did not present an immediate inhibiting effect of the intestinal activity of lipase, and finally being more effective than orlistat, an specific inhibitor of this esterase enzyme. The anti-obesity and hypolipidemic effects *in vivo* of THA might be partly mediated through the delay of the intestinal absorption of dietary fat by inhibiting pancreatic lipase activity. Thus, THA treatment may help preventing complications of obesity or hyperlipidemia, as a future adjunct in the arsenal of anti-obesity and/or mixed hypolipidemic drugs.

Acknowledgements

R.C. Pedrosa (Proc. 300718/2003-9) and D. Wilhelm Filho (Proc. 309438/2008-0) are recipients of research grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil.

References

- 1 *Friedman JM*. Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 2009;459:340-342.
- 2 *World Health Organization (WHO)* (2006). Fact sheet: obesity and overweight. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>. Accessed on 09 May 2009.
- 3 *Weaver JU*. Classical endocrine diseases causing obesity. *Front Horm Res* 2008;36:212-228.
- 4 *Ofir D, Laveneziana P, Webb KA, O'Donnell DE*. Ventilatory and perceptual responses to cycle exercise in obese women. *J Appl Physiol* 2007;102:2217-2226.
- 5 *Sørensen TI, Virtue S, Vidal-Puig A*. Obesity as a clinical and public health problem: Is there a need for a new definition based on lipotoxicity effects? *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:400-404.
- 6 *Eckel RH*. Clinical practice. Nonsurgical management of obesity in adults. *N Engl J Med* 2008;358:1941-1950.
- 7 *Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH*. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 2007;298:2028-2037.
- 8 *Marinou K, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadi E, Stefanadis C*. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol* 2010;138:3-8.
- 9 *Friedman JM*. Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 2009;21:340-342.
- 10 *Lenz M, Richter T, Mühlhauser I*. The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:641-648.
- 11 *Woo MN, Bok SH, Lee MK, Kim HJ, Jeon SM, Do GM, Shin SK, Ha TY, Choi MS*. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (S&S PWH) in rats fed high-fat diets. *J Med Food* 2008;11:169-178.
- 12 *Bamba V, Rader DJ*. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *J Gastro* 2007;132:2181-2190.
- 13 *Kuo DH, Yeh CH, Shieh PC, Cheng KC, Chen FA, Cheng JT*. Effect of shanzha, a Chinese herbal product, on obesity and dyslipidemia in hamsters receiving high-fat diet. *J Ethnopharmacol* 2009;124:544-550.

- 14 *Zalesin KC, Franklin BA, Miller WM, Peterson ED, McCullough PA.* Impact of obesity on cardiovascular disease. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2008;37:663-684.
- 15 *Lee KR, Hong SW, Kwak JH, Pyo S, Jee OP.* Phenolic constituents from the aerial parts of *Artemisia stolonifera*. *Arch Pharm Res* 1996;19:231-234.
- 16 *Chosson E, Chaboud A, Chulia AJ, Raynaud J.* A phloroacetophenone glucoside from *Rhododendron ferrugineum*. *Phytochemistry* 1998;47:87-88.
- 17 *Dai Y, He XJ, Zhou GX, Kurihara H, Ye WC, Yao XS.* Acylphloroglucinol glycosides from the fruits of *Pyracantha fortuneana*. *J Asian Nat Prod Res* 2008;10:111-117.
- 18 *Yoshikawa M, Shimada H, Nishida N, Li Y, Toguchida I, Yamahara J, Matsuda H.* Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. *Chem Pharm Bull* 1998;46:113-119.
- 19 *Matsuda H, Nishida N, Yoshikawa M.* Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV, and V. *Chem Pharm Bull* 2002;50:429-431.
- 20 *Suksamrarn A, Eiamong S, Piyachaturawat P, Byrne LT.* A phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 1997;45:103-105.
- 21 *Brandão MGL, Nery CGC, Mamão MAS, Krettli AU.* Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* 1998;48:397-399.
- 22 *Zhao LM, Jin HS, Sun LP, Piao HR, Quan ZS.* Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of trihydroxychalcone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15:5027-5029.
- 23 *Vásquez-Freire MJ, Lamela M, Calleja JM.* Hypolipidaemic activity of a polysaccharide extract from *Fucus vesiculosus* L. *Phytother Res* 1996;10:647-650.
- 24 *Allain CC, Poon LC, Chan CSG, Richmond W, Fu PC.* Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
- 25 *McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B.* A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1983;29:538-542.
- 26 *Kurooka S, Okamoto S, Hashimoto M.* A novel and simple

- colorimetric assay for human serum lipase. *J Biochem* 1977;81:361-369.
- 27 Harborne JB. Phenolic compounds. In: *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3 ed., London: Chapman & Hall. 1998;40-106.
 - 28 Piyachaturawat P, Suwanampai P, Komaratat P, Chuncharunee A, Suksamrarn A. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatol Res* 1998;12:198-206.
 - 29 Piyachaturawat P, Chai-ngam N, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A. Choleric activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur J Pharmacol* 2000;387:221-227.
 - 30 Piyachaturawat P, Tubtim C, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A. Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. *Toxic Letters* 2002;129:123-132.
 - 31 Piyachaturawat P, Srivoraphan P, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A. Cholesterol lowering effects of a choleric phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. *Eur J Pharmacol* 2002;439:141-147.
 - 32 Ito H, Nakasuga K, Ohshima A, Sakai Y, Maruyama T, Kaji Y, Harada M, Jingu S, Sakamoto M. Excess accumulation of body fat is related to dyslipidemia in normal-weight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:242-247.
 - 33 MacBride P. Triglycerides and risk for coronary artery disease. *Corrent Atherosclerosis Reports* 2008;10:386-390.
 - 34 Garattini S, Paoletti R. *Drugs Affecting Lipid Metabolism*. Amsterdam: Elsevier 1961;144p
 - 35 Pedrosa RC, Meyre-Silva C, Cechinel-Filho V, Benassi JC, Oliveira LFS, Zancanaro V, Dal Magro J, Yunes RA. Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana*. *Phytother Res* 2002;16:765-768.
 - 36 Amrani S, Harnafi H, Bouanani NEH, Aziz M, Caid HS, Manfredini S, Besco E, Napolitano M, Bravo E. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. *Phytother Res* 2006;20:1040-1045.
 - 37 Ueshima K, Akihisa-Umeno H, Nagayoshi A, Takakura S, Matsuo M, Mutoh S. A gastrointestinal lipase inhibitor reduces progression of atherosclerosis in mice fed a western-type diet. *Eur J Pharmacol* 2004;501:137-142.

- 38 *Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DHM, Ribeiro ML, Carvalho PO.* Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat-diet-induced obese mice. *Obesity* 2010;18:42-47.
- 39 *Schieffer B, Drexler H.* Role of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2003;91:12H-18H..
- 40 *Schiavo M, Lunardelli A, Oliveira JR.* Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. *J Bras Patol Med Lab* 2003;39:283-288.
- 41 *McNeely W, Benfield P.* Orlistat. *Drugs* 1998;56:241-249.
- 42 *Ballinger A, Peikin SR.* Orlistat: its current status as an antiobesity drug. *Eur J Pharmacol* 2002;440:109-117.
- 43 *Reitsma JB, Cabezas MC, de Bruin TW, Erkelens DW.* Relationship between improved postprandial lipemia and low-density lipoprotein metabolism during treatment with tetrahydrolipstatin, a pancreatic lipase inhibitor. *Metabolism* 1994;43:293-298.
- 44 *Ellrichmann, M, Kapelle M, Ritter PR, Holst JJ, Herzig KH, Schmidt WE, Schmitz F, Meier JJ.* Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3995-3998.
- 45 *Hsieh CJ, Wang PW, Liu RT, Tung SC, Chien WY, Chen JF, Chen CH, Kuo MC, Hu YH.* Orlistat for obesity: benefits beyond weight loss. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67:78-83.
- 46 *Birari RB, Bhutani KK.* Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today.* 2007; 12:879-889.

Capítulo 3

Potent hepatoprotective effect in CCl₄-induced hepatic injury in mice of phloroacetophenone from *Myrcia multiflora*

Artigo Publicado
Periódico – Libyan Journal of Medicine

Potent hepatoprotective effect in CCl₄-induced hepatic injury in mice of phloroacetophenone from *Myrcia multiflora*

Eduardo Antonio Ferreira¹, Eliana Fortes Gris¹,
Karina Bettega Felipe¹, João Francisco Gomes Correia¹,
Eduardo Cargnin-Ferreira², Danilo Wilhelm Filho³ and
Rozangela Curi Pedrosa^{1*}

¹Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;

²Department of Cell Biology, Embryology, and Genetics, Federal University of Santa Catarina,

Florianópolis, SC, Brazil; ³Department of Ecology and Zoology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Background: This study investigated the hepatoprotective effect and antioxidant properties of phloroacetophenone (2',4',6'-trihydroxyacetophenone – THA), an acetophenone derived from the plant *Myrcia multiflora*.

Material & Method: The free radical scavenging activity *in vitro* and induction of oxidative hepatic damage by carbon tetrachloride (CCl₄) (0.5 ml/kg, i.p.) were tested in male Swiss mice (25 ± 5 g).

Results: This compound exhibited *in vitro* antioxidant effects on FeCl₂-ascorbate-induced lipid peroxidation (LPO) in mouse liver homogenate, scavenging hydroxyl and superoxide radicals, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. The *in vivo* assays showed that THA significantly (*p* < 0.01) prevented the increases of hepatic LPO as measured by the levels of thiobarbituric acid-reactive substances, mitochondrial swelling. It also protected hepatocytes against protein carbonylation and oxidative DNA damage. Consistent with these observations, THA pre-treatment normalized the activities of antioxidant enzymes, such as catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase, and increased the levels of reduced glutathione (GSH) in CCl₄-treated mice. In addition, THA treatment significantly prevented the elevation of serum enzymatic activities of alanine amino transferase, aspartate amino transferase, and lactate dehydrogenase, as well as histological alterations induced by CCl₄. Silymarin (SIL) (24 mg/kg), a known hepatoprotective drug used for comparison, led to a significant decrease (*p* < 0.01) in activities of these enzymes in way very similar to that observed in pre-treatment with THA.

Conclusion: These results suggest that the protective effects are due to reduction of oxidative damage induced by CCl₄ resulting from the antioxidant properties of THA.

Keywords: *antioxidant; hepatoprotective; 2',4',6'-trihydroxyacetophenone; Myrcia multiflora; CCl₄; Silymarin*

Received: 19 January 2010; Revised: 1 May 2010; Accepted: 1 May 2010; Published: 8 June 2010

Reactive oxygen species (ROS) are causative factors of degenerative diseases, including some hepatopathies (1). The overproduction of ROS and therefore oxidative stress can be initiated by a variety of factors, including exposure to xenobiotics, such as acetaminophen and carbon tetrachloride (CCl₄) (2). CCl₄ has been extensively used to study liver injury induced by ROS in the mouse model, which is closely analogous to hepatotoxicity in humans. The hepatotoxic effect of CCl₄

is thought to be initiated as a result of its reductive dehalogenation by cytochrome P450 2E1 to the highly reactive trichloromethyl radical ([•]CCl₃), which is subsequently converted into a trichloromethyl peroxy radical ([•]OCCl₃) in the presence of oxygen (3). Removal of hydrogen atoms from unsaturated fatty acids by such radicals generates carbon-centered lipid radicals. These lipid radicals quickly add molecular oxygen to form lipid peroxy radicals, thereby initiating the process of lipid

peroxidation (LPO). Unless neutralized by radical scavengers, these peroxyl radicals in turn abstract hydrogen atoms from other lipid molecules, thereby propagating the process of LPO (4). Also, $\cdot\text{CCl}_3$ can react with sulfhydryl groups, such as reduced glutathione (GSH) and protein thiols, which eventually leads to abnormal protein function, membrane LPO and, consequently, damage to mitochondria and nuclei, leading to impaired physiological functions of hepatocytes, and finally, to cell necrosis (5).

In this sense, the antioxidant action plays an important role in protecting against CCl_4 -induced liver injury. Protective effects of various natural and synthetic products against hepatotoxicity have been reported (6–8). Phenolic compounds or polyphenols, which consist of secondary vegetal metabolites, constitute a wide and complex array of phytochemicals that exhibit antioxidant action (9). Among the phenolic compounds, some acetophenones possess several biological properties (10). It has been reported by Mathiesen and collaborators (11) that phloracetophenone (2',4',6'-trihydroxyacetophenone – THA; Fig. 1) exercises its antioxidant activity *in vitro* by scavenging 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), but no further investigations were carried out. THA is the aglycone part of a glycoside from *Myrcia multiflora* (family Myrtaceae), a plant popularly known as 'insulin plant' and used for diabetes in traditional medicine in South America. The literature cites several sources for obtaining phloracetophenone derivatives, but the free form of acylphloroglucinol is rare (12–14). Isolated flavanone and flavonol glucosides had been reported to inhibit aldose reductase and α -glucosidase activities and to possess a potential for hypoglycemic activity in alloxan-induced diabetic animals (15, 16). But only studies that describe the antioxidant effect and hepatoprotector of THA are available.

Here, we investigated both the *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and the potential protective effects of THA in CCl_4 -induced hepatotoxicity in mice. The protective activity of THA was compared with that of Silymarin (SIL), a natural antioxidant that has been used in clinical practice for the treatment of toxic liver disease

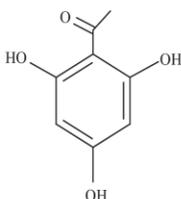


Fig. 1. Chemical structure of 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (phloracetophenone, THA).

(17). This study was carried out taking into consideration that THA possesses a beneficial activity as an antioxidant and hepatoprotective agent, although the mechanism for the activity remains to be elucidated.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals were of the highest commercially available purity. THA monohydrate was from Fluka. All other chemicals were from Sigma-Aldrich Co.

Plant material and isolation of phloracetophenone glucoside

The leaves of cultivated *M. multiflora* were obtained from Albano Ferreira Martins, Ltd., São Paulo, Brazil. The dried leaves of *M. multiflora* were subjected to the methods of extraction and isolation of phloracetophenone glucoside according to Suksamraran and collaborators (18). The compound was isolated and identified by preparative TLC and analyzed by ^1H NMR. IR showed that data were consistent with those reported for the 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone. Indeed, by the acidic hydrolysis of the compound mentioned above, it is possible to prepare the THA.

To obtain phloracetophenone, 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone (200 mg) was treated with 3 N HCl in methanol (200 ml) at a reflux temperature of 100°C for 30 min (18–20). After neutralization by careful addition of 20% aqueous NaHCO_3 and elimination of methanol under vacuum and controlled temperature, the phloracetophenone was extracted with CH_2Cl_2 , followed by the evaporation of solvent and recrystallization with boiling water. This yielded crystals of colorless needles that were submitted to ^1H NMR, IR, and TLC analyses with a synthetic standard of THA monohydrate. Analytical TLC was carried out on 0.2-mm plates of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt). For separation and identification of compounds, the following mobile phases (a, b) and spray reagent (c) were used: (a) $\text{AcOEt}-\text{H}_2\text{CO}_2-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}$ (500:5:5:2); (b) $\text{CHCl}_3-(\text{CH}_3)_2\text{CO}-\text{H}_2\text{CO}_2$ (150:33:17), and (c) vanillin/ H_2SO_4 (10% vanillin in a 2:1 mixture of 99.5% ethanol and concentrated H_2SO_4), followed by heating for color development.

In vitro antioxidant activity

The free radical scavenging activity of THA was evaluated using the 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) radical scavenger method and measured at 518 nm (21). Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) was measured according to Robak and Gryglewski (22), using its generation through xanthine/xanthine oxidase and detected by nitro blue tetrazolium (NBT) reduction at 560 nm. The hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) was generated by the deoxyribose

method and its reaction with thiobarbituric acid (TBA) was indirectly detected through the pink chromophore measured at 532 nm (23). LPO was assayed using the TBA method, as described by Chen and Tappel (24). THA antioxidant activities *in vitro* were evaluated in triplicates in the range 0.5 to 500 µg/ml and the results were expressed as IC₅₀, which was the concentration (in µg/ml) of THA required to inhibit the generation rates of radicals by 50%. SIL, a mixture of four flavonolignans that possesses a recognized ROS scavenger activity as well as a hepatoprotective effect, was used as the antioxidant standard (17).

Animals

Male Swiss mice, supplied by the local Biotério Central of the Federal University of Santa Catarina and weighing 25 ± 5 g, were housed under controlled conditions (12-h light-dark cycle, 22 ± 2°C, 60% air humidity), and had free access to standard laboratory chow and water. All animal procedures were conducted in accordance with legal requirements appropriate to the species (Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication #85.23, revised in 1985) and with the approval of the local Ethics Committee.

Hepatoprotective activity

Hepatotoxicity was induced by CCl₄ (0.5 ml/kg body weight in olive oil, injected intraperitoneally) according to the method described by Carbonari et al. (7). THA was preliminarily evaluated at 3, 6, and 12 mg/kg body weight and the dose of 6 mg/kg was selected because it was the lowest dose that could normalize the hepatic enzymes aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH). Mice were randomly divided into five groups (*n* = 6 each group) and administered orally by gavage during 7 days as follows:

- (1) Group I: Control group, treated with vehicle (saline) daily for 7 days.
- (2) Group II: Treated with vehicle (saline) daily for 7 days followed by CCl₄ on day 7.
- (3) Group III: Treated with THA (6 mg/kg) daily for 7 days.
- (4) Group IV: Treated with THA (6 mg/kg) daily for 7 days followed by CCl₄ on day 7.
- (5) Group V: Treated with SIL (24 mg/kg) daily for 7 days.
- (6) Group VI: Treated with SIL (24 mg/kg) daily for 7 days followed by CCl₄ on day 7.

Approximately 24 h after the i.p. administration of CCl₄, blood sample was collected and serum was separated to evaluate the biochemical markers of hepatic injury. After that, animals were euthanized by cervical dislocation and the livers were immediately excised, weighed, and kept on

ice for analysis of biomarkers of oxidative damage, assay of antioxidant enzymes, mitochondrial swelling, and histological analyses.

Determination of biochemical markers of hepatic injury

Blood was placed at room temperature for 1 h and then centrifuged at 1,000g for 10 min to obtain serum. The enzymatic activities of AST, ALT, and LDH were assayed spectrophotometrically according to Reitman and Frankel (25), Bergmeyer (26), and Allain et al. (27), using a commercial kit (LABTEST, Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brazil).

Oxidative damage biomarkers

Peroxidation of hepatic tissue lipids, *in vivo*, was measured by the method of Okawa et al. (28). The amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) was expressed as nmoles of TBARS formed per mg of protein and using a molar coefficient (ϵ) of 153 mmol/l per cm. Oxidative damage of proteins was quantified as carbonyl protein content according to the method of Levine et al. (29). This method is based on spectrophotometric detection of the end product of the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine with protein carbonyl to form protein hydrazones detected at 370 nm, and the results were expressed as nmoles of carbonyl group per mg of protein, using ϵ = 22 mmol/l per cm. Liver GSH levels were measured by a spectrophotometric method (30) in acid hepatic homogenates combined with disodium hydrogen phosphate and DTNB solution, and the yellow chromophore formed was quantified at 412 nm using a molar coefficient (ϵ) of 14.1 mmol/l per cm. The results were expressed in µmol per mg of protein.

Detection of DNA damage

The extent of DNA fragmentation was assessed by the alkaline Comet assay proposed by Singh et al. (31). Liver samples (100 mg) were homogenized in 1,000 µl phosphate-buffered saline (PBS) (1:9) and 10 µl of this solution was added to 70 µl of 0.75% low-melting point agarose. The cell/agarose mixture was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 µl of normal-melting agarose (1%). The slides were immersed into a cold and freshly made lysis solution [2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 10 mM Tris, pH 10] for a minimum of 2 h. Subsequently, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1.0 mM EDTA, pH 13) for 30 min. DNA was subjected to electrophoresis for 30 min at 280 mA and 25 V, and then neutralized with 0.4 M Tris, pH 7.5. Finally, DNA was stained with ethidium bromide (2.0 µg/ml). Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each

animal and comet image lengths (nuclear region+tail) were measured in arbitrary units. A DNA damage index (DI) was compiled according to tail size, from undamaged (0) to maximally damaged (400), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently, for each group studied. Thus, the DI of each group ranged from 0 (completely undamaged) to 400 (maximum damage).

Antioxidant enzymes

Catalase (CAT) activity was determined by measuring at 240 nm the decrease of H₂O₂ in a freshly prepared 10 mM hydrogen peroxide solution; the results are expressed in mmol/min per mg protein and $\epsilon = 40 \text{ mmol/l per cm}$ (32). Superoxide dismutase (SOD) activity in homogenates was determined by measuring the inhibition of the rate of autocatalytic adrenochrome formation and expressed in U SOD/mg protein (33). Glutathione peroxidase (GPx) activity was quantified by a coupled assay with glutathione reductase (GR) catalyzed oxidation of NADPH. Measurements were made at 340 nm and expressed in $\mu\text{mol/min per mg protein}$ (34). Protein was measured by the method of Lowry et al. (35) using bovine serum albumin as standard.

Determination of mitochondrial swelling

Mitochondria were prepared from mouse liver according to the method of Aprille et al. (36). In brief, livers of mice were excised and homogenized in an isolation buffer (225 mM d-mannitol, 75 mM sucrose, 0.05 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) at 4°C. The homogenates were centrifuged at 600g for 5 min and supernatants were centrifuged at 8,800g for 10 min. The pellet was washed twice with the same buffer. Protein concentration was determined by using Coomassie Brilliant Blue (37).

Mitochondrial swelling was assessed by measuring the absorbance of their suspension at 540 nm (38). Liver mitochondria isolated from each group of mice were dissolved at 0.5 mg protein per ml in 3 ml of the assay buffer (125 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5 mM succinate). To the assay buffer was added 50 mmol/l of Ca²⁺ to initiate mitochondrial swelling and the absorbance (A) at 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 min was measured. The rate of mitochondrial swelling was calculated by using following formula:

$$\left[\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{-Test}} - \Delta \text{Abs}_{\text{-CCl}_4}}{\Delta \text{Abs}_{\text{-Control}} - \Delta \text{Abs}_{\text{-CCl}_4}} \right] \times 100\%,$$

where $\Delta = \text{Abs}_{\text{-0 min}} - \text{Abs}_{\text{-6 min}}$

Histological analyses

The hepatic duct was chosen (adjacent to liver) to standardize the histological analyses and to avoid misinterpretations. Samples of the same liver lobes (8-15

$\times 3-4 \text{ mm}$ (for all treatments were fixed in 10% of formalin buffered with 0.1 M phosphate (pH 7.2). After fixation, samples were washed in tap water for 4 h and dehydrated through an increasing ethanol series, cleared, and embedded in 56-60% paraffin. Sections were cut at 5- μm thickness, stained with Cason's trichromic staining, and mounted in Eukit medium (39). Histological sections were photographed under a light microscope with a digital image capture system (Olympus, model Dx 41).

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SD. Statistical analysis was performed to compare treated groups with the respective control groups using one-sample Kolmogorov-Smirnov analysis of normality and two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test where appropriate. Values of $p < 0.01$ were considered statistically significant.

Results

In vitro antioxidant activity

A marked difference in DPPH radical scavenging capacity was found: the isomeric mix of flavonolignans SIL showed a higher DPPH scavenging capacity than THA (Table 1). Accordingly, SIL inhibited the generation of superoxide anion radicals to a greater extent than THA, but it is important to note that SIL concentration was about four-fold higher than that of THA. Curiously, no significant difference between SIL and THA was detected regarding both $\cdot\text{OH}$ scavenging capacity and protection against membrane LPO (Table 1).

Biochemical markers of hepatic injury

After 12 h since administration of CCl₄ to mice, the levels of markers, such as ALT, AST, and LDH activities, were high in serum sample when compared with controls

Table 1. *In vitro* antioxidant activity of THA and Silymarin measured by scavenging of DPPH, O₂⁻ and $\cdot\text{OH}$ radicals, and protection against lipid peroxidation (LPO) (levels of thiobarbituric acid reactive substances) in hepatic homogenates

Compounds	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^b			
	DPPH	O ₂ ⁻	$\cdot\text{OH}$	LPO
THA	50.9 \pm 0.5 ^a	66.5 \pm 0.8 ^a	5.7 \pm 1.3	7.7 \pm 0.7
Silymarin	13.9 \pm 0.7	45.4 \pm 1.5	7.6 \pm 0.8	10.1 \pm 0.5

Note: All values are expressed as means \pm SD (n = 6).

^aStatistically significant compared to Silymarin ($p < 0.01$).

^bIC₅₀: inhibitory concentration at 50% was obtained by linear regression.

(Table 2). Oral administration of THA or SIL significantly restored levels of these hepatic markers, except for LDH activity.

Oxidative damage biomarkers and DNA fragmentation

Pre-treatment of mice with THA or SIL had a remarkable antioxidant effect and prevented the LPO induced by CCl₄ (82.7% and 83.3%, respectively) (Fig. 2A). In accordance with the results related to LPO, protein oxidation quantified as carbonyl protein content also showed a significant increase after CCl₄ treatment (51.9%), which was significantly decreased by THA or SIL pre-treatment (35.8% and 31.2%, respectively) (Fig. 2B). In addition, fluorescence microscopy revealed that CCl₄ caused remarkable DNA fragmentation (DI = 110.2 ± 3.3) in hepatocyte homogenates when compared to the control group (DI = 49.0 ± 1.0). On the other hand, DNA fragmentation in mice pre-treated with THA or SIL (DI = 51.0 ± 2.0 and 45.0 ± 4.0) was similar to that in control mice (Fig. 2C).

Glutathione (GSH) content and antioxidant enzymes

When administration of CCl₄ to the mice resulted in approximately 60% depletion of hepatic GSH levels compared with controls (Table 3). Pre-treatment with THA or SIL was effective in protecting hepatocytes against such depletion. On the other hand, CCl₄ treatment resulted in a significant ($p < 0.01$) decrease of the hepatic enzymes CAT, SOD, and GPx when compared with the negative control group. THA or SIL pre-treatments prevented such decreases, which were within normal limits (Table 3).

Table 2. Effects of THA and Silymarin on CCl₄-induced liver damage in mice

Groups	Serum Enzymes		
	ALT (U/l)	AST (U/l)	LDH (U/l)
Control group	29.2 ± 3.5 ^a	9.1 ± 1.1 ^a	237.2 ± 38.3 ^a
CCl ₄	91.0 ± 1.5	38.4 ± 1.6	541.4 ± 41.2
THA	35.2 ± 2.4 ^a	13.1 ± 1.4 ^a	284.9 ± 28.3 ^{a,b}
THA + CCl ₄	30.9 ± 2.3 ^a	10.5 ± 1.0 ^a	272.4 ± 33.7 ^a
Silymarin	35.5 ± 2.1 ^a	15.7 ± 1.2 ^a	295.1 ± 29.3 ^a
Silymarin + CCl ₄	32.1 ± 1.1 ^a	12.7 ± 0.8 ^a	289.6 ± 30.5 ^{a,b}

Note: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase. Values are mean ± SD ($n = 6$).

^a $p < 0.01$ compared to CCl₄-treated mice.

^bCompared to control group.

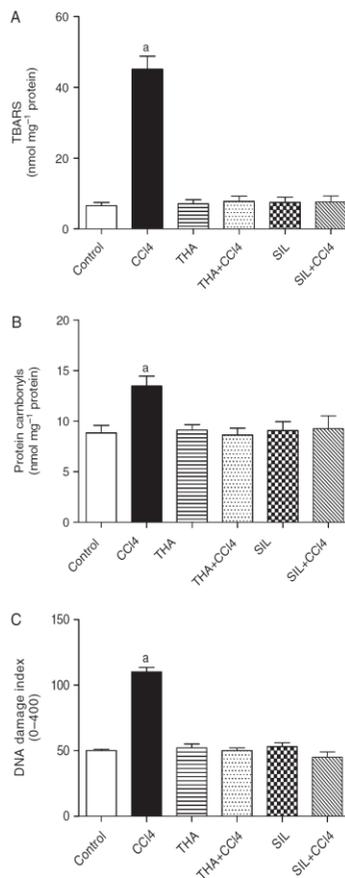


Fig. 2. Effect of THA (6 mg/kg body weight) or Silymarin (24 mg/kg body weight) on hepatic lipid peroxidation (A), protein carbonylation (B), and DNA damage Index (C) in CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. Bars represent means ± SD, $n = 6$. ^aSignificantly different from CCl₄-treated mice ($p < 0.01$).

Mitochondrial swelling

Calcium-induced remarkable mitochondrial swelling in normal mice, which was greatly attenuated in mice pre-treated with CCl₄ (46.9%) (Fig. 3), suggesting a decline in the sensitivity of mitochondria to swelling due to high calcium content. However, THA or SIL blocked such attenuation with inhibitory rates of 49.5% and 47.7%, respectively.

Capítulo 3 - Efeito Hepatoprotetor da THA

Eduardo Antonio Ferreira et al.

Table 3. Effects of THA and Silymarin on GSH levels and antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, and GPx) in livers of treated mice and of control mice

Groups	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	CAT (mmol/min/mg protein)	SOD (U SOD/mg protein)	GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
Control group	34.14 ± 0.12^a	8.31 ± 0.29^a	10.08 ± 0.26^a	33.35 ± 2.00^a
CCl_4	24.65 ± 0.14	5.33 ± 0.46	6.64 ± 0.13	23.14 ± 1.80
THA	30.72 ± 0.18^a	7.87 ± 0.31^a	8.45 ± 0.45^a	34.68 ± 1.10^a
THA + CCl_4	31.14 ± 0.14^a	8.17 ± 0.27^a	9.18 ± 0.65^a	29.92 ± 1.30^a
Silymarin	32.06 ± 0.22^a	7.70 ± 0.33^a	10.27 ± 0.39^a	32.79 ± 1.42^a
Silymarin + CCl_4	29.82 ± 0.15^a	7.43 ± 0.15^a	14.01 ± 0.73^a	31.97 ± 1.50^a

Note: GSH, reduced glutathione; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase. Values are mean \pm SD ($n=6$). ^a $p < 0.01$ compared to the CCl_4 -treated mice.

Histological analyses

Histological analyses revealed that in terms of morphology, livers subjected to all treatments generally showed normal structural integrity. The stromal and the parenchymal portions presented structural characteristics of healthy liver of mice. Intact hepatocytes plates were observed in fairly radial position in relation to the centrolobular vein with reticular fibers present on both sides. Plenty of capillary sinusoids of normal caliber and non-congestion were also observed. Hepatocytes were large and polyhedral, with round nuclei, abundant heterochromatin and nucleoli quite evident, all of which are characteristic of normal cells. However, when using Cason's staining, which can reveal distinct substrates with different colors, the CCl_4 group (Fig. 4G) showed higher variation in color with two distinct populations of hepatocytes (separated by dashed lines). These cells exhibited a variety of substrates in the cytoplasm (as

revealed by different staining), indicating that although initial morphological changes are not evident, there are indications of changes in hepatocyte metabolism. When the histological preparations are observed in a smaller magnification, the number of hepatocytes with different colors (and therefore with different metabolic activities) form groups quite limited under CCl_4 treatment not clear (Fig. 4C, dashed lines). When comparing the other groups, the appearance in color (and thus in cell physiology) is very similar to each other (Fig. 4A-E, dotted lines), showing that the hepatoprotective treatments with THA (Fig. 4D) and SIL (Fig. 4E) were very effective against the hepatotoxic effects of CCl_4 .

Discussion

We demonstrate that THA has a concentration-dependent scavenging capacity for the DPPH radical higher than that of SIL, which is attributable to its hydrogen-donating

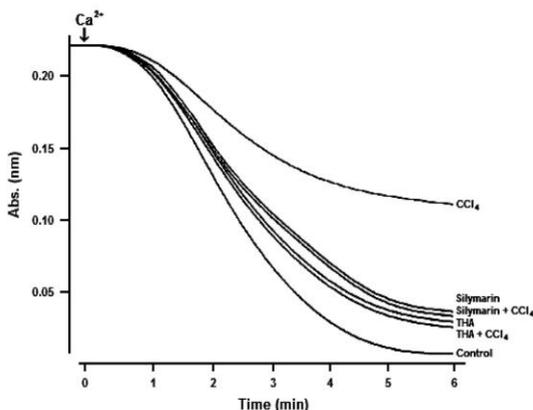


Fig. 3. Effect of THA (6 mg/kg body weight, by gavage) or Silymarin (24 mg/kg body weight, by gavage) on Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling. Bars represent means \pm SD for, $n=6$. ^aSignificantly different from CCl_4 -treated mice ($p < 0.01$).

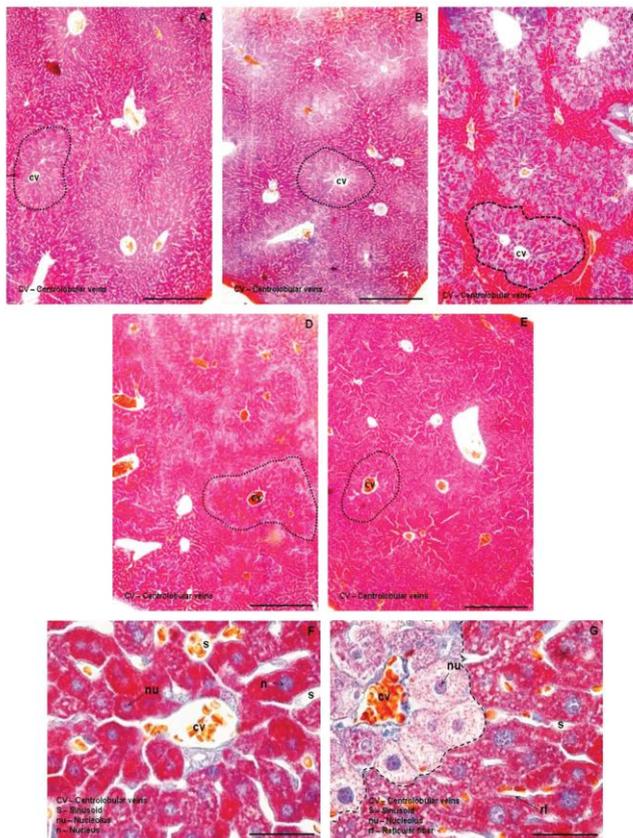


Fig. 4. Histological analyses of liver in control mice (A), mice treated with THA (B), mice treated with CCl_4 (C), mice pre-treated with THA followed by CCl_4 (D), and mice pre-treated with Silymarin followed by CCl_4 (E). Liver tissue was stained with trichrome Cason's staining ($100\times$, bar = $100\ \mu\text{m}$). Photomicrographs F and G show histocytological details of normal and abnormal livers, respectively (Cason's staining $1000\times$, bar = $10\ \mu\text{m}$). Dashed lines separate the number of hepatocytes with different staining and arrows showed the nucleus and reticular fibers.

ability. DPPH possesses a proton-free radical with the characteristics of absorption that decreases significantly on exposure of proton radical scavengers (40).

In the present study, THA or SIL were able to scavenge $\text{O}_2^{\cdot-}$ in a concentration-dependent manner, measured by the xanthine/xanthine oxidase and NBT assays (Table 1). Although the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) is a relatively weak oxidant, it reacts to form more potent ROS, such as the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), which initiate LPO processes (41). Furthermore, superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) is also

indirectly initiate the LPO as a result of H_2O_2 formation, creating precursors of $\cdot\text{OH}$ (41). Taking this into account, the results suggest that the antioxidant activity of THA is also related to its ability to scavenge the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

In the LPO assay, $\cdot\text{OH}$ was scavenged by co-incubation of mouse liver homogenate with different concentrations of THA or SIL, and both phenolic compounds showed substantial and similar protection against membrane LPO (Table 1). Furthermore, the evidence of $\cdot\text{OH}$ scavenging

activity of THA was obtained through the deoxyribose system, which displayed an IC_{50} close to that of SIL, thereby explaining such a strong protection against LPO. This property probably relies on the presence of phenolic hydroxyls at the *ortho* and *para* positions (11). An early study that used this system to assess the biological activity of natural plant-derived biomolecules reported that molecules that can inhibit deoxyribose degradation are those that can chelate iron ions and render them inactive or poorly active for the Fenton reaction (42). In summary, the *in vitro* results suggest that THA, which effectively scavenges several ROS, behaves in a way similar to SIL. The broad activity range related to THA suggests that multiple and synergistic mechanisms are probably responsible for the antioxidant activity of this acetophenone-derived substance.

CCl_4 is known to cause hepatic damage manifested in marked elevation in serum levels of LDH and amino transferase enzymes (AST and ALT), especially ALT, which is considered the primary and specific marker of liver injury (43). Accordingly, our results also showed a significant increase in the activities of AST, ALT, and LDH, thereby confirming the hepatocellular damage in CCl_4 -treated mice. A similar profile was observed by Hewawasam and collaborators (44) in adult Swiss mice treated with CCl_4 (0.5 ml/kg in olive oil). After pre-treatment with THA, the activities of these enzymes were decreased to values similar to those of controls (Table 2). THA could also prevent the CCl_4 -induced increase in hepatic TBARS levels, suggesting that THA inhibits LPO and its propagation reactions (Fig. 2A). In addition, the histological analyses revealed typical toxicological effects on hepatocytes promoted by CCl_4 , as already described in the literature (45, 46). THA alone increased LDH levels in relation to controls but this enhancement was significantly lower than that observed in CCl_4 treatment.

CCl_4 causes marked toxicity by increasing the liver LPO, as detected by enhanced levels of hepatic TBARS (47, 48). As already mentioned, CCl_4 hepatotoxicity depends on the reductive dehalogenation of CCl_4 catalyzed by CYP450 in the hepatic endoplasmic reticulum, leading to the generation of an unstable complex of trichloromethyl peroxy radicals (CCl_3^{\cdot}), which is reported to be a highly reactive species (5). This free radical attacks membrane lipids, causing their peroxidation, and may also covalently bind to lipids and proteins, thereby initiating deleterious processes that ultimately leads to cell damage. THA may afford cell protection by impairing CCl_4 -mediated LPO, thus preventing the generation of free radical derivatives, if the ameliorated TBARS levels and mitochondrial sensitivity to calcium are taken into consideration (Fig. 2A).

Besides the finding that CCl_4 increased LPO, it also depleted intracellular GSH levels, indicating that GSH

loss might result from the detoxification of CCl_4 by GSH conjugation. In addition, the previous enhancement of carbonyl protein contents was significantly prevented in mice treated with THA or SIL, suggesting a further antioxidant protection against protein oxidation. Therefore, these combined results strongly suggest that acetophenone acts as an antioxidant.

The histopathological analysis provided complementary evidence that pre-treatment with THA or SIL attenuated the cytoplasmic changes in mouse liver induced by CCl_4 administration. The hepatocyte plate of CCl_4 -treated mice resulted in cytophysiological changes shown by Cason's trichrome staining, revealing different colors in the cytoplasm (Fig. 4). This might have been due to the formation of highly reactive radicals associated with the oxidative threat induced by CCl_4 . Cellular accumulation of lipid hydroperoxides can cause cytotoxicity associated with peroxidation of membrane phospholipids by lipid hydroperoxides, the basis for a related cellular damage (41). The cytophysiological changes coincided with increased levels of LPO (Fig. 2A), protein oxidation (Fig. 2B), and DNA fragmentation (Fig. 2C), while the administration of THA or SIL prevented such biochemical and histological alterations induced by CCl_4 . This effect could be attributable to the antioxidant activity of these two compounds, which significantly attenuated the oxidative threat and led to restoration of normal physiological functions.

In addition, the antioxidant enzymes CAT and GPx in mice pre-treated with THA or SIL and then treated with CCl_4 had activities similar to those of controls (Table 3). Treatment of mice with CCl_4 concurrently induces processes in acute injury and also in regeneration, in which injury events are predominantly expressed at early stages, although this regeneration process is latent (49). A possible reason why CAT and GPx activities were augmented after treatment with THA or SIL in the presence of CCl_4 is the capacity of these compounds to counteract CCl_4 -induced massive ROS production (41). Therefore, we speculate here that THA plays a role during the early stages in CCl_4 -induced liver injury, decreasing LPO and protein carbonylation and, consequently, improving cellular antioxidant status, thereby preventing ALT, AST, and LDH leakage from liver.

The activity of GPx, an important antioxidant enzyme that takes part in the enzymatic neutralization of free radicals, was significantly decreased by CCl_4 treatment and normalized in mice pre-treated with THA or SIL. This result strongly suggests that CCl_4 , probably through its conversion to CCl_3^{\cdot} , the active metabolite produced in the liver after oral administration, inhibits the activity of GPx. In accordance with the response found in GPx, CAT activity also showed decreased values after CCl_4 treatment, and again the pre-treatment with THA was

able to normalize its activity. Taking into account the diminished GSH content together with the persistent enhancement of TBARS levels found in livers of mice treated with CCl₄, these combined results suggest that this organ was facing a severe oxidative insult. It also strongly suggests that this process was reversed after THA treatment because THA possesses some antioxidant properties that can guarantee GSH maintenance probably through ROS neutralization.

In contrast to the toxic activation of CCl₄ via P450 2E1 biotransformation process, the detoxification pathway also involves GSH conjugation of the CCl₃, a P450 2E1-mediated CCl₄ metabolite (50). A previous study on the mechanism of CCl₄-induced hepatotoxicity showed that GSH plays a key role in detoxifying the toxic metabolites of CCl₄ and that liver necrosis begins when GSH stores are markedly depleted (4). GSH levels are largely mediated by the activity of glutathione-S-transferase, generating adducts with the toxic metabolites of CCl₄, and it has been suggested that one of the main causes of CCl₄-induced liver injury is protein and LPO caused by its free radical derivatives (4). As already mentioned, the present results showed that pre-treatment with THA or SIL significantly inhibited LPO, protein carbonylation, and DNA damage and that it also inhibited CCl₄-induced hepatic GSH depletion.

ROS inflict damage on several cellular structures and functional components, including DNA, even under physiological conditions (41). The present study showed a 52% enhancement of DNA fragmentation in mice exposed to CCl₄ compared to the control group. However, DNA damage in liver was decreased in animals pre-treated with THA, suggesting that either the system of enzymatic repair was induced and/or an increase in antioxidant defenses in cell nuclei took place.

In conclusion, both the *in vitro* and the *in vivo* results indicate that THA can protect mouse liver from injury induced by CCl₄ probably through its ROS scavenging ability. Nevertheless, further research must be carried out to verify the capacity of THA to block P450-mediated CCl₄ bioactivation and also to elucidate the mechanisms regarding the hepatoprotective effect of THA at the molecular level.

Acknowledgements

R.C. Pedrosa (Proc. 300718/2003-9) and D. Wilhelm Filho (Proc. 309438/2008-0) are recipients of research grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil.

Conflict of interest and funding

The authors have not received any funding or benefits from industry to conduct this study.

References

- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 1456-62.
- Ronsein GE, Guidi DB, Benassi JC, Wilhelm Filho D, Pedrosa RC. Cytoprotective effects of carvedilol against oxygen free radical generation in rat liver. *Redox Rep.* 2005; 10: 131-7.
- Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol.* 1995; 25: 25-65.
- Recknagel RO, Glende EA, Britton RS. Free radical damage and lipid peroxidation. In: Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ, editors. *Hepatotoxicology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991, pp. 401-36.
- Recknagel RO, Glende EA, Dolack JA, Walter RL. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther.* 1992; 43: 139-54.
- Halim AB, el-Ahmady O, Hassab-Allah S, Abdel-Galil F, Hafez Y, Darwish A. Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann Clin Biochem.* 1997; 34: 656-63.
- Carbonari KA, Ferreira EA, Rebelo JM, Felipe KB, Rossi MH, Felício JD, et al. Free-radical scavenging by *Oureatea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. *Redox Rep.* 2006; 11: 124-30.
- Lin H-M, Tseng H-C, Wang C-J, Lin J-J, Lo C-W, Chou F-P. Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact.* 2008; 171: 283-93.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56: 17-33.
- Favier L, Tonn C, Guerreiro E, Rotelli A, Pelzer L. Anti-inflammatory activity of acetophenones from *Ophrysposora axilliflora*. *Planta Med.* 1998; 64: 657-9.
- Mathiesen L, Malterud KE, Sund RB. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of *c*-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 307-11.
- Lee KR, Hong SW, Kwak JH, Pyo S, Jee OP. Phenolic constituents from the aerial parts of *Artemisia stolonifera*. *Arch Pharm Res.* 1996; 19: 231-4.
- Dai Y, He XJ, Zhou GX, Kurihara H, Ye WC, Yao XS. Acylphloroglucinol glycosides from the fruits of *Pyracantha fortuneana*. *J Asian Nat Prod Res.* 2008; 10: 111-7.
- Chosson E, Chaboud A, Chulia AJ, Raynaud J. A phloracetophenone glucoside from *Rhododendron ferrugineum*. *Phytochemistry.* 1998; 47: 87-8.
- Yoshikawa M, Shimada H, Nishida N, Li Y, Toguchida I, Yamahara J, Matsuda H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrcianones A and B. *Chem Pharm Bull.* 1998; 46: 113-9.
- Matsuda H, Nishida N, Yoshikawa M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): structures of myrciacitrins III, IV, and V. *Chem Pharm Bull.* 2002; 50: 429-31.
- Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, Silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res.* 2006; 124: 491-504.
- Suksamaran A, Eiamong S, Piyachaturawat P, Byrne LT. A phloracetophenone glucoside with choleretic activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry.* 1997; 45: 103-5.

Capítulo 3 - Efeito Hepatoprotetor da THA

Eduardo Antonio Ferreira et al.

19. Brandão MGL, Nery CGC, Mamão MAS, Krettli AU. Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*. 1998; 48: 397-9.
20. Zhao LM, Jin HS, Sun LP, Piao HR, Quan ZS. Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of trihydroxyhalcone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005; 15: 5027-9.
21. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Leb Wiss Technol*. 1995; 28: 25-30.
22. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*. 1988; 37: 837-73.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. Formation of thiobarbituric acid-reactive substances from deoxyribose in the presence of iron sits: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett*. 1981; 128: 347-52.
24. Chen H, Tappel AL. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by CBrCl₃ in liver, lung, kidney, heart and spleen. *J Agric Food Chem*. 1996; 44: 854-8.
25. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamine pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 1957; 28: 56-63.
26. Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. *Verl Chem*. 1983; 3: 118-25.
27. Allain CC, Poon LC, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974; 20: 470-5.
28. Okawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95: 351-8.
29. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent AI, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-78.
30. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*. 1985; 113: 548-55.
31. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175: 184-91.
32. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-6.
33. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247: 3170-5.
34. Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 114-21.
35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
36. Aprille JR, Hom JA, Rulfs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. *J Trauma*. 1977; 17: 279-88.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem*. 1976; 72: 248-54.
38. Tang XH, Gao J, Chen J, Xu LZ, Tang YH, Zhao XN, et al. Mitochondrial modulation is involved in the hepatoprotection of *Limonium sinense* extract against liver damage in mice. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120: 427-31.
39. Cargini-Ferreira E, Sarasquete C. *Histofisiologia de Moluscos Bivalves Marinos* [Histology of Marine Bivalve Molluscs]. Madrid: CSIC; 2008.
40. Constantin M, Bromont C, Fickat R, Massingham R. Studies on the activity of bepridil as a scavenger of free radicals. *Biochem Pharmacol*. 1990; 40: 1615-22.
41. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999.
42. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*. 1987; 165: 215-9.
43. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 1889-95.
44. Hewavasam RP, Jayatilaka KAPW, Pthirana C, Mudduwa LKB. Hepatoprotective effect of *Epaltes divaricatus* extract on tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Indian J Med Res*. 2004; 120: 30-4.
45. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med*. 1993; 328: 1828-35.
46. Muriel P, Moreno MG, Hernandez M, del C. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicine acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96: 375-80.
47. Poli G. Liver damage due to free radicals. *Brit Med Bull*. 1993; 49: 604-20.
48. Noyan T, Kömüroglu U, Bayram I, Sekeroglu MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Cell Biol Toxicol*. 2006; 22: 381-91.
49. Bhawe SV, Donthamsetty S, Latendesse JR, Mehendale HM. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates secretory phospholipase A₂-mediated progression of acute liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 228: 239-46.
50. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis*. 1990; 10: 279-84.

*Rozangela Curi Pedrosa

Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX
 Departamento de Bioquímica
 Centro de Ciências Biológicas
 Universidade Federal de Santa Catarina
 CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
 Tel: +55 483721 5048
 Fax: +55 483721 9672
 Email: roza@ccb.ufsc.br

DISCUSSÃO GERAL

Inicialmente, para avaliação do efeito hipolipemiante, foi selecionado o modelo de hiperlipidemia aguda induzida pelo Triton WR-1339, que é um ensaio utilizado para triagem de compostos com atividade hipolipemiante mista (AMRANI et al., 2006). A administração i.p. de Triton WR-1339 a ratos promove um aumento rápido, tanto dos níveis séricos de colesterol quanto triglicerídeos e fosfolípidios (GARATTINI, 1961). Esse modelo pressupõe que a administração Triton WR-1339 causa modificações estruturais das lipoproteínas, dificulta o reconhecimento de receptores celulares específicos, destacando os receptores plasmáticos para apo B100 e apo C presentes nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e LDL (MURRAY et al., 2006). A expressão desses receptores é responsável pela diferença do nível de colesterol e triglicerídeos sanguíneos, sinalizando a ativação ou inibição dos processos de biossíntese de lipídeos. Desse modo, a ocorrência de um bloqueio na comunicação celular, privando a interação lipoproteína/receptor, promove a ativação permanente do processo de biossíntese lipídica que, em poucas horas, desenvolve um processo de hiperlipemia, desencadeando alteração na distribuição de colesterol e triglicérides nas lipoproteínas. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a THA causou uma redução significativa nos níveis de colesterol total em comparação aos ratos tratados com Triton WR-1339, reduzindo em aproximadamente 37% nos níveis séricos desse esterol, sendo tão efetivo quanto a Lovastatina (31%) (Tabela 1, Capítulo 2). Esse composto, um dos medicamentos mais utilizados atualmente para o tratamento da hipercolesterolemia, pertence à classe das estatinas e tem por principal mecanismo de ação a inibição da atividade da hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, enzima reguladora da síntese do colesterol (PARRA; REDDY, 2003; CAMPO; CARVALHO, 2007).

Curiosamente, a THA também foi mais efetiva que o Orlistate, um inibidor de lipase pancreática, na redução dos níveis sanguíneos de triglicerídeos (26 e 34% respectivamente) no modelo de hiperlipidemia aguda. Dessa forma, os resultados obtidos com o ensaio do Triton WR-1339 indicam que a THA possui importante efeito hipolipemiante misto, sendo efetivo tanto na redução dos níveis séricos de colesterol quanto de triglicerídeos.

Estudos realizados por Piyachaturawat e colaboradores (2000) demonstraram que a THA possui uma atividade hipocolesterolêmica. Segundo esses autores, a redução dos níveis séricos de colesterol poderia ser explicada em parte pela atividade colérica (indução da secreção biliar) promovida por essa acetofenona, que é influenciada pela quantidade e pela posição das hidroxilas no núcleo benzeno da molécula.

Por outro lado, elevadas concentrações de triglicerídeos circulantes promovem a inibição da lipólise tecidual, contribuindo para a formação de partículas de VLDL. Parte das VLDL formadas dá origem às IDL, que são rapidamente removidas da circulação sanguínea. Entretanto, o processo de catabolismo prossegue decorrente da ação da lipase hepática, promovendo a formação das LDL, que permanecem circulando no plasma sanguíneo por um longo tempo. Essa última lipoproteína é suscetível a processos de oxidação, depositando-se na parede arterial, processo-chave que precede o desenvolvimento da doença aterosclerótica (DURRINGTON, 1998; BREWER, 2004; SPOSITO et al., 2007).

Diets enriquecidas com lipídeos, também conhecida como “dieta de cafeteria”, que causam uma elevação nos níveis séricos tanto de colesterol quanto de triglicerídeos, têm demonstrado ser um importante modelo para avaliação do desenvolvimento da obesidade e hiperlipidemia crônica (HARTVIGSEN et al., 2007; WOO et al., 2008; PARK; LEE; PARK, 2009). A utilização dessa dieta durante quatro semanas causou uma elevação do peso corporal dos animais tratados, 100% de aumento em relação aos camundongos não tratados (Tabela 2, Capítulo 2). Entretanto, após quatro semanas de tratamento com a THA e dieta hipercalórica, foi possível observar uma redução significativa de 40% do peso corporal dos animais, semelhante ao resultado obtido com o tratamento com Orlistate (38%), um dos medicamentos atualmente mais utilizados no manejo clínico da obesidade (PADWAL; MAJUMDAR, 2007).

Além disso, com o modelo experimental de indução de hiperlipidemia crônica pela dieta de cafeteria, foi possível verificar que a THA tem importante potencial de inibição da dislipidemia, de tal forma que as concentrações de colesterol e de triglicerídeos foram significativamente reduzidas (32% e 61% respectivamente) após 30 dias de tratamento, confirmando mais uma vez o efeito hipolipemiante misto desse composto. De forma semelhante, foi possível observar que os animais que receberam apenas a dieta normal e os tratados com THA

também apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,01$) nos níveis sanguíneos de colesterol, após os 30 dias de tratamento, corroborando os resultados obtidos por Piyachaturawat e colaboradores (2002a) (Tabela 2, Capítulo 2).

Estudos em animais e humanos demonstraram que a hipercolesterolemia provoca a ativação do endotélio das artérias, devido a uma resposta inflamatória da parede da artéria, pela infiltração e retenção da LDL (HANSSON, 2005). Demonstrado também, que a redução ou a prevenção da elevação da concentração plasmática de colesterol reduzem o risco dos eventos vasculares obstrutivos e da mortalidade por causas cardiovasculares (ANDREWS et al., 2001; GRUNDY, 2003; SEVER et al., 2003).

Por outro lado, quando comparado com o tratamento com o Orlistate ou Lovastatina, a THA causou maior redução dos níveis de triglicerídeos (56% e 23% respectivamente). Portanto, o tratamento crônico com a dieta de cafeteria comprovou a maior eficácia da THA em relação aos fármacos padrões utilizados, em reduzir tanto os níveis séricos de colesterol quanto triglicerídeos.

As alterações nos níveis plasmáticos de triglicerídeos também estão associadas com a aceleração do processo de aterosclerose, além de que evidências indicam que a hipertrigliceridemia pode ser um fator de risco independente para doenças coronarianas (SARWAR et al., 2007; BAYS et al., 2008; MCBRIDE, 2008; FUJIOKA; ISHIKAWA, 2009), uma vez que os níveis elevados de triglicerídeos alteram o metabolismo das lipoproteínas, o que aumenta os riscos dessas doenças (MCBRIDE, 2008).

A restrição dietética e a adoção de um estilo de vida mais saudável são as medidas mais comumente recomendadas entre os vários tratamentos indicados para o controle da hiperlipidemia e da obesidade. Entretanto, caso essas orientações não promovam o resultado esperado (a redução de peso, da concentração de colesterol ou triglicerídeos), é necessária a administração de medicamentos com atividade hipolipemiante ou antiobesidade, associados sempre à restrição alimentar (SCHIEFFER; DREXLER, 2003; UESHIMA et al., 2004; SPOSITO et al., 2007).

Um alvo molecular importante na busca de novos fármacos para o tratamento da hiperlipidemia e obesidade inclui a redução da absorção de lipídeos pelo trato gastrointestinal mediante a inibição da atividade das enzimas responsáveis pela digestão parcial de triglicerídeos no lúmen intestinal (BRAY; TARTAGLIA, 2000; SHI; BURN, 2004).

Nesse sentido, a inibição da lipase gastrointestinal é um dos alvos moleculares mais visados nos estudos que procuram determinar o potencial de produtos naturais e sintéticos como agentes hipolipemiante e antiobesidade (BRAY; TARTAGLIA, 2000; BIRARI; BHUTANI; 2007; MARTINS et al., 2010).

As lipases são enzimas responsáveis pela digestão de gorduras, particularmente os triglicerídeos provenientes da dieta. A hidrólise dos triglicerídeos pelas lipases produz ácidos graxos livres, mono e diacilglicerol. No organismo, os ácidos graxos livres são utilizados para a produção de energia no músculo ou são reesterificados para que possam ser armazenados no tecido adiposo (MUKHERJEE, 2003). Assim, essas enzimas apresentam grande relevância clínica no que diz respeito à obesidade, à hiperlipidemia e à aterosclerose, uma vez que os produtos resultantes da hidrólise de triglicerídeos possuem um papel crucial nessas doenças (VAN GAAL et al., 2004).

O Orlistate (tetrahidrolipstatina) é um inibidor das lipases gastrointestinais, que age inibindo a hidrólise dos triglicerídeos provenientes da dieta, causando uma redução na absorção intestinal desses triglicerídeos em cerca de 30% (MCNEELY; BENFIELD, 1998; HANEFELD; SACHSE; 2002; CHANOINE et al., 2005). Já Chanoine e colaboradores (2005) demonstraram que o uso desse fármaco por adolescentes obesos durante um ano promoveu uma redução significativa nos índices de massa corpórea (IMC) e não causou efeitos adversos severos. Assim, acredita-se que a utilização do Orlistate pode ser útil no controle da obesidade, especialmente quando usado em conjunto com dietas adequadas e com a modificação do estilo de vida (HSIEH et al., 2005; CHANOINE et al., 2005).

Segundo Ueshima e colaboradores (2004), devido à ação hipotrigliceridêmica do Orlistate, esse fármaco também pode reduzir a progressão da lesão aterosclerótica. Além disso, Padwal e Majumdar (2007) demonstraram que o Orlistate foi capaz de diminuir os fatores de riscos cardiovasculares e a incidência de diabetes em indivíduos com alto risco de desenvolvimento dessas doenças.

No entanto, o Orlistate apresenta alguns efeitos adversos como problemas gastrintestinais, tais como fezes oleosas, diarreia e dor abdominal. Esse medicamento também pode interferir na absorção de alguns fármacos como a varfarina, amiodarona, ciclosporina e tiroxina, e vitaminas lipossolúveis, afetando sua biodisponibilidade e eficácia. Existem ainda alguns poucos relatos de efeitos hepatotóxicos graves (PADWAL; MAJUMDAR, 2007; FILIPPATOS et al., 2008).

No modelo experimental de hiperlipidemia crônica utilizado no presente trabalho, a THA apresentou um importante efeito antiobesidade, possivelmente associado à redução dos níveis séricos de lipídeos, especialmente aos triglicerídeos (Tabela 2, Capítulo 2). Então, procurando estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito, avaliou-se a ação da THA sobre a absorção intestinal de lipídeos, particularmente triglicerídeos. Para essa avaliação, foi administrado azeite de oliva a camundongos por via oral e posterior determinação dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e atividade da lipase pancreática a cada duas horas, utilizando como controle positivo o Orlistate. Verificou-se que, após duas horas da administração do azeite de oliva, a THA reduziu significativamente os níveis de triglicerídeos (59%), apresentando um efeito inibitório inicial maior sobre a absorção intestinal de lipídios em comparação ao Orlistate (24%), sugerindo assim que a THA possui um efeito direto e imediato sobre a absorção de lipídeos (Figura 1, Capítulo 2). Somente após 6 horas da administração do azeite de oliva, o Orlistate mostrou-se mais eficiente que a THA na redução dos níveis séricos de triglicerídeos (52 e 36%, respectivamente). Segundo Birari e Bhutani, (2007) os compostos oriundos de plantas medicinais podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da obesidade e das hiperlipidemias. Esses autores destacam os compostos fenólicos particularmente os polifenóis, tais como flavonas, flavonóis, taninos e chalconas como capazes de inibir a atividade da lipase pancreática.

É importante ressaltar que em nossos experimentos o tratamento com Orlistate causou uma redução significativa na concentração de triglicerídeos e na inibição da atividade da lipase pancreática nos tempos avaliados, porém a ação do Orlistate sobre a atividade da lipase pancreática foi diminuindo ao longo do tempo (de 2 para 6 horas) (Figura 2, Capítulo 2). Já o tratamento com a THA causou uma redução persistente dos níveis sanguíneos de triglicerídeos como também promoveu uma inibição crescente da lipase pancreática ao longo de todo o experimento. Esses resultados sugerem que a THA poderia ter um efeito inibidor das lipases gastrointestinais mais pronunciado que o Orlistate, e também que outros mecanismos de ação sobre a absorção de lipídeos pela mucosa intestinal poderiam estar envolvidos.

Em resumo, a THA apresentou um efeito antiobesidade e hipolipidêmico misto, sendo capaz de impedir a elevação do peso corporal dos animais tratados com uma dieta rica em gordura, reduzindo os níveis de colesterol e triglicerídeos, induzida por dieta hipercalórica,

possivelmente por bloqueio da absorção de triglicérides devido a um efeito inibitório sobre a atividade das lipases gastrointestinais, além de indução do colesterol 7 α -hidroxilase. Assim, a THA poderia ser utilizada como molécula protótipo nas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos que previnem complicações causadas pela obesidade ou dislipidemia, e servir como um complemento futuro no arsenal terapêutico antiobesidade ou hipolipemiante misto.

Outro importante problema de saúde pública são as doenças hepáticas, principalmente devido ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, que estão associados ao consumo inadequado e muitas vezes excessivo de alimentos e medicamentos. A prevalência dessas doenças vem crescendo acentuadamente nas últimas décadas, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, chegando em alguns casos a proporções de epidemia (UNGER, 2002; WANG; BEYDOUN, 2007; KARALIS et al., 2009).

Inicialmente, avaliou-se em modelos *in vitro* a capacidade da THA e Silimarina (SIL), como um agente antioxidante, capaz de capturar ou estabilizar radicais livres. Os resultados obtidos mostraram que a THA e a SIL foram capazes de estabilizar o radical livre DPPH, além de capturar o ânion superóxido (O₂^{•-}) e o radical hidroxil (•OH), demonstrando, dessa forma, o possível potencial da THA em bloquear o processo de iniciação e propagação da oxidação lipídica, uma vez que o radical •OH é um dos iniciadores desse processo, e o radical O₂^{•-}, embora seja um oxidante relativamente fraco, pode ser convertido em formas mais potentes de espécies reativas de oxigênio, como H₂O₂, e, posteriormente, convertido em •OH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999) (Tabela 1, Capítulo 3). Também foi avaliada *in vitro* a proteção da membrana lipídica contra o ataque oxidativo pelo THA. Essa acetofenona apresentou uma importante capacidade de proteção à lipoperoxidação de forma semelhante à SIL, sugerindo mais uma vez que a THA seria possivelmente um potente agente antioxidante. De acordo com Mathiesen e colaboradores (1997), essa propriedade da THA estaria relacionada à presença de hidroxilas fenólicas nas posições *orto* e *para* do anel fenólico.

Após ter sido caracterizada a atividade antioxidante da THA *in vitro*, procurou-se avaliar a possível correlação entre esse efeito e a atividade hepatoprotetora mediante a utilização do modelo de hepatotoxicidade induzida por um potente agente gerador de radicais livres, o tetracloreto de carbono (CCl₄). Este é um modelo experimental

largamente citado na literatura, uma vez que ele mimetiza com bastante precisão a hepatotoxicidade induzida por xenobióticos, sendo muito empregado na triagem de compostos com atividade hepatoprotetor (BRENT; RUMACK, 1993; BRAUTBAR; WILLIAMS, 2002; LEE et al., 2008).

O mecanismo pelo qual o CCl_4 induz a hepatotoxicidade está relacionado à sua ativação metabólica pelo sistema microsomal do citocromo P_{450} (CYP_{450}), em triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) e peroxi-triclorometil ($\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$), dois radicais livres altamente reativos e iniciadores da peroxidação lipídica (RECKNAGEL et al., 1989). Além disso, alguns autores também atribuem a hepatotoxicidade do CCl_4 à elevada geração de $\cdot\text{OH}$ na ausência da catalase (WANG; ISHII; TAKETA, 1998). Algumas investigações sugerem que, além da hepatotoxicidade, os efeitos nefrotóxicos do CCl_4 comumente observados em animais expostos a baixas concentrações desse composto também estariam associados à produção de tais metabólitos (SHEWEITA; ABD EL-GABAR; BASTAWY, 2001; OZTURK et al., 2003).

O dano hepático gerado pelo CCl_4 pode ser monitorado mediante a avaliação de indicadores séricos da função hepática, como as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) (NATHWANI et al., 2005; OZER et al., 2008; NOEL; SHARMA; RATH, 2008). Essas enzimas, em situações normais, geralmente apresentam baixos níveis séricos, entretanto, quando os hepatócitos são lesados, estas são liberadas em grande quantidade no sangue (NATHWANI et al., 2005). Segundo vários estudos, a maioria dos danos hepáticos estão associados a alterações da permeabilidade da membrana (MASUBUCHI; SUDA; HORIE, 2005), indução das enzimas microsômicas (OZER et al., 2008), necrose (WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003; HUNG et al., 2004; KODAI et al., 2007) ou colestase (SILVA; HENNIG; MANAUTOU, 2006).

Nosso estudo mostrou um significativo aumento na atividade da AST, ALT e LDH, indicando dano hepatocelular nos camundongos tratados com o CCl_4 , corroborando com os resultados relatados na literatura (LIN et al., 2008; OZER et al., 2008; NOEL; SHARMA; RATH, 2008). Por outro lado, verificou-se que o pré-tratamento dos animais com a THA ou a SIL causaram uma redução significativa na atividade dessas enzimas (Tabela 2, Capítulo 3), sugerindo desse modo um menor extravasamento das citadas enzimas dos hepatócitos para o sangue.

Em acordo com os dados acima apresentados, a THA e a SIL também preveniram o aumento nos níveis de lipoperoxidação da membrana plasmática induzida pela administração do CCl_4 , sugerindo que a THA pode inibir a peroxidação lipídica tanto pelo bloqueio das reações de iniciação quanto propagação, e, conseqüentemente, o acúmulo celular de hidroperóxidos lipídicos citotóxicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Confirmando esses dados, as análises histológicas revelaram que ocorreram danos hepáticos típicos nos animais tratados com CCl_4 , conforme descrito pela literatura (FRIEDMAN, 1993; MURIEL; MORENO; HERNANDEZ, 2005; LIN et al., 2008), e o pré-tratamento com a THA ou a SIL mantiveram a integridade estrutural normal, sugerindo que os danos celulares promovidos pelo CCl_4 foram atenuados tanto pela THA quanto pela SIL (Figura 4, Capítulo 3).

O radical livre $\cdot\text{CCl}_3$, proveniente da biotransformação do CCl_4 , pode reagir com grupos sulfidrila, como os da GSH e tióis proteicos; a sua ligação covalente com proteínas celulares é considerado o ponto inicial dos eventos da reação em cadeia, o qual pode conduzir a peroxidação de lipídios da membrana e, finalmente, a necrose (JEON et al., 2003; ACHLIYA; WADODKAR; DORLE, 2004). Já os níveis de GSH são determinantes essenciais de susceptibilidade do tecido ao dano oxidativo causado pelo CCl_4 , e a depleção dos níveis hepático de GSH tem frequentemente sido associada à elevação da toxicidade desse composto (HEWAWASAM et al., 2003). A utilização de compostos antioxidantes pode prevenir a toxicidade causada pelo CCl_4 , particularmente a hepatotoxicidade, por inibir a lipoperoxidação, a oxidação proteica e elevar a atividade das enzimas antioxidantes (KUMARAVELU et al., 1995; TESELKIN et al., 2000).

Os resultados obtidos no presente trabalho com o tratamento com CCl_4 corroboraram com os dados relatados na literatura (MANSOUR; HAFEZ; FAHMY, 2006; UPADHYAY; KUMAR; SINGH, 2007; JATWA; KAR, 2008), uma vez que foi capaz de promover um aumento da peroxidação lipídica, alteração da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), diminuição dos níveis intracelulares de GSH, bem como promoveu uma disfunção mitocondrial caracterizada pelo seu inchamento (Figura 3, Capítulo 3). A diminuição do conteúdo de GSH indica que a perda desse tiol não proteico pode ser resultante da detoxificação do CCl_4 pela conjugação com GSH. Contudo, o pré-tratamento com a THA ou a SIL foram efetivos na prevenção da depleção dos níveis de GSH hepático, bem como na

normalização das atividades enzimáticas antioxidante (SOD, CAT e GPx) (Tabela 3, Capítulo 3).

O inchamento osmótico mitocondrial causado pelo influxo de íons através da membrana é um valioso meio de estudo para avaliar sua permeabilidade bem como o funcionamento da maquinaria mitocondrial. Nossos resultados demonstraram que houve uma variação na amplitude do inchaço mitocondrial, onde o cálcio foi capaz de induzir o intumescimento nas mitocôndrias do fígado dos camundongos não tratados, demonstrando que estas estariam respondendo de forma positiva ao estímulo. Entretanto, esse efeito foi atenuado nos camundongos pré-tratados com CCl₄ (46,9%) (Figura 3, Capítulo 3), sugerindo uma alteração da permeabilidade mitocondrial detectada pela redução da sua sensibilidade ao influxo osmótico por dano à membrana. Por outro lado, o pré-tratamento com a THA ou a SIL foram capazes de proteger os hepatócitos desse dano causado pelo CCl₄, restabelecendo o funcionamento mitocondrial e sua permeabilidade em 49,5 e 47,7%, respectivamente.

Também é importante notar que o conteúdo de proteína carbonilada foi significativamente reduzido nos camundongos pré-tratados com a THA, sugerindo uma maior proteção contra o dano oxidativo causado pelo CCl₄ (Figura 2B, Capítulo 3). As proteínas podem ser modificadas oxidativamente (carboniladas) por ataque de radicais livres, o que pode levar à clivagem de cadeias polipeptídicas, à modificação de cadeias laterais de aminoácidos, e à sua conversão em derivados altamente sensíveis à degradação proteolítica (BERLETT; STADTMAN, 1997). Dessa forma, a presença dos grupos carbonila inseridos em sequência de proteínas serve como biomarcador de danos oxidativos (LEVINE et al., 1990; LEVINE, 2002; DALLE-DONNE et al., 2003).

Dados existentes na literatura sugerem que o CCl₄ é capaz de induzir a carbonilação proteica em hepatócitos de camundongos (SHEWEITA; ABD EL-GABAR; BASTAWY, 2001; CARBONARI et al., 2006). Tanto as espécies reativas como a lipoperoxidação, a redução dos açúcares e a exposição do ácido hipocloroso são capazes de causar dano oxidativo às proteínas, promovendo uma reação dos grupos carbonila às moléculas proteicas, principalmente nos aminoácidos lisina, prolina ou treonina. Assim nossos resultados corroboram com alguns estudos que indicam que a carbonilação proteica pode ser um importante biomarcador de estresse oxidativo (PANTKE et al., 1999; LIM et al., 2002; KODAI et al., 2007). Por outro lado, alguns processos patológicos

e fisiológicos também podem apresentar processos de oxidação catalisados por metais, promovendo modificação covalente nas proteínas (STADTMAN; LEVINE, 2003).

Portanto, é possível que a THA possa desempenhar sua ação protetora durante as fases iniciais do dano hepático induzido pelo CCl_4 , diminuindo a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas e, conseqüentemente, melhorando a capacidade antioxidante celular, impedindo assim que ocorra o extravasamento extracelular das enzimas AST, ALT e LDH pelos hepatócitos.

A exposição dos camundongos à CCl_4 também promoveu um aumento na fragmentação do DNA em comparação ao grupo controle. Esse dano foi revertido em animais pré-tratados com a THA ou a SIL, sugerindo que o sistema de reparo enzimático ao DNA foi ativado ou houve efetivamente uma redução no ataque oxidativo aos ácidos nucleicos por radicais livres (Figura 2, Capítulo 3). Entretanto é importante ressaltar que o tratamento dos camundongos com CCl_4 , simultaneamente aos pré-tratamentos, é capaz de induzir lesão hepática aguda, bem como possibilitar sua regeneração, mas os processos de lesões são predominantemente expressos nas fases iniciais, ao passo que o processo de regeneração são latentes ou não aparentes (BHAVE et al., 2008).

Os resultados obtidos em nossos experimentos corroboram aqueles relatados na literatura para algumas plantas utilizadas no tratamento de doenças hepáticas, em que são correlacionados os possíveis efeitos hepatoprotetores de seus extratos contra os danos oxidativos induzidos por CCl_4 , com a capacidade antioxidante, pela presença de compostos ativos tais como flavonóides e outros compostos fenólicos (PRAMYOTHIN et al., 2007; GOPAL; SENGOTTUVELU, 2008; JAIN et al., 2008; HSU et al., 2008). Os dados obtidos com o presente trabalho indicaram que a THA pode proteger o fígado de camundongos de danos induzidos pelo CCl_4 devido à sua capacidade de captura de radicais livres e conseqüente atividade antioxidante. Contudo, mais pesquisas devem ser realizadas para verificar a sua capacidade de inibir a bioativação do CCl_4 mediada pelo CYP_{450} , ou mesmo inibição de alguma etapa da cadeia respiratória mitocondrial com intuito de elucidar outros possíveis mecanismos de hepatoproteção da THA .

Em resumo, os resultados obtidos com o presente trabalho demonstraram que a 2',4',6'-trihidroxiacetofenona isolada de *Myrcia multiflora* popularmente utilizada no Brasil para o tratamento da diabetes e outras doenças possui um importante efeito hepatoprotetor

possivelmente associado ao seu potencial antioxidante, verificado pela captação dos radicais DPPH, $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$ e proteção contra lipoperoxidação da membrana plasmática, carbonilação proteica, oxidação do DNA e estabilização da permeabilidade da membrana mitocondrial ao cálcio.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THA) isolada de *Myrcia multiflora*:

- Possui efeito hipolipemiante, caracterizado pela diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos, tanto na hiperlipidemia aguda induzida pelo Triton WR-1339, como na hiperlipidemia crônica induzida pela dieta rica em lipídeos;
- Possui efeito antiobesidade caracterizado pela redução do peso corporal dos animais tratados com uma dieta rica em lipídeos;
- Quanto ao efeito antiobesidade observado, este pode estar associado à redução da absorção gastrointestinal de lipídeos devido à inibição da lipase pancreática;
- Possui efeito hepatoprotetor *in vivo*, protegendo os danos causados pelo CCl₄, demonstrados mediante a diminuição da atividade das enzimas marcadoras de hepatotoxicidade (AST, ALT e LDH) e da manutenção das estruturas morfológicas hepáticas;
- O efeito hepatoprotetor da THA é devido à sua capacidade antioxidante associado à sua capacidade de estabilizar o radical DPPH, além de capturar o ânion superóxido (O₂^{•-}) e o radical hidroxil (•OH);
- O efeito hepatoprotetor da THA foi caracterizado *in vivo* pela prevenção da peroxidação lipídica, carbonilação proteica e dano ao DNA, além da elevação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e prevenção da depleção dos níveis de GSH e estabilização da permeabilidade da membrana mitocondrial ao cálcio em animais tratados com CCl₄;
- No entanto, o esclarecimento das vias reguladas e/ou envolvidas nas ações da THA sobre os efeitos hipolipemiante e hepatoprotetor requer maiores investigações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHLIYA, G. S.; WADODKAR, S. G.; DORLE, A. K. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi Ghrita against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 229-232, 2004.
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, p. 1059-1062, 2005.
- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus Editora Ltda., 1993. 341p.
- AMRANI, S. et al. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 12, p. 1040-1045, 2006.
- ANDREWS, C. T. et al. Achieving and mantaining National Cholesterol Education Program Low-Density Lipoprotein Cholesterol Goals with Five Statins. **American Journal of Medicine**, v. 111, p. 185-191, 2001.
- ANTIGNY, F. et al. Dysfunction of mitochondria Ca^{2+} uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Mitochondrion**, v. 9, n. 4, p. 232-241, 2009.
- BADIMÓN, L.; VILAHUR, G.; PADRÓ, T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. **Revista Española de Cardiología**, v. 62, n. 10, p. 1161-1178, 2009.
- BAINES, C. P. et al. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 550-555, 2007.
- BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-495, 2005.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BAMBA, V.; RADER, D. J. Obesity and atherogenic dyslipidemia. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2181-2190, 2007.
- BARSHOP, N. J. et al. Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 13-24, 2008.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2, p. 114-120, 1984
- BAYS, H. E. et al. Colesevelam Hydrochloride Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Treated With Metformin. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 18, p. 1975-1983, 2008.

- BECKMAN, H.; HAWLEY, S.; BISHOP, T. Application of theory-based health behavior change techniques to the prevention of obesity in children. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 21, n. 4, p. 266-275, 2006.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 20313-20316, 1997.
- BERTOLAMI, M. C. Mechanisms of hepatotoxicity. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 5, p. 25-27, 2005.
- BHAVE, V. S. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates secretory phospholipase A2-mediated progression of acute liver injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, n. 2, p. 239-246, 2008.
- BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 879-889, 2007.
- BNOUHAM, M. et al. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). **International Journal of Diabetes and Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 1-25, 2006.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular**. Marcel Dekker: New York, v. 105, p. 1-25, 1997.
- BRASIL (2006a). Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília; Ministério da Saúde; 2006. 148 p.
- BRASIL (2006b). Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 10 de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de março de 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n.º 41, de 26 de fevereiro de 2003. Dispõe sobre o Painel de Avaliação dos Hepatoprotetores. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 de fevereiro de 2003.

- BRAUTBAR, N.; WILLIAMS, J. Industrial solvents and liver toxicity: Risk assessment, risk factors and mechanisms. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 205, p. 479-491, 2002.
- BRAY, G. A.; TARTAGLIA, L. A. Medicinal strategies in the treatment of obesity. **Nature**, v. 404, p. 672-677, 2000.
- BRENT, J. A.; RUMACK, B. H. Role of free radicals in toxic hepatic injury. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 31, p. 173-196, 1993.
- BREWER, H. B. Focus on high-density lipoproteins in reducing cardiovascular risk. **American Heart Journal**, v. 148, p. 14-18, 2004.
- BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 987-1000, 2005.
- CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.
- CARBONARI, K. A. et al. Free-radical scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. **Redox Report**, v. 11, n. 3, p. 124-130, 2006.
- CARINI, R. et al. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 10, p. 2111-2115, 1992.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.
- CECHINEL FILHO, V. et al. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxyline. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 171-173, 1996.
- CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B. Antispasmodic activity of Xanthoxyline derivatives structure activity relationships. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 84, p. 473-475, 1995.
- CHANOINE, J. P. et al. Effect of orlistat on weight and body composition in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 293, p. 2873-2883, 2005.
- CHAPMAN, M. J. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. **Atherosclerosis**, v. 30, p. 1-13, 2003.
- CHIN, Y.-W. et al. Drug Discovery From Natural Sources. **AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.
- CHOSSON, E. et al. A phloroacetophenone glucoside from *Rhododendron ferrugineum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 87-88, 1998.
- CORNIER, M. A. et al. The metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 777-822, 2008.

- COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, v. 5, p. 77-85, 2004.
- CROW, M. T. et al. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. **Circulation Research**, v. 95, p. 957-970, 2004.
- CSORDÁS, G.; HAJNÓCZKY, G. SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 11, p. 1352-1362, 2009.
- DAI, Y. et al. Acylphloroglucinol glycosides from the fruits of *Pyracantha fortuneana*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 2, p. 111-117, 2008.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.
- DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Drugs and non-alcoholic steatohepatitis. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, p. 238-242, 2006.
- DAVIDSON, M. A review of the current status of the management of mixed dyslipidemia associated with diabetes mellitus and metabolic syndrome. **The American Journal of Cardiology**, v. 102, n. 12A, p. 19L-27L, 2008.
- DEDKOVA, E. N.; BLATTER, L. A. Mitochondrial Ca^{2+} and the heart. **Cell Calcium**, v. 44, n. 1, p. 77-91, 2008.
- DELGADO, E. H. et al. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. **Neurochemical Research**, v. 31, n. 8, p. 1021-1025, 2006.
- DEMAUREX, N.; POBURKO, D. Cell biology. A revolving door for calcium. **Science**, v. 326, n. 5949, p. 57-58; 2009.
- DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 2006.
- DHIMAN, R. K.; CHAWLA, Y. K. Herbal medicines for liver diseases. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 1807-1812, 2005.
- DIMAURO, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial respiratory-chain diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 26, p. 2656-2668, 2003.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUKE, J.A. Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America. New York: CRC Press Taylor & Francis group, 2008. 832p.
- DURRINGTON, P. N. Triglycerides are more important in atherosclerosis than epidemiology has suggested. **Atherosclerosis**, v. 1, p. S57-S62, 1998.
- ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, n. 9468, p. 1415-1428, 2005.

- ELLRICHMANN, M. et al. Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 10, p. 3995-3998, 2008.
- FAVIER, L. et al. Anti-inflammatory activity of acetophenones from *Ophryosporus axilliflorus*. **Planta Medica**, 64:657-659, 1998.
- FEISSNER, R.F. et al. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, 1197-1218, 2009.
- FERNS, G.; KETI, V.; GRIFFIN, B. Investigation and management of hypertriglyceridaemia. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 11, p. 1174-1183, 2008.
- FILIPPATOS, T. D. et al. Orlistat associated adverse events and drug interactions – a critical review. **Drug Safety**, v. 31, p. 53-65, 2008.
- FLORA, K. et al. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 2, p. 139-143, 1998.
- FLORA DIGITAL RS. O projeto Flora Digital do Rio Grande do Sul. Disponível em: <www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php>. Acesso em: 23 set. 2009.
- FOGLIO, A. M. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MutiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a-047.pdf> Acesso em: 10 dez 2009.
- FORD, E. S. et al. Trends in the prevalence of low risk factor burden for cardiovascular disease among United States adults. **Circulation**, v. 120, p. 1181–1188, 2009.
- FRAYN, K. N. Obesity and metabolic disease: is adipose tissue the culprit? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 1, p. 7-13, 2005.
- FRIEDMAN, J. M. Obesity: Causes and control of excess body fat. **Nature**, v. 21, n. 459, p. 340-342, 2009.
- FRIEDMAN, S. L. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. **New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1828-1835, 1993.
- FUJIOKA, Y.; ISHIKAWA, Y. Remnant Lipoproteins As Strong Key Particles to Atherogenesis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 16, n. 3, p. 145-154, 2009.
- GARATTINI, S. et al. In, **Drugs Affecting Lipid Metabolism**, ed. by S. Gerattini and R. Paoletti, Elsevier, Amsterdam, v. 1, n. 1, 1961, 144 p.

- GARCÍA, A. G. et al. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 4, p. 1093-1131, 2006.
- GARLID, K. D. et al. Cardioprotective signaling to mitochondria. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 6, p. 858-866, 2009.
- GAZÁK, R.; WALTEROVÁ, D.; KREN, V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 315-338, 2007.
- GINSBERG, H. N. New Perspectives on Atherogenesis: Role of Abnormal Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism. **Circulation**, n. 106, p. 2137-2142, 2002.
- GINSBERG, H. N. REVIEW. Efficacy and mechanisms of action of statins in the treatment of diabetic dyslipidemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 383-392, 2006.
- GINSBERG, H. N.; MACCALLUM, P. R. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. **Journal of the CardioMetabolic Syndrome**, v. 4, n. 2, p. 113-119, 2009.
- GIRISH, C.; PRADHAN, S. C. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 623-632, 2008.
- GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.
- GOPAL, N.; SENGOTTUVELU, S. Hepatoprotective activity of Clerodendrum inerme against CCl4 induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 79, n. 1, p. 24-26, 2008.
- GRAIER, W. F.; MALLI, R.; KOSTNER, G. M. Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 186-193, 2009.
- GRUNDY, S. M. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 290, p. 3000-3002, 2003.
- GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institutes scientific statement. **Circulation**, v. 18, p. 1-18, 2005.
- GRUNDY, S. M. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes Worlds. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 6, p. 1093-1100, 2006.
- GULATI, K. C.; SETH, S. R.; VENKATARAMAN K. Phloroacetophenone. **Organic Syntheses, Coll.** v. 2, p. 522 (1943); v. 15,

- p.70 (1935). Disponível em:
<http://orgsyn.org/orgsyn/orgsyn/prepContent.asp?prep=cv2p0522>.
- GUNTER, T. E. et al. Calcium and mitochondria. **FEBS Letters**, v. 567, n. 1, p. 96-102, 2004.
- GUSTAFSSON, A. B.; GOTTLIEB, R. A. Heart mitochondria: gates of life and death. **Cardiovascular Research**, v. 77, n. 2, p. 334-343. 2008.
- HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cellular Signalling**, v. 14, p. 879-897, 2002.
- HAJNÓCZKY, G. et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. **Cell Calcium**, v. 40, n. 5-6, p. 553-560, 2006.
- HAKOVÁ, H.; MISÚROVÁ, E. Therapeutical effect of silymarin on nucleic acids in the various organs of rats after radiation injury. **Radiats Biol Radioecol**, v. 36, n. 3, p. 365-370, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3^a ed. New York: Oxford: Clarendon Press, 1999, 936 p.
- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.
- HANEFELD, M.; SACHSE, G. The effects of orlistat on body weight and glycaemic control in overweight patients with type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled trial. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 4, p. 415-423, 2002.
- HANEY, E. M. et al. Screening and treatment for lipid disorders in children and adolescents: systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. **Pediatrics**, v. 120, n. 1, p. 189-214, 2007.
- HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 1685-1695, 2005.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3. ed. London: Chapman and Hall, 1998. 302 p.
- HARTVIGSEN, K. et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 878-885, 2007.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts, based on FE(III) Xylenol orange complex formation, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

- HEWAWASAM, R. P. et al. Protective effect of *Asteracantha longifolia* extract in mouse liver injury induced by carbon tetrachloride and paracetamol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 10, p. 1413-1418, 2003.
- HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1527-1535, 2003.
- HSIEH, C. J. et al. Orlistat for obesity: benefits beyond weight loss. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, p. 78-83, 2005.
- HSU, Y. W. et al. Protective effects of *Dunaliella salina* - A carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3311-3317, 2008.
- HUNG, Y. C. et al. Preventive effect of *Thea sinensis* melanin against acetaminophen-induced hepatic injury in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5284-5289, 2004.
- HUSS, J. M.; KELLY, D. P. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 547-555, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares, 2002-2003. Aquisição alimentar domiciliar per capita, Brasil e grandes regiões**. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro; 2004.
- JAESCHKE, H. et al. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 166-176, 2002.
- JAIN, A. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 61-66, 2008.
- JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 31, n. 12, p. 1499-1506, 2003.
- JATWA, R.; KAR, A. Protective effect of L-ornithine-L-aspartate and silymarin on chemically induced kidney toxicity and thyroid dysfunction in mice. **EXCLI Journal**, v. 7, p. 139-150, 2008.
- JEON, T. I. et al. Extracts of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppress liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 24, p. 2093-2096, 2003.
- JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* - Myrtaceae. **Acta Amazonica**, v. 30, p. 49-57, 2000.

- KAHN, R. Metabolic syndrome: is it a syndrome?. Does it matter?. **Circulation**, v. 115, p. 1806-1811, 2007.
- KANCHANAPOO, J. et al. Inhibitory effects of choleric hydroxyacetophenones on ileal bile acid transport in rats, **Life Sciences**, v. 78, n. 14, p. 1630-1636, 2006.
- KARALIS, K. P. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5747-5754, 2009.
- KILBOURNE, A. M. et al: Cardiovascular disease and metabolic risk factors in patients with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. **Psychosomatics**, v. 48, p. 412-417, 2007.
- KIM, J. S.; HE, L.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 463-470, 2003.
- KODAI, S. et al. S-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats. **Free Radical Research**, v. 41, n. 4, p. 489-497, 2007.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.
- KUMANYIKA, S. K. The obesity Epidemic: Looking in the Mirror. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 3, p. 243-245, 2007.
- KUMARAVELU, P. et al. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 11, p. 1703-1707, 1995.
- KUO, D. H. et al. Effect of shanzha, a Chinese herbal product, on obesity and dyslipidemia in hamsters receiving high-fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 544-550, 2009.
- LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.
- LAMON, B. D.; HAJJAR, D. P. Inflammation at the molecular interface of atherogenesis: an anthropological journey. **American Journal of Pathology**, v. 173, n. 5, p. 1253-1264, 2008.
- LANG, A.; FROELICHER, E. S. Management of overweight and obesity in adults: behavioral intervention for long-term weight loss and maintenance. **European Journal of Cardiovascular Nursing**, v. 5, n. 2, p. 102-114, 2006.
- LARSON, A. M. et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. **Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 1364-1372, 2005.

- LAVIE, C.; MILANI, R.; VENTURA, H. Obesity and Cardiovascular Disease Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, p. 1925-1932, 2009.
- LEE, K. R. et al. Phenolic constituents from the aerial parts of *Artemisia stolonifera*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 19, p. 231-234, 1996.
- LEE, K. S. et al. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. **Yonsei Medical Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2001.
- LEE, W. Drug-induced hepatotoxicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 474-478, 2003.
- LEE, W. M. Acetaminophen Toxicity: Changing Perceptions on a Social/Medical Issue. **Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 966-970, 2007.
- LEE, H. S. et al. Morin protects acute liver damage by carbon tetrachloride (CCl₄) in rat. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 9, p. 1160-1165, 2008.
- LENS, S. et al. Severe acute hepatitis in the dress syndrome: Report of two cases. **Annals of Hepatology**, v. 9, n. 2, p. 198-201, 2010.
- LENZ, M.; RICHTER, T.; MÜHLHAUSER, I. The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review. **Deutsches Aerzteblatt international**, v. 106, n. 40, p. 641-648, 2009.
- LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.
- LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 790-796, 2002.
- LIM, P.S. et al. Increase in oxidative damage to lipids and proteins in skeletal muscle of uremic patients. **Free Radical Research**, v. 36, n. 3, p. 295-301, 2002.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.
- LIN, H.-M. et al. Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 283-293, 2008.
- LIU, Y.; WANG, M. W. Botanical drugs: Challenges and opportunities: Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 445-449, 2008.
- LORIA, P.; LONARDO, A.; TARGHER, G. Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis. **Clinical Science**, v. 115, n. 1, p. 1-12, 2008.

- LUENGO FERNÁNDEZ, E. et al. Obesidad, dislipemia y síndrome metabólico. **Revista Española de Cardiología**, v. 5, 21-29, 2005.
- MACBRIDE, P. Triglycerides and risk for coronary artery disease, **Corrent Atherosclerosis Reports**, v. 10, n. 5, p. 386-390, 2008.
- MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. L. G.; GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2917-2936, 2007.
- MALLIKA, V.; GOSWAMI, B.; RAJAPPA, M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. **Angiology**, v. 58, n. 5, p. 513-522, 2007.
- MANNA, S. K. et al. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 12, p. 6800-6809, 1999.
- MANSOUR, H. H.; HAFEZ, H. F.; FAHMY, N. M. Silymarin Modulates Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Rats. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 6, p. 656-661, 2006.
- MARINOU, K. et al. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. **International Journal of Cardiology**, v. 138, n. 1, p. 3-8, 2010.
- MARTINS, V. P. et al. Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 40, n. 4, p. 297-305, 2008.
- MARTINS, F. et al. Mate tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat-diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 42-47, 2010.
- MASSICOTTE, C. et al. Effects of organophosphorus compounds on ATP production and mitochondrial integrity in cultured cells. **Neurotoxicity Research**, v. 7, n. 3, p. 203-217, 2005.
- MASUBUCHI, Y.; SUDA, C.; HORIE, T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 1, p. 110-116, 2005.
- MATHIESEN, L.; MALTERUD, K. E.; SUND, R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of c-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 307-311, 1997.
- MATOS, L. C.; MARTINS, B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, v. 12, n. 4, p. 239-258, 2005. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol12/vol12_n4_2005_239-258.pdf>. Acesso em: 15 set. 2009.

- MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. V. Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, IV, and V. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 429-31, 2002.
- MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T.,. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.
- MCNALLY, P. R. Drug-Induced Liver Disease. GI/Liver Secrets. **Info Access**, p. 174-175, 1996.
- MCNEELY, W.; BENFIELD, P. Orlistat. **Drugs**, v. 56, p. 241-249, 1998.
- MCSTAY, G. P.; CLARKE, S. J.; HALESTRAP, A. P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochemical Journal**, v. 367, p. 541-548, 2002.
- MEAD, J.; IRVINE, S.; RAMJI, D. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease, **Journal of Molecular Medicine**, v. 12, p. 753-769, 2002.
- MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1745-1750, 2000.
- MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipogenesis and lipotoxicity: Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1). **Public Health Nutrition**, v. 10, p. 1132-1137, 2007.
- MISRA, A.; KHURANA, L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 11, p. s9-s30, 2008.
- MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 7, n. 1, p. 3-32, 2006.
- MUKHERJEE, M. Human digestive and metabolic lipases - a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, p. 369-376, 2003.
- MURIEL, P.; MORENO, M. G.; HERNANDEZ, M. del C. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl4 administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 375-380, 2005.
- MURIEL, P.; RIVERA-ESPINOZA, Y. Beneficial drugs for liver diseases. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 93-103, 2008.

- MURRAY, R. K. et al. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 27th ed. McGraw-Hill Medical: New York, 2006. 672p
- NATHWANI, R. A. et al. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. **Hepatology**, v. 41, n. 2, p. 380-382, 2005.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PANEL (NCEP): Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, p. 3143-3421, 2002.
- NEGI, A. S. et al. Recent advances in plant hepatoprotectives: A chemical and biological profile of some important leads. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 5, p. 746-772, 2008.
- NEUMEYER, D. D.; FERGUSON-MILLER, S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 481-490, 2003.
- NICHOLLS, D. Mitochondrial Bioenergetics, Aging, and Aging-Related Disease. **Science of Aging Knowledge Environment**, v. 2002, n. 31, p. pe12, 2002.
- NIERO, R. et al. Isolation of triterpenes and an acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. Ex Boiss (Euphorbiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 15, p. 239-242. 1996.
- NIUMSAKUL, S. et al. An antioxidative and cytotoxic substance extracted from *Curcuma comosa* Roxb., **Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine**, v. 5, n. 1, p. 24-29, 2007.
- NOEL, S.; SHARMA, S.; RATH, S. K. Simultaneous application of t-test and fold change criteria to identify acetaminophen and carbon tetrachloride affected genes in mice liver. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 150-161, 2008.
- OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.
- OZTURK, F. et al. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. **Urology**, v. 62, n. 2, p. 353-356, 2003.
- PACKARD, R. R.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2008.
- PADWAL, R. S.; MAJUMDAR, S. R. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. **Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 71-77, 2007.

- PAFUMI, Y. et al. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 31, p. 28070-28079, 2002.
- PAGLIARINI, D. J.; DIXON, J. E. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, p. 26-34, 2006.
- PANTKE, U. et al. Grune, Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 1080-1086, 1999.
- PARRA, J. L.; REDDY, K. R. Hepatotoxicity of hypolipidemic drugs. **Clinics In Liver Disease**, v. 7, n. 2, p. 415-433, 2003.
- PARDINA, E. et al. Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis. **Obesity Surgery**, v. 19, n. 5, p. 608-616, 2009.
- PARK, K. W.; LEE, J. E.; PARK, K. M. Diets containing *Sophora japonica* L. prevent weight gain in high-fat diet-induced obese mice. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 819-824, 2009.
- PASTORINO, J. G.; HOEK, J. B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 40, n. 3, p. 171-182, 2008.
- PEPATO, M. T. et al. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotcin diabetic rats. **Diabetes Research**, v. 22, p. 49-57, 1993.
- PILLAI, A. A.; RINELLA, M. E. Non-alcoholic fatty liver disease: is bariatric surgery the answer? **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 4, p. 689-710, 2009.
- PIYACHATURAWAT, P. et al. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. **Hepatology Research**, v. 12, p. 198-206, 1998.
- PIYACHATURAWAT, P. et al. Choleric activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. **European Journal of Pharmacology**, v. 37, p. 221-227, 2000.
- PIYACHATURAWAT, P. et al. Cholesterol lowering effects of a choleric phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. **European Journal of Pharmacology**, v. 439, p. 141-147, 2002a.
- PIYACHATURAWAT, P. et al. Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. **Toxic Letters**, v. 129, p. 123-132, 2002b.
- POIRIER, P. et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association scientific statement on obesity and heart disease from the

obesity committee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism. **Circulation**, v. 113, p. 898-918, 2006.

PRADHAN, S. C.; GIRISH, C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. **Indian Journal of Medical Research**, v. 124, n. 5, p. 491-504, 2006.

PRAMYONTHIN, P. et al. Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. extract in ethanol treated rats: in vitro and in vivo studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 169-173, 2007.

RADER, D. J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 904-913, 2008.

RAJANI, G. P.; ASHOK, P. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 227-232, 2009.

RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 139-154, 1989.

REIS, P. M. et al. Influence of Surfactants on Lipase Fat Digestion in a Model Gastro-intestinal System. **Food Biophysics**, v. 3, p. 370-381, 2008.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

RUSSO, E. M. K. et al. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, p. 11-20, 1990.

SAITO, Y. et al. Obesity as a Risk Factor for Coronary Events in Japanese Patients with Hypercholesterolemia on Low-Dose Simvastatin Therapy. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 17, n. 3, p. 270-277, 2010

SARWAR, N. et al. Triglycerides and the Risk of Coronary Heart Disease: 10 158 Incident Cases Among 262 525 Participants in 29 Western Prospective Studies. **Circulation**, v. 115, n. 4, p. 450-458, 2007.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacology Research**, v. 58, n. 2, p. 165-171, 2008.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. Influência de triglicérides na concentração sérica de triglicérides. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

- SCHIEFFER, B.; DREXLER, H. Role of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. **American Journal of Cardiology**, v. 91, p. 12H-18H, 2003.
- SCHITTMAYER, M.; BIRNER-GRUENBERGER, R. Functional proteomics in lipid research: lipases, lipid droplets and lipoproteins. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 6, p. 1006-1018, 2009.
- SEVER, P. S. et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 361, n. 9364, p. 1149-1158, 2003.
- SHAILAJAN, S. et al. Effect of *Asteracantha longifolia* Nees. against CCl₄ induced liver dysfunction in rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, n. 1, p. 68-75, 2005.
- SHEWEITA, S. A.; ABD EL-GABAR, M.; BASTAWY, M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. **Toxicology**, v. 165, n. 2-3, p. 217-224, 2001.
- SHI, Y.; BURN, P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 695-710, 2004.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SILVA, V. M.; HENNIG, G. E.; MANAUTOU, J. E. Cholestasis induced by model organic anions protects from acetaminophen hepatotoxicity in male CD-1 mice. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 3, p. 204-211, 2006.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M. e ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.
- SITNICK, M.; BODINE, S. C.; RUTLEDGE, J. C. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 23, p. 5753-565, 2009.
- SKOTTOVÁ, N. et al. Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in

- hereditary hypertriglyceridemic rats. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 123-130, 2004.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Sobrepeso e Obesidade: Diagnóstico. **Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, p. 1-9, 2004.
- SØRENSEN, T. I.; VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Obesity as a clinical and public health problem: Is there a need for a new definition based on lipotoxicity effects? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, n. 3, p. 400-404, 2010.
- SOUZA, M. da C. et al. Subtribo Myrciinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 49-63. 2007.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG II**. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008, 640 p.
- SPÄT, A. et al. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. **Cell Calcium**, v. 44, n. 1, p. 51-63, 2008.
- SPITELLER, G. Is Atherosclerosis a Multifactorial Disease or Is It Induced by a Sequence of Lipid Peroxidation Reactions? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 355-366, 2005.
- SPOSITO, A. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 1, p. 1-19, 2007.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, N. 3-4, p. 207-218, 2003.
- STEBBENS, W. E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 75, p. 265-276, 2003.
- STEIN, Y.; STEIN, O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 1-9, 2003.
- STEINBERGER, J. et al. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 119, n. 4, p. 628-647, 2009.
- SUKSAMRARN, A. et al. A phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 103-105, 1997.

- SZABADKAI, G.; DUCHEN, M. R. Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. **Physiology**, v. 23, p. 84-94, 2008.
- SZEWCZYK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 1, p. 101-127, 2002.
- TESELKIN, Y. O. et al. Dihydroquercetin as a means of antioxidative defence in rats with tetrachloromethane hepatitis. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 160-162, 2000.
- TRIGGLE, D. J. Drug Discovery and Delivery in the 21st Century. **Medical Principles and Practice**, v. 16, p. 1-14, 2007.
- TSUJIMOTO, Y.; NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1297-1300, 2006.
- UESHIMA, K. et al. A gastrointestinal lipase inhibitor reduces progression of atherosclerosis in mice fed a western-type diet. **European Journal of Pharmacology**, v. 501, p. 137-142, 2004.
- UNGER, R. H. Lipotoxic Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 319-36, 2002.
- UPADHYAY, G.; KUMAR, A.; SINGH, M. P. Effect of silymarin on pyrogallol- and rifampicin-induced hepatotoxicity in mouse. **European Journal of Pharmacology**, v. 565, p. 190-201, 2007.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN AKEN, G. A. Relating Food Emulsion Structure and Composition to the Way It Is Processed in the Gastrointestinal Tract and Physiological Responses: What Are the Opportunities? **Food Biophysics**, p. 1-26, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/h3741236t5586q82/fulltext.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2010.
- VAN GAAL, L. et al. Modern, new pharmacotherapy for obesity. A gastrointestinal approach. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 6, p. 1049-1072, 2004.
- VOGEL, Arthur I. Análise orgânica qualitativa. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 3 v., 1983.
- WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 359-407, 2005.
- WALLACE, D. C.; FAN, W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. **Mitochondrion**, v. 10, n. 1, p. 12-31, 2010.

- WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: Risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. **Journal of Internal Medicine**, v. 255, p. 188-205, 2004.
- WALTER, L. et al. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. **Free Radical Research**, v. 36, p. 405-412, 2002.
- WANG, D. H.; ISHII, K.; TAKETA, K. Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury in acatalasemic mice by hepatic iron deprivation. **Hepatology Research**, v. 10, p. 237-247, 1998.
- WANG, Y.; BEYDOUN, M. A. The obesity epidemic in the United States - Gender, Age, Socioeconomic, Racial/Ethnic, and Geographic Characteristics: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. **Epidemiologic Reviews**, v. 29, n. 1, p. 6-28, 2007.
- WEAVER, J. U. Classical endocrine diseases causing obesity. **Frontiers of Hormone Research**, v. 36, p. 212-228, 2008.
- WEBER, L. W.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 105-36, 2003.
- WEISS, J. N. et al. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. **Circulation Research**, v. 93, n. 4, p. 292-301, 2003.
- WELLINGTON, K.; JARVIS, B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. **BioDrugs**, v. 15, n. 7, p. 465-489, 2001.
- WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 1, p. 1-17, 2007.
- WOLF, P. L. Biochemical diagnosis of liver diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 14, p. 59-90, 1999.
- WOO, M. N. et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (SandS PWH) in rats fed high-fat diets. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 169-178, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional Medicine Strategy: 2002–2005. Geneva, 2002, 66 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact sheet: obesity and overweight. 2006.
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>>.
Acessado em: 09.mai.2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention of Cardiovascular Disease. Guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk, World Health Organization, Geneva, 2007, 86 p.

XIE, W. et al. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: Different from fibrates but similar to statins. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 103, p. 267-274, 2007.

YASKIN, J.; TONER, R. W.; GOLDFARB, N. Obesity management interventions: a review of the evidence. **Population health management**, v. 12, n. 6, p. 305-316, 2009.

YOSHIKAWA, M. et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 113-119, 1998.

YUAN, G.; AL-SHALI, K. Z.; HEGELE, R. A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. **Canadian Medical Association Journal**, v. 176, n. 8, p. 1113-1120, 2007.

ZALESIN, K. C. et al. Impact of obesity on cardiovascular disease. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 663-684, 2008.

ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 1999.

ANEXO

Resultados da Dissertação de Mestrado de Eduardo Antonio Ferreira (2005).

Compounds	CE ₅₀ (µg/ml)			
	DPPH	O ₂ ^{•-}	•OH	LPO
2',4',6'-trihidroxiacetofenona - THA	76,4 ± 0,7	66,4 ± 2,1	113,9 ± 1,2	151,7 ± 0,7
2',3',4'-trihidroxiacetofenona	17,7 ± 0,4	> 1000	> 1000	> 500
2'-hidroxiacetofenona	> 1000	> 1000	964,6 ± 0,5	> 500
2',6'-dihidroxiacetofenona	276,6 ± 0,5	s.a.	886,6 ± 1,6	> 500
3'-nitroacetofenona	> 1000	s.a.	940,0 ± 1,6	> 500
4'-nitroacetofenona	> 1000	s.a.	> 1000	> 500
4'-aminoacetofenona	> 1000	s.a.	> 1000	s.a.
3',4'-dicloroacetofenona	> 1000	> 1000	> 1000	s.a.
4'-metoxiacetofenona	s.a.	> 1000	> 1000	s.a.

Concentração eficaz 50% (CE₅₀).

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.