



## **AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA REDUÇÃO DE DANOS HEPÁTICOS INDUZIDO POR CCL4**

**Daniela Pereira da Silva Alves<sup>1\*</sup> (IC), Dorcas Fernandes dos Anjos Melo<sup>1,2</sup> (PQ), Marina Alves Coelho Silva<sup>2</sup> (PQ), Luiz Carlos da Cunha<sup>2</sup> (PQ).**

Email:daniela\_pgt@hotmail.com

Universidade Estadual de Goiás (UEG).  
Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal de Goiás (UFG).

As doenças hepáticas são decorrentes das atividades desenvolvidas pelo fígado, como metabolização e desintoxicação de substâncias. O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade hepatoprotetora do ácido rosmarínico (AR) puro, in vivo (ratos fêmeas), no tratamento das doenças hepáticas após intoxicação com tetracloreto (CCL4). Os dados fisiológicos e o potencial hepatoprotetor foram observados através dos exames bioquímicos e hematológicos da dosagem sanguínea das enzimas hepáticas L-alanina aminotransferase (ALT), L-aspartato aminotransferase (AST),  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) e a fosfatase alcalina (ALP). Assim como pela dosagem de malondialdeído (MDA) em soro e histologia celular. O MDA é um biomarcador que possibilita a quantificação do estresse oxidativo celular nos sistemas biológicos. Este apresenta valores de referência variável, sendo utilizados como parâmetro de acordo com as condições experimentais. Com o auxílio da microscopia pode-se avaliar os tecidos biológicos hepáticos, obtendo assim maior confiabilidade dos resultados. Os achados histológicos foram compatíveis com os clínicos. Os animais intoxicados com o CCl4 aumentaram os níveis de MDA e tiveram necrosamento das células hepáticas. No entanto, os animais que receberam o AR obtiveram uma redução nos níveis de MDA, consequentemente, teve-se uma minimização da inflamação a nível celular. Conclui-se que nas doses estabelecidas para análise observou-se bons resultados hepatoprotetores

Palavras-chave: antioxidante, hepatoproteção, lipoperoxidação, tetracloreto de carbono.

### **Introdução**

A humanidade juntamente com a comunidade científica tem buscado diariamente metodologias que possibilitem o aumento da qualidade de vida. (DENMARK & MAYER, 2014). Dentre as tratativas, o uso de plantas medicinais tornou-se um dos tratamentos terapêuticos e profiláticos mais utilizado (ZHONG, 2011).



Estudos das plantas medicinais permitiram um rápido desenvolvimento dos campos específicos da química e da medicina moderna, pois muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (KIM et al., 2013). O ácido rosmarínico (AR), trata-se de um composto polifenólico, é um éster do ácido caféico encontrado em várias espécies de plantas, com uma multiplicidade de efeitos biológicos, como atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante (COSTA et al., 2013).

A avaliação do ácido rosmarínico isolado (puro) é importante para garantir a sua utilização segura em seres humanos, assim como sua eficácia na hepatoproteção associada ao seu teor antioxidante in vivo.

## Material e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas oriundas do Biotério Central da UFG, sendo animais adultos jovens com 8 a 12 semanas de vida e o peso entre 180 a 240 g, não excedendo 20% da média do grupo. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, de forma coletiva, onde permaneceram por um período de adaptação (aclimatização). As salas onde os animais ficaram alojados foram mantidas sob condições ambientais controladas (temperatura ambiente de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de 50-60% e ciclo claro/escuro de 12h), com água filtrada e ração Labina Presence®.

Os animais foram tratados por gavagem com volume máximo administrado não maior que 1 mL/100g (10 mL/kg) de massa corpórea de animais. Foram utilizados 8 grupos com 5 animais em cada. Um grupo basal, um recebendo veículo, um controle positivo tratado com tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) e, os demais grupos receberão distintas doses de AR, sempre após receberem  $\text{CCl}_4$ . Dados fisiológicos (peso, consumo de água, consumo de ração, produção de fezes e urina) e alterações comportamentais anormais durante o estudo, foram observados e anotados. Parâmetros hepáticos foram analisados em todos os grupos: aminotransferases – AST (aspartato-aminotransferase) e ALT (alanina-aminotransferase) e malondialdeído (MDA, marcador da atividade oxidativa).



Ao final dos experimentos, todos os animais (ratos) foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g (8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), e eutanasiados por incisão e perfusão do diafragma.

A histologia serve como mecanismo de visualização das células e garante uma maior confiabilidade dos resultados. Portanto, foram realizados testes histológicos através da microscopia, para avaliar a presença ou ausência de danos celulares nos tecidos hepáticos.

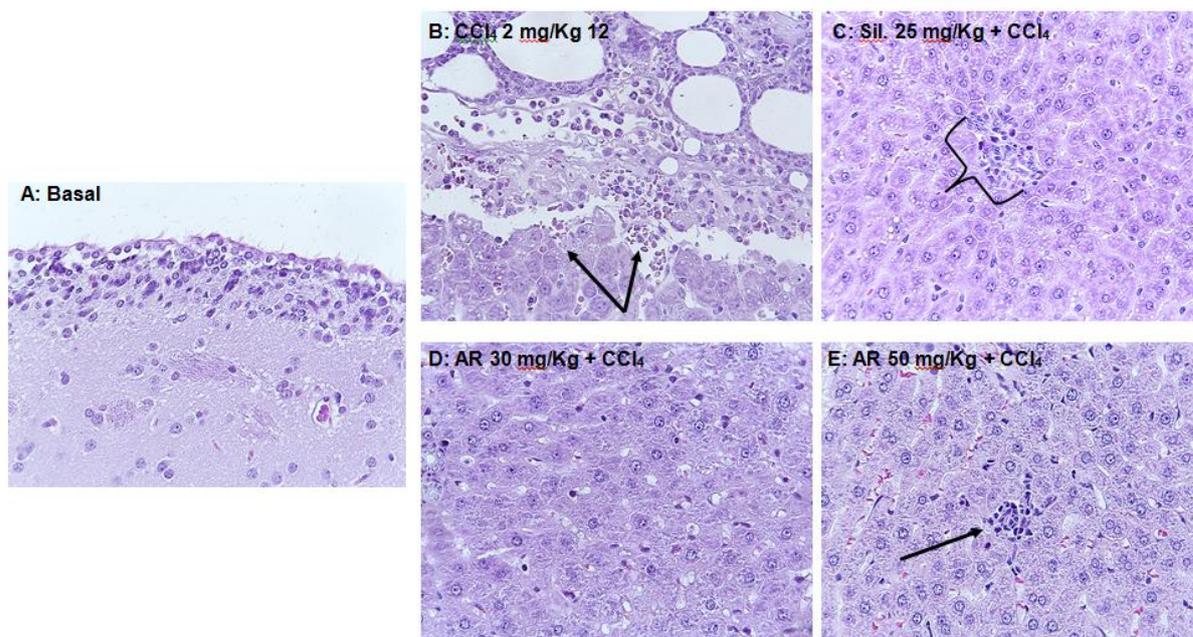
## Resultados e Discussão

Os sinais característicos de danos no fígado estão relacionados ao extravasamento de substâncias, ditas marcadores hepáticos, através da membrana dos hepatócitos para a corrente sanguínea, aumentando suas concentrações no plasma e/ou soro.

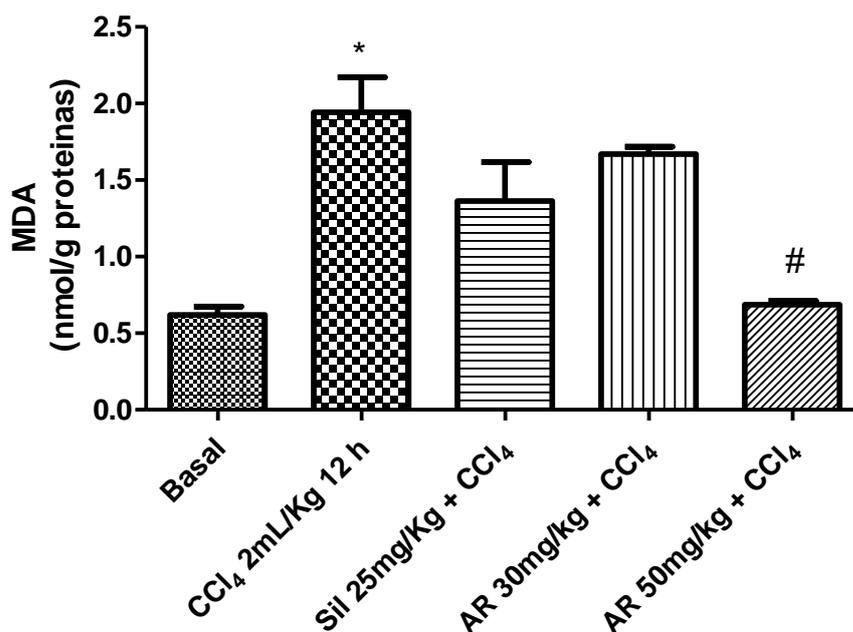
Considerando que o aparecimento de necrose tecidual é o limite às alterações celulares, por ser uma consequência frequente de processos inflamatórios, degenerativos e infiltrativos, além de alterações circulatórias. Podendo ser resultado de uma injúria celular irreversível, caracterizando a incapacidade de restauração do equilíbrio homeostático.

Os achados histológicos hepáticos (Figura 1D e 1E) corroboram com achados clínicos, apresentando pouca inflamação. Assim como os resultados observados na figura 2, onde os níveis de MDA (marcador de intoxicação) no fígado foram favoráveis ao AR, ou seja o grupo intoxicado CCl<sub>4</sub> 2 mL/Kg por 12 horas (grupo 2) aumentou os níveis de MDA ( $p < 0,05$  comparado ao grupo basal), como era esperado. Enquanto os grupos de animais que receberam AR, principalmente na dose de 50 mg/kg (grupo 5) conseguiram reduzir a intoxicação produzida pelo CCl<sub>4</sub> quando da observação de níveis baixos de MDA,  $p < 0,5$  (figura 2).

**Figura 1:** Fotomicrografias de amostras de fígado de ratos, coradas H & E. **A:** Grupo controle Basal (sem tratamento – grupo 1): aspecto normal; **B:** Grupo controle intoxicado com CCl<sub>4</sub> 2 mL/Kg por 12 horas (grupo 2): presença de degeneração necrótica com inflamação da cápsula; **C:** Grupo controle tratado com Silimarina 25 mg/Kg p.c + CCl<sub>4</sub> (grupo 3): aspecto normal; **D:** Grupo tratado com AR 30 mg/Kg p.c + CCl<sub>4</sub> (grupo 4): presença de inflamação; **E:** Grupo tratado com AR 50 mg/Kg p.c + CCl<sub>4</sub> (grupo 5): presença de inflamação. (n = 5 animais / grupo).



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



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

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

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



## Considerações Finais

As enzimas AST e ALT reduziram significativamente seus níveis plasmáticos, assim como achados histológicos, comparados ao grupo controle intoxicado com  $\text{CCl}_4$  2 mL/Kg ( $p < 0,05$ ). O MDA manteve-se elevado a medida que houve a intoxicação e oxidação das células hepáticas, e reduziu-se nos animais tratados com o ácido rosmarínico, permitindo uma minimização da inflamação e conseqüentemente da necrose celular. Pelos resultados observados o ácido rosmarínico demonstrou ser protetor de lesões hepáticas induzidas por tetracloreto de carbono em todos os ensaios realizados.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e a FAPEG pelo custeio e incentivo para realização deste projeto.

## Referências

- COSTA, P., SARMENTO, B., GONÇALVES, S., ROMANO, A. **Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line.** *Industrial Crops and Products*, v. 50, pg. 361–365, 2013.
- DENMARK, V. K. & MAYER, L. **Inflammatory Bowel Diseases.** *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)*, pg. 873-888, 2014.
- KARTHIKKUMAR, V., SIVAGAMI, G., VINOTHKUMAR, R., RAJKUMAR, D., Nalini, N. **Modulatory efficacy of rosmarinic acid on premalignant lesions and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis.** *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 34, pg. 949–958, 2012.
- KALANTARI, H.; AGHEL, N.; BAYATI, M. **Hepatoprotective effect of *Morus alba* L. in carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in mice.** *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 17(1), p. 90-94, 2009.
- KIM, Y. B., KIM, J. K., UDDIN, M. R., XU, H. Woo Tae Park, Pham Anh Tuan, Xiaohua Li, Eunsook Chung, Jai-Heon Lee, Sang Un Park. **Metabolomics Analysis and Biosynthesis of Rosmarinic Acid in *Agastache rugosa* Kuntze Treated with Methyl Jasmonate.** *PLOS ONE*, v. 8, pg. 1-8, 2013.

REALIZAÇÃO

PRG  
Pró-Reitoria de  
Graduação

PRP  
Pró-Reitoria de  
Pesquisa e  
Pós-Graduação

PRE  
Pró-Reitoria de  
Extensão, Cultura e  
Assuntos Estudantis



Universidade  
Estadual de Goiás



V Congresso de Ensino,  
Pesquisa e Extensão da UEG



ZHONG, J. J. Plant Secondary Metabolites. **Comprehensive Biotechnology (second edition)**. Industrial Biotechnology and Commodity Products, v. 3, pg. 299-308, 2011.

WOLFENDER, J. L., RUDAZ, S., CHOI, Y. H., KIM, H. K. **Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers**. Current Medicinal Chemistry, v. 20, pg. 1056-1090, 2013.

---

REALIZAÇÃO

PRG  
Pró-Reitoria de  
Graduação

PRP  
Pró-Reitoria de  
Pesquisa e  
Pós-Graduação

PRE  
Pró-Reitoria de  
Extensão, Cultura e  
Assuntos Estudantis



Universidade  
Estadual de Goiás