



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO (-)-ALFA-
BISABOOL EM MODELO ANIMAL DE
HEPATOTOXICIDADE AGUDA**

FORTALEZA

2021

HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO (-)-ALFA-BISABOOL
EM MODELO ANIMAL DE HEPATOTOXICIDADE AGUDA

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal do Ceará Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N195a Nascimento, Helaynne Gomes do.

Avaliação do efeito protetor do (-)-alfa-bisabolol em modelo animal de hepatotoxicidade aguda /
Helaynne Gomes do Nascimento. – 2021.

55 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

1. Lesão Hepática Aguda. 2. (-)-alfa-Bisabolol. 3. Hepatoproteção. I. Título.

CDD 615

HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO (-)-ALFA-BISABOOL EM MODELO
ANIMAL DE HEPATOTOXICIDADE AGUDA

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Erlânia Alves de Siqueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Regina e Hildebrando.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Regina Claudia e Hildebrando Chaves, que são a minha maior inspiração e a base de tudo o que tenho e sou. Por todo amor, por todo carinho, por toda a atenção, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Eu amo vocês!

Ao Thiago Silva, por ser meu companheiro e melhor amigo. Por todo amor, carinho, atenção, apoio e dedicação, durante toda essa árdua trajetória estive ao meu lado nos momentos bons e ruins, buscando mostrar sempre o lado positivo das coisas e acreditando em mim.

Aos meus avós maternos, Maria Ilca e Domingos Pereira, e paternos, Maria Chaves e Pedro Tomé (*in memoriam*), que mesmo de longe sempre me deram apoio necessário para me ajudar a concluir esta etapa.

Aos meus tios e tias, em especial minhas tias: Marineide, Erineide, Meire, Vera e Rejane, que foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui, por todo carinho, cuidado, atenção, incentivo e durante esta minha jornada.

Aos meus primos e primas, em especial minhas primas: Wilkele, Késsia e Suelen, por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos da minha vida, pelo carinho, atenção e confiança em mim.

A todos os meus familiares que de maneira direta ou indireta acreditaram e me apoiaram durante todo esse tempo para a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ramon de Paula Pessoa, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Bioquímica Clínica e Bioprospecção Farmacêutica, para que eu pudesse desenvolver as minhas atividades da monografia, e por todo o seu apoio, dedicação e confiança no meu trabalho. Sou grata por todos os momentos que tive nesse último ano de iniciação científica fazendo parte dessa equipe maravilhosa!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Tiago Sampaio, por toda a dedicação, paciência e disposição em ajudar na idealização e execução desse trabalho.

Ao pós-graduando Emanuel Magalhães, por todo o apoio, ajuda e suporte durante a realização desse trabalho.

A pós-graduanda Me. Erlânia Alves, por gentilmente ter aceitado participar da banca de avaliação deste trabalho.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, por ceder o seu laboratório para a realização dos experimentos e por todo apoio ao nosso grupo de pesquisa.

A todos os meus colegas de iniciação científica do nosso laboratório por todo

apoio e disposição na realização dos experimentos.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET/UFC – Farmácia), que foi um divisor de águas para o meu crescimento pessoal e profissional. A todos os membros do grupo, os quais tive a oportunidade de dividir e compartilhar diversas experiências durante quase 3 anos dessa minha jornada acadêmica, vocês foram e são incríveis!

À Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides, responsável pelo Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec), por ter me concedido a primeira a oportunidade de ingressar na iniciação científica, e me proporcionar ensinamentos indescritíveis acerca da ciência durante os 4 primeiros anos da graduação. Às minhas orientadoras durante esse período, Dra. Annyta Frota e Dra. Vitória Soares, por todo carinho, ensinamentos e aprendizados. Ao meu colega, Pedro Nonato, por compartilhar comigo as suas experiências da iniciação científica nesse período, pelos momentos bons e ruins, e por sempre me dar apoio.

Aos amigos de graduação Anderson, Lara, Allyson, Thayane, Ingrid, Ana Carolina, Ana Beatriz, Landerson, João Pedro, Daniel, Brenda e Ian por quem tenho um enorme carinho, por toda a vivência e momentos compartilhados, vocês foram importantes para tornar essa jornada mais leve e alegre.

Às minhas amigas, Ana Carolina e Nicole Cavalcante, por todo companheirismo durante esses anos de amizade, e por sempre acreditarem em mim. Tenho enorme carinho por vocês!

Ao CNPq, CAPES, Funcap e UFC, pela manutenção do apoio financeiro durante todo o período da minha graduação.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará (UFC), e também da Universidade Estadual do Ceará (UECE), que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.”

Paulo Coelho

RESUMO

A lesão hepática aguda (LHA) é uma condição caracterizada pelo acometimento abrupto e grave da função hepática. É considerada uma das situações clínicas mais graves em pacientes e é comumente induzida por medicamentos. Dentre os mecanismos propostos para a LHA, destaca-se a produção de metabólitos reativos tóxicos, que causam estresse oxidativo e, conseqüente, morte de hepatócitos. As limitadas opções terapêuticas para o tratamento de pacientes com LHA são voltadas a induzir o aumento dos estoques de moléculas antioxidantes no tecido hepático. Assim é relevante a pesquisa de novas moléculas hepatoprotetoras, especialmente que possuam atividade antioxidante. O (-)-alfa-Bisabolol é um álcool sesquiterpeno, monocíclico, lipofílico e de baixo peso molecular, obtido, principalmente, da Camomila (*Matricaria recutita*) e que apresenta muitas bioatividades, dentre elas efeito nefroprotetor, antioxidante e gastroprotetor. Dessa maneira, o presente estudo objetivou avaliar o efeito hepatoprotetor do (-)-alfa-Bisabolol em modelo animal de lesão hepática aguda. Camundongos *swiss* machos (10 animais por grupo) foram tratados com (-)-alfa-Bisabolol por cinco dias consecutivos nas doses de 1, 5 e 10 mL/Kg. Duas horas após a última administração, a hepatotoxicidade foi induzida (com exceção do grupo controle, que recebera azeite de oliva) via i.p. com CCl₄ (0,01 mL/Kg de uma solução a 0,2% em azeite de oliva). Salina foi utilizada no grupo controle negativo e silimarina, como controle positivo. 24 horas após indução, amostras de sangue e tecido hepático foram coletadas para a realização das análises. Foi realizada a dosagem da atividade plasmática de AST, ALT e FAL, além da concentração de albumina. Além disso, fragmentos do tecido hepático foram homogeneizados para determinação da concentração de glutatona reduzida. Além disso, o tecido foi fixado em lâmina, corado e submetido à análise histológica. A indução com CCl₄ foi capaz de causar a lesão hepática, o que foi observado através do aumento da atividade plasmática de ALT e AST, a redução de GSH hepático e a observação de alterações histológicas. O Bisabolol foi capaz de prevenir o aumento das aminotransferases e a redução de GSH. Além disso, foi observado redução do dano tecidual nos grupos tratados com a substância em estudo. Em conclusão, os resultados demonstram que o alfa-Bisabolol apresenta efeito hepatoprotetor. Novos estudos podem ser realizados para identificar os mecanismos envolvidos nesse efeito, permitindo o desenvolvimento de novos fármacos e ferramentas farmacológicas.

Palavras-chave: Lesão Hepática Aguda. (-)-alfa-Bisabolol. Hepatoproteção.

ABSTRACT

Acute liver injury (LHA) is a condition characterized by abrupt and severe impairment of liver function. It is considered one of the most serious clinical hypotheses in patients and is commonly induced by drugs. Among the mechanisms proposed for an LHA, the production of toxic reactive metabolites, which cause oxidative stress and, consequently, death of hepatocytes, stands out. The limited therapeutic options for the treatment of patients with LHA are aimed at inducing an increase in the stocks of antioxidant molecules in the liver tissue. Thus, it is relevant to search for new hepatoprotective molecules, especially those that have antioxidant activity. The (-)-alpha-Bisabolol is a sesquiterpene, monocyclic, lipophilic and low molecular weight alcohol, mainly from Chamomile (*Matricaria recutita*) and which has many bioactivities, including nephroprotective, antioxidant and gastroprotective effects. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of the hepatoprotective of (-)-alpha-Bisabolol in an animal model of acute liver injury. Male Swiss mice (10 animals per group) were treated (-)-alpha-Bisabolol for five consecutive days in doses of 1, 5 and 10 mL/kg. Two hours after the last administration, hepatotoxicity was induced (with the exception of the group control, which had received olive oil) via ip with CCl₄ (0.01 mL/Kg of a 0.2% solution in olive oil). Saline was used in the negative control group and silymarin, as a positive control. 24 hours after induction, blood and liver tissue were collected for analysis. Plasma activity of AST, ALT and FAL was measured, in addition to the concentration of albumin. In addition, fragments of the liver tissue were homogenized to determine the reduced glutathione concentration. In addition, the tissue was fixed in a slide, stained and submitted to histological analysis. Induction with CCl₄ was able to cause liver damage, which was observed by increasing the plasmatic activity of ALT and AST, the reduction of hepatic GSH and the observation of histological changes. Bisabolol is able to prevent an increase in aminotransferases and a reduction in GSH. In addition, a reduction in tissue damage was observed in the groups treated with the test substance. In conclusion, the results demonstrate that alpha-Bisabolol has a hepatoprotective effect. New studies can be carried out to identify the elements involved in this effect, allowing the development of new drugs and pharmacological tools.

Keywords: Acute Liver Injury. (-)-alpha-Bisabolol. Hepatoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Processo de conversão da bilirrubina	18
Figura 2	– Armazenamento de glicose	19
Figura 3	– Processo de excreção do colesterol	20
Figura 4	– Estrutura química do (-)-alfa-Bisabolol	28
Figura 5	– Dosagem de Alanina aminotransferase (ALT)	35
Figura 6	– Dosagem de Aspartato aminotransferase (AST)	35
Figura 7	– Dosagem de Fosfatase Alcalina (ALP)	36
Figura 8	– Dosagem de Albumina (ALB)	37
Figura 9	– Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH)	37
Figura 10	– Fotomicrografias das análises histológicas	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores bioquímicos hepáticos	21
Tabela 2 – Principais classes farmacológicas e medicamentos relatadas na literatura por suspeita de estarem envolvidas na lesão hepática induzida por medicamentos (DILI)	23
Tabela 3 – Especificações comerciais do (-)-alfa-Bisabolol	30
Tabela 4 – Grupos experimentais no modelo animal de hepatotoxicidade aguda	31
Tabela 5 – Escores atribuídos as alterações histopatológicas	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	FÍGADO E FUNÇÕES HEPÁTICAS	18
3.2	LESÃO HEPÁTICA AGUDA E AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO DANO HEPÁTICO	20
3.3	FÁRMACOS HEPATOTÓXICOS E MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR FÁRMACOS	22
3.4	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO DANO HEPÁTICO	24
3.5	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS HEPATOPROTETORAS	25
3.6	ALFA-BISABOLOL	27
4	METODOLOGIA	30
4.1	ESTUDO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DO (-)-ALFA- BISABOLOL	30
4.1.1	Animais	30
4.1.2	Obtenção do (-)-alfa-Bisabolol	30
4.2	ENSAIO DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO	31
4.2.1	Grupos experimentais	31
4.2.2	Eutanásia e coletas das amostras	31
4.3	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	32
4.3.1	Preparo das amostras de plasma	32
4.3.2	Avaliação dos marcadores bioquímicos de função hepática	32
4.3.2.1	Determinação da Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)	32
4.3.2.2	Determinação da Fosfatase alcalina (FAL)	32
4.3.2.3	Determinação da Albumina (ALB)	33
4.4	ANÁLISE BIOQUÍMICA NO TECIDO HEPÁTICO	33

4.4.1	Preparo dos homogenatos	33
4.4.2	Determinação dos níveis de glutathione reduzida (GSH)	33
4.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA	34
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	35
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO I – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-UFC)	55

1 INTRODUÇÃO

A lesão hepática aguda (LHA) é considerada uma das situações clínicas mais graves que acomete a função hepática de maneira abrupta e grave (VELAZQUEZ, 2001). O fígado compreende 2,5 a 4,5% da massa corporal total dos indivíduos e apresenta um peso médio de, aproximadamente, 1500g, sendo considerado o maior órgão do corpo humano (MARTINS, 2012). Além de ser um órgão de alta complexidade, realiza diversas funções vitais para o metabolismo e funcionamento do organismo, e muitas outras que ainda não são tão compreendidas e necessitam ser estudadas.

A hepatotoxicidade é caracterizada por alterações no desempenho e lesão hepática, podendo acarretar algum dano a este órgão. Geralmente, está associada a inalação, ingestão ou administração de agentes, que podem ser classificados como farmacológicos ou químicos, e que acabam desencadeando nos indivíduos determinadas reações, como por exemplo, a diminuição ou disfunção da atividade do fígado, podendo evoluir para um quadro clínico grave rapidamente (ARAÚJO *et al.* 2018).

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), foram registrados no Brasil em 2017 cerca de 76.115 casos de intoxicação humana. Nesse mesmo ano, a intoxicação causada por fármacos totalizou 20.637 dos casos, ou seja, aproximadamente 27% das intoxicações humanas foram ocasionadas pelo seu uso inadequado. Na região nordeste foram registrados 672 casos de intoxicações por medicamentos, dos quais 2 destes culminaram em óbito. Dentre os principais causadores de danos hepáticos e, conseqüentemente, desencadeantes de manifestações clínicas podemos citar o paracetamol, o dissulfiram, a fluoxetina e as estatinas (BERTOLAMI, 2005).

Dessa forma, a lesão hepática induzida por medicamento (DILI) é bastante frequente em casos de LHA. Esta pode passar despercebida até o aparecimento da icterícia, que é a causada pelo excesso de bilirrubina no sangue provocando a pigmentação amarelada da pele (DEVARBHAVI, 2012). A DILI pode ser classificada de acordo com a sua manifestação clínica, podendo ela ser: hepatocelular, colestática ou mista. (TAJIRI; SHIMIZU, 2008). E, dependendo desta classificação, apresentar alterações bioquímicas indicativas do dano, das quais estão relacionadas com os níveis séricos algumas enzimas, como por exemplo, da alanina aminotransferase (AST), da aspartato aminotransferase (AST), da fosfatase alcalina (FAL); da albumina (ALB) e da glutathiona reduzida (GSH), além de alterações histopatológicas (BERTOLAMI, 2005).

Existem determinados alimentos e fármacos específicos que podem diminuir ou

até mesmo reverter os danos pelos quais o fígado possa vir a sofrer. Dentre estes podemos citar o café (AGUILAR, 2016), a melantonina, a n-acetilcisteína (ROSA, 2013), a dieptanoína, a trieptanoína (SILVA *et al.*, 2008) etc. Fitoterápicos também são utilizados no tratamento dessa patologia. Estudos recentes têm revelado a importância e a utilização de plantas em quadros de danos hepáticos e a sua atividade protetora (MARMITT *et al.*, 2016).

O (-)-alfa-Bisabolol é classificado como um sesquiterpeno, monocíclico, volátil, lipofílico e de baixo peso molecular, da classe dos bisabolanos. Essa substância é bastante conhecida e utilizada, pois estudos relevaram a sua capacidade anti-inflamatória, gastroprotetora, antinociceptiva (ROCHA, 2009), neuroprotetora (FERNANDES, 2015), antifúngica (ROCHA *et al.*, 2015), e anti-tumoral (LIANG *et al.*, 2014), antioxidante e protetora (SAMPAIO *et al.*, 2016). Está presente na composição de plantas e apresenta resultados positivos e animadores para o tratamento de diversas enfermidades que acometem a saúde da população (SOUZA; OLIVEIRA FILHO, 2017).

Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade protetora do (-)-alfa-Bisabolol em modelos de lesão hepática relacionados ao estresse oxidativo, haja vista que apesar da sua potencial atividade protetora, raros são os estudos nesta vertente. Visando, portanto, a busca por novas alternativas farmacológicas com efeito hepatoprotetor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito hepatoprotetor do (-)-alfa-Bisabolol em modelo animal de lesão hepática aguda (LHA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do Bisabolol sobre a liberação de marcadores laboratoriais de dano hepático;
- Investigar as alterações bioquímicas induzidas pelo tetracloreto de carbono (CCl_4) e o efeito protetor do Bisabolol;
- Analisar o efeito do Bisabolol na redução do estresse oxidativo induzido por CCl_4 ;
- Analisar a proteção do Bisabolol sobre as alterações histológicas induzidas por CCl_4 no tecido hepático.

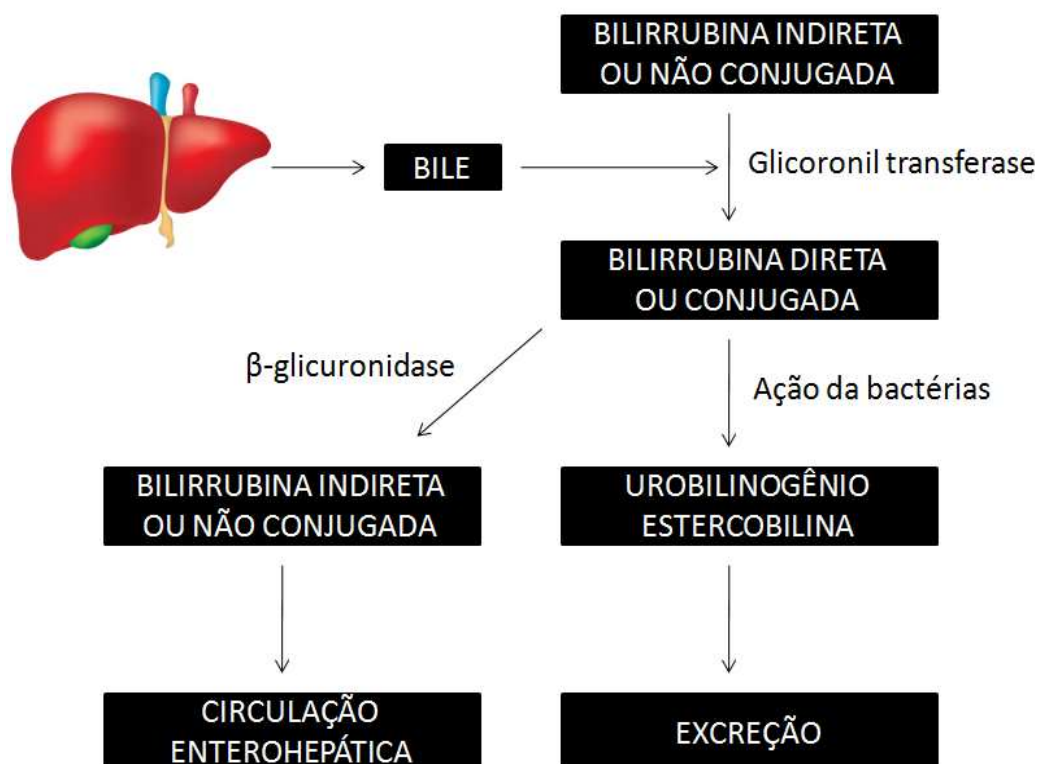
3 RERENCIAL TEÓRICO

3.1 FÍGADO E FUNÇÕES HEPÁTICAS

O fígado é um órgão de extrema importância para a manutenção das funções vitais do organismo (JESUS *et al.*, 2014). As suas principais funções são a síntese de proteínas, o armazenamento de ferro e vitaminas (A, B₁₂, D, E, K), a degradação hormonal e a inativação e excreção de drogas e toxinas, o metabolismo de diversos nutrientes, além da atuação na circulação sanguínea, recebendo cerca de vinte e cinco por cento do débito cardíaco (NUNES *et al.*, 2006; RITTER *et al.*, 2006).

No processo de digestão, o fígado realiza a secreção da bile responsável por converter a bilirrubina indireta ou não conjugada, oriunda do catabolismo das hemo-proteínas, em bilirrubina conjugada através da ligação com moléculas de ácido glicurônico, dando origem aos monos e diglucoronídeos de bilirrubina (SCHINONI, 2008), como na figura 1.

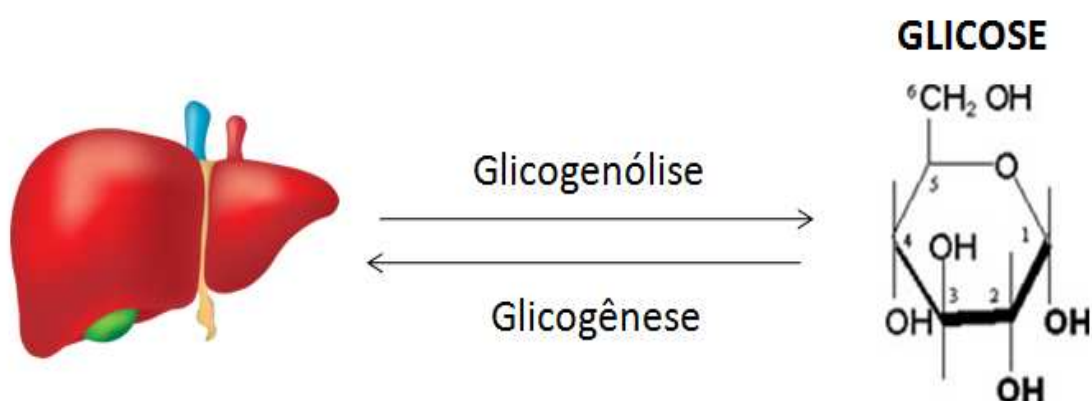
Figura 1 – Processo de conversão da bilirrubina



Fonte: a Autora.

O fígado tem um papel importante no metabolismo energético, por atuar no metabolismo de proteínas, carboidratos, glicose e corpos cetônicos (NUNES; MOREIRA, 2006). Por exemplo, quando o organismo se encontra em estado de hipoglicemia, o fígado é responsável por ativar vias metabólicas alternativas para compensar a deficiência de energia; em contrapartida, na hiperglicemia é capaz de captar e armazená-la na forma de moléculas de glicogênio (Figura 2).

Figura 2 – Armazenamento de glicose

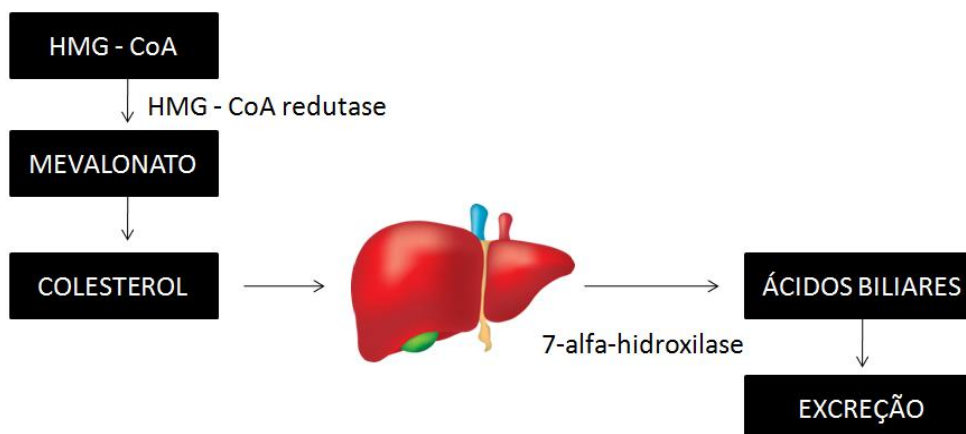


Fonte: a Autora.

Durante a atividade anabólica, esse órgão sintetiza diversas proteínas, como a albumina, os transportadores de hormônios, os fatores de coagulação e fibrinolíticos, os fatores de crescimento e as globulinas. As reações hepáticas catabólicas de importância incluem a degradação de aminoácidos (NUNES; MOREIRA, 2006; SCHINONI, 2008; JESUS *et al.*, 2014). Além disso, possui importante função no armazenamento do ferro, na ativação de hormônios e vitaminas e na excreção de hormônios esteroides, os quais possuem amplas funções no organismo humano (NUNES; MOREIRA, 2006). O fígado tem ainda um papel central no metabolismo de drogas e toxinas, podendo gerar metabólitos inativos, ativos e, até mesmo, tóxicos (SCHINONI, 2008).

Além disso, ele é considerado o órgão responsável pela manutenção da homeostasia do colesterol (NUNES; MOREIRA, 2006) (Figura 4). Atua diretamente na via metabólica de eliminação desse lipídio, na qual o colesterol sintetizado pelo organismo através da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA) é convertido a ácidos biliares através da 7-alfa-hidroxilase.

Figura 3 – Processo de excreção do colesterol



Fonte: a Autora.

3.2 LESÃO HEPÁTICA AGUDA E AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO DANO HEPÁTICO

A lesão hepática aguda (LHA) possui numerosas etiologias, podendo ser classificada como infecciosa, imunológica, metabólica, maligna, vascular ou relacionada a drogas/toxinas (SUCHY; SOKOL; BALISTRERI, 2014). Segundo Strauss *et al.* (2011), a LHA leva à deficiência funcional grave do fígado, com alteração de todo o seu metabolismo. A capacidade de metabolização de substâncias endógenas como hormônios, bilirrubinas, vitaminas e mesmo medicamentos encontra-se depletada, necessitando de extrema precaução na prescrição de fármacos para estes pacientes, principalmente, aqueles dependentes de passagem e metabolização hepática ou potencialmente hepatotóxicos. O quadro clínico dessa patologia pode ser insidioso ou rápido e progressivo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas. Os primeiros sintomas não são específicos, tais como, náusea, mal-estar e fadiga. O sintoma mais relevante é a encefalopatia, que pode aparecer antes ou depois da icterícia.

É uma condição complexa, com muitas etiologias possíveis, podendo ser um desfecho comum de diversas situações. Deve ser identificada rapidamente visando a abordagem precoce das causas tratáveis, o manejo das complicações e a indicação do transplante no tempo adequado. Ainda hoje, apesar dos avanços envolvendo o cuidado intensivo e as técnicas de transplante hepático, os resultados, em geral, permanecem ruins, com alta mortalidade (STURM; LEXMOD; VERKADE, 2015).

Devido às inúmeras e relevantes funções que o fígado desempenha de forma direta e indireta no organismo, foram desenvolvidas várias técnicas para mensurar o

desempenho, bem como apontar possíveis lesões neste órgão (BATISTA, 2016). Para Thrall *et al.* (2015), os exames laboratoriais hepáticos devem ser divididos em testes que mensuram lesão nos hepatócitos, que detectam colestase e, por fim, os que avaliam a função hepática.

Segundo Batista (2016), a mensuração se dá através das enzimas séricas liberadas do rompimento celular hepático, fornecendo informações da extensão, magnitude e curso (aguda ou crônica) da lesão. A detecção da colestase ocorre através do extravasamento das células biliares, quando fluxo biliar fica comprometido de forma parcial ou total, que liberam algumas enzimas que podem ser detectadas na corrente circulatória no decorrer. A avaliação da função hepática é realizada através da mensuração de metabólitos séricos de forma direta ou indireta, que são normalmente produzidos e ou excretados pelo órgão. Para cada exame laboratorial realizado existem os marcadores específicos (tabela 1).

Tabela 1 – Marcadores bioquímicos hepáticos

Marcadores de lesão nos hepatócitos	Marcadores de colestase	Marcadores de função
ALT (alanina aminotransferase); AST (aspartato aminotransferase); DH (sorbitol desidrogenase); GLDH (glutamato desidrogenase)	gama-glutamil transferase (GGT); Fosfatase alcalina (FAL)	Bilirrubina; Ácidos biliares; Amônia; Ureia; Albumina; Globulinas; Glicose; Colesterol; Fatores de Coagulação

Fonte: a Autora.

Alguns marcadores hepáticos são, relativamente, bastante importantes e utilizados na triagem básica da disfunção hepática, dos quais podemos citar: a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT), a gama-GT (GGT), a fosfatase alcalina (FAL) e a albumina (ALB) (JESUS *et al.* 2014).

O AST e o ALT são enzimas intracelulares, e estão presentes na mitocôndria e no citoplasma, respectivamente. Quando há algum tipo de lesão ou danos celulares, estas enzimas extravasam para a circulação sanguínea, sendo possível a sua intercorrelação, a depender da gravidade do dano. Elas são responsáveis por catalisar a conversão de aspartato e alanina em oxalacetato e piruvato, respectivamente, que são parâmetros da avaliação do dano hepático altamente específicos (MOTTA, 2009; ISOLANI, 2013)

A GGT é responsável por avaliar a função hepatobiliar, tendo em vista que ela se eleva em casos onde há uma obstrução dos ductos biliares intra-hepáticos. A sua principal

função é catalisar a transferência de aminoácidos catalisar a transferência de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, mas também é capaz de realizar síntese proteica e peptídica e regulação dos níveis teciduais de glutathione encontrada no fígado, rim, intestino, próstata, pâncreas, cérebro e coração. Os casos de obstrução hepática são relatados quando a sua elevação está correlacionada com a elevação da FA, porém ela pode se elevar em outras desordens do fígado (ANDRADE *et al.*, 1992; MOTTA, 2009).

A FAL também avalia a função hepatobiliar, mas de maneira inespecífica, devido à presença de isoenzimas que também estão presentes em outros órgãos, como por exemplo, nos ossos e na placenta. Por isso, a necessidade de dosá-la juntamente com a GGT (NUNES; MOREIRA, 2006; MINCIS; MINCIS, 2007).

A ALB é a proteína mais abundante do plasma e tem como principal função a manutenção do volume plasmático circulante, devido ao seu peso relativamente baixo e a sua alta concentração. Camilo (1995) relata que os níveis desse marcador se normaliza quando há uma diminuição ou cura do dano hepático.

Normalmente, níveis altos de bilirrubina indicam danos hepáticos relacionados a metabolização ou excreção, impossibilitando a funcionalização do hepatócito (JESUS *et al.* 2014). Ela é oriunda do catabolismo das hemácias, e origina a bilirrubina indireta que é carregada pela albumina até o fígado, onde se transforma em direta após a conjugação de duas moléculas de ácido glicurônico, uma molécula hidrossolúvel e excretável (NUNES; MOREIRA, 2006).

Costa e Oliveira (2021) explicam que apesar dos avanços da indústria farmacêutica, ainda não foi possível a obtenção de fármacos que, além de garantir sua eficácia, possam oferecer também uma completa proteção ao fígado e auxiliar na regeneração e estimulação hepática. Além disso, alguns medicamentos podem induzir severos efeitos colaterais. Assim, se faz necessário identificar alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento de doenças hepáticas.

3.3 FÁRMACOS HEPATOTÓXICOS E MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR FÁRMACOS

A lesão hepática induzida por medicamentos, conhecida também por *Drug Induced Liver Injury* (DILI), é uma doença que acomete o fígado e se manifesta, geralmente, em até três meses após a administração de medicamentos. O aparecimento dos sintomas depende, diretamente, do tempo de uso de alguns fármacos, da dose utilizada e, também, das

características individuais do paciente exposto. A sintomatologia é comum a diversas doenças, compreendendo o aparecimento de febre, de náuseas, vômitos entre outros. Logo, ela pode passar despercebida até o aparecimento da icterícia, que é a causada pelo excesso de bilirrubina no sangue provocando a pigmentação amarelada da pele (DEVARBHAVI, 2012).

A lesão causada pelos fármacos se dá, principalmente, através da peroxidação dos lipídeos de membrana causada pelos radicais livres ou metabólitos oriundos da metabolização destes. A toxicidade hepática induzida por medicamentos pode se manifestar através de, basicamente, dois mecanismos: reações diretas e idiossincrásicas. As reações diretas são bastantes previsíveis e dose-dependente e se desenvolvem em curto período de tempo após exposição. As reações idiossincrásicas se manifestam tardiamente, até três meses após a administração do medicamento (DEVARBHAVI, 2012) e não possuem mecanismo elucidado. De acordo com os dados presentes na literatura acerca da incidência de DILI, algumas classes farmacológicas e medicamentos (tabela 2) são bastante relatadas na literatura como suspeitas de estarem envolvidas no seu aparecimento.

A DILI pode também ser classificada em hepatocelular, colestática ou mista, a depender da sua manifestação clínica. O primeiro e o terceiro são caracterizados pelos elevados níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), em até duas vezes maior que o limite superior. Já o segundo é caracterizado pelos elevados níveis elevados de fosfatase alcalina (FAL), em até duas vezes maior que o limite superior. A lesão hepatocelular é considerada mais grave, quando se comparada aos outros tipos, principalmente, quando os valores de bilirrubina também se encontram elevados (TAJIRI; SHIMIZU, 2008).

Tabela 2 – Principais classes farmacológicas e medicamentos relatadas na literatura por suspeita de estarem envolvidas na lesão hepática induzida por medicamentos (DILI)

Classe farmacológica	Medicamentos	Estudos que citam a DILI
Antimicrobianos	Amoxicilina-clavulanato; Azitromicina	105
Anti-inflamatório	Paracetamol; Diclofenaco	98
Tuberculostático	Isoniazida; Rifampicina; e Pirazinamida	62
Outros	Fitoterápicos	31
Antineoplásico	Flutamida; Metotrexato	21
Anticonvulsivante	Carbamazepina; Ácido valpróico	18

Anticoagulante	Ticlopidina	14
Antilipêmico	Atorvastatina; Fenofibrato	13
Imunossupressor	Azatioprina	11

Fonte: Adaptado de LUNARDELLI *et al.*, 2016.

Dentre os medicamentos causadores de lesão hepática, destaca-se o paracetamol. Este fármaco é considerado no Reino Unido e nos Estados Unidos o maior causador de insuficiência hepática aguda. O efeito tóxico ocorre devido à ação do seu metabólito N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI). Em doses terapêuticas, este é conjugado e detoxificado pela conjugação com a glutathione (BRENT, 2005). Em casos de superdosagem, quando os estoques de glutathione estão reduzidos, inicia o processo de dano hepático, o qual o NAPQI livre se liga rapidamente aos hepatócitos ocasionando a lesão hepática (NELSON *et al.*, 2011).

Diante das complicações ocasionadas por estes fármacos, alguns estudos experimentais têm sido desenvolvidos para avaliar o potencial antioxidante e hepatoprotetor *in vivo* de substâncias bioativas (VIEIRA, 2014).

O CCl₄ é considerado um potente indutor de lesão hepática aguda, amplamente utilizado para investigação de hepatotoxicidade, citotoxicidade e, principalmente, estresse oxidativo, tanto para estudos *in vivo* quanto *in vitro* (PINTO *et al.*, 2012). É metabolizado no fígado onde as enzimas CYP2E1, CYP2B1 e CYP2B2 do citocromo P₄₅₀, das quais, possivelmente, a CYP3A, o transformam no radical livre triclorometila (CCl₃•). Na presença do oxigênio (O₂), este radical é convertido a triclorometila peroxila (CCl₃OO•), que se liga a lipídeos da membrana dos hepatócitos, provocando peroxidação e lise celular e, conseqüentemente, a liberação de enzimas hepáticas e íons cálcio (Ca²⁺) no meio extracelular, agravando ainda mais a lesão hepática (PORUBSKY; MENEELY; SCOTT, 2008). Apesar de não ser um fármaco, o CCl₄ tem sido usado classicamente em modelos animais e *in vitro* de indução de DILI, pois a lesão tecidual observada e os mecanismos celulares envolvidos são semelhantes aos observados para fármacos (MCGILL; JAESCHLE, 2019).

3.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO DANO HEPÁTICO

Os principais fármacos hepatoprotetores disponíveis são a betaina, a colina, a L-ornitina, a metionina e a vitamina B₆ (piridoxina). Alguns fitoterápicos também podem ser utilizados para o tratamento agudo do dano hepático (COSTA; OLIVEIRA, 2021). Em casos

graves e crônicos, no qual o tratamento farmacológico não é possível, a indicação clínica é o transplante do órgão (JÚNIOR *et al.*, 2002).

Segundo Araújo *et al.* (2014) a betaína é considerada um hepatoprotetor por agir na redução de gordura no parênquima hepático, resultando na diminuição de processos inflamatórios crônicos. Além disso, atua controlando a osmolaridade celular e a desnaturação proteica. Ela pode ser oriunda da dieta, suplementos alimentares, mas também, pode ser sintetizada de maneira endógena através da oxidação da colina (LOPES *et al.*, 2015).

A colina é responsável pela metabolização e transporte de lipídios hepáticos, síntese da acetilcolina, transmissão de impulsos nervosos, diminuição do risco cardíaco por meio do metabolismo da homocisteína, e como precursor da biossíntese de fosfatidilcolina, um fosfolípido responsável pela estruturação de membranas celulares. Contudo, ela é produzida em pequenas quantidades, o que pode vir a comprometer o funcionamento de alguns órgãos, incluindo o fígado. Devendo esta ser ingerida através da suplementação ou proveniente de alimentos (MACIEL; TERRAZZAN, 2017).

A L-ornitina é utilizada para reduzir os sintomas da encefalopatia hepática associada a casos de cirrose, um estágio mais grave da doença, e atenuação dos níveis de amônia na circulação sanguínea. Atua como antioxidante, pois age diretamente no Ciclo da Ureia, o qual é responsável pelo processo de desintoxicação do fígado (KOKUBO *et al.*, 2015).

A metionina em associação com a colina são fundamentais para eliminação hepática de triglicerídeos, na forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para os tecidos periféricos (SUGA *et al.*, 2019). Ademais, quando metabolizada, ela dá origem a S-adenosil-L-metionina (SAM), sua forma ativa, que é responsável por regular processos proliferativos de hepatócitos, diferenciação e morte celular em processos fisiológicos hepáticos (MORA *et al.*, 2018).

A vitamina B₆ age indiretamente como antioxidante, participando como coenzima na síntese da glutathione, além de ser estimulante da produção da bile hepática, enzimas metabolizantes e desintoxicantes de ácidos biliares/bilirrubina, que são capazes de inibir a obstrução de vias biliares ou inibição da bomba de exportação de sais biliares (NASSAN *et al.*, 2018). Estudos recentes demonstraram ainda que ela é capaz de aumentar a síntese de glutathione e provocar a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em danos causados pelo paracetamol exercendo, então, função hepatoprotetora (ROH *et al.* 2018).

3.5 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS HEPATOPROTETORAS

Desde a antiguidade as plantas representam a forma mais antiga e conhecida para tratar e curar enfermidades (SANTOS *et al.* 2011), e até os dias atuais, mesmo com as modernizações, elas continuam contribuindo para desenvolvimento de novos fármacos (BOLZANI *et al.*, 2012), devido à grande diversidade biológica e de compostos químicos bastante promissores (YANG *et al.*, 2016). Além de outras vantagens extremamente importantes, em especial, para a indústria, das quais podemos citar: o baixo custo, o fácil acesso e uma menor incidência de efeitos colaterais (RIBEIRO *et al.*, 2018).

O Brasil possui uma grande variedade de flora e fauna ainda não investigada, e que podem apresentar um grande potencial terapêutico na descoberta de novos fármacos (MANDER; LIU, 2010). Elas estão compreendidas dentro de um vasto território, e são denominadas e agregadas em biomas, são eles: a Floresta Amazônica, o Pantanal, o Cerrado, a Caatinga, a Mata atlântica entre outros (NEWMAN, 2017).

Estudos desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que cerca de 80% da população mundial em desenvolvimento utiliza medicamentos de origem vegetal, e 25% das substâncias ativas são derivados de produtos biológicos de mesma origem (AZIZ *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018), ou seja, as plantas e seus derivados possuem um papel importante na produção e fabricação de novos ativos farmacológicos.

Tendo em vista os problemas enfrentados na atenção primária, em especial a dificuldade de acesso aos medicamentos, o uso de plantas medicinais representa um papel importante para driblar essa dificuldade (CARVALHO *et al.*, 2011), pois através da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) existem normas para o uso seguro desses produtos no Sistema Único de Saúde (SUS).

Existem inúmeros componentes ativos que incluem metabólitos secundários, como alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas e compostos fenólicos (EDEOGA *et al.*, 2005), de acordo com Cirilo (1993) é a diversidade de compostos farmacologicamente ativos presentes nas plantas que representa o seu potencial para a obtenção de novos fármacos.

Alguns fitoterápicos possuem atividade hepatoprotetora conhecida, dos quais podemos citar: a *Centella asiatica* (Linn) Urban, a *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton, a *Silybum marianum* (L.) e a *Curcuma longa* L. (COSTA; OLIVEIRA, 2021).

A *C. asiatica* é considerada um triterpenóide asiaticosídeo, o qual é conhecido por prevenir e tratar lesões hepáticas causadas por fármacos hepatotóxicos. Além disso, o seu

mecanismo de ação está relacionado a sua capacidade antioxidante e a ação neutralizadora sobre os radicais livres originados do processo de metabolização (SILVA *et al.*, 2014).

A *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton possui alguns componentes responsáveis por sua atividade hepatoprotetora, são eles: glicosídeos, triterpenos, taninos e polifenóis. Usualmente, são utilizadas as folhas e o látex desta espécie, contudo, assume-se que o seu mecanismo de ação esteja relacionado a capacidade antioxidante do látex, pois ele é constituído de basicamente de substâncias como cardenolídeos, lignanas e flavonoides, que são capazes de capturar as espécies reativas de oxigênio, contendo os radicais livres (COSTA *et al.*, 2015).

A *Silybum marianum* (L.) tem como principal ativo a silimarina, um hepatoprotetor bastante utilizado em danos hepáticos por necrose ou falha funcional. A sua atividade está relacionada à capacidade antioxidante e de combater radicais livres, que ocorrem por inibição da deposição de fibras de colágeno, aumento da concentração de glutathione celular e estimulação da DNA polimerase, este é capaz de aumentar a produção de RNA ribossômico e causar a reconstrução das células hepáticas (BAHMANI *et al.*, 2015).

A *Curcuma longa* L., conhecida popularmente como açafrão, também possui atividade hepatoprotetora conhecida (MARCHI *et al.*, 2016), que está diretamente relacionada à presença de curcumina em sua composição, um polifenol com atividade antioxidante, antitumoral e hepatoprotetora (TUNG; HAI; SON, 2017). Estudos demonstraram que ela é capaz de exercer atividade hepatoprotetora em lesões hepáticas induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄), pois após a sua administração foi possível observar a restauração do parênquima hepático e diminuição dos níveis enzimáticos de ALT, AST e FAL. Tendo em vista que os danos causados pelo CCl₄ são de peroxidação lipídica, com a liberação de agentes pró-inflamatórios que causam fibrinogênese e lesão nos hepatócitos (SALDANÃ *et al.* 2017).

3.6 ALFA-BISABOLOL

Os óleos essenciais são substâncias de origem vegetal que se destacam por possuir grande utilidade biotecnológica, e por isso, são bastante visados pela indústria química e farmacêutica. Por possuírem propriedades aromáticas podem ser amplamente utilizados na produção de cosméticos. Ademais, por serem facilmente encontrados em uma grande quantidade de espécies de plantas, bem como possuírem propriedades e atividades farmacológicas, eles são de bastante interesse comercial (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

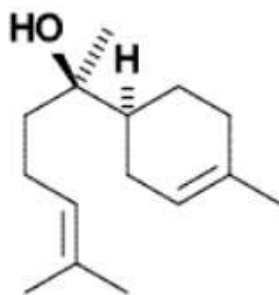
Os terpenos são óleos aromáticos que podem ser chamados de isoprenóides, sendo derivados do ácido mevalônico, mas também, podendo ser produzidos a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato. É constituído basicamente de estruturas de isopreno de 5 carbonos, e são classificados em: a) hemiterpenos, contendo 5 carbonos; b) monoterpenos, com 10 carbonos; c) sesquiterpenos, com 15 carbonos; d) os diterpenos, que contém entre 20 e 40 átomos de carbono; e e) os triterpenos, contendo 30 carbonos (BREITMAIER, 2006).

Estudos revelaram que as plantas utilizadas tradicionalmente pelo conhecimento popular certamente detêm potencial farmacológico. Dessa maneira, os sesquiterpenos apresentaram efeitos anti-inflamatório (MAURYA *et al.*, 2014), anticolinesterásico (MAKWANA *et al.*, 2015), antimicrobiano, antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2015) e anticancerígeno (FRIKECHE *et al.*, 2015).

O (-)-alfa-Bisabolol (figura 4) é um álcool classificado como sesquiterpeno, monocíclico, volátil, lipofílico e de baixo peso molecular (massa molar de 222,37 g/mol), da classe dos bisabolanos, denominado de alfa,4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol, também pode ser chamado de levomenol. Ele pode ser obtido a partir da hidrodestilação do óleo essencial de algumas espécies, como a camomila alemã (*Matricaria chamomilla*), sálvia (*Salvia runcinata*), candeieiro (*Vanillosmopsis arborea*), arnica (*Arnica chamissonis*) e *Myoporum grassifolium* (BUIRAGO *et al.*, 2015). Contudo, inicialmente, ele foi extraído das flores e folhas de camomila, e corresponde a aproximadamente 50% do conteúdo total do seu óleo essencial. Ele está presente na natureza em quatro formas estereoisoméricas, das quais o isômero (+)-α-Bisabolol raramente encontrado, e o (-)-α-Bisabolol em maior incidência (MCKAY; BLUMBERG, 2006).

É uma substância bastante conhecida e utilizada, pois estudos relevaram a sua capacidade antimicrobiana (ROTTINI *et al.*, 2015; VILA *et al.*, 2010), antineoplásica (CHEN *et al.*, 2010; COSTARELLI *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2014; RIGO; VINANTE, 2016; SEKI *et al.*, 2011; UNO *et al.*, 2016), anticolinesterásica (DE SIQUEIRA *et al.*, 2014), anti-inflamatória (ZARGARAN *et al.*, 2014), nefroprotetora (SAMPAIO *et al.*, 2016), antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2015) e gastroprotetora (BEZERRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010). Ademais, ainda pode ser utilizado como excipiente em formulações tópicas, por aumentar a permeação transdérmica de fármacos (KIM *et al.*, 2012).

Figura 4 - Estrutura química do (-)-alfa-Bisabolol.



Fonte: CAVALIERI *et al.*, 2004.

Para mais, alguns estudos *in vivo* demonstram que ele possui baixa toxicidade e boa absorção, indicando que é substância aplicável a ensaios *in vivo* (ROCHA *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2016). No entanto, apesar de diversos estudos mostrarem suas potenciais atividades e ter-se um elevado índice para sua ação e aplicação hepatoprotetora, correlatos nessa área ainda são escassos. Sendo, portanto, necessários e relevantes, os estudos que buscam determinar, caracterizar e propor mecanismos para tal substância.

4 METODOLOGIA

4.1 ESTUDO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DO (-)-ALFA-BISABOLOL

4.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos *swiss* machos, com 7 a 8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g, mantidos em um ciclo claro/escuro de 12/12h a 22 ± 2 °C e umidade relativa de $55 \pm 10\%$, com livre acesso à dieta e água. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial Professor Eduardo Torres (FAMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) antes do início dos experimentos (CEUA no. 9790260819) (Anexo A).

4.1.2 Obtenção do (-)-alfa-Bisabolol

O (-)-alfa-Bisabolol pode ser extraído como óleo essencial de diversas plantas, tendo sido isolado inicialmente das flores e folhas de camomila (*Matricaria chamomilla*). Tendo em vista o seu potencial terapêutico, ele é extraído e comercializado por grandes indústrias. Sendo assim, o (-)-alfa-Bisabolol utilizado no experimento em questão foi obtido da empresa Sigma-Aldrich®, e possui as especificações descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Especificações comerciais do (-)-alfa-Bisabolol

Número do CAS	23089-26-1
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₂₆ O
Peso molecular	222,37
Número EC	208-205-9
Volume	5mL

Fonte: Merk, Sigma-Aldrich.

4.2 ENSAIO DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO

4.2.1 Grupos experimentais

O efeito hepatoprotetor do Bisabolol foi avaliado em modelo animal de hepatotoxicidade aguda induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄) previamente descrito (WANG *et al.*, 2019). Para tal, foram utilizados inicialmente 60 camundongos, os quais foram divididos em 6 grupos (n=10), conforme a tabela 4.

Tabela 4 – Grupos experimentais no modelo animal de hepatotoxicidade aguda

Grupo	Tratamento	Indução
Controle negativo	Solução salina v.o.	Azeite de oliva i.p.
Modelo	Solução salina v.o.	CCl ₄ (0,2%) i.p.
Controle positivo	Silimarina (100 mg/Kg) v.o.	CCl ₄ (0,2%) i.p.
BIS 1 mL/Kg	Bisabolol (10 mg/Kg) v.o.	CCl ₄ (0,2%) i.p.
BIS 5 mL/Kg	Bisabolol (50 mg/Kg) v.o.	CCl ₄ (0,2%) i.p.
BIS 10mL/Kg	Bisabolol (100 mg/Kg) v.o.	CCl ₄ (0,2%) i.p.

Fonte: a Autora.

As doses de BIS foram selecionadas com base em trabalhos prévios, que utilizaram doses semelhantes sem observação de toxicidade (BEZERRA, 2009). Os grupos experimentais foram tratados com BIS, salina ou silimarina por cinco dias consecutivos, por via oral (v.o.), e duas horas (2h) após a última administração, a hepatotoxicidade foi induzida em todos os animais (com exceção do grupo controle) através da administração i.p. de CCl₄ (0,01 mL/Kg de uma solução a 0,2% em azeite de oliva). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de azeite de oliva por via intraperitoneal (i.p.).

4.2.2 Eutanásia e coleta das amostras

Vinte e quatro horas (24h) após a última indução por CCl₄, os animais foram

anestesiados pela administração de cetamina (250 mg/Kg) e xilazina (25mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue pela veia cava inferior, e o tecido hepático retirado para a realização de análises bioquímicas e histológicas. As carcaças dos animais foram armazenadas em freezer (-20°C) para posterior incineração.

4.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

4.3.1 Preparo das amostras de plasma

O sangue obtido dos camundongos foi centrifugado a 3000rpm por 15 minutos a 4 °C, e o plasma foi cuidadosamente coletado e armazenados a -20°C para posterior realização das análises. As amostras foram utilizadas para avaliação dos seguintes marcadores: atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL) e albumina (ALB). Todas as análises foram realizadas utilizando kits comerciais e respeitando as orientações dos fabricantes.

4.3.2 Avaliação dos marcadores bioquímicos de função hepática

4.3.2.1 Determinação da Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

A ALT é responsável por catalisar a especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, formando glutamato e piruvato ao final da reação. O piruvato é, então, reduzido pela lactato desidrogenase (LDH) à lactato, e a coenzima NADH é oxidada a NAD. A AST, por sua vez, catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato ao final da reação. O oxalacetado é, então, reduzido pela malato desidrogenase (MDH) à malato, e a coenzima NADH é oxidada a NAD.

A medição da atividade dessas enzimas no plasma dos animais foi realizada por reação espectrofotométrica. Para isso, foram utilizados kits comerciais (Roche), onde a atividade da enzima é diretamente proporcional à velocidade de oxidação da NADH. A leitura foi realizada em analisador bioquímico automatizado Cobas c111 (Roche) a 340 nm e os resultados foram expressos em U/L (LabTest®, 2012; 2014).

4.3.2.2 Determinação da Fosfatase alcalina (FAL)

A FAL presente no soro é capaz de hidrolisar a timolftaleína monofosfato a timolftaleína, que possui a coloração azul em meio alcalino. Essa coloração foi mensurada em espectrofotômetro a 590 nm utilizando kit comercial (LabTest®, 2009)

4.3.2.3 Determinação da Albumina (ALB)

A albumina plasmática foi medida por reação colorimétrica com o verde de bromocresol. Esta promove um desvio no pico de absorvidade do corante, permitindo que a cor resultante possa ser medida por espectrofotometria. A reação foi realizada utilizando kit comercial e cor formada foi medida em espectrofotômetro em um intervalo de 600-640 nm (LabTest®, 2013)

4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA NO TECIDO HEPÁTICO

4.4.1 Preparo dos homogenatos

As amostras de tecido hepático coletas foram armazenadas a -80 °C. Para realização da análise, elas foram então, descongeladas e homogeneizadas em fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4 (10% m/v). Logo após os homogenatos serem centrifugados (11000xg por 15 minutos a 4°C), os sobrenadantes foram coletados e usados para avaliação de mediadores envolvidos no modelo experimental.

4.4.2 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Para a determinação da concentração de GSH, foi utilizado o sobrenadante do homogenato do tecido a 10% em EDTA 0,02 M. Foi retirado 500 µL deste e adicionado 200 µL de água destilada. O material foi agitado e centrifugado (3000xg por 15 minutos a 4°C). Posteriormente, foi recolhido 200 µL do sobrenadante e a ele adicionado 400 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e 10 µL de DTNB 0,01 M (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico). Após 1 minuto da reação, foi realizada a leitura da coloração em 412 nm, em espectrofotômetro, e a concentração da glutathiona reduzida expressa em ng de GSH/g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1988).

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os lóbulos do tecido hepático foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Em seguida, foram desidratados e armazenados. Para a confecção das lâminas, foi realizada a coloração de Hematoxilina de Harris & Eosina (H&E). A hematoxilina, por ser uma base, cora, preferencialmente, componentes ácidos das células em um tom azulado escuro. Como os componentes ácidos mais predominantes são o DNA e o RNA, tanto o núcleo, quanto certas partes do citoplasma, adquirem coloração azulada, portanto, são basófilos. A eosina, diferente desta, por ser um ácido, é capaz de corar as estruturas básicas da célula de rosa, normalmente, presente no citoplasma e chamadas de acidófilas (TIMM, 2005).

As amostras de tecido hepático foram encaminhadas ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC) para confecção das lâminas. Posteriormente, em parceria com o Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Ceará (UECE) foi realizada a leitura e a análise destas.

A gravidade do dano tecidual hepático nos grupos experimentais foi avaliada utilizando um escore semiquantitativo progressivo, como a seguir: (0) ausência de necrose; (+) leve, (++) moderada; (+++) severa (JÚNIOR, 2005).

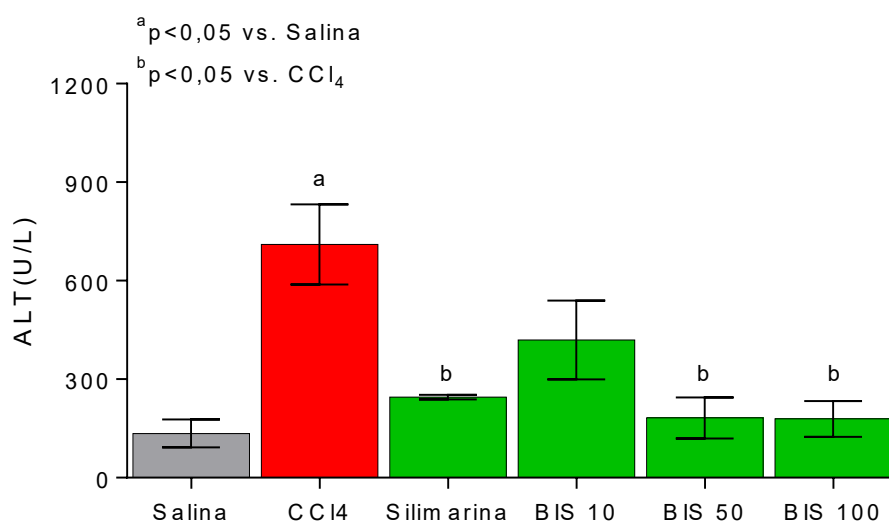
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos com média \pm erro padrão da média (SEM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet. Como critério de significância foi utilizado $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

5 RESULTADOS

De acordo com as figuras 5 e 6, o CCl_4 induziu lesão hepatocelular em todos os grupos, quando comparado ao grupo modelo. Observou-se o (-)-alfa-Bisabolol apresentou efeito hepatoprotetor comparável a Silimarina. Além disso, o tratamento com Bisabolol nas três doses utilizadas no experimento foi capaz de proteger o tecido hepático do aumento de ALT e AST induzido por CCl_4 . Os resultados obtidos foram significativamente menores do que os observados para o grupo CCl_4 , não havendo diferença estatística quando comparados ao grupo Salina, evidenciando uma potencial atividade protetora do Bis.

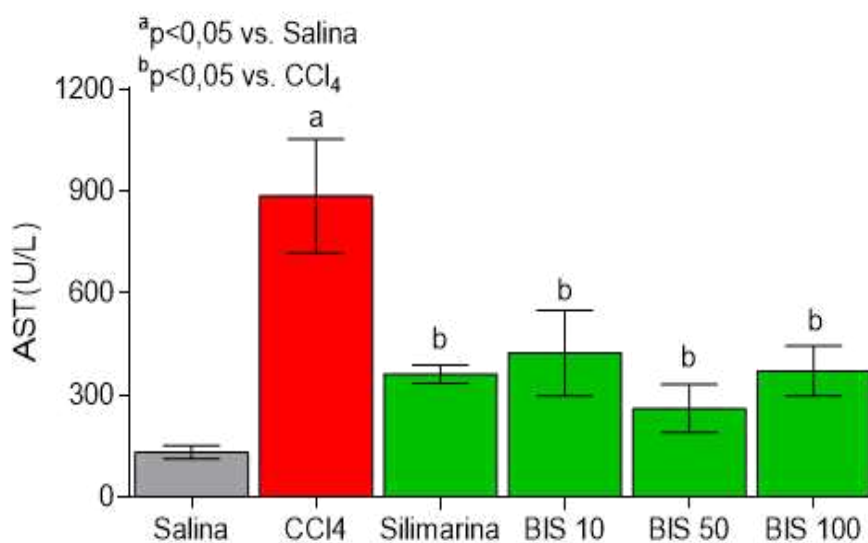
Figura 5: Dosagem de Alanina aminotransferase (ALT)



Legenda: Dosagem de Alanina aminotransferase (ALT); U/L – unidades por litro. ^a $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina; ^b $p < 0,05$ em comparação ao grupo CCl_4 . Os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média (SEM) utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet obtidos através do software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

Fonte: a Autora.

Figura 6: Dosagem de Aspartato aminotransferase (AST)

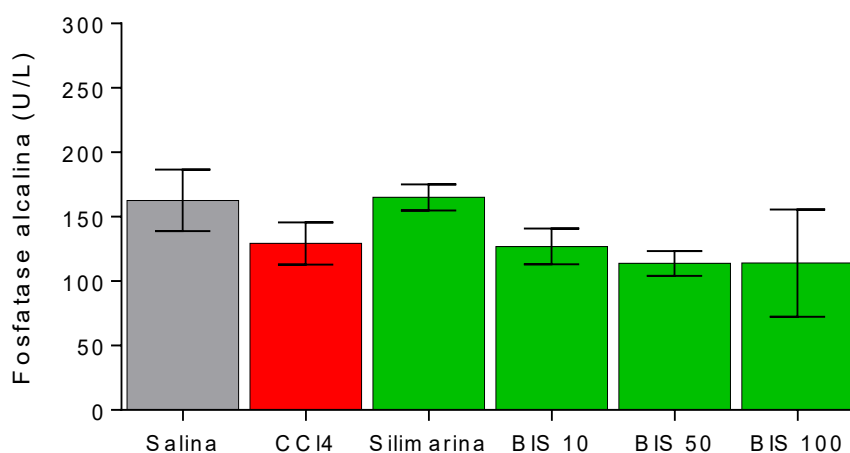


Legenda: Dosagem de Aspartato aminotransferase (AST); U/L – unidades por litro. ^ap<0,05 em comparação ao grupo salina; ^bp<0,05 em comparação ao grupo CCl₄. Os resultados foram expressos como porcentagem média ± erro padrão da média (SEM) utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet obtidos através do software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

Fonte: a Autora.

Em contrapartida, a indução por CCl₄ nos grupos experimentais não ocasionou alterações dos níveis de fosfatase alcalina (FAL) (Figura 7) e de albumina (ALB) (Figura 8). Ademais, os resultados obtidos a partir destas dosagens quando comparados ao grupo Salina foram significativamente semelhantes (*p<0,05).

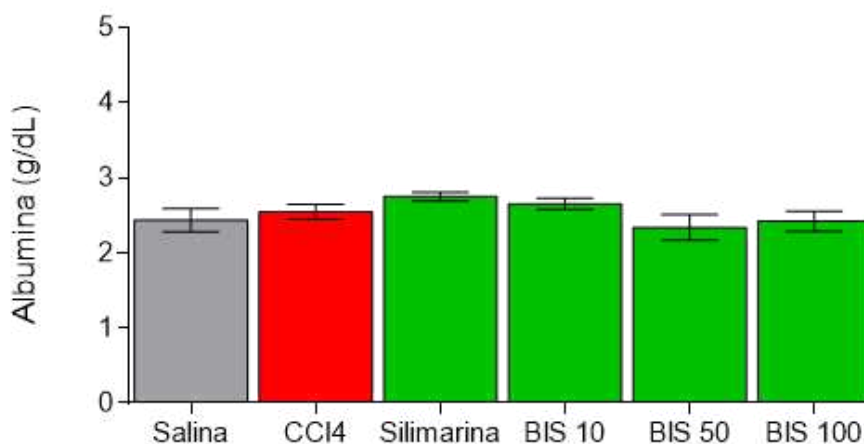
Figura 7: Dosagem de Fosfatase alcalina (FAL)



Legenda: Dosagem de Fosfatase Alcalina em U/L – unidades por litro. Os resultados foram expressos com p<0,05, e porcentagem média ± erro padrão da média (SEM) utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet obtidos através do software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

Fonte: a Autora.

Figura 8: Dosagem de Albumina (ALB)

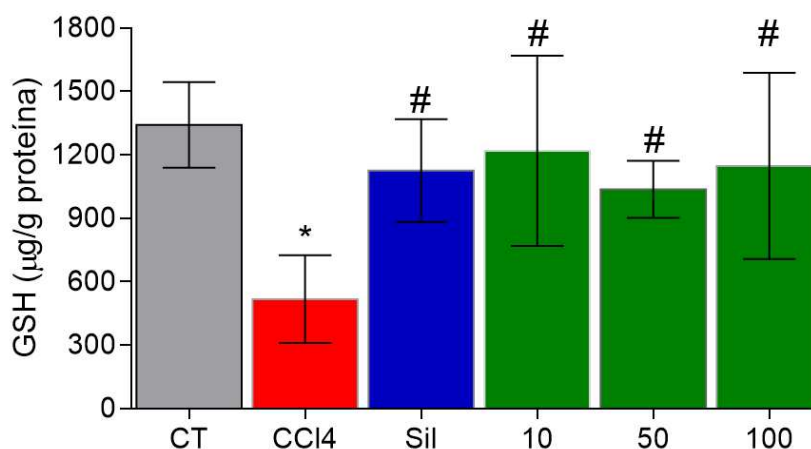


Legenda: Dosagem de Albumina; g/dL – gramas por decilitro. Os resultados foram expressos com $p < 0,05$, e porcentagem média \pm erro padrão da média (SEM) utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet obtidos através do software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

Fonte: a Autora.

Os resultados obtidos através da determinação da glutathiona reduzida (GSH) demonstraram que os grupos tratados com o (-)-alfa-Bisabolol apresentaram concentrações de GSH semelhantes ao grupo controle positivo (Silimarina). O grupo tratado com apenas com CCl₄ apresentou depleção nos níveis de GSH, evidenciando a lesão celular e o estresse oxidativo causado por esta substância. Os resultados foram expressos em $\#p < 0,05$, e representam diferença estatística em comparação ao grupo modelo (CCl₄).

Figura 9: Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH)

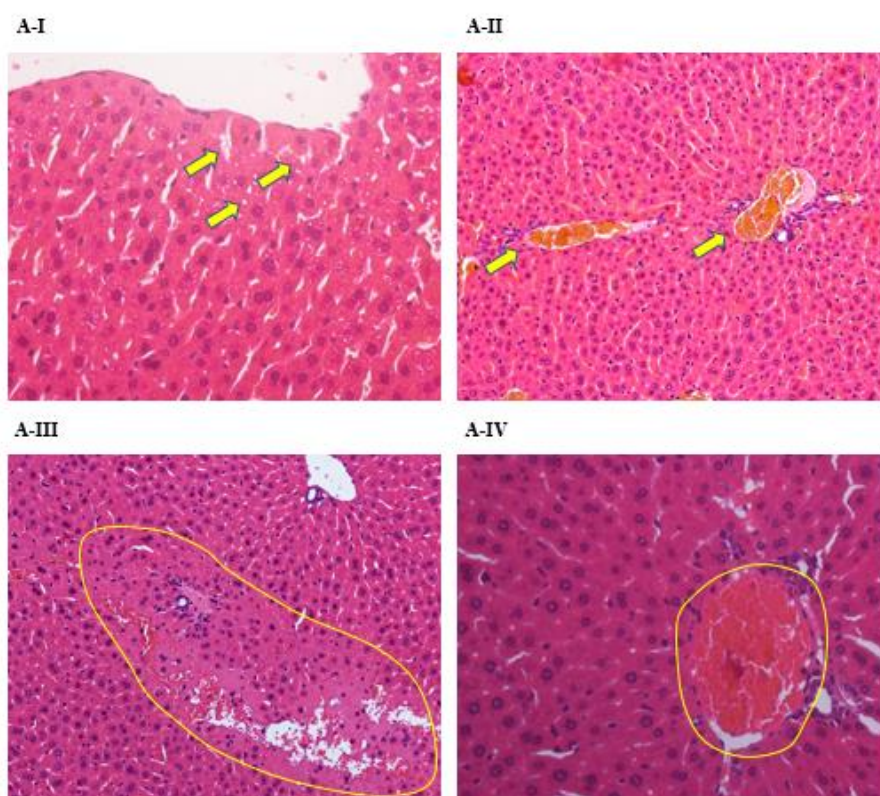


Legenda: Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH); $\mu\text{g/g}$ – microgramas por gramas de proteína. $*p < 0,05$ em comparação ao grupo controle e $\#p < 0,05$ em comparação ao grupo modelo (CCl₄), em porcentagem média \pm erro padrão da média (SEM) utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet obtidos através do software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

Fonte: a Autora.

Nas análises histológicas algumas alterações foram observadas, das quais, a presença de vacuolização, de congestão vascular, de fibrose interlobular, de hemorragia, de degeneração hidrópica, de infiltrado inflamatório e de dilatação de sinusóides nos graus ausentes ou leves. Não foram observadas células de Kupfer. Para o grupo controle negativo, observou-se a presença discreta de vacúolos e de degeneração hidrópica próxima a veia porta (figura 10: A-I). Já para o grupo modelo foi possível visualizar uma leve presença de edema, infiltrado perivascular e vasos congestionados dispersos (figura 10: A-II). O grupo controle positivo apresentou leve tumefação dos hepatócitos da perivascularatura central. Os grupos tratados com (-)-alfa-Bisabolol nas concentrações utilizadas apresentaram leve fibrose ou hialinização próximo a veia portal (figura 10: A-III), bem como a discreta presença de vasos congestionados e infiltrado celular (figura 10: A-IV).

Figura 10: Fotomicrografias das análises histológicas



Legenda: A-I (seta amarela) – Grupo controle negativo: vacúolos intracitoplasmáticos e degeneração hidrópica próxima a veia porta (+) em aumento de 40x; A-II (seta amarela) – Grupo modelo: discreto edema, vasos congestionados dispersos e infiltrado perivascular (+) em aumento de 20x; A-III (circunferência amarela) – Grupo Bis 1mL/Kg: fibrose ou hialinização e hemorragia intersticial (+) em aumento de 20x; A-IV (circunferência amarela) – Grupo Bis 5mL/Kg: Vasos congestionados, infiltrado perivascular e hepatócitos grande e desnudos (+) em aumento de 20x.

Fonte: a Autora.

A partir das observações histológicas realizadas, foram atribuídos escores de acordo com a extensão e o tipo de alterações observadas. Como mostrado na tabela 5, o tratamento com Bisabolol foi capaz de reduzir a gravidade das lesões observadas.

Tabela 5 - Escores atribuídos as alterações histopatológicas

	Controle Negativo	Modelo	Controle Positivo	Bis 1 mL/Kg	Bis 5 ml/Kg	Bis 10 mL/Kg
Vacuolização	0	0	0	0	0	0
Congestão	+	+	+	0	+	++
Fibrose	+	0	0	+	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0
Degeneração hidrópica	+	0	0	+	+	+
Infiltrado inflamatório	+	+	0	0	0	+
Dilatação de sinusóides	+	+	0	0	0	0
Células de Kupfer	ndn	ndn	Ndn	ndn	ndn	ndn

Fonte: a Autora.

6 DISCUSSÃO

O fígado é responsável por diversas funções metabólicas que visam a manutenção da homeostase do organismo. Ele é um órgão essencial para os processos de depuração de substâncias, síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos, lipídeos, xenobióticos, entre outros (STOLZ, 2002). A lesão hepática aguda (LHA) pode acarretar em insuficiência do órgão em um curto intervalo de tempo, com perda da função metabólica (BALDO, 2008). A LHA é caracterizada por uma rápida perda das funções hepáticas e, consequentemente, sistêmicas (POLSON; LEE, 2005). Embora existam diversas inovações farmacêuticas e no manejo clínico dessa patologia, o único tratamento eficaz ainda consiste no transplante de hepático (MANI; VAN THIEL *et al.*, 2001). A abordagem terapêutica da LHA está relacionada ao tratamento da patologia responsável pelo seu aparecimento e o manejo das complicações sistêmicas observadas (GOLDBERG; CHOPRA, 2006).

A lesão hepática induzida por medicamentos (DILI) é a causa mais comum de IHA nos EUA. É também um dos motivos mais comuns para retirada pós-comercialização de medicamentos em todo o mundo (MCGILL; JAESCHLE, 2019). Apesar da gravidade desta patologia, de acordo com Lunardelli (2016), nos países da América Latina existem poucos registros na literatura acerca da sua incidência. A principal medida terapêutica consiste na imediata suspensão do medicamento causador. Além disso, mesmo nas formas crônicas, não existem evidências científicas que comprovem uso de medicamentos, como por exemplo, corticoides na terapia farmacológica da DILI (SOUZA *et al.*, 2016).

Tendo em vista a deficiência de terapia medicamentosa para esta patologia, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito hepatoprotetor do (-)-alfa-Bisabolol em modelo de LHA. Os estudos foram realizados em modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4).

O CCl_4 é absorvido rapidamente por todas as vias, sejam elas: oral, subcutânea ou intraperitoneal, e atinge o seu pico de concentração no intervalo de 1 a 6 horas, dependendo da concentração e da dose administrada (MANIBUSAN *et al.*, 2010). Apesar de ser bastante utilizado para induzir lesão hepática em ensaios *in vivo*, ainda não há uma padronização da dose dessa substância a ser administrada para induzir LHA. Contudo, os dados presentes na literatura acerca da padronização da dosagem a ser utilizada indicam que a dose de 0,5 mL/Kg é capaz provocar LHA em ratos (VIEIRA, 2014), e para camundongos, foi observada com uma concentração de 0,2 mL/Kg (em azeite de oliva) via i.p. (ROCHA *et al.*, 2019). Dessa maneira, no presente estudo foram utilizadas doses de 0,01 mL/Kg de uma solução a 0,2% em

azeite de oliva via intraperitoneal. Estas foram capazes de induzir a LHA em todos os grupos, tendo em vista os resultados obtidos com baixa observação de mortalidade.

A dosagem da atividade plasmática de transaminases é amplamente utilizada para avaliar dano hepatocelular, sendo ALT importante marcador de morte em lesões hepatocelulares ocasionadas por medicamentos (BJÖRNSSON; OLSSON, 2005). Os níveis de AST e ALT superiores 1.000 UI/L normalmente estão ligados à disfunção hepática e têm sido utilizados para caracterizar a hepatotoxicidade (CRAIG, DARREN *et al.*, 2011). No presente estudo, os animais que receberam apenas CCl₄ apresentaram valores de AST e ALT próximos de 1000 U/L após 24 horas da sua administração. Em contrapartida, o tratamento com (-)-alfa-Bisabolol nas doses de 10 mg/Kg, 50 mg/Kg e 100 mg/Kg foi capaz de proteger o tecido hepático da alteração da atividade das aminotransferases.

O extrato das folhas de *Cassia auriculata* Linn e de *Cassia occidentalis* apresentaram resultados satisfatórios quando utilizados no tratamento de doenças hepáticas. Foi utilizada a indução por etanol, e o efeito protetor atribuído à atividade antioxidante produzida pela presença dos flavonoides. De acordo com os resultados obtidos, os níveis séricos das transaminases foram mantidos (RAJAGOPAL *et al.*, 2003). Demonstrando, portanto, concordância com a literatura, pois as enzimas ALT e AST são consideradas hepatoespecífica e elevam-se imediatamente após lesão hepatocelular e funcionam como um marcador sérico (CHOI *et al.*, 2006; PEREIRA, 2006).

Outros compostos bioativos também vêm sendo utilizados com finalidade hepatoprotetora, como por exemplo, a *Ambrosia marítima* (AHMED; KHATER, 2001), a *Trianthema portulacastrum* (KUMAR, *et al.*, 2004), a *Strychnos potatorum* Linn (SANMUGAPRIYA; VENKATARAMAN, 2006) e a *Hedyotis corymbosa* (SADASIVAN *et al.*, 2006).

Dados acerca da atividade hepatoprotetora do Bisabolol ainda não foram descritos. Contudo, de acordo com Solidônio (2009), bioativos oriundos a partir da camomila possuem atividade hepatoprotetora. Os mecanismos de proteção estão relacionados a presença de flavonoides, que são capazes de afetar o metabolismo de esfingolipídios e células hepáticas lesionadas por CCl₄ (BABENKO; SHANKOVA, 2006). O presente trabalho acrescenta que o Bisabolol e, possivelmente, outros terpenos podem também estar associados a esse efeito. De fato, a atividade hepatoprotetora de terpenos já foi descrita previamente (COLOMA *et al.*, 2011).

A albumina sérica é sintetizada de maneira exclusiva pelos hepatócitos, com meia-vida entre 15 a 20 dias. Assim, não é considerada um bom indicador para avaliação do dano

hepático agudo. Em contrapartida, a hipoalbuminemia é comum nas doenças hepáticas crônicas, como por exemplo, em quadros de cirrose (NUNES; MOREIRA, 2007). Para Thrall *et al.* (2015), a concentração de albumina pode ser afetada por outros fatores além da disfunção hepática, que compreendem os processos inflamatórios orgânicos, o parasitismo, o equilíbrio hidroeletrolítico e o nível nutricional. Dessa forma, o nível de albumina deve ser avaliado em associação com outros metabólitos, para excluir a influência de outros fatores em seus níveis.

A fosfatase alcalina possui meia vida de cerca de 7 dias, e seus valores costumam estar elevados em casos de disfunção hepática. Eleva-se em 1 a 2 dias após episódio de colestase, ou seja, quando há bloqueio nas vias biliares, permanecendo por vários dias, mesmo após a resolução da obstrução (REICHILING; KAPLAN, 1988). Níveis elevados de fosfatase alcalina (FAL), em até duas vezes maior que o limite superior (TAJIRI; SHIMIZU, 2008).

Em conjunto, esses marcadores laboratoriais são empregados no diagnóstico diferencial do tipo de lesão hepática. Redução nas concentrações de albumina sérica indicam lesão hepática prolongada ou cronificada, enquanto aumento de FAL estão relacionadas à obstrução biliar (COUTO *et al.*, 2008). A lesão hepatocelular aguda, por sua vez, ocorre com aumento de ALT e AST (Choi *et al.*, 2006) e da razão ALT/FAL, com valor superior a 5 (BITTENCOURT, 2011). É importante ressaltar que, tendo em vista que o metabolismo ósseo pode alterar os valores de FAL (GOMES, 2014), recomenda-se o doseamento e avaliação de outros biomarcadores com atividade no tecido hepático associá-la ao dano hepático. No presente trabalho, os resultados dos marcadores hepáticos evidenciam que a lesão induzida por CCl₄ é de natureza aguda e hepatocelular, o que corrobora com dados previamente publicados (MCGILL; JAESCHLE, 2019).

O estresse oxidativo é um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante *versus* antioxidante, a favor do estado pró-oxidativo. Ele pode ser causado pelo acúmulo de produtos do metabolismo celular normal ou pela ação de substâncias químicas tóxicas. O ciclo da glutathiona reduzida (GSH) é um sistema protetor que minimiza a lesão celular do estresse oxidativo. Quanto menor os níveis celulares de GSH, menor será a defesa celular contra toxicantes, podendo resultar em morte celular (ROBBINS *et al.* 2005). Os grupos tratados com o (-)-alfa-Bisabolol apresentaram concentrações de GSH semelhantes ao grupo controle positivo (Silimarina), enquanto o grupo tratado com apenas com CCl₄ apresentou depleção nos níveis de GSH, evidenciando a lesão celular e o estresse oxidativo causado por esta substância.

De acordo com Souza (2014), a atividade antioxidante do Bisabolol está relacionada a sua capacidade de combater radicais livres e restaurar o equilíbrio redox. Estudos *in vitro* de lesão renal aguda demonstraram que essa propriedade pode estar relacionada a sua capacidade de inibir a oxidação catalítica de NADPH por meio da inibição de NADPH oxidase (SAMPAIO, 2019).

A glutatona é, normalmente, regenerada pelo fígado e pelo músculo esquelético às custas de NADPH⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídio). Este, por sua vez, é utilizado como substrato pela enzima glutatona redutase, originando como produto a glutatona, o principal substrato para o sistema glutatona peroxidase (SILVEIRA *et al.*, 2008). Dessa forma, os níveis de GSH do presente estudo, para os grupos testados com as doses de Bisabolol, podem estar diretamente relacionados com a atividade antioxidante dessa substância através da vida supracitada.

A indução por CCl₄ é capaz de causar alterações no fígado que resultam em esteatose hepática, necrose celular, fibrose e cirrose. Essas alterações refletem nas análises histológicas, as quais é possível observar a presença de necrose de região centrilobular, esteatose microvesicular e forte presença de infiltrado inflamatório no tecido hepático (VIEIRA, 2014).

No presente experimento, a análise histopatológica evidenciou um processo de alteração hepatocelular nos graus ausentes a leves de acordo com os parâmetros analisados. Foi possível observar a presença, principalmente, de congestão e infiltrado inflamatório em todos os grupos experimentais. Evidenciando, portanto, o dano causado pela indução por CCl₄. Os grupos tratados com Bisabolol demonstraram elementos semelhantes de lesão hepática, quando comparados com o grupo Silimarina. Estes por sua vez foram classificados como ausentes ou leves.

Um estudo publicado pelo Ministério da Saúde (2015), a respeito da potencial atividade protetora do extrato da camomila, demonstrou que este quando utilizado no tratamento de ratos diabéticos, além de causar redução significativa dos níveis de glicose no sangue, foram capazes de reduzir as atividades séricas das enzimas hepáticas, incluindo AST, ALT e ALP. Além disso, o efeito hepatoprotetor deste foi confirmado por observação histológica em tecido hepático e renal dos ratos diabéticos tratados.

No entanto, a avaliação destes parâmetros observados carece de dados acerca do tratamento da LHA por Bisabolol em indução por CCl₄. Essas limitações se dão por conta da escassez de estudos que indiquem os possíveis mecanismos nos resultados obtidos. Ademais, os resultados apresentados reforçam a necessidade de novas pesquisas com este bioativo,

objetivando aprofundar e assegurar os resultados apresentados, tendo em vista que a partir do presente estudo, foi possível observar uma potencial atividade hepatoprotetora do (-)-alfa-Bisabolol.

7 CONCLUSÃO

Portanto, o (-)-alfa-Bisabolol apresentou possível atividade hepatoprotetora em modelo *in vivo* de hepatotoxicidade aguda induzido por CCl₄. No entanto, devido os estudos nessa área ainda serem bastante limitados, ressalta-se a importância de estudos posteriores para melhor elucidação da sua atividade, bem com o aprofundamento do conhecimento científico sobre essa molécula, visando a sua utilização como uma alternativa terapêutica mais eficaz e menos tóxicas para o tratamento de doenças hepáticas.

REFERÊNCIAS

- AGATONOVIC-KUSTRIN, S. *et al.*; Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1385, p. 103–110, 2015.
- AGUILAR, C. S.; **Frequência da ingestão de café em grupos de hepatopatias crônicas portadores do vírus da hepatite B e C: o efeito protetor do café na evolução de hepatopatias crônicas**. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- AHMED, M. B.; KHATER, M. R.; Evaluation of the protective potential of Ambrosia maritime extract on acetaminophen-induced liver damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 169–174, 2001.
- ALBERTO S.F.; PIRES S.S.; FIGUEIREDO A.; DEUS, J.R.; Insuficiência Hepática Aguda. **Acta Med. Port.** 22(6):809-820, 2009.
- ANDRADE, P. *et al.*; Gama-gt e doença hepática alcoólica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 5, n. 3, p. 119-23, 1992.
- ARAÚJO, G. T. *et al.*; Betaine a potential agente for the treatment of hepatopathy associated with short bowel syndrome. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, n. 6, p. 1366-1371, 2014.
- AZIZ, M. A. *et al.*; Traditional uses of medicinal plants practiced by the indigenous communities at Mohmand Agency, FATA, Pakistan. **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 14, n. 2, p. 1–16, 2018.
- BABENKO, N. A.; SHANKOVA, E. G.; Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats. **Experimental Gerontology**, v. 41, p.32-39, 2006.
- BAHMANI, M. *et al.*; Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. **Journal of Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, n. 4, p. 292-301, 2015.
- BATISTA, C. H.; Indicadores de lesão e função hepática. **Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 10, 2016.
- BERTOLAMI, M. C.; Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 85, supl. 5, p. 25-27, Oct. 2005.
- BEZERRA, S. B.; **Atividade gastroprotetora e antimicrobiana do extrato seco de Matricaria recutita (camomila) e do alfa-bisabolol: possíveis mecanismos de ação**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- BEZERRA, S. B. *et al.*; Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP⁺ channels. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 6, p. 1403–1406, 2009.

BITTENCOURT, P. L.; Destaques da Reunião com expertos em Hepatotxicidade da Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH). Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **GED gastroenterol. endosc.dig.** 2011: 30(Supl.1):06-47.

BOLZANI, V. D. S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS, C.; Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 84, n. 9, p. 1837, 2012.

BREITMAIER, E.; Terpenes: importance, general structure and biosynthesis. In: Brent J, editor. **Clinical care toxicology: diagnosis and management of the critically poisoned patient**. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2005.

BUITRAGO, A. *et al.*; Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Tachira-Venezuela. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 2, p. 375–377, 2015.

CAMACHO, V. R. R.; **A relação entre o dano de isquemia/reperfusão renal e o estímulo à fibrogênese em modelo experimental em fígado de ratos: comprando diferentes soluções de preservação**. Tese (Doutorado em Gastroenterologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CAMILO, M. E.; LOURENÇO, R. Albumina da fisiopatologia ao uso terapêutico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 8, n. 5, p. 298-305, 1995.

CARVALHO, A. C. *et al.*; Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n. 3, p. 467–473, 2011.

CAVALIERI, E. *et al.*; α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 315, n. 3, p.589-594, 2004.

CHEN, W. *et al.*; α -Bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NF κ B. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 247–254, 2010.

CHENG, N. *et al.*; Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 55, n 1, p. 234-240, 2013.

CHOI, J. S. *et al.*; Glycoprotein isolated from *Acanthopanax senticosus* protects against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 29: 306-314. 2006.

CIRILO, V. K.; Manual de Plantas Medicinais, 44th ed.; **Ed. Assessorar**, Paraná, Brazil, 1993.

COLOMA, A. G. *et al.*; Triterpene-based plant defenses. **Phytochem Ver**, v. 10, p. 245-260, 2011.

COSTA, I. A. F.; OLIVEIRA, F. S. Fármacos hepatotóxicos e hepatoprotetores: uma revisão de literatura. **Revista da Universidade Federal da Paraíba**, v. 17, n. 1, 2020.

COSTA, N. D. J. *et al.*; Potencial terapêutico e tecnológico da planta *Calotropis procera*. **Revista Gestão Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 3, p. 2222-2236, 2015.

COSTARELLI, L. *et al.*; In Vivo Effect of α -Bisabolol, a Nontoxic Sesquiterpene Alcohol, on the Induction of Spontaneous Mammary Tumors in HER-2/neu Transgenic Mice. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 409–418, 2010.

COUTO, J. L. A. *et al.*; Liver function abnormalities in undernourished and *Schistosoma mansoni* - infected mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.4, p.390-393, 2008.

CRAIG, D. G. N. *et al.*; Overdose pattern and outcome in paracetamol-induced acute severe hepatotoxicity. **British journal of clinical pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 273-82, fev. 2011.

DA SILVA, A. P. *et al.*; Antitumor activity of (-)-alpha-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2987–2993, 2010.

DE SIQUEIRA, R. J. B. *et al.*; (-)- α -Bisabolol inhibits preferentially electromechanical coupling on rat isolated arteries. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 37–45, 2014.

DEBARBHAVI, H.; An Update on Drug-Induced Liver Injury. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, 2012, 2(3): 247 – 259.

DINIZ, J. A.; **Siparuna guianensis Aublet como nova fonte de α -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus***. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M.; Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Oxygen Radicals In Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants**, [s.l.], p.421-431, 1990.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O.; Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African journal of biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

FERNANDES, M. Y. S. D.; **Efeito neuroprotetor do α -bisabolol em camundongos submetidos á isquemia cerebral focal permanente**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

FIOCRUZ/CICT/SINITOX (Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Informação Científica e Tecnológica/ Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Brasil, Rio de Janeiro, 2017.

FRIKECHE, J. *et al.*; Research on the immunosuppressive activity of ingredients contained in sunscreens. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 3, p. 211–218, 2015.

FONTANA, R. J.: Acute Liver Failure. In: Sleisenger & Fordtran's. **Gastrointestinal and Liver Disease**. Philadelphia. Elsevier edition 8th Ed. 2006: 1993-2003.

GAZIANO, J. M.; GIBSON, C. M.; Potential for Drug–Drug Interactions in Patients Taking Analgesics for Mild-to-Moderate Pain and Low-Dose Aspirin for Cardioprotection. **The American Journal Of Cardiology**, [s.l.], v. 97, n. 9, p.23-29, maio 2006. Elsevier BV.

GOLDBERG, E.; CHOPRA, S.; **Overview of treatment of fulminant hepatic failure. Fulminant hepatic failure: Definition, etiology and prognostic indicators.** UpToDate. Aug, 2006.

GOMES, D. L. F.; **Biomarcadores para a avaliação da lesão hepática induzida por fármacos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia. Portugal, 2014.

HUANG, C. C. *et al.*; Phytocompounds from *Vitiskelungensis* stem prevent carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food Chemistry, London**, v. 125, n. 2, p. 726-773, 2013.

ISOLANI, A. P. *et al.*; Avaliação enzimática e sorológica para hepatite B de funcionários de uma instituição de ensino superior em Campo Mourão-PR. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, 2013.

JESUS, G. C. *et al.*; Principais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas. **Revista Estudos, Vida e Saúde**, Goiânia, v. 41, n. 3, p.525-537, 2014.

KIM, J. *et al.*; Enhanced topical delivery of small hydrophilic or lipophilic active agents and epidermal growth factor by fractional radiofrequency microporation. **Pharm Res.** 2012 Jul;29(7):2017-29.

KOKUBO, T. *et al.*; The effect of L-ornithine on the phosphorylation of mTORC1 downstream targets in rat liver. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 20, n. 4, p. 238-245, 2015.

KUMAR, C. H. *et al.*; A review on hepatoprotective activity of medicinal plants. **Int J Pharm Sci Res**, 2011.

KUMAR, G. *et al.*; Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 37– 40, 2004.

LabTest®. **Instruções de Uso. Fosfatase Alcalina.** Ref. 40. Junho, 2009.

LabTest®. **Instruções de Uso. ALT/GPT Liquiform Vet.** Ref. 1008. Abril, 2012.

LabTest®. **Instruções de Uso. Albumina.** Ref. 19. Outubro, 2013.

LabTest®. **Instruções de Uso. AST/GOT Liquiform.** Ref. 109. Fevereiro, 2014.

LEVY, C.; SEEFF, L. D.; LINDOR, K. D.; Use of herbal supplements for chronic liver disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 2004.

LIANG, Y. *et al.*; Antitumor activity of the protein and small molecule component fractions from *Agrocybe aegerita* through enhancement of cytokine production. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 4, p. 439–46, 2014.

LIU, Q. *et al.*; Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 1316-1321, 2011.

LOPES, R. V. C. *et al.*; Betaína e colina dietéticas relacionadas à homocisteína plasmática: estudo de base populacional, São Paulo, Brasil. **Internacional Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 28, n. 1, p. 61-69, 2015.

LUNARDELLI, *et al.*; lesão hepática induzida por medicamentos: qual o papel do farmacêutico clínico?. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde**. São Paulo v.7 n.4 31-35 out./dez. 2016.

MACIEL, C. L. Z.; TERRAZZAN, A. C.; Papel da colina na gestação humana: revisão da literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 3, n. 3, p. 481-492, 2017.

MAKWANA, R. *et al.* The Effect of Phytocannabinoids on Airway Hyper- Responsiveness, Airway Inflammation, and Cough s. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 353, p. 169–180, 2015.

MANDER, L.; LIU, H. W. Comprehensive natural products II: chemistry and biology. **Elsevier**, 2010.

MANIBUSAN, M. *et al.*; **Toxicological review of carbon tetrachloide**. Washington: United States Environmental Protection Agency (EPA), 2010.

MARCHI, J. P. *et al.*; Curcuma longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, p. 189-194, 2016.

MARMITT, D. J. *et al.*; Potencial hepatoprotetor das plantas medicinais da renisus: revisão sistemática. **Rev. Aten. Saúde**, São Caetano do Sul, v. 14, n. 49, p.84-91, jul./set. 2016.

MARTINS, M. J.; **Principais Funções do Fígado**. Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) 2012.

MAURYA, A. K. *et al.*; α -(-)-bisabolol Reduces Pro-inflammatory Cytokine Production and Ameliorates Skin Inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173–81, 2014.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B.; A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy research**, v. 20, p. 519–530, 2006.

MERK. Sigma-Aldrich®. **Product Information**.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o estudo de patologias do fígado. **Prática Hospitalar**, Ano IX, n. 51, p. 44-48, 2007.

Ministério da Saúde e Anvisa. **Monografia da espécie *Matricaria chamomilla* L. (=Chamomilla recutita (L.) Rauschert, camomila)**. Brasil. Brasília. 2015

MORA, S. I. *et al.*; Chronic liver diseases and the potential use of S-adenosyl-L-methionine as a hepatoprotector. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 30, n. 8, p. 893-900, 2018.

MOTTA, V. T.; Bioquímica clínica: princípios e interpretações. **Ed. Medbook**, 2009.

NASSAN, M. A. *et al.*; Ameliorative effect of curcumin and vitamin B₆ against lithocholic acid-induced cholestasis and liver injury in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 11, n. 2, p. 50-63, 2018.

NELSON, L. *et al.*; Goldfrank's toxicologic emergencies. **Ed. New York: McGraw-Hill Professional**, 9nd. 2011.

NEWMAN, D. J.; The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 28, p. 402-414, 2017.

NUNES, P. P.; MOREIRA, A. L. Fisiologia Hepática: Texto de apoio Faculdade de Medicina da Universidade do Porto Serviço de Fisiologia, 2006-2007.

PEREIRA, B S; **Avaliação das atividades gastroprotetora e hepatoprotetora dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. em modelo experimental in vivo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

PINTO, C. *et al.*; Xanthohumol prevents carbon tetrachloide-induced acute liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 3405-3412, 2012.

PORUBSKY, P. R.; MENEELY, K. M.; SCOTT, E. E.; Structure into the binding of human cytochrome P₄₅₀-2E1: inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, n. 48, p. 33698-33707, 2008.

RAJAGOPAL, S. K. *et al.*; Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 14: 452–458. 2003.

REICHILING, J.J.; KAPLAN, M.M.; Clinical use of serum enzymes in liver disease. **Dig Dis Sci**. 33:1601-1614, 1988.

RIBEIRO, V. P. *et al.*; Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p.253-268, 1 jan. 2018.

RIGO, A.; VINANTE, F.; The antineoplastic agent α -bisabolol promotes cell death by inducing pores in mitochondria and lysosomes. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 21, n. 8, p. 917–27, 2016.

RITTER, L.; GAZZOLA, J.; Nutritional evaluation of the cirrhotic patient: an objective, subjective or multicompartamental approach?, **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43, n. 1, p. 66-70, 2006.

ROCHA, J. E. et al.; Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) baker e seu composto majoritário α -bisabolol. **In: X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, Juazeiro da Bahia. Anais do X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2015.

ROCHA, N. F. M. **Estudo do efeito do alfa-bisabolol em modelos de animais de nocicepção, inflamação e úlcera gástrica em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ROCHA, N. F. M. *et al.*; Gastroprotection of (-)- α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: The possible involved pharmacological mechanisms. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 63–71, 2010.

ROCHA, S. W. S.; Dietilcarbamazina (dec) protege contra hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono (ccl₄) em camundongos, por reduzir marcadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo. Ed. Atena. **Rev Ciências da Saúde: da Teoria à Prática**. cp.14, p, 125-129. 2019.

ROH, T. *et al.*; Detoxifying effect of pyridoxine on acetaminophen-induced hepatotoxicity via suppressing oxidative stress injury. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 11- 22, 2018.

ROSA, D. P.; **Hepatoproteção dos antioxidantes melatonina e n-acetilcisteína na hipóxia intermitente**. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

ROTTINI, M. M. *et al.* In vitro evaluation of (-)- α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 66–72, 2015.

SADASIVAN, S. *et al.*; Hepatoprotective studies on *Hedyotis corymbosa* (L.) Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 245–249, 2006.

SALDANÑA, P. C. *et al.*; Análisis fitoquímico, actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto acuoso liofilizado de *Curcuma longa* en lesiones hepáticas inducidas con tetraclorometano en ratas albinas. **Revista Peruana de Medicina Integrativa**, v. 2, n. 3, p. 765-772, 2017.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H.; Modelos animais de lesão hepática induzida por drogas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 5, pág. 1031–1039, 2019.

SAMPAIO, T. L. *et al.* Nephroprotective effects of (-)- α -bisabolol against ischemic reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1843–1852, 2016.

SAMPAIO, T. L. *et al.*; Involvement of NADPH-oxidase enzyme in the nephroprotective effect of (-)- α -bisabolol on HK2 cells exposed to ischemia–Reoxygenation. **European Journal of Pharmacology**, v. 855, p. 1–9, 2019.

SANMUGAPRIYA, E.; VENKATARAMAN, S.; Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 154–160, 2006.

SANTOS, M. O. *et al.*; Medicinal plants: Versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **An Acad Bras Cienc**, v. 90, n. 3, p. 2767–2779, 2018.

SCHINONI, M. I.; Fisiologia Hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 2, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, Raymond H.; Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 25, p.192-205, 1968.

SEKI, T. *et al.*; Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2199–2205, 2011.

SHEMITT, E. G.; **Ação da glutamina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório na insuficiência hepática aguda grave**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SILVA, G. H. *et al.*; Avaliação da atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo em modelo experimental de lesão hepática por paracetamol 51 em ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 489-496, 2014.

SILVEIRA, L. R. *et al.*; Regulação metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. **Rev Bras Med Esporte**, Niterói, v. 14, n. 1, p. 57-63, Feb. 2008.

SOLIDÔNIO, E G; **Avaliação microbiológica de materiais de camomila (*Matricaria recutita* L.) irradiados, empregados na produção de chás**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUZA, E. R. L.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; Análise farmacológica in sílico do α -bisabolol relacionado à odontologia. **II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**, Fortaleza, p.1-6, jun. 2017.

STRAUSS, *et al.*; Programa de Educação Médica Continuada: Falência hepática aguda. São Paulo: **Atha Comunicação e Editora**, 2011.

STURM, E.; LEXMOD, W. S.; VERKADE, H. J.; Pediatric acute liver failure: variations in referral timing are associated with disease sub types. **Eur J Pediatr**, 2015.

SUCHY, F. J.; SOKOL, R.J.; BALISTRERI, W. F.; Liver disease in children. **New York: Cambridge University Press**, 4a ed. 2014.

SUGA, T. *et al.* Altered bile acid composition and disposition in a mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 379, n. 1, p. 1-41, 2019.

TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y.; Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. **World J Gastroenterol**, 2008, 14(44): 6774–6785.

THRALL M. A. *et al.*; Hematologia e bioquímica clínica veterinária. **Guanabara Koogan**, 2 ed. Rio de Janeiro, p. 349 a 360, 2015.

TIMM, L. L.; Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. Métodos de Estudo em Biologia. **Caderno La Salle XI**, Canoas, v.2, nº 1, 231 - 239, 2005.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, 2014.

TUNG, B. T.; HAI, N. T.; SON, P. K.; Hepatoprotective effect of Phytosome Curcumin against paracetamol-induced liver toxicity in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1-13, 2017.

UNO, M. *et al.*; α -Bisabolol Inhibits Invasiveness and Motility in Pancreatic Cancer Through KISS1R Activation. **Anticancer Res.** 2016 Feb;36(2):583-9. v. 590, p. 583–589, 2016.

VELAZQUEZ, M. I.; Insuficiencia hepática aguda. **Rev Cub Med Mil**, Ciudad de la Habana, v. 30, supl. 5, p. 63-70, dic. 2001.

VIEIRA, B. M.; Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos wistar. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

VILA, R. *et al.*; Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of alfa-bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2510–2514, 2010.

WANG, M. *et al.*; Zerumbone Protects against Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Acute Liver Injury in Mice via Inhibiting Oxidative Stress and the Inflammatory Response: Involving the TLR4/NF- κ B/COX-2 Pathway. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 10, p.1964,2019.

YANG, R. *et al.*; The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p.5-18, 21 set. 2016.

ZARGARAN, A. *et al.*; Potential effect and mechanism of action of topical chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) oil on migraine headache: A medical hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 83, n. 5, p. 566–569, 2014.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEUA-UFC)



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito hepatoprotetor do (-)-alfa-Bisabolol em hepatotoxicidade aguda induzida por CCl₄", protocolada sob o CEUA nº 9790260819 (ID 001282), sob a responsabilidade de **Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes e equipe; Helaynne Gomes do Nascimento; Tiago Lima Sampaio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 18/09/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the hepatoprotective effect of (-)-alpha-Bisabolol on CCl₄-induced acute hepatotoxicity", utilizing 60 Heterogenics mice (60 males), protocol number CEUA 9790260819 (ID 001282), under the responsibility of **Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes and team; Helaynne Gomes do Nascimento; Tiago Lima Sampaio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 09/18/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2019](#) a [12/2020](#)

Área: [Departamento de Análises Clínicas E Toxicológicas](#)

Origem: [Biotério Prof. Eduardo Torres \(setorial FAMED\)](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [7 a 8 semanas](#)

N: [60](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [18 a 22 g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão realizados em sala especial no Laboratório de Pesquisa Renal e Doenças Tropicais.

Fortaleza, 04 de fevereiro de 2021

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará