



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ALANA FONTELES LIMA RABELO

ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA DA *trans*-
DESIDROCROTONINA (*t*-DCTN), UM DITERPENÓ OBTIDO DE
***Croton cajucara* BENTH, E DE ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS**
PREVENTIVAS EM MODELOS ANIMAIS.

FORTALEZA

2008

ALANA FONTELES LIMA RABELO

ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA DA *trans*-DESIDROCROTONINA (*t*-DCTN),
UM DITERPENÓ OBtido DE *Croton cajucara* BENTH, E DE ESTRATÉGIAS
FARMACOLÓGICAS PREVENTIVAS EM MODELOS ANIMAIS.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

FORTALEZA

2008

R114e Rabelo, Alana Fonteles Lima

Estudo da toxicidade hepática da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) um diterpeno obtido de *Croton cajucara* Benth, e de estratégias farmacológicas preventivas em modelos animais / Alana Fonteles Lima Rabelo. – Fortaleza, 2008.

107 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza – CE, 2008.

1. *Croton* 2. Euphorbiaceae 3. Diterpenos 4. Diabetes
5. Hepatite tóxica I. Rao, Vietla Satyanarayana (orient.)
II. Título.

CDD: 615.32395

ALANA FONTELES LIMA RABELO

ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA DA *TRANS*-DESIDROCROTONINA (*T*-DCTN),
UM DITERPENÓ OBTIDO DE *CROTON CAJUCARA* BENTH, E DE ESTRATÉGIAS
FARMACOLÓGICAS PREVENTIVAS EM MODELOS ANIMAIS.

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

Data da aprovação: 20/08/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Adriana da Rocha Tomé
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará

*Aos meus pais, Cláudio Oliveira Lima e
Maria Eronildes Fonteles Lima, pelo amor
incondicional, pela vida que me
proporcionaram e pelo apoio na conquista
dos meus ideais.*

*Ao meu grande amor, Leirton, por me
acompanhar em todos os momentos, com
amor, paciência e dedicação.
Obrigada por me fazer tão feliz.*

*Às minhas irmãs, Aline e Alice, por
acreditarem em mim e por se inspirarem com
a minha batalha pelo conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. **Vietla Satyanarayana Rao**, pela orientação científica, ensinamentos, amizade, incentivo e paciência durante a realização deste trabalho.

À profa. Dra. **Flávia Almeida Santos** pela colaboração.

À profa. Dra. **Maria Aparecida Maciel**, pelo fornecimento da *Trans-desidrocrotonina*, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Dra. **Adriana Tomé** pela colaboração na análise histopatológica.

Aos **professores da Pós-graduação** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, pelos ensinamentos.

Aos amigos **Danilo, Iana e Tiago**, que me acompanharam desde a graduação até o mestrado, pelo incentivo e momentos de risadas que compartilhamos juntos nesta trajetória.

Ao ex-doutorando e agora doutor **Roberto César** pelos conselhos e apoio no início do mestrado.

Aos pós-graduandos **Ana Carla, Caroline Mourão, Cinthya Iamille, Deive Campos, Otacílio Júnior**, em especial a **Marjorie Guedes** e **Silvéria Lira** pela amizade sincera e ajuda na realização dos experimentos.

Aos bolsistas e ex-bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), **Aline, Daniel, Lívia, Patrícia, Saulo, Sâmia, Rafaela, Rhandell e Tiago**, pela ajuda nos mutirões em dias de experimentos e pelas conversas animadas que tornavam estes momentos mais descontraídos.

À minha companheira de estudo, **Juliana Lemos**, pelas palavras de incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, **Alana, Aura, Chiquinho, Edmilson, Fernando, Íris, Mônica** pela presteza e dedicação com que sempre me atenderam.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

RESUMO

ESTUDO DA TOXICIDADE HEPÁTICA DA *trans*-DESIDROCROTONINA (*t*-DCTN), UM DITERPENÓIDE OBTIDO DA *Croton cajucara* BENTH, E DE ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PREVENTIVAS EM MODELOS ANIMAIS.

Alana Fonteles Lima Rabelo. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2008.

A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) é o principal composto diterpenóide presente no extrato da casca do caule de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae). Este diterpeno possui um amplo espectro de atividades farmacológicas que inclui antiinflamatória, antinociceptiva, e efeitos hipoglicemiante e hipolipidêmico. Substâncias com esse perfil farmacológico são comumente associadas a efeitos deletérios sobre o fígado. Tendo em vista que estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram uma hepatotoxicidade da *t*-DCTN, o presente estudo objetivou analisar em maior profundidade o seu potencial em causar dano hepático e, então, buscar estratégias farmacológicas para mitigar tal toxicidade. Desta forma, os experimentos iniciais foram direcionados para observação do dano hepático em camundongos que receberam, por gavagem, uma única (aguda) ou repetidas administrações de *t*-DCTN, em doses que variam de 10 a 300 mg/kg. A segunda série de experiências foi projetada para avaliar os efeitos do (i) pré-condicionamento com a menor dose de *t*-DCTN (10 mg/kg) ou etanol (1 g/kg), e do (ii) pré-tratamento com Vitamina E ou N-acetilcisteína (NAC) no dano hepático associado a altas doses de *t*-DCTN em camundongos. Um possível envolvimento de NO também foi verificado no efeito pré-condicionante de *t*-DCTN e/ou Etanol. *t*-DCTN em doses mais altas (100 e 300 mg/kg, v.o.) causou dano hepático severo, comprovado por aumentos significativos ($p < 0,001$) nos níveis séricos de ALT e AST e por alterações histopatológicas, quando administrada isolada ou repetidamente. Em contraste, as doses de 10 e 30 mg/kg não promoveram alterações significativas, sugerindo que a toxicidade da *t*-DCTN é dose dependente. O pré-condicionamento farmacológico com *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) e Etanol (1 g/kg, v.o.) atenuaram significativamente ($p < 0,001$) a hepatotoxicidade associada a alta dose (100 mg/kg) de *t*-DCTN, como comprovado pela redução na atividade das transaminases séricas, como também nas lesões hepáticas. A suplementação em camundongos com L-arginina, um substrato para geração de NO, preveniu parcialmente o efeito hepatotóxico da *t*-DCTN, possivelmente devido a um aumento na microcirculação hepática. Adicionalmente, o pré-tratamento com Vitamina E, mas não com NAC, reduziu efetivamente os efeitos hepatotóxicos de *t*-DCTN, comprovado pela diminuição dos níveis séricos de ALT e AST, de TBARS hepático e das alterações histológicas. Isto sugere que Vitamina E protege contra o aumento da peroxidação lipídica hepática promovido por alta dose de *t*-DCTN. Paradoxalmente, comparada a outros hepatotóxicos relatados na literatura, a *t*-DCTN aumenta os níveis de glutatona hepática que pode ser uma consequência do estresse oxidativo prolongado. Em conjunto, estes resultados confirmam as observações anteriores sobre o potencial hepatotóxico da *t*-DCTN e sugerem que um aumento no estresse oxidativo e na peroxidação lipídica das membranas dos hepatócitos contribui para o dano hepático desse diterpeno. A suplementação com Vitamina E, um antioxidante lipossolúvel, ou o pré-condicionamento com doses menores de *t*-DCTN ou etanol poderiam ser profilaticamente útil para superar os efeitos hepatotóxicos de *t*-DCTN.

Palavras-chave: *Croton cajucara*, *trans*-desidrocrotonina, diterpenos, hipoglicemiantes, hepatotoxicidade.

ABSTRACT

STUDIES ON THE HEPATOTOXICITY OF *trans*- DEHYDROCROTONIN (*t*-DCTN), A DITERPENE ISOLATED FROM *Croton cajucara* BENTH, AND THE PHARMACOLOGICAL STRATEGIES FOR PREVENTION IN ANIMAL MODELS.

Alana Fonteles Lima Rabelo. Principal Advisor: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Dissertation submitted in partial fulfillment to obtain the Master's Degree in Pharmacology, Post-Graduate Programme in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 2008.

The *trans*-dehydrocrotonin (*t*-DCTN) is a major diterpenoid compound present in bark extracts of *Croton cajucara* (Euphorbiaceae) stem. This diterpene possesses a wide spectrum of pharmacological activity that include anti-inflammatory, antinociceptive, hypoglycemic and antihyperlipidemic effects. Deleterious effects on liver are not uncommon with substances having this pharmacological profile. Keeping in view the reported hepatotoxicity of *t*-DCTN *in vitro* and *in vivo*, the present study was carried out to analyse in greater depth its potential to cause hepatic damage and then to seek pharmacological strategies to mitigate such a toxicity. Accordingly, our initial experiments were aimed to observe the hepatic damage in mice that received the single (acute) or repeated administrations of *t*-DCTN by oral gavage, at doses ranging from 10 to 300 mg/kg. The second series of experiments were designed to evaluate the effects of (i) pre-conditioning with a smaller dose *t*-DCTN or ethanol, and (ii) pre-treatments with Vitamin E or NAC on high-dose -associated hepatic injury in mice. A possible involvement of NO was also verified on the pre-conditioning effects of *t*-DCTN and or Ethanol. *t*-DCTN at higher doses (100 e 300 mg/kg, v.o.) caused severe hepatic damage as evidenced by significant ($p<0,001$) increases in the serum levels of ALT and AST and histopathological alterations, whether administered singly or repeatedly. In contrast, at the doses of 10 e 30 mg/kg, there were no significant alterations suggesting that the toxicity is a dose-related one. Pharmacological pre-conditioning with *t*-DCTN (10 mg/kg, p.o.) e Ethanol (1 g/kg, p.o.) significantly ($p<0,001$) attenuated the high-dose *t*-DCTN (100 mg/kg) -associated hepatotoxicity, as evidenced by reductions in serum enzyme activities as well as the hepatic lesions. In mice supplemented with L-arginine, the substrate for NO generation only partially prevented the hepatotoxic effect of *t*-DCTN most possibly due to an improved hepatic microcirculation. Additionally, pre-treatment with Vitamin E but not the NAC effectively reduced hepatotoxic effect of *t*-DCTN, evidenced by diminished serum levels of ALT, AST and hepatic TBARS and histological alterations. This suggests that Vitamine E protects against the increased hepatic lipid peroxidation promoted by high-dose *t*-DCTN. Paradoxically, compared to other hepatotoxicants reported in literature, *t*-DCTN enhanced the hepatic glutathione levels, which may be a consequence of prolonged oxidative stress. Taken together, these results confirm the earlier observations on the hepatotoxic potential of *t*-DCTN and suggest that an increased oxidative stress and lipid peroxidation of hepatocyte membranes contributes to hepatic damage. Supplementation with liposoluble antioxidant Vitamina E, or pré-conditioning with smaller doses of *t*-DCTN or ethanol might be useful prophylactically to overcome hepatotoxic effects of *t*-DCTN.

Key-words: *Croton cajucara*, *trans*-dehydrocrotonin, diterpenes, hypoglycemic, hepatotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
FIGURA 1.	Estruturas químicas de alguns dos constituintes isolados do <i>Croton cajucara</i> Benth.....	28
FIGURA 2.	Estrutura química da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN).....	30
FIGURA 3.	Sistemas enzimáticos envolvidos no ciclo redox da glutathiona.....	40
FIGURA 4.	Método de obtenção do diterpeno <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) a partir dos extratos hexânicos e clorofórmico.....	47
FIGURA 5.	Efeito de uma única administração de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathiona em camundongos.....	58
FIGURA 6.	Efeito de uma única administração de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST.....	60
FIGURA 7.	Microfotografias de fígados de camundongos (400x) – dose única de <i>t</i> -DCTN.....	61
FIGURA 8.	Efeito de administrações sucessivas de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathiona em camundongos.....	64
FIGURA 9.	Efeito de administrações sucessivas de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST.....	66
FIGURA 10.	Microfotografias de fígados de camundongos (200x) – doses repetidas de <i>t</i> -DCTN.....	67
FIGURA 11.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN sobre os níveis hepáticos de glutathiona na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	70
FIGURA 12.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	72
FIGURA 13.	Microfotografias de fígados de camundongos (200x) – Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN.....	73
FIGURA 14.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis de glutathiona hepática na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	76

FIGURA 15.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis séricos de ATL e AST na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	78
FIGURA 16.	Microfotografias de fígados de camundongos (200x) – Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol.....	79
FIGURA 17.	Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis hepáticos de Glutathione na hepatotoxicidade induzida pela <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	82
FIGURA 18.	Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis séricos de ALT e AST toxicidade induzida pela <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	84
FIGURA 19.	Microfotografias de fígados de camundongos (200x) – Envolvimento do Óxido Nítrico no pré-condicionamento com <i>t</i> -DCTN.....	85
FIGURA 20.	Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de Glutathione hepática na toxicidade induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	88
FIGURA 21.	Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatite tóxica induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	90
FIGURA 22.	Efeito da <i>trans</i> -desidroacetonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis hepáticos de TBARS.....	92
FIGURA 23.	Microfotografias de fígados de camundongos (200x) – Efeito da Vitamina E e NAC na hepatite tóxica induzida por <i>t</i> -DCTN.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
TABELA 1.	Efeito de uma única administração de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathione em camundongos.....	57
TABELA 2.	Efeito de uma única administração de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST.....	59
TABELA 3.	Efeito de administrações sucessivas de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathione em camundongos.....	63
TABELA 4.	Efeito de administrações sucessivas de <i>trans</i> -desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST.....	65
TABELA 5.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN sobre os níveis hepáticos de glutathione na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	69
TABELA 6.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	71
TABELA 7.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis de glutathione hepática na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	75
TABELA 8.	Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis séricos de ATL e AST na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	77
TABELA 9.	Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis hepáticos de Glutathione na hepatotoxicidade induzida pela <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	81
TABELA 10.	Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis séricos de ALT e AST toxicidade induzida pela <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	83
TABELA 11.	Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de Glutathione hepática na toxicidade induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	87

TABELA 12.	Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatite tóxica induzida por <i>t</i> -DCTN em camundongos.....	89
TABELA 13.	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis hepáticos de TBARS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CL ₅₀	Concentração letal 50%
DTNB	5,5`- dithil-bis (2-nitrobenzoic acid)
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
et al.	...e colaboradores
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSH	Glutathiona Oxidada
h	Hora (s)
i.p.	Intraperitoneal
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
M	Molar
MDA	Malonaldeído
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
min	Minuto (s)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NAC	N-acetilcisteína
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
NP-SH	Grupos sulfidrílicos não protéicos
p	Nível de significância
PMN	Polimorfonucleares
rpm	Rotações por minuto

TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
<i>t</i> -DCTN	<i>Trans</i> -desidrocrotonina
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TZD	Tiazolidinas
U/mL	Unidades por mililitro
v.o.	Via oral (Gavagem)
vs	Versus
X	Vezes
α	Alfa
β	Beta
$\mu\text{g/g}$	Micrograma por grama
%	Porcentagem
$\pm$	Mais ou menos
&	E
°C	Graus Celsius
<	Menor que
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Plantas medicinais.....	18
1.2. Toxicidade de Plantas Medicinais.....	19
1.3. Terpenos.....	22
1.4. Diterpenos.....	23
1.5. <i>Croton cajucara</i> Benth.....	24
1.6. <i>Trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN).....	29
1.7. Hepatotoxicidade de drogas hipoglicêmicas e hipolipidêmicas.....	32
1.8. Mecanismos de hepatotoxicidade de fármacos.....	33
1.9. EROs e o Estresse Oxidativo.....	37
1.10. Sistemas de defesa antioxidante.....	39
1.11. Relevância e justificativa.....	42
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIAIS.....	44
3.1. Material botânico.....	44
3.2. Animais experimentais.....	44
3.3. Drogas e reagentes.....	45
3.4. Equipamentos.....	45
4. MÉTODOS.....	46
4.1. Isolamento da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN).....	46
4.2. Avaliação da toxicidade aguda de <i>t</i> -DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) em fígados de camundongos.....	48
4.3. Determinação dos grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) hepáticos.....	49
4.4. Análise histopatológica.....	49
4.5. Avaliação da toxicidade hepática de administrações sucessivas de <i>t</i> -DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) em camundongos.....	50
4.6. Avaliação do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	51

4.7. Avaliação do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	52
4.8. Envolvimento do óxido nítrico no pré-condicionamento hepático da <i>t</i> -DCTN e do etanol.....	53
4.9. Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) na hepatite tóxica induzida por <i>t</i> -DCTN.....	54
4.10. Determinação dos níveis hepáticos de TBARS	55
4.11. Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1. Efeito de uma única administração de <i>t</i> -DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) na hepatotoxicidade em camundongos.....	56
5.2. Efeito de administrações sucessivas de <i>t</i> -DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) na toxicidade hepática em camundongos.....	62
5.3. Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de <i>t</i> -DCTN na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	68
5.4. Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol na toxicidade aguda induzida por <i>t</i> -DCTN.....	74
5.5. Envolvimento do óxido nítrico (NO) no pré-condicionamento hepático da <i>t</i> -DCTN e do etanol.....	80
5.6. Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) na hepatite tóxica induzida por <i>t</i> -DCTN.....	86
6. DISCUSSÃO.....	94
7. CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais

As plantas medicinais consistem em uma estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, sendo uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento das doenças humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso popular. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers onde, este último, enumera cerca de 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO *et al.*, 2002). Com os avanços científicos, esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento de fitoterapia.

Juntos, os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade do mundo. O Brasil sozinho possui de 20 a 22% de todas as plantas e microorganismos existentes. Todavia, é estimado que não mais do que 25.000 espécies de plantas foram objetos de alguma investigação científica (CALIXTO, 2005).

Plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico mundial (KIRKPATRICK, 2002). Entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos ou moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003). Contudo, o potencial dos produtos de origem natural, como fontes de novas drogas, continua largamente inexplorado uma vez que somente pequena fração de plantas, animais e microorganismos tem sido investigada fitoquímica e biologicamente (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

Em termos históricos, a pesquisa com plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século XIX. As plantas possibilitaram a descoberta de vários medicamentos, podemos citar os alcalóides bisindólicos vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* G., a atropina, obtida a partir de *Atropa belladonna* e também a lactona sesquiterpênica artemisina isolada de *Artemisia Annua* L., utilizada como antimalárico.

Apesar do enorme desenvolvimento da síntese química, atualmente 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal (BALUNAS *et al.*, 2005).

Na metade do século XX, avanços na síntese química permitiram a entrada maciça de componentes ativos derivados de plantas medicinais empregadas desde a antiguidade, utilizadas para tratamento de patologias leves e moderadas (BARREIRO *et al.*, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial utiliza plantas medicinais, em sua maioria nos países em desenvolvimento (GURIB-FAKIM, 2006). No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo de medicamentos alopáticos; os 80% restantes encontram nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006).

A utilização de terapias não convencionais parece não estar confinada a uma única classe social, contudo indivíduos com patologias crônicas representam claramente um grupo. No Brasil, especialmente na região Nordeste, o uso de plantas medicinais e de preparações caseiras assume importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

Em geral as plantas medicinais utilizadas possuem pouca ou nenhuma comprovação científica de suas propriedades farmacológicas. Apesar da crescente importância dos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas ainda são utilizadas com base somente no conhecimento popular bem estabelecido (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

1.2. Toxidade de Plantas Medicinais

No Brasil, a utilização de plantas, como meio curativo, é uma atividade altamente difundida e popular, às vezes, empregadas de maneira equivocada e até mesmo malévola, afinal muitas plantas possuem princípios tóxicos e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas (MATOS *et al.*, 2001; LORENZI; MATOS, 2002).

Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido. Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos. A crença comum de que o uso de produtos naturais não comporta riscos, favorece o uso inadequado inclusive pela omissão do uso no momento da consulta médica (CAPASSO *et al.*, 2000).

Em alguns países como na Ásia e África, onde o uso de plantas medicinais é comum, algumas são utilizadas com cautela devido sua toxicidade para alguns órgãos como fígado, rins, pele e outros tecidos. É sabido que muitas plantas produzem substâncias que são potencialmente tóxicas. Riscos particulares de toxicidade são associados com o uso de plantas concomitante com drogas convencionais. Certas ervas medicinais podem reduzir ou potencializar a eficácia de um medicamento (CAPASSO *et al.*, 2000).

A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de Saúde Pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, passíveis de adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. Diversos fitoterápicos usados no Brasil têm sido documentados como sendo seguros e eficazes, baseados apenas em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, realizados em animais. No entanto, esses estudos não garantem evidências suficientes para assegurar a sua eficácia e segurança em seres humanos (PIMENTEL *et al.*, 1998). Pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos fiscais (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Como exemplo de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas, pode ser citado os efeitos hepatotóxicos do apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO *et al.*, 2000). Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial, assim como, diversas substâncias isoladas de plantas

medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

Turolla e Nascimento (2006), num levantamento da literatura existente sobre a toxicidade de dez plantas medicinais comercializadas com maior frequência na forma de medicamentos fitoterápicos encontraram poucas informações referentes à toxicidade pré-clínica sobre maracujá (*Passiflora incarnata* L., Passifloraceae), ginkgo (*Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae), castanha da índia (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae), plantago (*Plantago ovata* Forsk, Plantaginaceae), ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer, Araliaceae), kava-kava (*Piper methysticum* G. Forsttt, Piperaceae), valeriana (*Valeriana officinales* L., Valerianaceae), erva de São João (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae), erva de São Cristóvão (*Cimicífuga racemosa* (L) Nutt, Ranunculaceae), cáscara sagrada (*Rhamnus purschiana* D.C., Rhamnaceae). As monografias da Organização Mundial de Saúde e da Comissão E contemplam as dez plantas, porém apresentam poucos dados sobre as informações pesquisadas.

Esses exemplos sinalizam que, quando não há estudos toxicológicos detalhados, a experiência documentada do uso de longo prazo sem evidências de problemas de segurança pode ser um indicativo para a avaliação do risco, mas sem constituir uma base para afirmar a segurança incondicional do uso de determinada planta medicinal e fitoterápico. E considerando que qualquer substância ingerida em excesso é potencialmente prejudicial, nenhum material de origem vegetal é exceção a esse princípio geral (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Entretanto, casos de intoxicação por fitoterápicos não devem ser motivo para que plantas medicinais sejam banidas do arsenal terapêutico. Ao contrário, devem servir de estímulo para que os estudos sobre a atividade farmacológica e a toxicidade sejam rotineiros e uma exigência para o registro de fitoterápicos.

A predição acurada da toxicidade de drogas (naturais ou sintéticas) em humanos requer, não somente a análise da relação dose-resposta, mas também o claro conhecimento a respeito dos mecanismos de toxicidade e dos fatores de risco correspondentes (LI, 2004).

1.3. Terpenos

Os terpenos representam uma classe de produtos naturais amplamente distribuída no reino vegetal, sendo uma família de compostos quimicamente diversos (DI STASI, 1996). Possuem uma composição molecular típica, formados por duas ou mais unidades isoprênicas ($C_{10}H_{15}$) (NABETA *et al.*, 1995).

Esses compostos representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos obtidos de plantas, perdendo apenas para os flavanóides. São classificados de acordo com as unidades de carbonos e as formas de ciclização e estão subdivididos em monoterpenos (10 unidades de carbono), sesquiterpenos (15 unidades de carbono), diterpenos (20 unidades de carbono), sestetervenos (25 unidades de carbono), triterpenos (30 unidades de carbono) e tetraterpenos (40 unidades de carbono) (DI STASI, 1996).

Muitos terpenos também possuem um interesse comercial, incluindo importantes atividades farmacológicas, por exemplo, atividade antitumoral (MUJOO *et al.*, 2001), sedativa (KELECOM, 1983), analgésica (MALHEIROS *et al.*, 2001), cardioprotetora (TORRES *et al.*, 2000), antioxidante (BARONE *et al.*, 1983), antialérgica (YAMAHARA *et al.*, 1982; KUBO *et al.*, 1987) e anti-hipertensiva (DUBEY, 1974).

Os monoterpenos estão entre os terpenos mais comuns como o citral, cânfora, linalol, terpinen-4-ol, cineol, carvacrol entre outros. Eles representam uma classe nova de agentes potencialmente terapêuticos contra o câncer de mama e ainda são utilizados em várias preparações farmacêuticas (JIRTLE, 1993; POZZI, 1989).

Os sesquiterpenos originam-se com o aumento do número de carbonos; aumentando o número de ciclizações e modificações nas moléculas ocasionando uma variedade de compostos. Alguns compostos antitumorais também são exemplos de sesquiterpenos como, por exemplo, fenolina, elefantina e vernolepina. Outros sesquiterpenos também possuem atividade antiúlcera, citotóxica, antiespasmódica e inibitória da síntese de DNA (DI STASI, 1996).

Os triterpenos caracterizam-se por sua abundância e grande número de constituintes ativos onde estão incluídos metabólitos de grande importância biológica, como o colesterol, vitamina D, hormônios sexuais e inúmeros esteróides. Inúmeros triterpenos possuem atividade antiprotozoária, especialmente contra amebíase e malária onde se destacam a chaparrinona, bruceantina, glaucarubole, bruceínas A, B e C e a quassina. Outros triterpenos como o ácido oleanólico e seu isômero, o ácido ursólico, possuem atividade antioxidante, hepatoprotetora, antiinflamatória e antihiperlipidêmica (DI STASI, 1996; LIU, 1994).

Os tetraterpenos representam uma subclasse de metabólitos que inclui a maioria dos carotenóides, pigmentos essenciais para a fotossíntese. Do ponto de vista farmacológico, são compostos importantes e extremamente úteis quanto ao seu papel biológico, como é o caso da vitamina A (DI STASI, 1996).

1.4. Diterpenos

Os diterpenos constituem uma grande e diversificada classe de metabólitos secundários que podem ser considerados como resultados de fatores naturais. Possuem esqueleto básico com 20 átomos de carbono e derivam biogeneticamente do pirofosfato de geranilgeranila que resulta do encadeamento cabeça-cauda de quatro unidades de isopreno (TORSSELL, 1983).

Várias propriedades farmacológicas dos diterpenos foram estudadas, dentre elas podemos citar: antitumoral (ADOLF *et al.*, 1985; ROENGSUMRAN *et al.* 2002), antiinflamatória (BRAQUET, 1988; DEMETZOS *et al.*, 2001), antireumática (GU *et al.*, 1995), antiulcerogênica (SHIRAKABE *et al.*, 1995; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2001), antibiótica (NAKANISHI, 1974). Foram também descritas atividades vasculares tanto de relaxamento (DUARTE *et al.*, 1992; LAMBERTE *et al.*, 1994; TORRES *et al.*, 2000) como de contração (BAZAN *et al.*, 1993; MIRANDA *et al.*, 1998).

Dentre os diterpenos biologicamente ativos estudados incluem-se: forskolina, com atividade hipotensora e um ativador específico e reversível das isoformas particulada e solúvel da adenilil ciclase (SEAMON *et al.*, 1981; DALY, 1982); ésteres de forbol, isolados inicialmente de plantas do gênero *Croton* que são ativadoras de proteína quinase C e têm sido largamente utilizados para o estudo das funções biológicas, propriedades e distribuição desta

enzima e na investigação da carcinogênese química (NISHIZUKA, 1986; CHUANG, 1989) e cleonol com atividades hipotensora, espasmolítica inespecífica, cronotrópica positiva e vasodilatadora (DUBEY *et al.*, 1974).

Muitos diterpenos isolados de produtos marinhos têm mostrado pronunciados efeitos cardiovasculares, como por exemplo, respostas inotrópicas positivas, como ativador de canal de sódio (grayanotoxin I) e resposta vasorelaxantes, como Jatrophone. Três diterpenos, flexibilide, dihidroflexibilide e sinulariolide, também isolados de produtos naturais marinhos (*S.jiexibilis* – coral) produzem respostas vasorelaxante independente do endotélio, resposta inotrópica positiva e resposta cronotrópica positiva sem produzir toxicidade acentuada (ACERET *et al.*, 1996).

Os clerodanos são uma classe de diterpenóides bicíclicos cujo nome genérico deriva da (-)-clerodina, primeiro diterpeno da série dos clerodanos isolado da *Clerodendron infotunatum* (BARTON; ELAD, 1956). Variadas atividades biológicas são citadas para diferentes formas estruturais de clerodanos: antibiótica (ANDERSEN *et al.*, 1983; KHAN *et al.*, 2001), antiulcerogênica (APPENDIDO *et al.*, 2003), anti-hipertensiva (ODEK-OGUNDE & RAJAB, 1994), citotóxica (SHEN *et al.*, 2004; SAI *et al.*, 2002), hipoglicemiante (TASHMUKHAMEDOVA *et al.*, 1992), antiproteolítica, anti-hemorragica (JANUARIO *et al.*, 2004), tripanocida (ESPINDOLA *et al.*, 2004), antimalária (MAMBU *et al.*, 2002), antileishmania (HABTEMARIAM, 2003), antiviral e anti-fúngica (ROGERS *et al.*, 1979).

1.5. *Croton cajucara* Benth

A família Euphorbiaceae é uma família de plantas amplamente distribuída em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo possuindo cerca de 300 gêneros e 8000 espécies, sendo os gêneros com maior número de espécies o *Euphorbia* e *Croton* (FARNSWORTH, 1976; WEBSTER, 1967; WILSON, 1976).

O gênero *Croton*, cujo nome significa “carrapato”, pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae. É encontrado principalmente como árvore de pequeno porte e arbusto, apresentando cerca de 700 espécies, metade destas encontradas no Brasil. O gênero *Croton* tem representantes tanto medicinais, quanto tóxicos; uma das espécies mais conhecidas no Norte do Brasil é o *Croton cajucara* (ABREU *et al.*, 2001).

O *Croton cajucara* Benth., conhecido popularmente como “sacaca”, que na língua Tupi significa “feitiço”, representa um recurso medicinal de grande importância no tratamento e cura de várias doenças. Possui características de erva daninha e cresce em áreas abandonadas ou em clareiras abertas em áreas baixas da floresta. É uma árvore de até 6 a 10 metros de altura, encontrada na região amazônica e tendo como centro de dispersão o Estado do Pará. Possui madeira branco-amarelada com cascas aromáticas, folhas inteiras e simples, pecioladas, estipuladas, lanceoladas, peninérveas, verdes com lombos divididos em lobos ou segmentos, inflorescência racemosa com flores de sexo separado, fruto seco, esquizocárpico, separando-se em 3 cocos, bem como sementes ricas em endosperma (DI STASI, 1989. VAN DEN BERG, 1982).

No estado do Pará, as folhas e cascas do caule desta planta são utilizadas em forma de chá ou pílulas, no combate a diabetes, diarreia, malária, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado, rins, vesícula e no controle de índices elevados de colesterol (VAN DEN BERG, 1982; DI STASI, 1989; DI STASI *et al.*, 1994; MARTINS, 1989). A sacaca também é comercializada em farmácias de manipulação e, neste caso, o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas (concentração aproximada de 250 mg). As folhas são comercializadas em feiras livres da cidade de Belém-PA, para distúrbios do fígado e auxilia na digestão, principalmente após a ingestão de alimentação rica em gorduras. O pó das folhas é vendido com indicação hepatoprotetora, para tratamento do diabetes e em dietas de emagrecimento. Em alguns casos, este pó é comercializado em mistura com o pó do boldo do Chile (MACIEL *et al.*, 1998., MACIEL *et al.*, 2000; VEIGA JR *et al.*, 2005).

O chá das folhas é indicado em academias de ginásticas da cidade de Belém para diminuição de peso corporal, em dietas de emagrecimento. Porém, inúmeros casos de hepatite tóxica já foram notificados em hospitais públicos dessa cidade, devido ao uso prolongado deste chá, em dosagens concentradas. O uso recomendado do pó das cascas é 25 g de pó em 1000 mL de água, administrados 2 vezes ao dia durante 3-4 semanas, ou até que os sintomas da doença desapareçam. No caso do uso correto do chá das cascas, não se encontra descrito na literatura, nenhum tipo de efeito colateral (MACIEL *et al.*, 2000).

Apesar do *Croton cajucara* possuir uma grande representatividade na medicina tradicional da região Amazônica, até o final da década de 80, apenas uma avaliação farmacológica havia sido efetuada com esta espécie. Neste estudo, cavalcante *et al.* (1998),

comprovaram a eficácia hipoglicêmica e hipolipidêmica da sacaca, em ratos e, Oliveira *et al.* (1995) confirmaram o efeito hipolipidêmico em coelhos.

Outras atividades farmacológicas do *Croton cajucara* já foram evidenciadas, das quais podemos citar a atividade antinociceptiva dos extratos hexânicos, clorofórmico e metanólico das folhas (CAMPOS *et al.*, 2002) e o efeito hipolipidêmico, correlacionado com a redução de índices elevados de colesterol, foi evidenciado no extrato hidroalcólico das folhas (FARIAS *et al.*, 1996). Estudos realizados com óleo essencial obtido a partir das cascas da sacaca demonstraram atividade gastroprotetora como também atividade citotóxica para células V79 (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1999b). A atividade anti-leishmanicida foi identificada para o óleo essencial (DO SOCORRO *et al.*, 2003; BIGHETTI *et al.*, 1999). Também foi verificado que o extrato hidroalcoólico das folhas não produziu toxicidade em camundongos tratados oralmente com até 5g/kg (toxicidade aguda).

Estudos fitoquímicos do *Croton cajucara* revelaram a presença dos principais constituintes químicos presentes nas folhas, cascas e caule. A presença de óleo essencial nas folhas do *Croton cajucara* foi identificada por Campbel *et al.* (1974) possuindo a seguinte composição: 66% de linalol, 2,55% de 1-8 cineol e 1,65% de terpenóides. Nos galhos também se observou a presença de óleo essencial, porém em menor quantidade. Estudos posteriores identificaram a presença de α -pineno, β -cariofileno, α -humuleno, cadineno e mirceno no óleo essencial (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1996).

Das folhas do *Croton cajucara* foram isolados e identificados três esteróides (β -sitosterol, stigmasterol e sisterol-3-O- β -glucoside), dois flavanóides (3,4,7-trimetoxicampferol e 3,7-dimetoxicampferol) e um diterpeno *nor*-clerodano (cajucarinolida) (MACIEL *et al.*, 1998b; MACIEL *et al.*, 2003).

Até o momento, as cascas do caule do *Croton cajucara* detêm o maior índice de estudos. O estudo fitoquímico clássico realizado com 6 kg das cascas do caule de árvores com idades variando entre 4-6 anos, mostrou que esta parte da planta é rica em diterpenos do tipo clerodano (MACIEL *et al.*, 2000; ITOKAWA *et al.*, 1990; ICHIHARA *et al.*, 1990; KUBO *et al.*, 1991; MACIEL *et al.*, 1998).

As cascas do caule do *Croton cajucara* foram investigadas pela primeira vez em 1979 na Universidade Federal do Pará, onde foi isolado e identificado o primeiro diterpeno clerodano desta planta. A comparação dos dados espectrais dessa nova substância com os da crotonina levou a conclusão que se tratava de um derivado deste terpenóide, designado de desidrocrotonina (DCTN), tendo sua estrutura química definida e possuindo como fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_4$ (HIDEJI *et al.*, 1989; MACIEL *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 1986; SIMÕES *et al.*, 1979).

Outras investigações fitoquímicas com as cascas da sacaca resultaram no isolamento de mais quatro clerodanos: cajucarina A, *cis*-cajucarina B, cajucarinolida e *iso*-cajucarinolida (ITOKAWA *et al.*, 1990; ICHIHARA *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 1998). O fracionamento dos extratos hexânico e metanólico das cascas do caule do *Croton cajucara* levou ao isolamento e caracterização dos terpenóides: ácido acetilaleuritólico, *trans*-desidrocrotonina, *trans*-crotonina, *cis*-cajucarina B, cajucarinolida e cajucarina A, previamente isolados das cascas do caule desta planta, e dois novos clerodanos: *trans*-cajucarina B e sacarina (**Figura 1**) (MACIEL, 1997).

O triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) também foi isolado das cascas do caule do *Croton cajucara* por Müller *et al.* (1986) e Maciel *et al.* (1995). O ácido acetilaleuritólico (AAA) foi isolado como componente majoritário em árvores com idade de 1 $1/2$ ano. O triterpeno AAA foi também isolado em 0,08% de rendimento, nas árvores com idade variando entre 3-6 anos. Experimentos biológicos realizados com o AAA mostraram que este triterpeno possui atividade antiespasmódica, antiinflamatória e antinociceptiva. Esta substância, entretanto, mostrou-se inativa em testes que avaliam atividade antitumoral e antiulcerogênica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998; PERAZZO *et al.*, 1997; VANDERLINDE *et al.*, 1997).

Através de hidrogenação catalítica da *t*-DCTN foi obtido o derivado *trans*-crotonina (CTN), o qual possui atividades antiulcerogênica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998; ALBINO DE ALMEIDA *et al.*, 2003), antiinflamatória e antinociceptiva (PERAZZO *et al.*, 1997). No entanto, esta substância não demonstrou efeito em testes que avaliam atividades antitumoral (GRYNBERG *et al.*, 1999) e antiespasmódica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998), atividades estas, que foram observadas para a molécula-mãe *t*-DCTN.

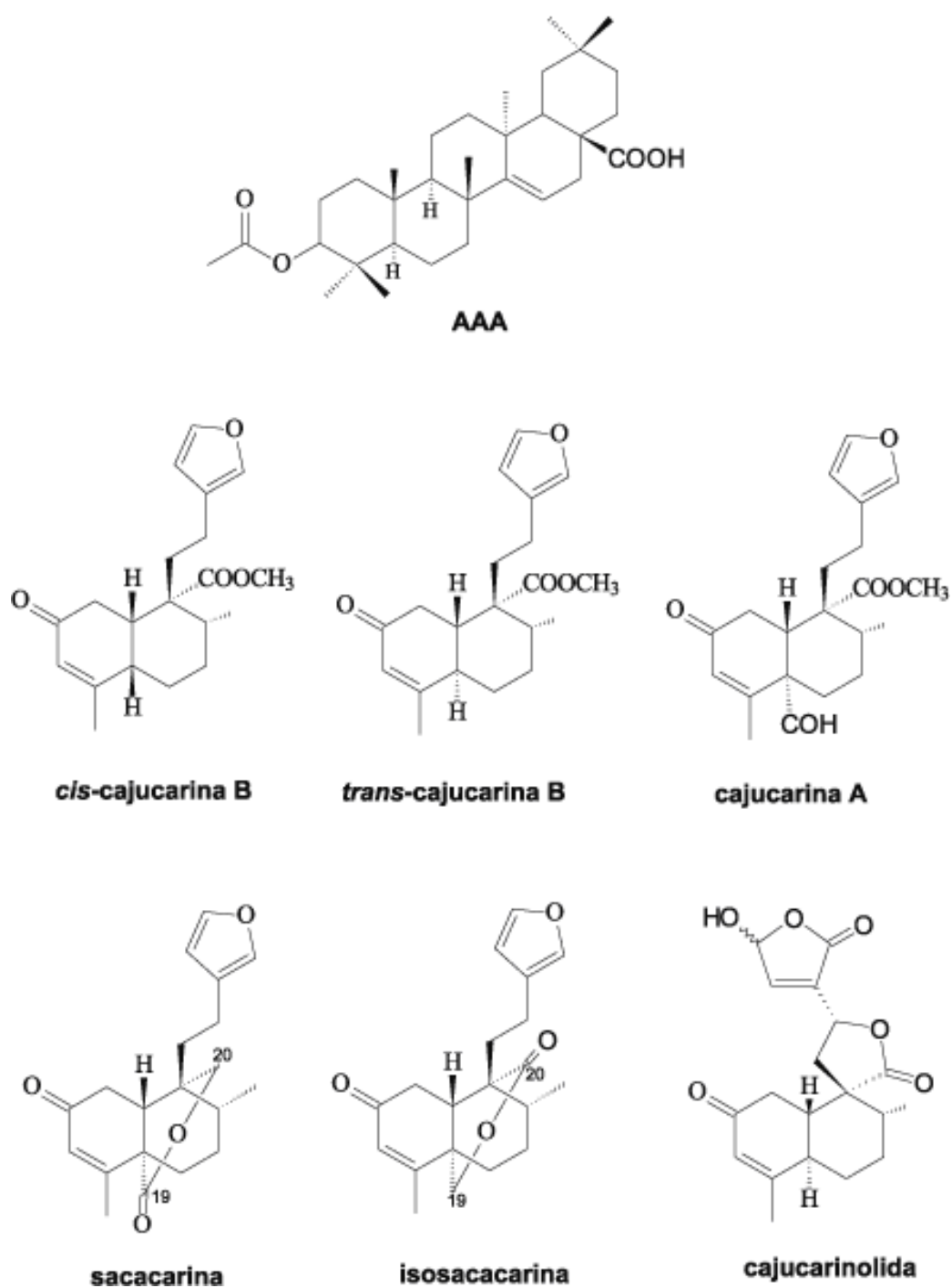


FIGURA 1 - Estruturas químicas de alguns constituintes isolados de *Croton cajucara* Benth (MACIEL, 2002).

1.6. *Trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN)

A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) (**Figura 2**) é um diterpeno 19-*nor*-clerodano obtido da casca de *Croton cajucara*, sendo o componente majoritário de árvores com idades variando entre 4-6 anos, isolado com um rendimento incomum (em se tratando de produto natural) de 1,4% (MACIEL *et al.*, 1998). Contudo a concentração desta molécula é moderada em árvores com 3 anos e não tendo sido detectada em árvores com idade de 1 ¹/₂ ano. Estes dados podem justificar o uso popular do chá da casca grossa da sacaca, sendo que a casca fina não é utilizada (MACIEL, 1997).

O estudo fitoquímico realizado em todas as partes do *Croton cajucara* (raiz até folhas), mostrou que a *t*-DCTN também está presente nas raízes e caule. Estudos com HPLC (High Performace Liquid Chromatograph) realizados com o chá das cascas do *C. cajucara*, mostraram que a *t*-DCTN é o constituinte majoritário tendo concentração mais elevada no chá obtido com as cascas moídas (MACIEL, 1997). Estes resultados juntamente com os altos índices de isolamento do clerodano *t*-DCTN nas cascas desta planta, levaram à realização de diversos testes farmacológicos com esta substância.

A toxicidade da *t*-DCTN foi avaliada em camundongos, não sendo observadas alterações comportamentais nos animais que justifiquem a ação da *t*-DCTN sobre o sistema nervoso central. A DL₅₀ foi determinada e corresponde a 550 mg/kg, via oral (CARVALHO *et al.*, 1996).

O 19-*nor*-clerodano *t*-DCTN mostrou correlação com grande parte das propriedades terapêuticas da planta, evidenciando a atividade antiinflamatória e antinociceptiva correlacionados com as indicações da planta para cura de inflamações (CARVALHO *et al.*, 1996). No modelo de diabetes induzida por aloxana, a *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) demonstrou atividade hipoglicêmica comparável àquela produzida pela glibenclamida, não sendo observado o mesmo efeito em animais normais (FARIAS *et al.*, 1997).

Em ratos diabéticos pelo uso da estreptozotocina (STZ), a *t*-DCTN (50 mg/kg, v.o.) demonstrou atividade antidiabética oral. O efeito hipoglicemiante da *t*-DCTN é maior quando administrada uma hora antes da estreptozotocina (efeito preventivo). Quando a *t*-DCTN foi

administrada 48 horas após a STZ (efeito curativo), os níveis de glicose sanguínea caíram em torno de 49% (SILVA *et al.*, 2001c).

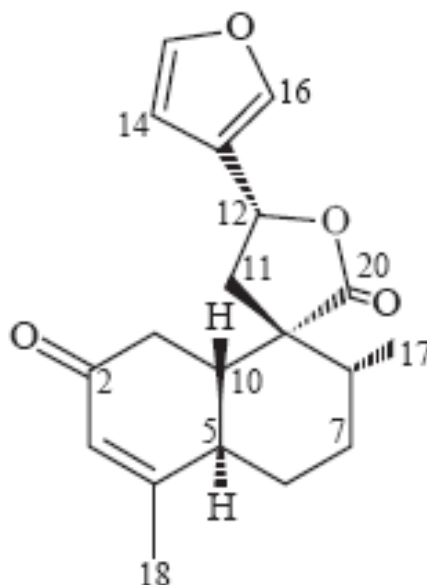


FIGURA 2 - Estrutura química da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN).

Trabalhos demonstraram que a administração oral de *trans*-desidrocrotonina (25 e 50 mg/kg) é efetiva em reduzir a hiperlipidemia induzida por uma dieta rica em gordura ou por tiloxapol em camundongos, como também na hipertrigliceremia induzida por etanol e sugere seu uso benéfico como um agente antiaterogênico (SILVA *et al.*, 2001a; SILVA *et al.*, 2001b). Entretanto, a *t*-DCTN não apresentou resultado significativo em modelos de hiperlipidemia genética com a utilização de animais geneticamente modificados (BIGHETTI *et al.*, 2004).

Evidenciaram-se ainda, para este diterpeno, propriedades biológicas não mencionadas pelos usuários da planta, tais como a atividade antitumoral e antiestrogênica. A *t*-DCTN possui efeitos citotóxicos basais em linhagens de células fibroblásticas V79 e citotoxicidade seletiva após metabolização em hepatócitos de ratos, como também atividade antitumoral sobre o tumor de sarcoma 180 injetado em camundongos (DA SILVA MELO *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 1996; GRYNBERG *et al.*, 1999; RODRIGUEZ; HAUN, 1999; MELO *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2000).

Investigações adicionais demonstraram que *t*-DCTN possui atividade antitumoral em linhagens de células HL60 causando necrose celular devido ao estresse oxidativo evidenciado pelo aumento dos níveis de GSH, como também para células mononucleares de sangue periférico humano. Outros trabalhos relataram que a *t*-DCTN produz apoptose em células HL60 através da indução de estresse na peroxidação lipídica (FREIRE *et al.*, 2003a; FREIRE *et al.*, 2003b, ANAZETTI *et al.*, 2003; ANAZETTI *et al.*, 2004).

Brito *et al.* (1998) demonstraram que a *t*-DCTN possui significativa atividade antiulcerogênica, correlacionando com o uso da planta para o tratamento de problemas estomacais como azia, gastrite e úlcera gástrica. Este efeito provavelmente está relacionado às ações antissecreatória e gastroprotetora por um aumento de prostaglandinas E₂ (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1999; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Derivados semi-sintéticos da *t*-DCTN foram estudados em diferentes modelos animais de úlcera gástrica e demonstraram possuir atividade gastroprotetora com redução da toxicidade (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2004).

Luna costa *et al.* (1999), e Maciel *et al.* (2000), demonstraram as atividades antiestrogênica e antiespasmódica da *t*-DCTN em animais experimentais, respectivamente. Investigações adicionais confirmaram o efeito antimutagênico da *t*-DCTN, através de testes citogenéticos do micronúcleo e de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos, demonstrando que esta não é genotóxica ou citotóxica para estas células (AGNER *et al.*, 2001; AGNER *et al.*, 1999).

A *trans*-desidrocrotonina não apresentou toxicidade em animais tratados oralmente com a dose de 50 mg/kg, por um período de 30 dias, demonstrando em bom perfil de segurança e eficácia (SILVA, 2000). Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que o tratamento oral com altas doses de *t*-DCTN (100 mg/kg) por um período de 5 semanas, aumentou o peso dos fígados com significativa redução dos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina e colesterol, como também um aumento dos níveis de γ -glutamil transpeptidase (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Portanto, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* têm apontado um potencial hepatotóxico da *t*-DCTN (MELO *et al.*, 2002; CORREA *et al.*, 2005), sugerindo que este composto é dotado de propriedades tanto citoprotetoras quanto citotóxicas.

Outros derivados da *t*-DCTN estão sendo obtidos (GARDEN *et al.*, 1999; MARTINS, 2000) para que seja possível o estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação deste diterpeno bioativo que além de ser o componente majoritário nas cascas do *Croton cajucara*, foi o que apresentou a melhor correlação com grande parte das propriedades terapêuticas da sacaca.

1.7. Hepatotoxicidade de drogas hipoglicêmicas e hipolipidêmicas

Recentemente, a hepatotoxicidade associada a fitoterápicos está sendo reconhecida crescentemente devido ao grande uso e a fácil disponibilidade destes. Produtos vegetais como pulegone, um ketone de monoterpene, presente no pennyroyal (*Mentha pulegium*) e muitas outras moléculas presentes nos óleos essenciais; teucrina A, um diterpeno encontrado em germander (*Teucrium chamaedrys*); alcalóides pirrolizidina de *Senecio* (Asteraceae) e de *Symphytum officinale* (confrei; Boraginaceae) e pironas de kava (*Piper methysticum*) são exemplos típicos que causam severa hepatotoxicidade (STEDMAN, 2002; SCHULZE *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2007; LÜDE *et al.*, 2008). Eles podem produzir dano hepático promovendo apoptose e/ou alterando membranas celulares por mecanismos mediadores da bioativação que favorecem a formação de metabólitos/intermediários reativos, a depleção da glutathione intracelular e/ou formação de quinona (ZHOU *et al.*, 2007). Muitas plantas sintetizam compostos tóxicos, podendo induzir hepatotoxicidade, possivelmente agindo como pró-oxidantes, atacando macromoléculas, inclusive proteína, DNA e lipídios.

Como a *Croton cajucara*, espécie do gênero *Teucrium*, de germander (*Teucrium chamaedrys* L. e *Teucrium canadense* L.), são ricas em diterpenos clerodano ou neoclerodano que podem responder pelo potencial hepatotóxico destas espécies vegetais (LEKEHAL *et al.*, 1996; SUNDERESAN *et al.*, 2006). Alguns diterpenóides derivados de plantas podem induzir hepatotoxicidade, mostrando a importância da avaliação destes derivados quanto ao seu potencial hepatotóxico, para garantir a segurança e qualidade de medicamentos fitoterápicos.

No passado, poucos estudos foram direcionados para investigação do potencial hepatotóxico da *t*-DCTN em experimentação animal *in vitro* e *in vivo* (MELO *et al.*, 2004; CORRÊA *et al.*, 2005). Adicionalmente, havia relatos que *t*-DCTN era destituída de genotoxicidade e poderia até mesmo induzir um efeito antígeno-tóxico (AGNER *et al.*, 2001; POERSCH *et al.*, 2007). Estes achados podem conduzir ao menosprezo dos efeitos

citotóxicos da *t*-DCTN, que são normalmente aparentes somente em doses altas. Estudos prévios estabeleceram os efeitos hipoglicêmico e hipolipidêmico da *t*-DCTN, e validou o seu uso tradicional no controle da diabetes e como um agente dietético emagrecedor (MACIEL *et al.*, 2000). Os agentes antidiabéticos sintéticos como glitazonas, metformina e acarbose foram descritos por causarem rara, mas severa hepatotoxicidade, que às vezes resulta em falência hepática conduzindo à necessidade por transplante de fígado ou, até mesmo à morte (ISLEY, 2003; KUTOH, 2005; HSIAO *et al.*, 2006).

Triglitazona, a primeira droga da classe das tiazolidinas, utilizada no tratamento da diabetes Tipo 2, foi comercializada em março de 1997 e retirada do mercado americano 36 meses após noventa casos de insuficiência hepática terem sido registrados (CLUXTON *et al.*, 2005). Troglitazona, uma tiazolidina, foi removida do mercado devido a sua hepatotoxicidade. Os casos registrados envolvendo novas TZDs de segunda geração, rosiglitazona e pioglitazona, são poucos em números e menos severos em danos (MARCY *et al.*, 2004).

Estatinas, agentes conhecidos por diminuir o colesterol, têm sido utilizadas por 15 anos e estão dentre as drogas mais comumente prescritas. Estudos animais e ensaios clínicos têm mostrado sinais de hepatotoxicidade, primariamente por elevação nos níveis da enzima sérica alanina aminotransferase (ALT). Por esta razão, todas as drogas que diminuem os níveis de colesterol requerem monitoramento das enzimas hepáticas.

Estas elevações são reversíveis com a descontinuação da terapia, são doses relacionadas, e são provavelmente, relacionadas à diminuição do colesterol *per se*. Raros casos de insuficiência aguda hepática têm sido registrados com todas as drogas que diminuem os níveis de colesterol. Com lovastatina, a frequência é de aproximadamente 1/1,14 milhões de pacientes tratados ao ano. Monitoramento da hepatotoxicidade não tem sido efetivo na prevenção das doenças hepáticas, devido a sua raridade e fraco valor de predição com relação às alterações da ALT (TOLMAN, 2003).

1.8. Mecanismos de hepatotoxicidade de fármacos

Lesões hepáticas induzidas por drogas constituem uma potencial complicação de qualquer tratamento medicamentoso, uma vez que o fígado é o órgão central de disposição

metabólica de praticamente todas as drogas e xenobióticos (ZIMMERMAN; MADDREY, 1993; FARRELL, 1994).

Muitos xenobióticos são biotransformados e eliminados pelo fígado, principalmente na forma de conjugados, sem maiores conseqüências. No entanto, alguns são concentrados a níveis tóxicos, enquanto outros são bioativados a compostos intermediários reativos que podem lisar o fígado de diversas maneiras (KULKARNI; BYCZKOWSKI, 1994).

Essas lesões resultam do efeito direto da droga e/ou produto de biotransformação provocando disfunção intracelular pela ruptura da integridade dos diversos sistemas de membranas dos hepatócitos ou indiretamente através dos danos celulares provocados por processos imunológicos. Fatores que contribuem para o acúmulo de toxinas nos hepatócitos incluem alterações genéticas em sistemas enzimáticos que permitem a formação de metabólitos reativos, competição por outras drogas e depleção de substratos necessários para a eliminação do metabólito (LEE, 1995).

Existem, basicamente, seis tipos de alterações hepáticas que podem ser induzidas pelos medicamentos e o modo com que várias organelas intracelulares são afetadas define o padrão da doença (LEE, 2002; JAESCHKE *et al.*, 2002):

1- Alteração da homeostase do cálcio intracelular, produzindo ruptura das fibrilas de actina na superfície do hepatócito, culminando com a lise celular, em decorrência das reações de alta energia de enzimas do citocromo P-450.

2- Interrupção do fluxo biliar por substâncias que afetam proteínas de transporte na membrana canalicular ligando-se à proteína exportadora de sais biliares ou inativando-a. A ruptura dos filamentos de actina ocorre junto aos canalículos causando colestase, entretanto produz pouca agressão celular. É o mecanismo mais provável na toxicidade hepática decorrente do uso de fibratos.

3- Citotoxicidade mediada por anticorpos. Os medicamentos são moléculas relativamente pequenas e, portanto, é improvável que evoquem resposta imunológica. Entretanto, a biotransformação que envolve reações de alta energia, pode resultar na formação de produtos inativos, ou seja, medicamentos covalentemente ligados a enzimas. Estas moléculas, que são grandes o suficiente para servir como alvos imunológicos podem migrar para a superfície do hepatócito onde podem induzir a formação de anticorpos.

4- Indução de respostas citolíticas diretas por células T. A resposta secundária das citocinas a esses processos pode causar inflamação e hepatotoxicidade adicional mediada por neutrófilos.

5- Morte celular programada (apoptose) decorrente da agressão imuno-mediada, com a destruição de hepatócitos pelas vias do TNF e da Fas. Estas funcionam como gatilho para a cascata de caspases, que levam à contração das células e fragmentação da cromatina nuclear.

6- Estresse oxidativo ocasionado pela agressão dos fármacos às mitocôndrias, seja por inativação ou ligação a enzimas respiratórias ou ao DNA mitocondrial, desregulando a oxidação dos ácidos graxos e a produção de energia celular. Isto resulta no aparecimento de metabolismo anaeróbico, acidose láctica e acúmulo de triglicérides nas células (esteatohepatite).

Sendo o hepatócito a principal unidade metabólica do fígado, muitas reações adversas podem resultar na sua morte. A reação mais comum conduzindo a morte celular é a formação de ligações covalentes entre o metabólito reativo e macromoléculas biológicas. Reações de oxidação também podem produzir compostos eletrofílicos ou espécies reativas de oxigênio (tais como o ânion superóxido e outros radicais livres) que reagem com componentes celulares (RECKNAGEL *et al.*, 1991).

Espécies reativas de oxigênio (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil) são produzidas continuamente durante o metabolismo aeróbico. O desequilíbrio entre a formação excessiva de EROs e a defesa antioxidante resulta em vários processos deletérios para a célula. Pequenas flutuações na concentração destes oxidantes exercem um papel na sinalização intracelular, enquanto aumentos descontrolados dessas espécies de oxigênio conduzem a reações em cadeia com proteínas, lipídeos, polissacarídeos e DNA (DROGE, 2002).

A formação de EROs não é o único evento responsável pela toxicidade de muitos fármacos contra as células. A alteração do estado redox pela depleção de substâncias redutoras, a inibição dos seqüestradores de EROs, ou a adição direta de espécies produtoras de EROs, também contribuem para citotoxicidade dos fármacos.

O balanço redox é regulado por uma quantidade relativa de substâncias oxidantes e redutoras. Ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^+), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e

oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) constituem os principais componentes oxidantes endógenos (KAMATA; HIRATA, 1999; THANNICKAL; FANBURG, 2000). Em condições normais, o O_2^- é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela adição da superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 por sua vez é reduzido a H_2O pela glutathiona redutase, com a utilização de NADPH. Desta forma, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente composto por GSH, SOD, NADPH, glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GRd), além de vitaminas C e E (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

Além de fornecer mais de 95% de energia utilizada pela célula por meio da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha diferentes funções na regulação de vários processos celulares, participando da modulação do estado redox celular, da regulação osmótica, do controle de pH, da sinalização celular, e, sobretudo, da manutenção da homeostasia do cálcio. Devido a essa diversidade de funções, a mitocôndria é uma organela alvo de várias situações lesivas e agentes tóxicos, estando envolvidas nos mecanismos de dano e morte celular (ORRENIUS *et al.*, 1989; GUNTER *et al.*, 1994; WALLACE *et al.*, 1997). Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas (NIEMINEN *et al.*, 1990; BELLOMO *et al.*, 1982; IMBERTI *et al.*, 1993).

As mitocôndrias são essenciais para a manutenção da vida celular, e exercem um papel central na regulação da morte celular, constituindo a principal fonte geradora de EROS uma vez que o sistema de transporte elétrico mitocondrial consome aproximadamente 85% de todo oxigênio utilizado pela célula e, em contraposição aos outros sistemas oxidantes celulares (citocromo P450, várias oxidases citosólicas, β -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomas, etc), as mitocôndrias são requeridas para a produção de ATP e estão presentes em elevado número em praticamente todas as células. Um déficit de energia ocasionado pelo declínio na função mitocondrial pode comprometer a atividade celular normal (SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994).

Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, incluindo a quebra da homeostasia intracelular de íons, inibição enzimática, danos às membranas celulares e anóxia (RAHN *et al.*, 1991). Quando há alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial (PMM) as células morrem principalmente por

apoptose. Os fatores chave que regulam a PMM incluem a concentração intramitocondrial do cálcio, o estado redox celular (incluindo níveis de espécies reativas de oxigênio) e a mobilização dos membros da família Bcl-2.

Alterações nas funções mitocondriais têm um efeito imediato no balanço energético da célula (ROSSER; GORES, 1995). Diversos mecanismos podem estar envolvidos nesse processo: (a) inibição direta do metabolismo mitocondrial por inibição do transporte de elétrons e/ou da fosforilação oxidativa; (b) danos estruturais na mitocôndria devido a oxidação dos lipídeos de membrana ou devido a intercalação de compostos na membrana lipídica, conduzindo à alteração do potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente à dissipação do potencial energético necessário para a síntese de ATP e (c) danos ao DNA mitocondrial (NIEMINEN *et al.*, 1995).

1.9. EROs e o Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um achado freqüente na hepatotoxicidade induzida por xenobióticos (POLI *et al.*, 1987). Trata-se de um processo mediado pela formação de radicais livres diversos que resultam da degradação oxidativa dos lipídeos (lipoperoxidação) e de proteínas presentes nos diversos sistemas de membrana da célula. Outras macromoléculas (glicídios e ácidos nucleicos) também podem ser afetadas. Esse processo pode ser iniciado por radicais derivados dos xenobióticos gerados em reações catalisadas pelas isoenzimas do citocromo P-450 ou ainda pela produção de radicais livres oriundos do oxigênio (O_2^- , H_2O_2 e OH^+). Na presença do oxigênio, esse processo é estendido aos lipídeos insaturados e uma cadeia de reações é estabelecida de modo que os danos às membranas são propagados. A primeira conseqüência desse processo é a profunda alteração das propriedades físicas e químicas das membranas, causando perda das suas funções especializadas (ROSS, 1988).

A cadeia transportadora de elétrons parece ser a principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio, e, portanto, causador de estresse oxidativo, o H_2O_2 em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, o que pode acarretar infecções, formação de úlceras e até necrose (WIEACKER *et al.*, 1980). Na presença de várias drogas ou toxinas, como por exemplo: inibidores da cadeia

transportadora de elétrons, desacopladores da fosforilação oxidativa, compostos quinonoídeos e metais, a geração de radicais livres de oxigênio pela mitocôndria pode ser aumentada substancialmente (GERLACH *et al.*, 1995).

O radical aniônico superóxido (O_2^-) parece ser o principal produto da redução incompleta do oxigênio sob condições fisiológicas e patológicas. Sob a ação da superóxido dismutase o radical superóxido é transformado em água oxigenada, cuja redução pode se difundir da mitocôndria e lesar componentes celulares distantes do seu sítio de formação; o radical hidroxil, devido à sua alta reatividade e conseqüente meia vida muito curta, não possui a capacidade de difusão. Dessa forma, os efeitos das EROs podem ser maiores na membrana mitocondrial interna, cujo principal componente da bicamada fosfolipídica é a cardiolipina, um derivado do fosfatidil glicerol, que possui uma alta relação de ácidos graxos insaturados/saturados.

A cardiolipina apresenta uma importante função no controle da permeabilidade da membrana, bem como no estabelecimento do gradiente eletroquímico de prótons. É ainda um regulador da respiração de estado 3, podendo modular a estrutura secundária de proteínas da membrana interna da mitocôndria, tais como os transportadores de substratos, NADH desidrogenase, citocromo bc1, citocromo c oxidase e ATP sintetase (MASSOTTI *et al.*, 1974). Além disso, a membrana mitocondrial interna possui enzimas contendo ferro e cobre, as quais podem catalisar a reação de oxidação do superóxido e da água oxigenada e formar radicais hidroxilas (ZHANG *et al.*, 1990).

As células possuem diversas estratégias para neutralizar os radicais livres de oxigênio gerados durante as oxidações biológicas prevenindo assim a propagação dos danos. Trata-se de um sistema complexo que compreende: (a) inativação dos radicais livres de oxigênio por enzimas específicas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase); (b) neutralização dos radicais eventualmente formados pela ação de substâncias com propriedades sequestradoras de radicais livres (vitamina E, GSH) e (c) reparo dos lipídios oxidados (glutaredoxina). A geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria é um processo contínuo e fisiologicamente normal em condições aeróbicas, visto que cerca de 1-2% do oxigênio reduzido pela mitocôndria é convertido em superóxido (VERCESI, 1993).

1.10. Sistemas de defesa antioxidante

A mais importante defesa contra as lesões oxidativas induzidas pelas espécies reativas de oxigênio é a manutenção da homeostase da glutathiona (GSH). A glutathiona reduzida serve como substrato para a ação da glutathiona peroxidase, na remoção do radical superóxido, e da glutathiona transferase, na formação do ácido mercaptúrico, além de atuar como sequestrador de radicais livres. Atua também como reguladora intracelular de grupos sulfidríla de enzimas glicolíticas e de ATPase- Ca^{+2} (BENZI; MORETTI, 1995). A ação da glutathiona peroxidase leva à produção da glutathiona dissulfeto ou glutathiona oxidada (GSSG), a qual é tóxica para a célula pela formação de derivados cistenil, especialmente na presença de metais de transição (JENNER, 1994).

As reações dependentes da glutathiona reduzida são de fundamental importância para a proteção da célula contra o estresse oxidativo, por manter a célula em um ambiente reduzido sob condições fisiológicas normais. A quebra da homeostase dos compostos de sulfidrílas em células tratadas com pró-oxidantes provoca enfraquecimento do sistema de translocação do cálcio, estimulação dos canais de cálcio e inibição do sequestro de cálcio pelo retículo endoplasmático e mitocôndria. Isto resulta na incapacidade da célula em manter a concentração do cálcio intracelular em níveis fisiológicos. Esse aumento intracelular da concentração do cálcio pode causar a ativação de várias enzimas cálcio-dependentes (fosfolipases, proteases e endonucleases) relacionadas aos processos de degradação de macromoléculas, o que pode contribuir para a morte de célula (ORRENIUS; NICOTERA, 1994; VERCESI, 1993; TRUMP; BEREZESKY, 1995).

Em muitas doenças a natureza da espécie radicalar que amplifica a lesão primária não é conhecida. Desta forma, torna-se difícil o planejamento correto da utilização de fármacos com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente o radical livre, impedindo sua reação com alvos celulares ou interrompendo as cadeias radicalares e assim, evitando a propagação das lesões provocadas por esses radicais (SUN, 1990). O emprego adequado destes fármacos e das estratégias terapêuticas depende de diversos fatores, tais como: entendimento dos processos dependentes dos radicais livres envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças, identificação das fontes celulares geradoras das espécies radicalares potencialmente tóxicas, identificação dos compostos que possam atuar como antioxidantes,

bem como a sua distribuição nos tecidos, localização subcelular e mecanismo de ação (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; SUN, 1990).

Neste contexto, os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutatona, particularmente a *glutathione peroxidase*. Estudos demonstraram também que outras enzimas antioxidantes, como *glutathione reductase* e *glicose-6-fosfato-desidrogenase*, apresentaram propriedades protetoras similares à *glutathione peroxidase* (SENTUERKER, 1993; WELLS *et al.*, 1997). Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidante operando em conjunto com as enzimas anteriormente citadas incluem a *superóxido dismutase* (SOD), dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores, onde ocorre a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, bem como a *catalase*, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular nas hemácias (MEISTER; ANDERSON, 1983).

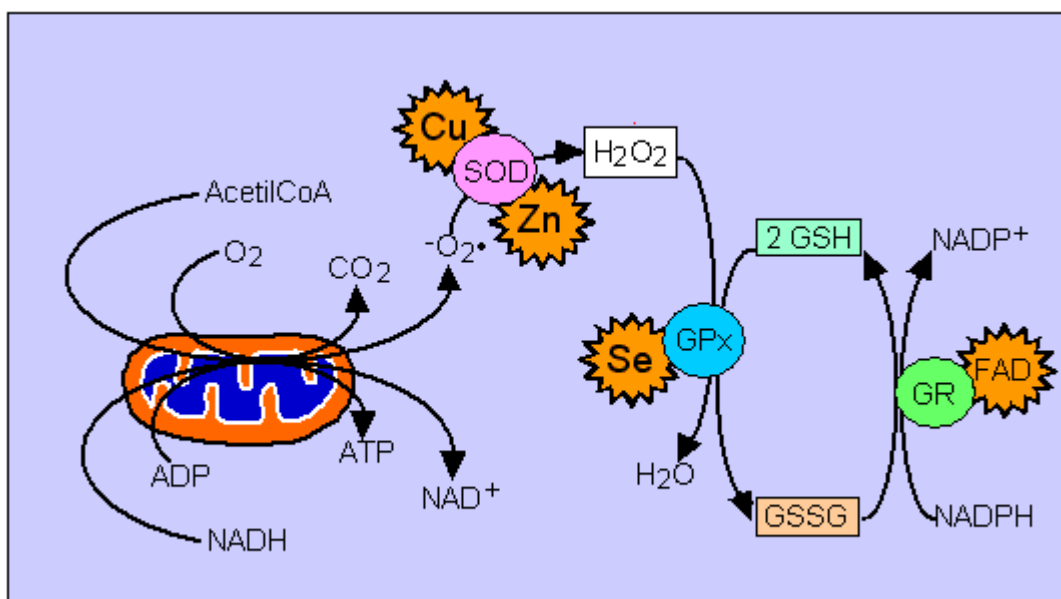


FIGURA 3 - Sistemas enzimáticos envolvidos no ciclo redox da glutatona

(Fonte: <http://www.unifesp.br/dneuro/nexp/riboflavina/d.htm>)

Muitas das reações radiculares prejudiciais *in vivo* são evitadas ou modificadas pela ação de agentes inibidores ou antioxidantes. Por exemplo, no caso de superóxido, a enzima SOD age como defesa contra esta espécie, enquanto as enzimas *catalase* e *peroxidase* atuam sobre H_2O_2 .

Há ainda a proteção não enzimática por pequenas moléculas, dentre as quais as mais utilizadas estão as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido L-ascórbico). A vitamina E é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação (KAY *et al.*, 1986). Ela pode reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o superóxido, a hidroxila etc., e também com o oxigênio singlete (MACHLIN; BENDICH, 1987).

A vitamina E foi primeiramente relatada em 1922, nos Estados Unidos, por Evaris e Bishop, que demonstraram ser lipossolúvel e também fator essencial para reprodução normal em ratos. A purificação deste fator revelou que ele é composto da família dos tocoferóis. Quatro tocoferóis são conhecidos, porém o alfa-tocoferol é o mais importante biologicamente e os termos alfa-tocoferol e vitamina E são quase intercambiáveis na literatura (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Primeiramente, o alfa-tocoferol inativo reage com o oxigênio singlete protegendo a membrana contra essa espécie. Durante a sua ação antioxidante (destruindo a cadeia de lipoperoxidação) nas membranas, o alfa-tocoferol é consumido e convertido em forma de radical. A vitamina E pode também proteger contra a peroxidação modificando a estrutura da membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

A vitamina E, localizada perto do citocromo P-450 no fosfolípídeo da membrana, varre os radicais livres formados no citocromo P-450. A seguir, a vitamina C reduz o radical tocoferil. Ambos os radicais tocoferil e hidroascorbil não são muito reativos inviabilizando o processo de lipoperoxidação (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Os carotenóides destacam-se também como agentes antioxidantes, dentre os quais a pró-vitamina A (β -caroteno), pigmento responsável pela cor característica da cenoura, é o carotenóide mais abundante e de maior atividade. Estudos recentes indicam uma possível atividade anti-cancerígena do β -caroteno, sendo usado como corante e antioxidante em alimentos (BURTON; INGOLD, 1984). Especificamente, o β -caroteno exibe uma boa capacidade de captura de radicais livres somente a pressões parciais normais de oxigênio no ar, comumente encontrada na maior parte dos tecidos biológicos sob condições fisiológicas (CARDOSO, 1997).

1.11. Relevância e justificativa

O *Croton cajucara* Benth. (sacaca) é uma espécie medicinal amplamente utilizada na região amazônica no tratamento do diabetes, desordens hepáticas e renal, obesidade e hipertensão. Estudos farmacológicos comprovaram as propriedades antiinflamatória, antinociceptiva, antiestrogênica, antiulcerogênica, antitumoral, hipolipidêmica, hipoglicêmica e citotóxica da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), um diterpeno do tipo clerodano isolado da sacaca e componente majoritário desta planta.

Em virtude de o chá das cascas do caule de sacaca ser muito utilizado em dietas de emagrecimento e como hipoglicemiante e diante da possibilidade da *t*-DCTN, molécula majoritária da *Croton cajucara*, ser a responsável por efeitos hepatotóxicos que podem ser desencadeados em tratamentos prolongados, há necessidade de se investigar os efeitos tóxicos da *t*-DCTN sobre o fígado e determinar novas alternativas terapêuticas que possam diminuir os possíveis efeitos adversos associados a este diterpeno.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Uma vez que, muitas atividades já foram comprovadas para a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e que estudos demonstraram que algumas substâncias hipoglicemiantes e hipolipidêmicas são associadas a efeitos tóxicos sobre o fígado, este trabalho tem por objetivo geral avaliar a hepatotoxicidade da *t*-DCTN em camundongos e desenvolver estratégias farmacológicas para mitigar este efeito tóxico.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a toxicidade hepática aguda da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN);
- Determinar a toxicidade hepática de administrações repetidas da *t*-DCTN;
- Avaliar o efeito pré-condicionante de baixas doses de *t*-DCTN na toxicidade hepática aguda induzida por *t*-DCTN;
- Avaliar o efeito pré-condicionante de baixas doses de Etanol na toxicidade hepática aguda induzida por *t*-DCTN.
- Avaliar o envolvimento do óxido nítrico no efeito pré-condicionante da *t*-DCTN e do Etanol;
- Avaliar o efeito da Vitamina E e N-acetilcisteína (NAC) na hepatite tóxica induzida por *t*-DCTN.

3. MATERIAIS

3.1. Material botânico

A *t*-DCTN foi isolada a partir da casca do caule do *Croton cajucara* Benth. e fornecida pela Prof^a Maria Aparecida Maciel do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para utilização nos experimentos, a *t*-DCTN foi diluída na concentração de até 3% de Tween 80 em água destilada.

3.2. Animais experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss Webster, adultos, machos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura variando entre 22-24°C, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade federal do Ceará (Protocolo nº 44/08).

3.3. Drogas e reagentes

PRODUTO	ORIGEM
Ácido Etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA)	Proanalysis, Brasil
Ácido tiobarbitúrico	Sigma, USA
Ácido tricloroacético P.A.	Sigma, USA
Ácido trinitrobenzeno sulfônico – TNB	Sigma, USA
Álcool etílico absoluto P.A.	Synth, Brasil
D-Arginina	Sigma, USA
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Éter etílico	Labsynth, Brasil
Glutation reduzido (GSH)	Sigma, USA
L-Arginina	Sigma, USA
Metanol absoluto P.A.	Quimex, Brasil
N-Acetilcisteína	Sigma, USA
Trizma	Sigma, USA
Tween 80	Sigma, USA
Vitamina E	Aché, Brasil

3.4. Equipamentos

EQUIPAMENTO	ORIGEM
Agitador – aquecedor, modelo 258	Fanen®, Brasil
Espectrofotômetro: modelo DU640B	Beckman®
Espectrofotômetro: modelo B582	Micronal®
Balança analítica: modelo AX-200	Shimadzu, Japão
Balança para animais: modelo MF-6	Filizola, Brasil
Banho-maria, modelo Q-249	QUIMIS®, Brasil
Centrífuga refrigerada, modelo 5417R	Eppendorf®
Centrífuga refrigerada, modelo CT 5500 DR	CIENITEC®, Brasil
pHmetro Microprocessado	QUIMIS®, Brasil
Pipetas automáticas	Jencons®

4. MÉTODOS

4.1. Isolamento da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN)

A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) foi isolada do extrato hexânico das cascas (6 kg) do *Croton cajucara* Benth., o qual forneceu, após filtração em gel de sílica, a fração CH₂Cl₂ (eluída em diclorometano).

A fração CH₂Cl₂ sofreu nova filtração em gel de sílica, tendo sido eluída com hexano - CH₂Cl₂-MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas frações de 500 mL, que sofreram monitoramento por cromatografia de camada delgada – CCD, gerando a reunião de 6 grupos de frações.

Os grupos de frações 7-21/ 22-25/ 26-29/ 30-33/ 34-41, eluídos em hexano- CH₂Cl₂ (5:5 – 0:1) e o grupo de frações 42-53, eluídos em CH₂Cl₂-MeOH (9:1 – 0:1), foram submetidos ao processo de recristalização em hexano-Me₂CO. Após as filtrações obteve-se aproximadamente 32 g de um sólido cristalino correspondente ao diterpeno *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), como mostra a **Figura 4**.

<i>t</i>-DCTN – Características	Sólido cristalino
	Ponto de fusão: 139 – 140°C
	Peso molecular: 314 M

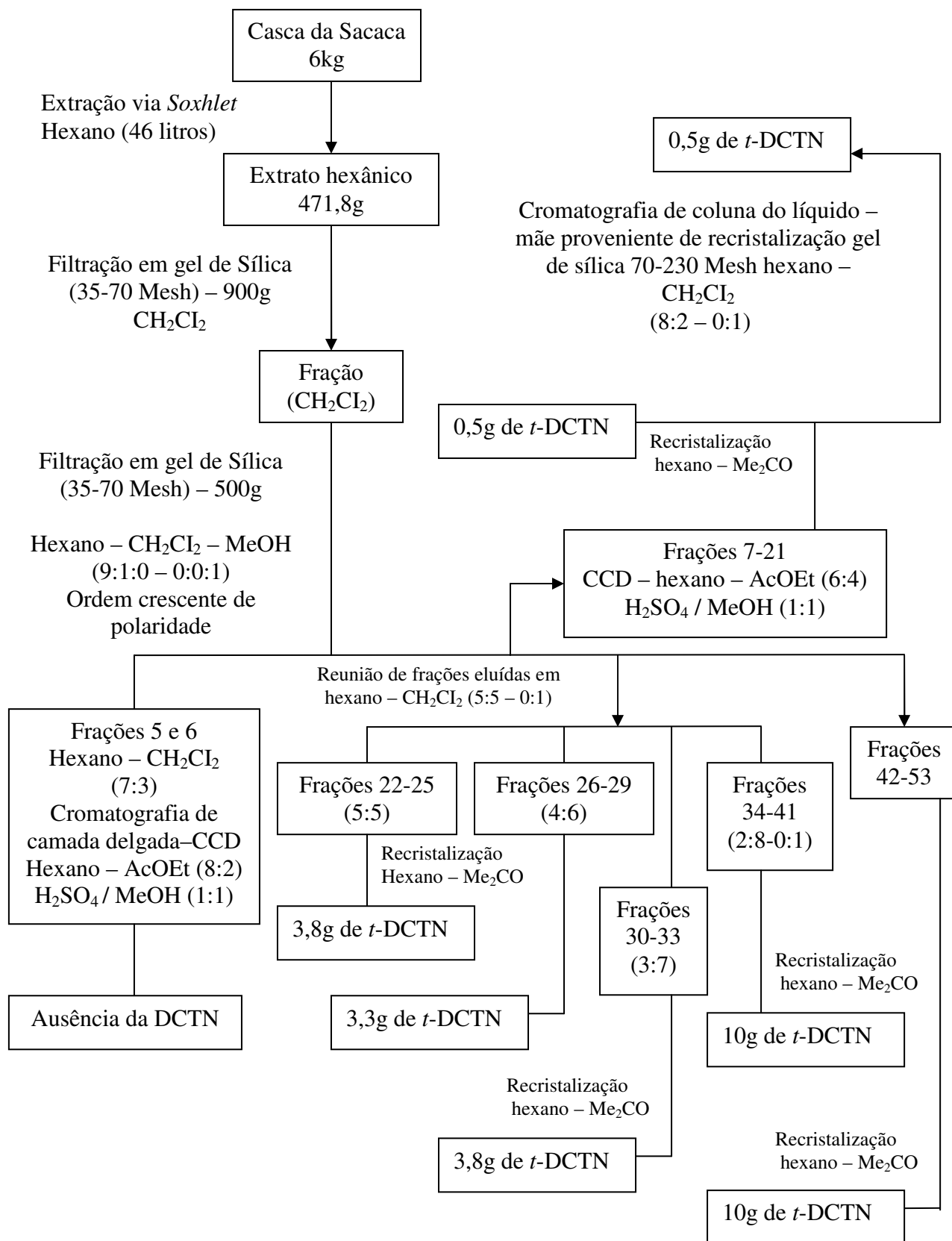


FIGURA 4 - Método de obtenção do diterpeno *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) a partir dos extratos hexânicos e clorofórmico.

4.2. Avaliação da toxicidade aguda de *t*-DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) nos fígados de camundongos

Na avaliação da toxicidade aguda da *t*-DCTN, foram utilizados camundongos Swiss, escolhidos aleatoriamente, separados em grupos de 8 animais cada. A *t*-DCTN foi administrada, por gavagem (v.o.), em doses crescentes de 10, 30, 100 e 300 mg/kg no volume de 10 ml/kg. A escolha das doses foi baseada em dados encontrados na literatura referentes a DL50 e as doses utilizadas freqüentemente em testes farmacológicos com *t*-DCTN. Outro grupo recebeu igual volume de veículo (3% de Tween 80 em água destilada) e foi incluído no estudo como controle normal.

Após o período de 24 horas da administração da *t*-DCTN, amostras de sangue, de todos os animais, foram obtidas através do plexo orbital, sob leve anestesia com éter, em tubos heparinizados para determinação dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e um espectrofotômetro semi-automático (Micronal®, modelo B582).

Os animais foram então sacrificados e o tecido hepático coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrilas não protéicos hepáticos – NP-SH (SEDLACK & LINDSAY, 1968) e para análise histológica.

4.3. Determinação dos grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH) hepáticos

A quantificação dos grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH) foi realizada segundo o método de SEDLACK & LINDSAY (1968). O fígado foi removido, pesado e homogeneizado com EDTA 0,02 M gelado, para preparar um homogenato a 10%. Uma alíquota de 1 ml de cada amostra foi retirada e adicionado 0,8 ml de água destilada e 0,2 ml de ácido tricloroacético – TCA 50% em solução aquosa. Os tubos de ensaio contendo a mistura foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Um volume de 1 ml foi retirado do sobrenadante e adicionado 2 ml de Tris 0,4 M, pH 8,9 e 0,05 ml de DTNB 0,01M.

A absorbância foi medida dentro de 5 minutos a 412 nm. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva de calibração de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de NP-SH/g de tecido.

4.4. Análise histopatológica

Para avaliação das alterações teciduais microscópicas dos fígados, foram realizados cortes histopatológicos de todos os grupos. O fígado foi fixado em formol tamponado 10%, incluído em parafina, realizadas secções em micrótomo e corado com hematoxilina-eosina. As alterações histopatológicas foram examinadas e microfotografadas em microscópio óptico sendo analisada a arquitetura do tecido, a presença de infiltrado inflamatório, áreas necróticas, hemorragias, degeneração hidrópica, entre outras alterações.

4.5. Avaliação da toxicidade hepática de administrações sucessivas de *t*-DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) em camundongos

Foram divididos grupos de oito animais cada, os quais foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada- 0,1 ml/10g, v.o.- gavagem) ou *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.- gavagem) 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes do experimento. Os animais que receberam apenas veículo foram incluídos no estudo como controle normal.

Após o período de 24 horas da última administração da *t*-DCTN, foram determinados os níveis séricos de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e um espectrofotômetro semi-automático (Micronal®, modelo B582). Em seguida os animais foram sacrificados, o tecido hepático coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrila não protéicos hepáticos – NP-SH (SEDLACK; LINDSAY, 1968) e para análise histológica, segundo metodologias descritas nos itens 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.6. Avaliação do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN

Grupos de oito animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada- 0,1 ml/10g, v.o.- gavagem) ou *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.- gavagem) 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes do experimento. Outro grupo recebeu pré-tratamento por cinco dias consecutivos com 10 mg/kg (v.o.) de *t*-DCTN e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). Os animais que receberam apenas veículo foram incluídos no estudo como controle normal.

Após o período de 24 horas da última administração da *t*-DCTN, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais e os níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) foram analisados utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e um espectrofotômetro semi-automático (Micronal®, modelo B582). Os animais foram sacrificados e o tecido hepático foi coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrila não protéicos hepáticos – NP-SH (SEDLACK; LINDSAY, 1968) e para análise histológica, segundo metodologias descritas nos itens 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.7. Avaliação do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN

Os animais foram divididos em grupos (n=8), os quais receberam os seguintes tratamentos: veículo (3% de Tween 80 em água destilada- 0,1 ml/10g, v.o.- gavagem) ou etanol (1 g/kg de animal, v.o.- gavagem) 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes do experimento. Outro grupo recebeu pré-tratamento por 5 dias consecutivos com 1 g/kg de etanol e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.- gavagem).

Amostras de sangue de todos os animais foram coletadas após o período de 24 horas da última administração da *t*-DCTN, determinando-se os níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e um espectrofotômetro semi-automático (Micronal®, modelo B582). Os animais foram sacrificados e foram realizadas dosagens dos grupos sulfidrilas não protéicos hepáticos – NP-SH (SEDLACK; LINDSAY, 1968) e análise histológica, segundo metodologias descritas nos itens 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.8. Envolvimento do óxido nítrico no pré-condicionamento hepático da *t*-DCTN e do etanol

Os animais foram divididos em grupos de 8 e tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada- 0,1 ml/10g, v.o.) ou *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). Outros grupos receberam pré-tratamento com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou D-arginina (400 mg/kg, i.p.) 30 min antes da administração da *t*-DCTN.

Após o período de 24 horas da última administração da *t*-DCTN, foram coletadas amostras de sangue de todos e os níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) foram analisados utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e um espectrofotômetro semi-automático (Micronal®, modelo B582). Os animais foram sacrificados e tecido hepático foi coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrila não protéicos hepáticos – NP-SH (SEDLACK; LINDSAY, 1968) e para análise histológica, segundo metodologias descritas nos itens 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.9. Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) na hepatite tóxica induzida por *t*-DCTN

Os animais foram divididos em grupos de 8 e tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada- 0,1 ml/10g, v.o.- gavagem) ou *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.-gavagem). Outros grupos receberam pré-tratamento com Vitamina E (300 mg/kg, v.o.- gavagem), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou com a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.).

Após o período de 24 horas da última administração da *t*-DCTN, foram coletadas amostras de sangue dos animais e analisados os níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e um espectrofotômetro semi-automático (Micronal®, modelo B582). Os animais foram sacrificados e tecido hepático foi coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrila não protéicos hepáticos – NP-SH (SEDLACK; LINDSAY, 1968), TBARS (AGAR *et al.*, 1999) e para análise histológica.

4.10. Determinação dos níveis hepáticos de TBARS (AGAR *et al.*, 1999)

A atividade antioxidante foi medida pela dosagem das substâncias reativas com o ácido Tiobarbitúrico (TBARS), um indicador de peroxidação lipídica (AGAR *et al.*, 1999). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de malondialdeído (MDA) para formar uma solução de cor rosa, que tem absorbância máxima em pH ácido de 532 a 535 nm.

Após os tratamentos e coleta de sangue, os animais foram sacrificados e seus fígados foram removidos, pesados e homogeneizados em tampão fosfato 50 mM (pH 7.4), para preparar um homogenato a 10%. 250 µl do homogenato foram introduzidos em tubos de ensaio e incubados por 1 h no banho de água a temperatura de 37°C. Após a incubação, 400 µl de ácido perclórico 35% foi adicionado, a fim de parar a peroxidação, sob agitação e, em seguida, centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. Em seguida 600 µl do sobrenadante foram adicionados a 200 µl de ácido tiobarbitúrico 1,2%. A mistura foi levada ao banho de água por 30 minutos a uma temperatura variável de 95 - 100°C. A solução foi então retirada e colocada para esfriar à temperatura ambiente, após isso foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de 532 nm. Os valores de TBARS foram expressos em termos de absorbância a 532 nm.

4.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 4.0 para Windows (GraphPad Software).

Os valores experimentais obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M). Para comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelos testes Student Newman Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito de uma única administração de *t*-DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) na hepatotoxicidade em camundongos

Uma única administração da *t*-DCTN nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 mg/kg aumentou os níveis hepático de glutathiona ($1401 \pm 32,73$; $1937 \pm 116,5$; $2286 \pm 95,83$ e $1603 \pm 141,3$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparados ao grupo controle normal ($1299 \pm 49,88$ $\mu\text{g/g}$ de tecido). Este aumento foi significativo com as doses 30 e 100 mg/kg ($p < 0,001$) (**Tabela 1 e Figura 5**).

A *t*-DCTN administrada nas doses de 100 e 300 mg/kg aumentou significativamente ($p < 0,001$) os níveis de ALT e AST séricos ($189,0 \pm 21,86$ e $158,6 \pm 17,22$; $259,1 \pm 19,04$ e $197,3 \pm 16,56$ U/mL, respectivamente) quando comparado com o controle normal ($42,86 \pm 6,49$ e $91,57 \pm 5,70$ U/mL, respectivamente). Entretanto, nenhum aumento das aminotransferases foi verificado nas doses de 10 e 30 mg/kg (**Tabela 2 e Figura 6**).

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com veículo (3% de Tween 80) demonstrou tecido com arquitetura preservada. Já o grupo tratado com altas doses de *t*-DCTN (100 e 300 mg/kg), apresentou extensas áreas necróticas com presença de degeneração hidrópica e de infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares (PMN). Nos grupos tratados com *t*-DCTN nas doses de 10 e 30 mg/kg, os fígados tiveram sua estrutura preservada, não observando áreas inflamatórias e presença de células necróticas (**Figura 7**).

TABELA 1 - Efeito de uma única administração de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutationa em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (μ g/g tecido)
Controle normal	---	1299 $\pm$ 49,88
<i>t</i> -DCTN	10	1401 $\pm$ 32,73
	30	1937 $\pm$ 116,5 ^{a,b}
	100	2286 $\pm$ 95,83 ^{a,c}
	300	1603 $\pm$ 141,3

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos (n=8). As dosagens foram analisadas 24 horas após a administração de *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,01 vs *t*-DCTN 10 mg/kg; ^cp<0,05 vs *t*-DCTN 30 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

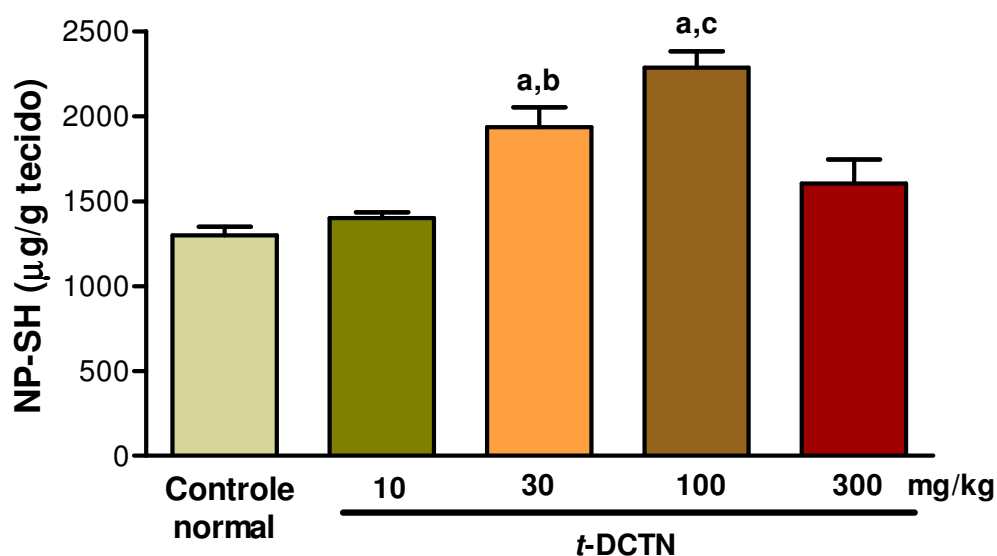


FIGURA 5 - Efeito de uma única administração de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathione em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos (n=8). As dosagens foram analisadas 24 horas após a administração de *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,01 vs *t*-DCTN 10 mg/kg; ^cp<0,05 vs *t*-DCTN 30 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 2 - Efeito de uma única administração de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/ml)	AST (U/ml)
Controle normal	---	42,86±6,49	91,57±5,70
t-DCTN	10	49,88±1,30	83,30±4,53
	30	48,66±3,31	99,29±6,00
	100	189,0±21,86 ^{a,b}	158,6±17,22 ^{a,b}
	300	259,1±19,04 ^{a,c}	197,3±16,56 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/ml) de camundongos (n=8). As transaminases foram analisadas 24 horas após a administração de *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN 30 mg/kg; ^cp<0,001 vs *t*-DCTN 100 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

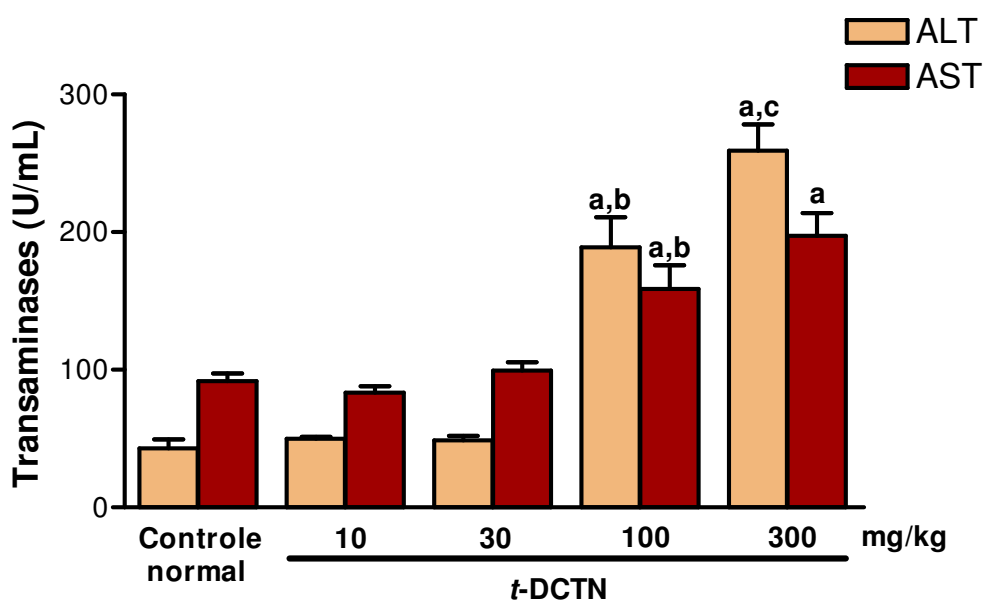


FIGURA 6 - Efeito de uma única administração de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/ml) de camundongos (n=8). As transaminases foram analisadas 24 horas após a administração de *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN 30 mg/kg; ^cp<0,001 vs *t*-DCTN 100 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

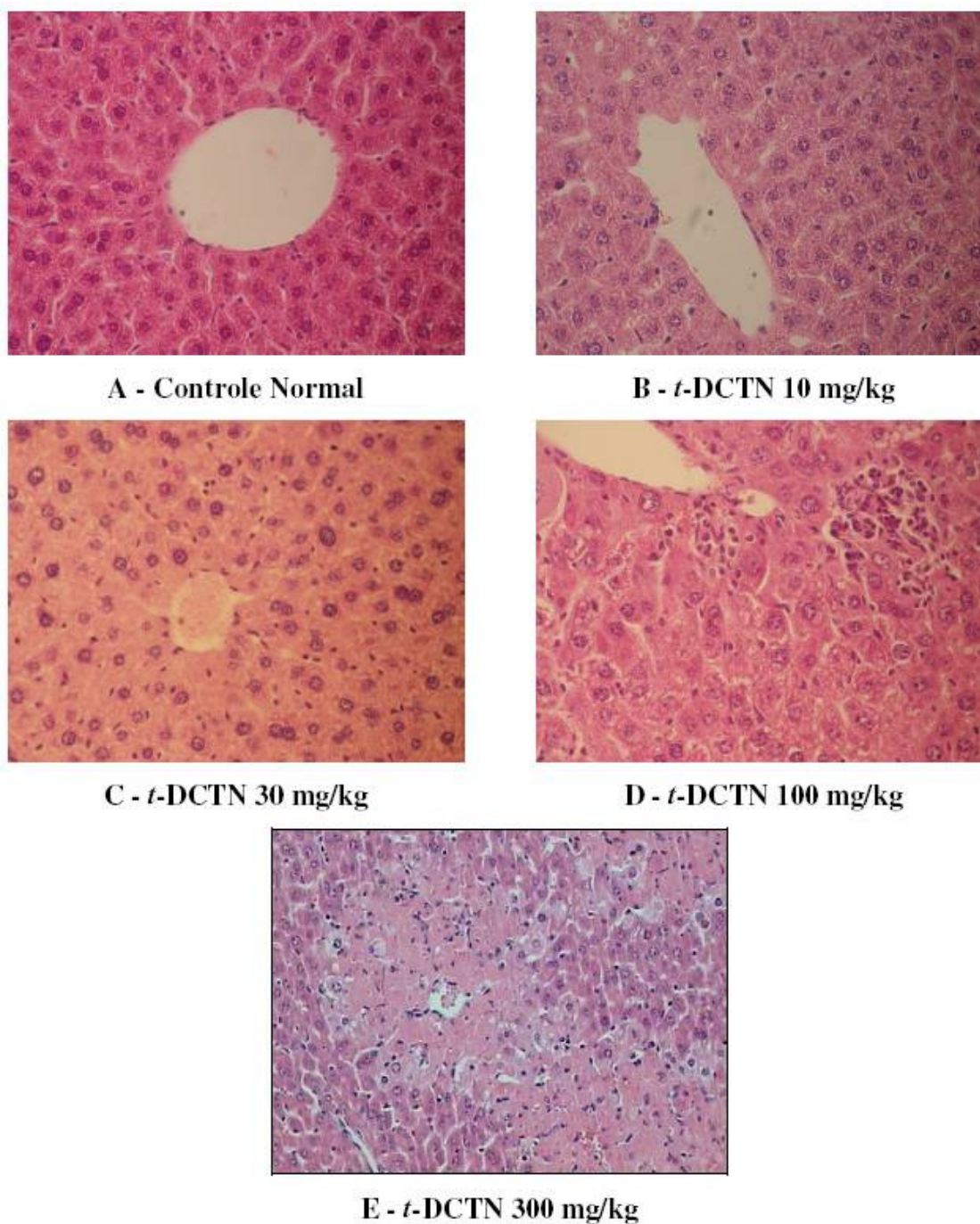


FIGURA 7 - Microfotografias de fígados de camundongos (H&E 400x) – dose única de *t*-DCTN: (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 – controle normal); (B) animais tratados com *t*-DCTN 10 mg/kg; (C) animais tratados com *t*-DCTN 30 mg/kg; (D) animais tratados com *t*-DCTN 100 mg/kg ; (E) animais tratados com *t*-DCTN 300 mg/kg (200x).

5.2. Efeito de administrações sucessivas de *t*-DCTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso) na toxicidade hepática em camundongos

Administrações repetidas da *t*-DCTN nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 mg/kg aumentou os níveis hepático de glutathione (1649±57,36; 2263±91,57; 2104±100,5 e 2027±177,1 µg/g tecido, respectivamente) quando comparados ao grupo controle normal (1408±53,77 µg/g tecido). Este aumento foi significativo com as doses 30, 100 e 300 mg/kg ($p < 0,001$) (**Tabela 3 e Figura 8**).

A *t*-DCTN administrada nas doses de 100 e 300 mg/kg aumentou significativamente ($p < 0,001$) os níveis de ALT e AST séricos (219,7±10,22 e 225,3±9,847; 230,2±3,272 e 212,0±7,658 U/mL, respectivamente) quando comparado com o controle normal (49,96±2,483 e 90,24±6,739 U/mL, respectivamente). Entretanto, nenhum aumento das aminotransferases foi verificado nas doses de 10 e 30 mg/kg (**Tabela 4 e Figura 9**).

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com veículo (3% de Tween 80) demonstrou tecido com arquitetura preservada. Já o grupo tratado com altas doses de *t*-DCTN (100 e 300 mg/kg) por 5 dias consecutivos, apresentou extensas áreas de degeneração hidrópica com presença de células necróticas, hemorragia e infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares (PMN). Nos grupos tratados com *t*-DCTN nas doses de 10 e 30 mg/kg, os fígados tiveram sua estrutura preservada, não observando áreas inflamatórias e presença de células necróticas (**Figura 10**).

TABELA 3 - Efeito de administrações sucessivas de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathione em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (μ g/g tecido)
Controle normal	---	1408 $\pm$ 53,77
<i>t</i> -DCTN	10	1649 $\pm$ 57,36
	30	2263 $\pm$ 91,57 ^a
	100	2104 $\pm$ 100,5 ^{a,b}
	300	2027 $\pm$ 177,1 ^a

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das amostras. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN 30 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

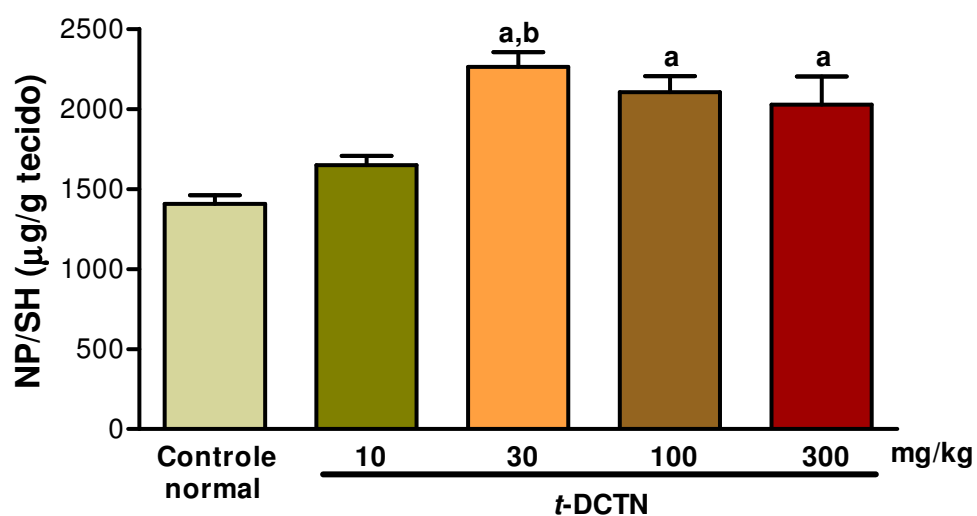


FIGURA 8 - Efeito de administrações sucessivas de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis hepáticos de Glutathione em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das amostras. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN 30 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 4 - Efeito de administrações sucessivas de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/ml)	AST (U/ml)
Controle normal	---	49,96 ± 2,483	90,24 ± 6,739
t-DCTN	10	56,76 ± 3,600	96,91 ± 3,668
	30	57,62 ± 2,968	93,34 ± 2,294
	100	219,7 ± 10,22 ^{a,b}	225,3 ± 9,847 ^{a,b}
	300	230,2 ± 3,272 ^a	212,0 ± 7,658 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/ml) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das transaminases. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN 30 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

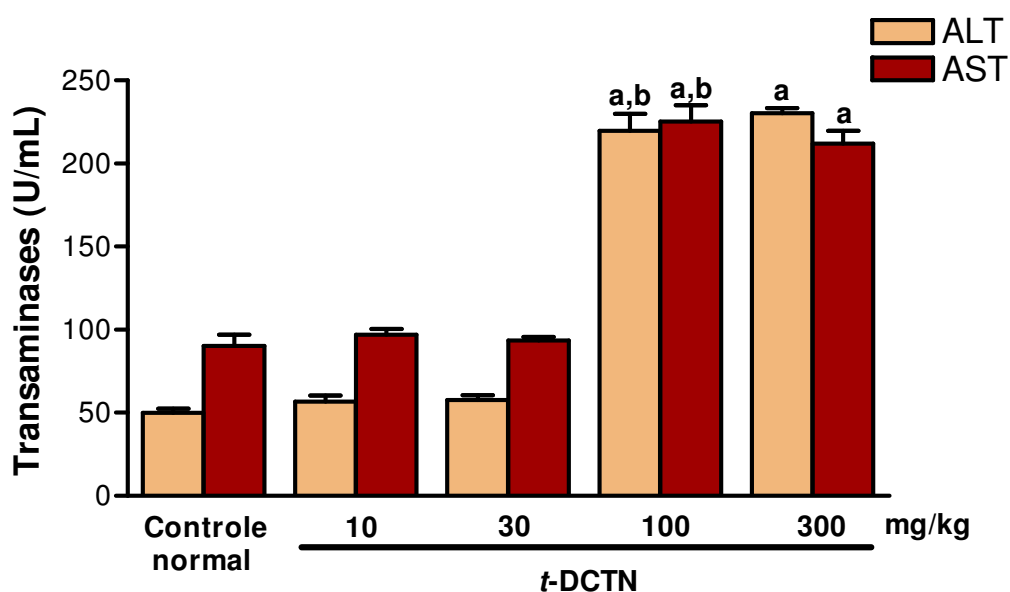
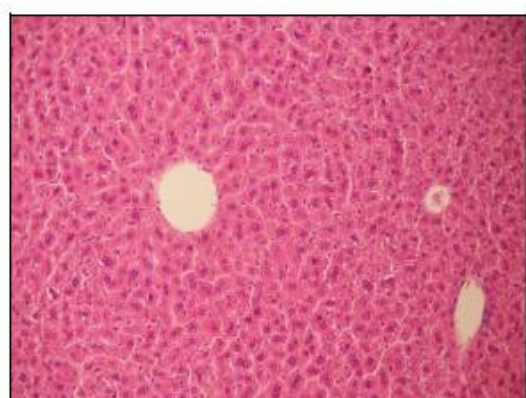
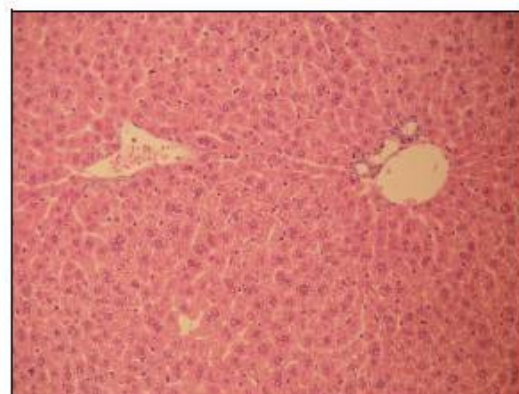


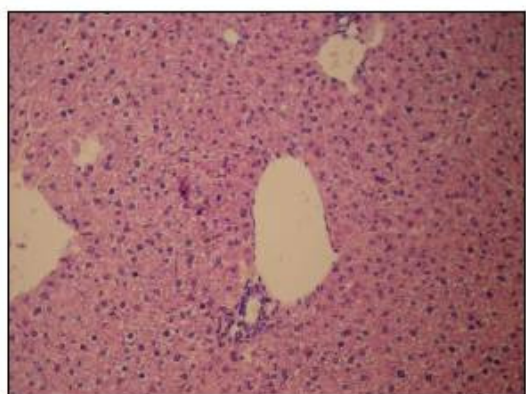
FIGURA 9 - Efeito de administrações sucessivas de *trans*-desidrocrotonina sobre os níveis séricos de ALT e AST. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/mL) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das transaminases. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN 30 mg/kg (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).



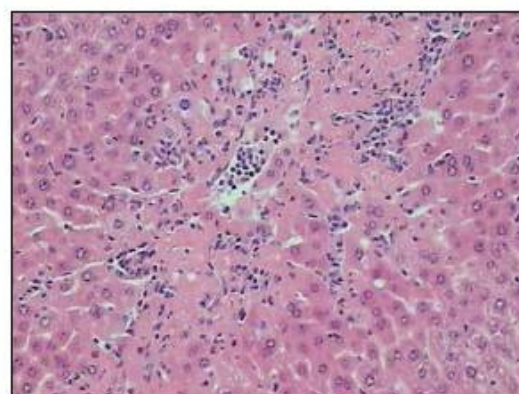
A – Controle Normal



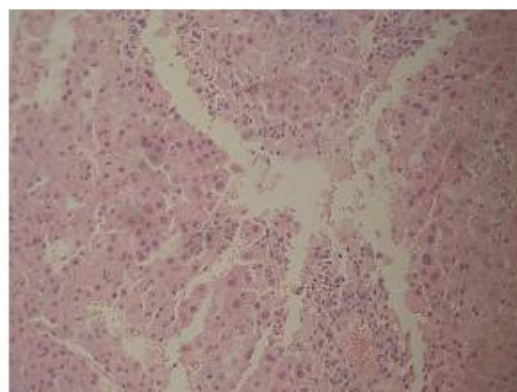
B – *t*-DCTN 10 mg/kg



C - *t*-DCTN 30 mg/kg



D - *t*-DCTN 100 mg/kg



E - *t*-DCTN 300 mg/kg

FIGURA 10 - Microfotografias de fígados de camundongos (H&E 200x) – doses repetidas de *t*-DCTN: (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 – controle normal); (B) animais tratados com *t*-DCTN 10 mg/kg; (C) animais tratados com *t*-DCTN 30 mg/kg; (D) animais tratados com *t*-DCTN 100 mg/kg; (E) animais tratados com *t*-DCTN 300 mg/kg.

5.3. Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN

Visto que a dose de 100 mg/kg da *t*-DCTN apresentou toxicidade hepática, ao aumentar significativamente (4,5 vezes) o nível sérico de ALT, esta dose foi selecionada para o estudo das estratégias farmacológicas de prevenção desta hepatotoxicidade.

A **Tabela 5** mostra que o tratamento com *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) promoveu um aumento significativo ($p<0,001$) dos níveis de glutathiona hepática ($1675\pm120,5$ µg/g de tecido) quando comparado ao grupo controle normal (**Figura 11**). Este efeito também foi observado no grupo que recebeu pré-tratamento com *t*-DCTN 10 mg/kg por 5 dias consecutivos, seguida de uma administração de *t*-DCTN na dose de 100 mg/kg ($2144\pm62,14$ µg/g de tecido).

Os níveis séricos das aminotransferases ALT e AST, aumentaram de forma significativa ($p<0,001$) no grupo tratado com *t*-DCTN na dose de 100 mg/kg ($179,8\pm8,766$ e $206,9\pm2,336$ U/ml, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($42,66\pm5,701$ e $109,6\pm3,609$ U/ml, respectivamente) (**Tabela 6 e Figura 12**).

O pré-tratamento com baixa dose de *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) por 5 dias consecutivos, antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg), foi capaz de reduzir significativamente ($p<0,001$) os níveis de ALT e AST ($64,96\pm16,04$ e $128,9\pm14,81$ U/ml, respectivamente) quando comparado com o grupo que recebeu somente *t*-DCTN em alta dose (100 mg/ kg) ($179,8\pm8,766$ e $206,9\pm2,336$ U/ml, respectivamente).

A análise histológica dos fígados do grupo controle normal mostrou um tecido hepático preservado, apresentando hepatócitos com a citoarquitetura íntegra. Já o grupo tratado com *t*-DCTN, mostrou extensas áreas inflamatórias com presença de células necróticas. No grupo que recebeu pré-tratamento com *t*-DCTN (10 mg/kg) por 5 dias consecutivos, antes da administração de *t*-DCTN em dose alta (100 mg/kg), observou-se pequenos pontos de infiltrado inflamatório, no entanto, não foram observadas áreas hemorrágicas e necróticas (**Figura 13**).

TABELA 5 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN sobre os níveis hepáticos de glutathiona na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (µg/g tecido)
Controle normal	---	1148 ± 82,69
<i>t</i> -DCTN	10	1382 ± 37,93
	100	1675 ± 120,5 ^a
	10 + 100	2144 ± 62,14 ^{a,b}

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens. Outro grupo recebeu pré-tratamento por cinco dias consecutivos com 10 mg/kg (v.o.) de *t*-DCTN e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg)(ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

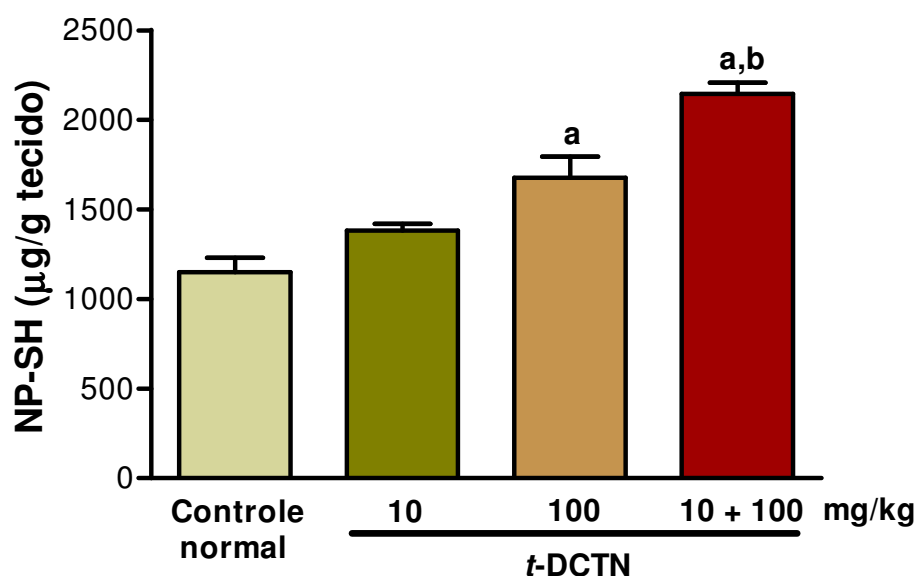


FIGURA 11 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN sobre os níveis hepáticos de glutathione na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens. Outro grupo foi pré-tratado por cinco dias consecutivos com 10 mg/kg (v.o.) de *t*-DCTN e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 6 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/ml)	AST (U/ml)
Controle normal	---	42,66 ± 5,701	109,6 ± 3,609
<i>t</i> -DCTN	10	40,08 ± 2,252	112,6 ± 7,665
	100	179,8 ± 8,766 ^a	206,9 ± 2,336 ^a
	10 + 100	64,96 ± 16,04 ^b	128,9 ± 14,81 ^b

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis séricos de ALT e AST de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das transaminases. Outro grupo foi pré-tratado por cinco dias consecutivos com 10 mg/kg (v.o.) de *t*-DCTN e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg)(ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

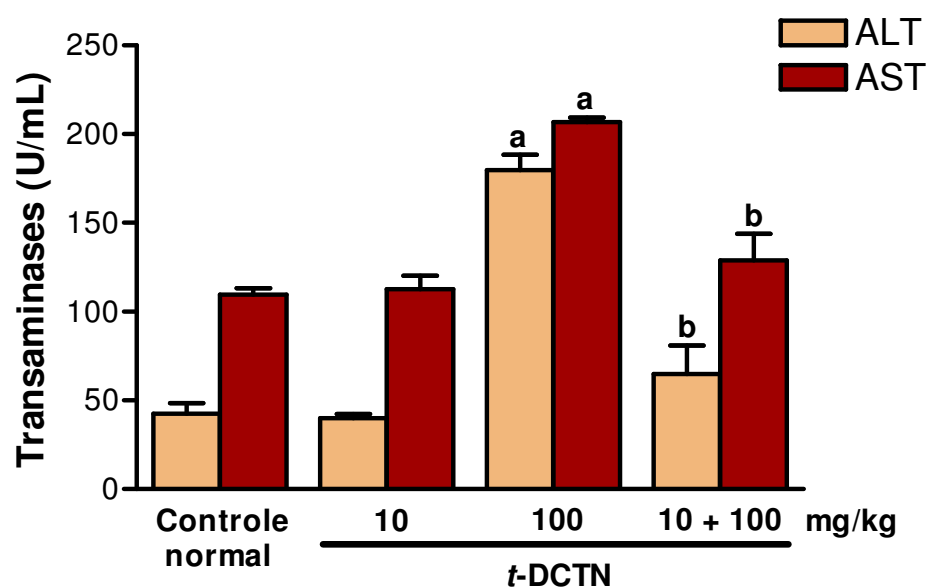


FIGURA 12 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/ml) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das aminotransferases. Outro grupo recebeu pré-tratamento por cinco dias consecutivos com 10 mg/kg (v.o.) de *t*-DCTN e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

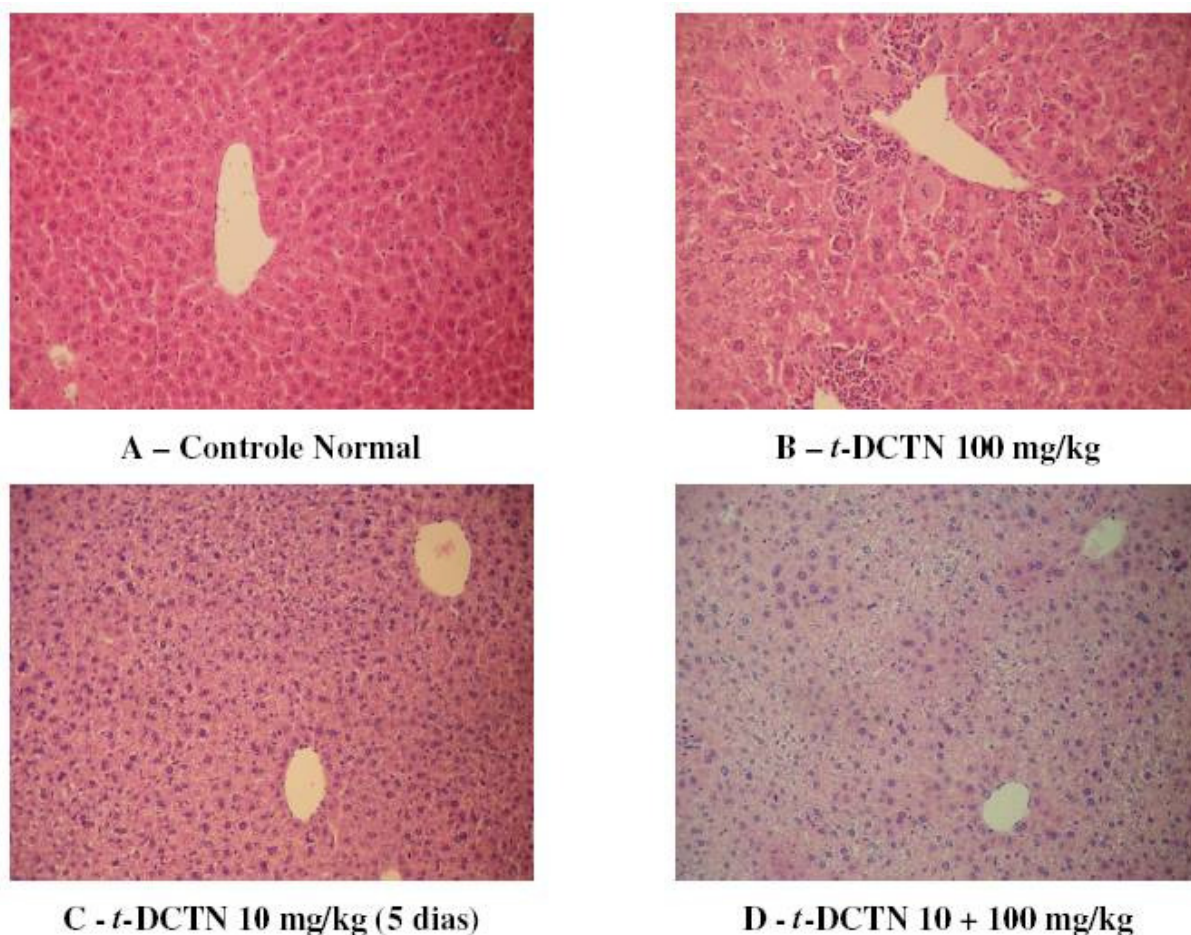


FIGURA 13 - Microfotografias de fígados de camundongos (H&E 200x) – Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN: (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 – controle normal); (B) animais tratados com *t*-DCTN 100 mg/kg (único tratamento); (C) animais tratados com *t*-DCTN 10 mg/kg (5 dias de tratamento); (D) animais pré-tratados com *t*-DCTN 10 mg/kg (5 dias de tratamento) + *t*-DCTN 100 mg/kg (único tratamento).

5.4. Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN

O tratamento com *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) promoveu um aumento significativo ($p < 0,001$) dos níveis de glutathione hepática ($1675 \pm 120,5 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle normal (**Tabela 7 e Figura 14**). Este efeito também foi observado no grupo que recebeu pré-tratamento com Etanol 1 g/kg por 5 dias consecutivos, seguida de uma administração de *t*-DCTN na dose de 100 mg/kg ($1893 \pm 110,4 \mu\text{g/g}$ de tecido).

Os níveis séricos das aminotransferases ALT e AST, aumentaram de forma significativa ($p < 0,001$) no grupo tratado com *t*-DCTN na dose de 100 mg/kg ($167,5 \pm 14,39$ e $196,8 \pm 10,28$ U/ml, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($42,66 \pm 5,701$ e $109,6 \pm 3,609$ U/ml, respectivamente) (**Tabela 8 e Figura 15**).

O pré-tratamento com baixa dose de Etanol (1 g/kg, v.o.) por 5 dias consecutivos, antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg), foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) os níveis de ALT e AST ($102,4 \pm 22,15$ e $116 \pm 15,73$ U/mL, respectivamente) quando comparado com o grupo que recebeu somente *t*-DCTN em alta dose (100 mg/kg) ($167,5 \pm 14,39$ e $196,8 \pm 10,28$ U/mL, respectivamente).

A análise histológica dos fígados do grupo controle normal mostrou um tecido hepático preservado, apresentando hepatócitos com a citoarquitetura íntegra. Já o grupo tratado com *t*-DCTN, mostrou extensas áreas inflamatórias com presença de células necróticas. No grupo que recebeu pré-tratamento com Etanol (1 g/kg) por 5 dias consecutivos, antes da administração de *t*-DCTN em dose alta (100 mg/kg), observou-se pequenos pontos de infiltrado inflamatório, no entanto, não foram observadas áreas hemorrágicas e necróticas (**Figura 16**).

TABELA 7 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis de glutathiona hepática na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN.

GRUPOS	DOSE	NP-SH ($\mu\text{g/g}$ tecido)
Controle normal	---	1148 $\pm$ 82,69
Etanol (g/kg)	1	821,6 $\pm$ 70,93
<i>t</i> -DCTN (mg/kg)	100	1675 $\pm$ 120,5 ^a
Etanol + <i>t</i> -DCTN	1 + 100	1893 $\pm$ 110,4 ^a

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. Outro grupo foi pré-tratado por cinco dias consecutivos com Etanol (10 g/kg, v.o.) e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal (100 mg/kg)(ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

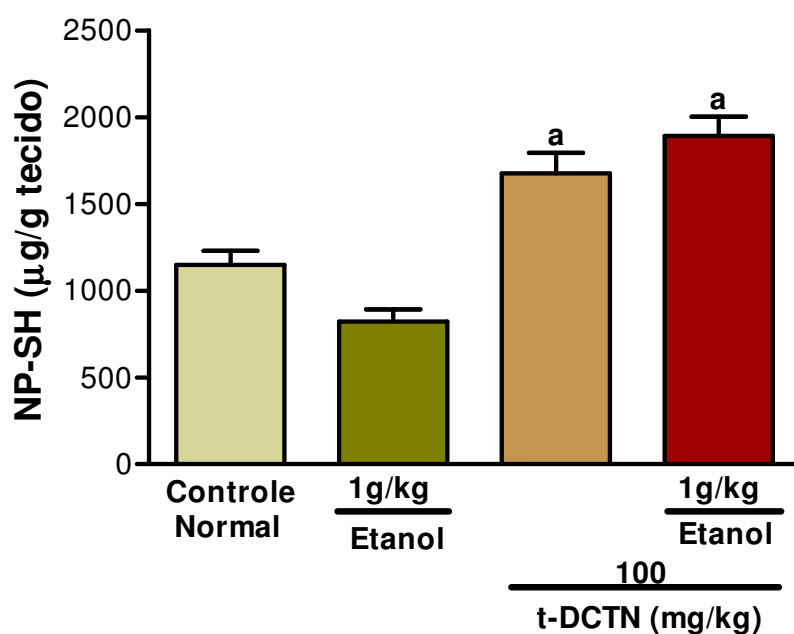


FIGURA 14 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis de glutathiona hepática na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. Outro grupo foi pré-tratado por cinco dias consecutivos com Etanol (10 g/kg, v.o.) e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 8 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN.

GRUPOS	DOSE	ALT (U/ml)	AST (U/ml)
Controle normal	---	42,66 ± 5,701	109,6 ± 3,609
Etanol (g/kg)	1	60,92 ± 8,609	109,3 ± 4,795
<i>t</i> -DCTN (mg/kg)	100	167,5 ± 14,39 ^a	196,8 ± 10,28 ^a
Etanol + <i>t</i> -DCTN	1 + 100	102,4 ± 22,15 ^{b,c}	116,0 ± 15,73 ^c

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis séricos de ALT e AST de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. Outro grupo foi pré-tratado por cinco dias consecutivos com Etanol (10 g/kg, v.o.) e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,01 vs controle normal; ^cp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg); (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

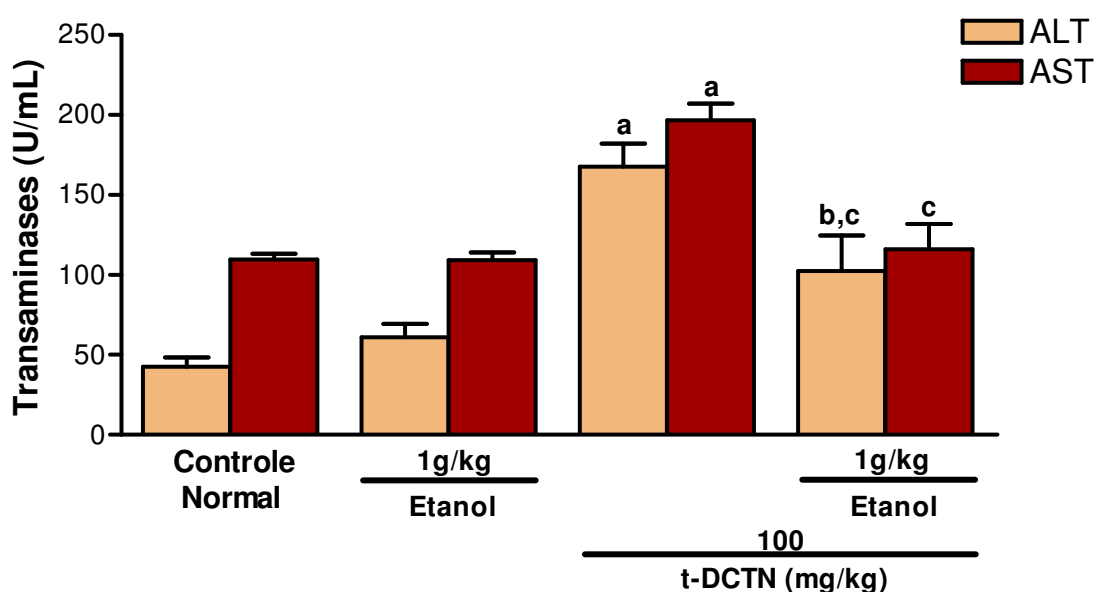
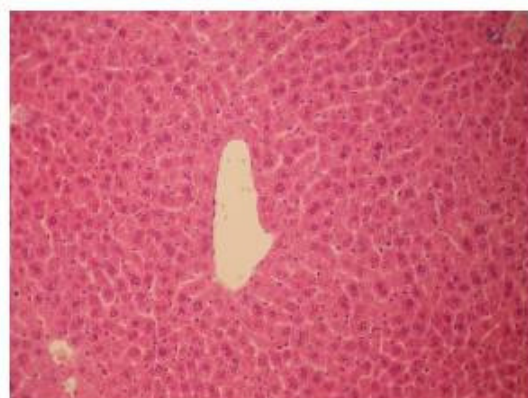
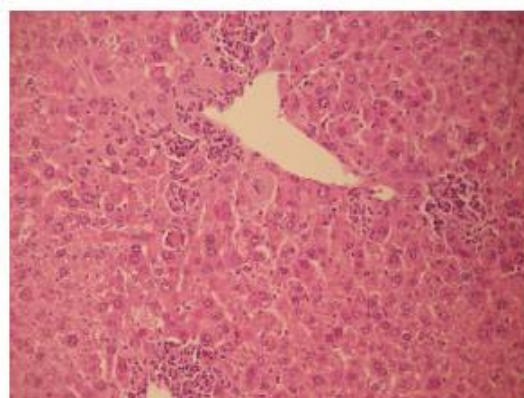


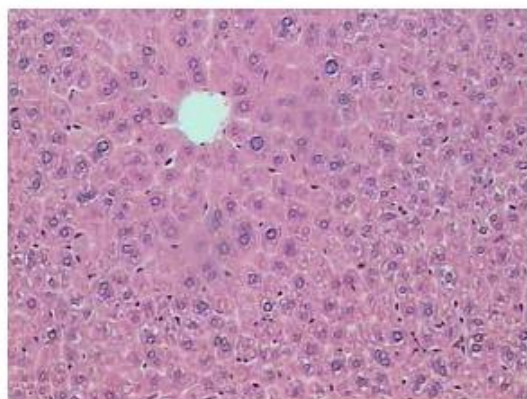
FIGURA 15 - Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol sobre os níveis séricos de ATL e AST na toxicidade aguda induzida por *t*-DCTN. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/mL) de camundongos ($n=8$). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10mg/kg, v.o.) foram administrados 120, 96, 72, 48 e 24 horas antes das dosagens das transaminases. Outro grupo recebeu pré-tratamento por cinco dias consecutivos com 10 mg/kg (v.o.) de *t*-DCTN e 24 h após o último tratamento recebeu uma dose aguda de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^a $p<0,001$ vs controle normal; ^b $p<0,01$ vs controle normal; ^c $p<0,001$ vs *t*-DCTN (100 mg/kg); (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).



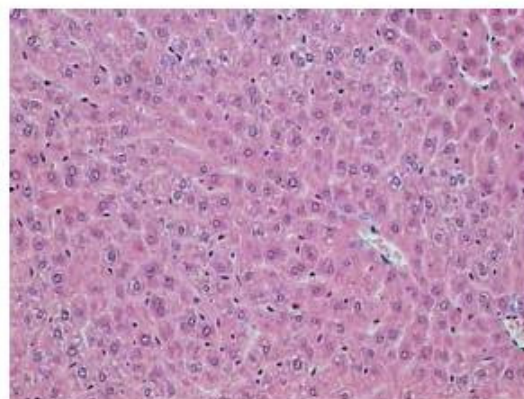
A – Controle Normal



B - *t*-DCTN 100 mg/kg



C – Etanol 1 g/kg (5 dias)



D - Etanol 1 g/kg + *t*-DCTN 100 mg/kg

FIGURA 16 - Microfotografias de fígados de camundongos (H&E 200x) – Efeito do pré-condicionamento com baixas doses de Etanol: (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 – controle normal); (B) animais tratados com *t*-DCTN 100 mg/kg (único tratamento); (C) animais tratados com Etanol 1 g/kg (5 dias de tratamento); (D) animais pré-tratados com Etanol 1 g/kg (5 dias de tratamento) + *t*-DCTN 100 mg/kg (único tratamento).

5.5. Envolvimento do óxido nítrico (NO) no pré-condicionamento hepático da *t*-DCTN e do etanol

A **Tabela 9** mostra que os grupos tratados (*t*-DCTN; L-arginina + *t*-DCTN e D-arginina + *t*-DCTN) aumentaram significativamente ($p < 0,001$) os níveis hepáticos de glutathiona ($2402 \pm 91,15$; $2085 \pm 103,8$ e $2287 \pm 84,68$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparados com o grupo controle normal ($1313 \pm 64,61$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) (**Figura 17**).

Os níveis das aminotransferases séricas ALT e AST aumentaram significativamente ($p < 0,001$) no grupo tratado com *t*-DCTN 100 mg/kg ($241,4 \pm 7,638$ e $108,7 \pm 5,218$ U/mL, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($75,16 \pm 7,638$ e $108,7 \pm 5,218$ U/mL, respectivamente). Este efeito também pode ser observado no grupo tratado com D-arginina + *t*-DCTN ($183,8 \pm 25,56$ e $172,8 \pm 14,21$ U/mL, respectivamente) (**Tabela 10 e Figura 18**).

O pré-tratamento com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) antes da administração de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) os níveis de ALT e AST ($74,81 \pm 10,70$ e $111,9 \pm 7,350$ U/ml, respectivamente) quando comparado com o grupo que recebeu somente *t*-DCTN ($241,4 \pm 7,638$ e $108,7 \pm 5,218$ U/mL, respectivamente).

A análise dos cortes histológicos dos fígados do grupo tratado com *t*-DCTN (100 mg/kg) demonstrou extensas áreas de infiltrado inflamatório e células necróticas. O grupo que recebeu pré-tratamento com D-arginina seguida da administração da *t*-DCTN apresentou perda da arquitetura do tecido hepático com presença de infiltrado de polimorfonucleares (PMN) e necrose. Já os grupos controle normal e L-arginina + *t*-DCTN demonstraram tecido com arquitetura preservada e ausência de foco inflamatório (**Figura 19**).

TABELA 9 - Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis hepáticos de Glutathiona na hepatotoxicidade induzida pela *t*-DCTN em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (µg/g tecido)
Controle normal	---	1313 ± 64,61
<i>t</i> -DCTN	100	2402 ± 91,15 ^a
L-Arginina + <i>t</i> -DCTN	600 + 100	2085 ± 103,8 ^{a,b}
D-Arginina + <i>t</i> -DCTN	400 + 100	2287 ± 84,68 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou D-arginina (400 mg/kg, i.p.) foram administradas 30 min antes da administração da *t*-DCTN. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,05 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

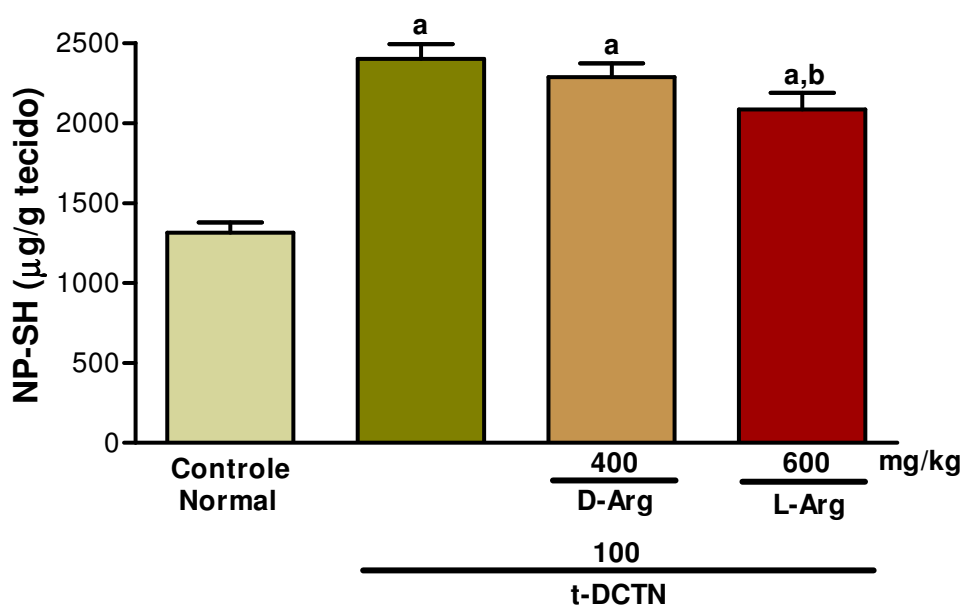


FIGURA 17 - Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis hepáticos de Glutathione na hepatotoxicidade induzida pela *t*-DCTN em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos ($n=8$). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou D-arginina (400 mg/kg, i.p.) foram administradas 30 min antes da administração da *t*-DCTN. ^a $p<0,001$ vs controle normal; ^b $p<0,05$ vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 10 - Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade induzida pela *t*-DCTN em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/ml)	AST (U/ml)
Controle normal	---	75,16 ± 7,638	108,7 ± 5,218
<i>t</i> -DCTN	100	241,4 ± 12,59 ^a	201,9 ± 7,916 ^a
L-Arginina + <i>t</i> -DCTN	600 + 100	74,81 ± 10,70 ^b	111,9 ± 7,350 ^b
D-Arginina + <i>t</i> -DCTN	400 + 100	183,8 ± 25,56 ^a	172,8 ± 14,21 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis séricos de ALT e AST de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou D-arginina (400 mg/kg, i.p.) foram administradas 30 min antes da administração da *t*-DCTN. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

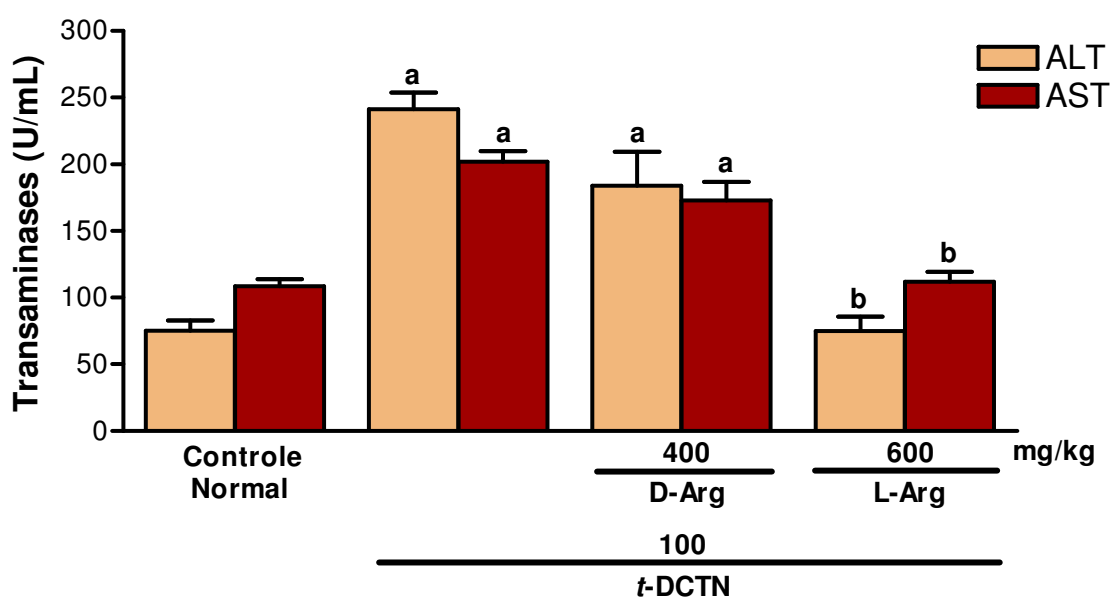
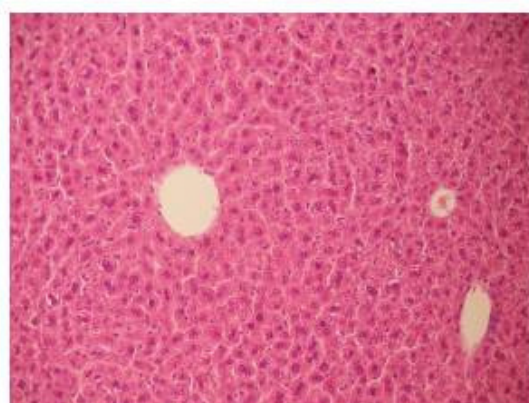
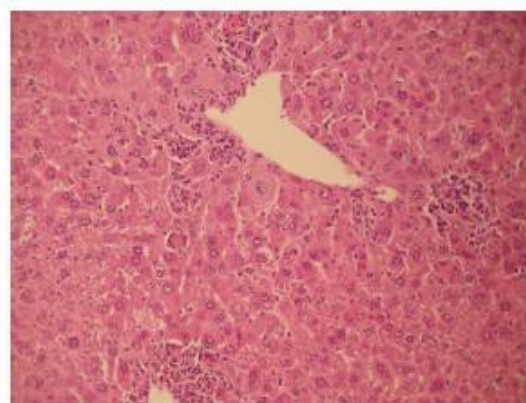


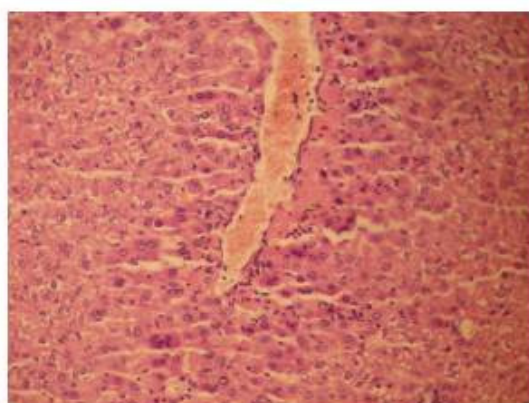
FIGURA 18 - Efeito do Óxido Nítrico (NO) sobre os níveis séricos de ALT e AST na toxicidade induzida pela *t*-DCTN em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/mL) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou D-arginina (400 mg/kg, i.p.) foram administradas 30 min antes da administração da *t*-DCTN. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).



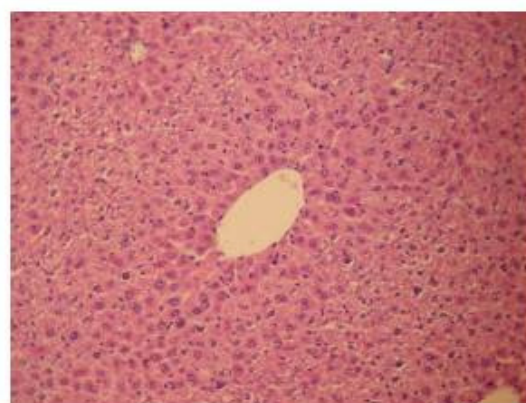
A – Controle Normal



B – t-DCTN 100 mg/kg



C – D-Arginina + t-DCTN



D – L-Arginina + t-DCTN

FIGURA 19 - Microfotografias de fígados de camundongos (H&E 200x) – Envolvimento do Óxido Nítrico no pré-condicionamento com *t*-DCTN e etanol: (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 – controle normal); (B) animais tratados com *t*-DCTN 100 mg/kg; (C) animais tratados com D-Arginina 300 mg/kg + *t*-DCTN 100 mg/kg; (D) animais tratados com L-Arginina 600 mg/kg + *t*-DCTN 100 mg/kg.

5.6. Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) na hepatite tóxica induzida por *t*-DCTN

A **Tabela 11** mostra que os grupos tratados (*t*-DCTN; Vitamina E + *t*-DCTN; NAC + *t*-DCTN e NAC + Vitamina E + *t*-DCTN) aumentaram significativamente ($p < 0,001$) os níveis hepáticos de glutathiona ($2473 \pm 94,05$; $2644 \pm 91,88$; $2298 \pm 84,80$ e $2099 \pm 126,0$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparados com o grupo controle normal ($1409 \pm 82,92$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) (**Figura 20**).

Os níveis das aminotransferases séricas ALT e AST aumentaram significativamente ($p < 0,001$) no grupo tratado com *t*-DCTN 100 mg/kg ($238,2 \pm 12,46$ e $225,5 \pm 22,85$ U/mL, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($67,07 \pm 4,295$ e $122,9 \pm 10,55$ U/mL, respectivamente). Este efeito também pode ser observado no grupo tratado com NAC + *t*-DCTN ($189,5 \pm 19,27$ e $194,7 \pm 17,09$ U/mL, respectivamente) (**Tabela 12 e Figura 21**).

O pré-tratamento com Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) antes da administração de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) os níveis de ALT e AST ($83,20 \pm 10,59$ e $124,9 \pm 7,210$ U/mL, respectivamente) quando comparado com o grupo que recebeu somente *t*-DCTN ($238,2 \pm 12,46$ e $225,5 \pm 22,85$ U/mL, respectivamente). Consistente com o níveis séricos de ALT e AST, o pré-tratamento com vitamina E ($0,063 \pm 0,006$ Abs- 532 nm), mas não com NAC ($0,157 \pm 0,010$ Abs- 532 nm), causou diminuição significativa ($p < 0,001$) na formação hepática de TBARS induzida por *t*-DCTN quando comparado com o grupo que recebeu somente *t*-DCTN ($0,179 \pm 0,015$ Abs- 532 nm) (**Tabela 13 e Figura 22**). O tratamento combinado de vitamina E + NAC embora tenha mostrado ser efetivo, não é aditivo em combater as alterações nos parâmetros bioquímicos induzidos por *t*-DCTN.

A análise dos cortes histológicos dos fígados do grupo tratado com *t*-DCTN (100 mg/kg) demonstrou extensas áreas de infiltrado inflamatório e células necróticas. O grupo que recebeu pré-tratamento somente com N-acetilcisteína seguida da administração da *t*-DCTN apresentou perda da arquitetura do tecido hepático com presença de infiltrado de polimorfonucleares (PMN) e necrose. Já os grupos controle normal, vitamina E + *t*-DCTN e NAC + vitamina E + *t*-DCTN demonstraram tecido com arquitetura preservada e ausência de foco inflamatório (**Figura 23**).

TABELA 11 - Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de Glutationa hepática na toxicidade induzida por *t*-DCTN em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (µg/g tecido)
Controle normal	---	1409 ± 82,92
<i>t</i> -DCTN	100	2473 ± 94,05 ^a
NAC + <i>t</i> -DCTN	150 + 100	2298 ± 84,80 ^a
Vitamina E + <i>t</i> -DCTN	300 + 100	2644 ± 91,88 ^a
NAC + Vitamina E + <i>t</i> -DCTN	150 + 300 + 100	2099 ± 126,0 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathione (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A Vitamina E (300 mg/kg, v.o.), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

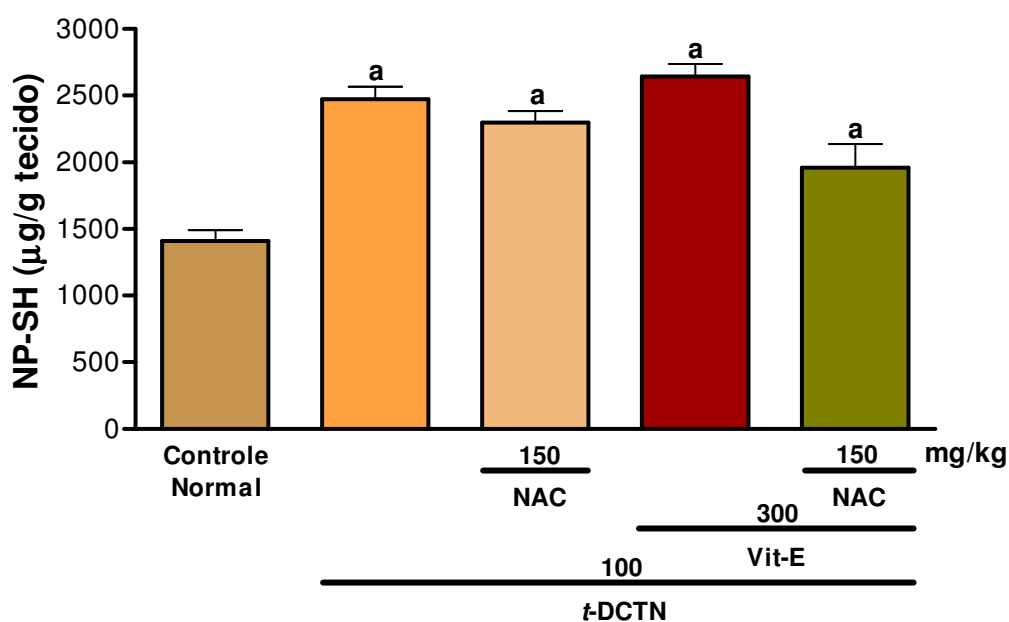


FIGURA 20 - Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de Glutathiona hepática na toxicidade induzida por *t*-DCTN em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A Vitamina E (300 mg/kg, v.o.), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 12 - Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatite tóxica induzida por *t*-DCTN em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/mL)	AST (U/mL)
Controle normal	---	67,07 ± 4,295	122,9 ± 10,55
<i>t</i> -DCTN	100	238,2 ± 12,46 ^a	225,5 ± 22,85 ^a
NAC + <i>t</i> -DCTN	150 + 100	189,5 ± 19,27 ^a	194,7 ± 17,09 ^a
Vitamina E + <i>t</i> -DCTN	300 + 100	83,20 ± 10,59 ^b	124,9 ± 7,210 ^b
NAC + Vitamina E + <i>t</i> -DCTN	150 + 300 + 100	64,30 ± 2,177 ^b	122,1 ± 8,132 ^b

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis séricos de ALT e AST de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A Vitamina E (300 mg/kg, v.o.), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

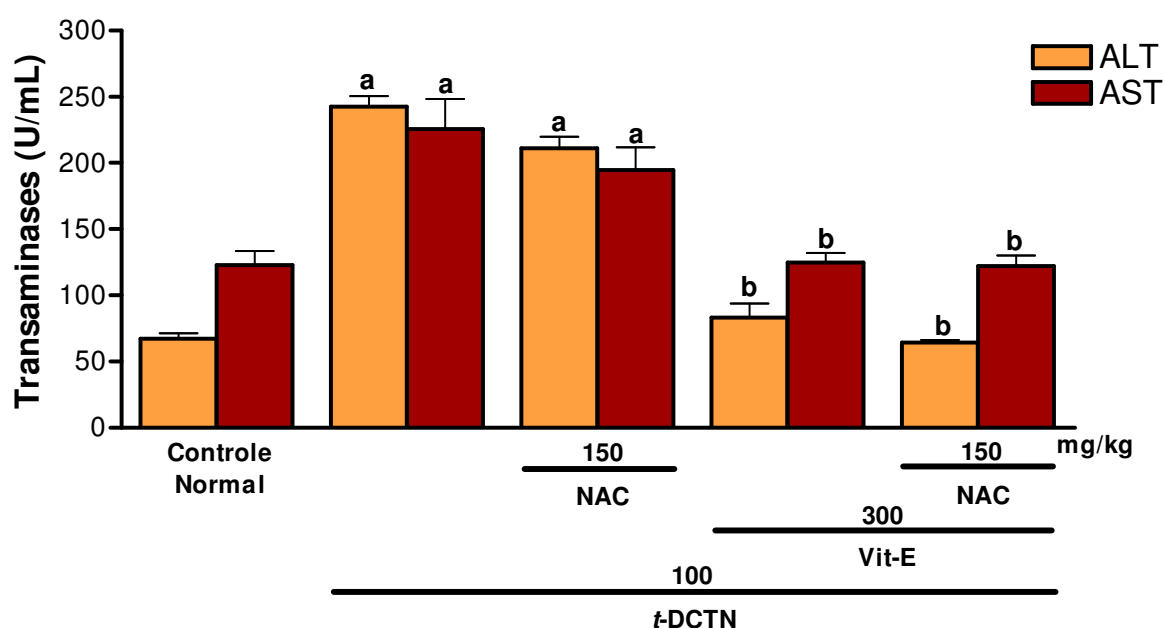


FIGURA 21 - Efeito da Vitamina E e N-Acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatite tóxica induzida por *t*-DCTN em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis séricos de ALT e AST (U/mL) de camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A Vitamina E (300 mg/kg, v.o.), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,05 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

TABELA 13 - Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os níveis hepáticos de TBARS.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	TBARS (Abs – 532 nm)
Controle normal	---	0,035± 0,003
<i>t</i> -DCTN	100	0,179± 0,015 ^a
NAC + <i>t</i> -DCTN	150 + 100	0,157± 0,010 ^a
Vitamina E + <i>t</i> -DCTN	300 + 100	0,063± 0,006 ^c
NAC + Vitamina E + <i>t</i> -DCTN	150 + 300 + 100	0,082 ± 0,004 ^{b,c}

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de TBARS em camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A Vitamina E (300 mg/kg, v.o.), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,01 vs controle normal; ^cp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

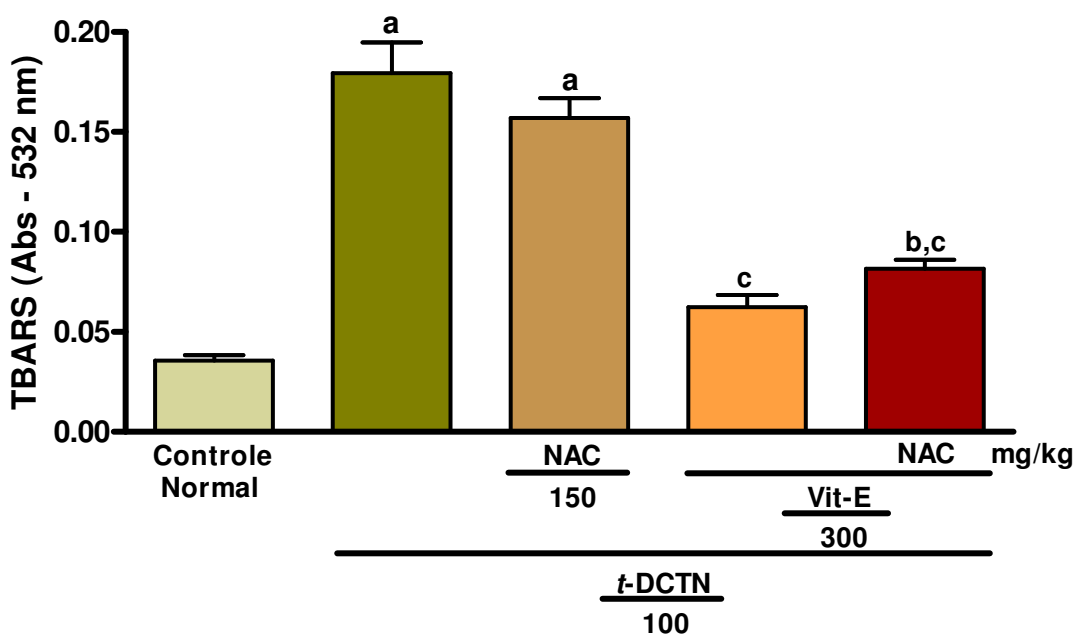
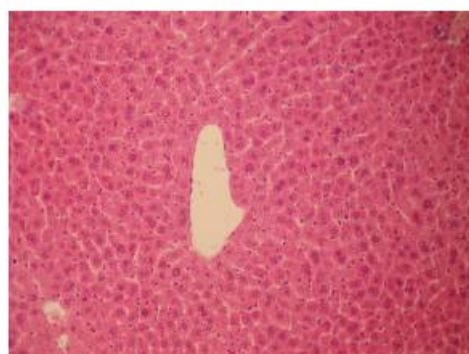
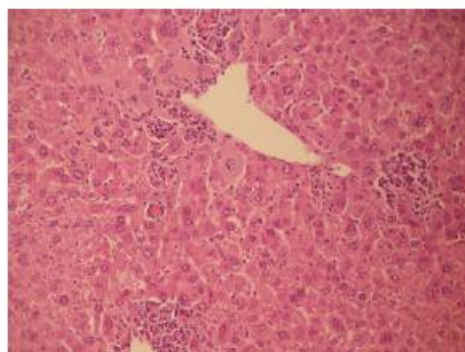


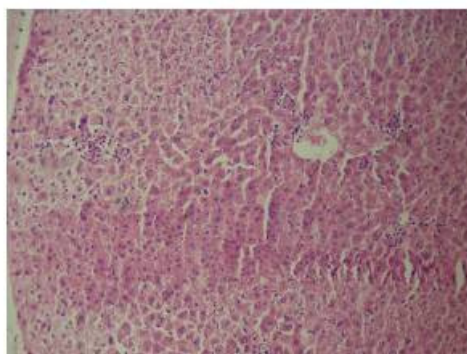
FIGURA 22 - Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os níveis hepáticos de TBARS. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) dos níveis hepáticos de TBARS (Abs – 532 nm) em camundongos (n=8). O veículo (controle normal) e *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) foram administrados 24 horas antes das dosagens. A Vitamina E (300 mg/kg, v.o.), NAC (150 mg/kg, i.p.) ou a combinação de Vitamina E (300 mg/kg, v.o.) e NAC (150 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da administração da *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,01 vs controle normal; ^cp<0,001 vs *t*-DCTN (100 mg/kg) (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).



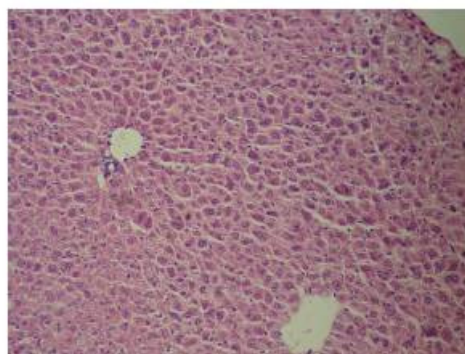
A – Controle Normal



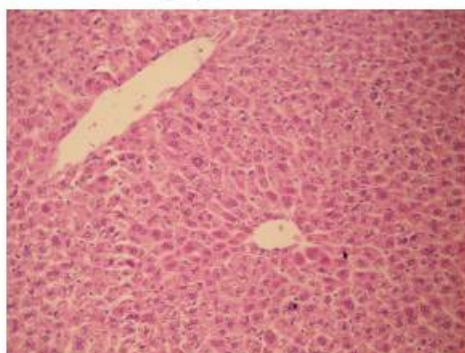
B – *t*-DCTN 100 mg/kg



C – NAC (150 mg/kg) + *t*-DCTN 100 mg/kg



D – Vit-E (300 mg/kg) + *t*-DCTN 100 mg/kg



E – NAC + Vit-E + *t*-DCTN

FIGURA 23 - Microfotografias de fígados de camundongos (H&E 200x) – Efeito da Vitamina E e NAC na hepatite tóxica induzida por *t*-DCTN: (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 – controle normal); (B) animais tratados com *t*-DCTN 100 mg/kg; (C) animais tratados com NAC (150 mg/kg) + *t*-DCTN 100 mg/kg; (D) animais tratados com Vitamina E 300 mg/kg + *t*-DCTN 100 mg/kg; (E) animais pré-tratados com NAC (150 mg/kg) + Vitamina E 300 mg/kg + *t*-DCTN 100 mg/kg.

6. DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (YUNES; CHECHINEL, 2001).

A área da pesquisa farmacêutica e desenvolvimento de novos fármacos demandam custos elevados para a produção de novos medicamentos, em contraste, um número substancial de drogas que alcançam as fases II e III não são utilizados na clínica (DIX, 2004). A avaliação da segurança destes novos fármacos é um ponto de fundamental importância e se realizada satisfatoriamente nos ensaios pré-clínicos, pode melhorar a eficiência e diminuir os custos destas pesquisas (LAPA *et al.*, 2003).

Recentemente, muitas drogas foram retiradas do mercado devido aos ensaios insuficientes de segurança nos estudos pré-clínicos. Podemos citar como exemplos o astigmazol, uma droga antialérgica, associada com aumento da mortalidade em homens e mulheres devido à prolongação do intervalo QT (SCHOUTEN, 1991), a triglitazona pertencente à classe denominada tiazolidinas, efetivo em controlar a glicemia, mas com sérios efeitos hepatotóxicos (ISLEY, 2003), além de provocar edema e insuficiência cardíaca congestiva, particularmente quando combinado com insulina em pacientes portadores de diabetes tipo 2 (DELEA, 2003) e risco de ataque cardíaco, choque e morte em pacientes que fazem uso de agentes antiinflamatórios pertencente a classe de drogas inibidoras de COX-2, como rofecoxib e lumiracoxib (DAVIES; JAMALI, 2004; GOTTLIEB, 2005).

As plantas medicinais são fontes de inúmeras moléculas com potencial terapêutico e por isso merecem destaque neste contexto da segurança, é comum a crença de que por tratar-se de uma substância natural seja desprovida de efeitos colaterais, entretanto há vários relatos na literatura que demonstram o contrário, ou seja, várias espécies podem apresentar efeitos tóxicos dependendo do tempo e da via de administração (RODRIGUES, 2007). Dentre os inúmeros efeitos deletérios a saúde, podemos citar a hepatotoxicidade.

Várias espécies podem produzir danos hepáticos. Segundo Staraski et al.(2006) as drogas e outros agentes químicos contribuem com pelo menos 5% dos casos de icterícia ou hepatite aguda, além de um pequeno número de casos de doenças crônicas do fígado.

Dentre as espécies vegetais que produzem efeitos hepatotóxicos, podemos citar a *Rhamnus purshiana* DC (Casaca sagrada), *Chelidonium majus*, espécies do gênero *Teucrium*, como o *Teucrium polium* (golden germander), o *Teucrium chamaedrys* L (germander) e seu principal constituinte, teucrin, um diterpeno furanoclerodano e o extrato de *Croton cajucara* (sacaca) e seu constituinte bioativo, *t*-DCTN. Estudos mostram que pessoas que fazem uso prolongado dos extratos dessas plantas, no tratamento do diabetes *mellitus* e em dietas de emagrecimento, sofrem de hepatotoxicidade (STARASKI et al., 2006; SOARES, 2004; PITTLER; ERNST, 2003; KOUZI et al., 1994; LEKEHAL et al., 1996).

Existe um grande interesse sobre os prováveis efeitos hepatotóxicos dos extratos de *Croton cajucara* e seu constituinte bioativo, *t*-DCTN. Estudos com pessoas obesas que fazem uso desta planta por longos períodos têm demonstrado que estas pessoas sofrem com hepatite tóxica. Os estudos mostram ainda que a *t*-DCTN é citotóxica para fibroblastos V79 e tóxica para hepatócitos de ratos *in vitro* e que a hepatotoxicidade parece ser uma possível limitação para seu uso clínico (RODRIGUEZ; HAUN, 1999; MELO et al., 2002). Afora estes dados, uma atividade antitumoral de *t*-DCTN também é encontrada na literatura (GRYNBERG et al., 1999; MELO et al., 2004) e Graim et al (2008) demonstraram que o infuso de *Croton cajucara Benth* (sacaca) foi capaz de promover degeneração e necrose hepatocitária, sugerindo uma hepatotoxicidade à sacaca.

O dano hepático induzido por fármacos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá por aumento das aminotransaminases (ALT e AST), ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas (particularmente da direta), da fosfatase alcalina e da gama-glutaril transferase (G-GT). Observa-se que a agressão hepática causada pelos hipolipemiantes é principalmente do tipo hepatocelular, levando, portanto, ao aumento de ALT e/ou AST. Geralmente esse aumento é assintomático, transitório e cessa após a descontinuação do medicamento (RUSSO; JACOBSON, 2002).

No presente estudo, a administração de doses mais elevadas de *t*-DCTN (100 e 300 mg/kg) aumentou significativamente os níveis séricos das aminotransferases (ALT e AST)

demonstrando um efeito hepatotóxico da *t*-DCTN. Em contraste, a administração em doses menores (10 e 30 mg/kg) não causou nenhum aumento nestas enzimas, mesmo quando administradas repetidamente por 5 dias consecutivos, sugerindo que a hepatotoxicidade da *t*-DCTN é dose-dependente.

Este efeito tóxico da *t*-DCTN (nas doses de 100 e 300 mg/kg) sobre os hepatócitos foi confirmado com a análise histológica dos fígados dos camundongos tratados, onde foi verificada necrose multifocal, degeneração hidrópica e infiltrações de células inflamatórias tanto mononucleares como polimorfonucleares.

Muitos dos hipolipemiantes empregados no dia a dia têm potencial hepatotóxico. Assim, as estatinas, os fibratos, a niacina e as resinas podem produzir alterações hepáticas (BERTOLAMI, 2005).

No caso das substâncias hipolipemiantes, pouco ainda é conhecido sobre quais os mecanismos que podem estar envolvidos quando eles determinam hepatotoxicidade. Acredita-se que, na maioria das vezes em que a agressão hepática ocorre, existe a participação de mais de um mecanismo. Entre eles o mais importante é o estresse oxidativo ocasionado pela agressão dos fármacos às mitocôndrias, seja por inativação ou ligação a enzimas respiratórias ou ao DNA mitocondrial, desregulando a oxidação dos ácidos graxos e a produção de energia celular. Isto resulta no aparecimento de metabolismo anaeróbico, acidose láctica e acúmulo de triglicérides nas células (esteatohepatite) (LEE, 2002; JAESCHKE *et al.*, 2002).

Qualquer tipo de lesão hepática pode causar elevações significativas nas concentrações de aminotransferases AST e ALT (PRATT, 2002). A lesão hepática aguda pode ser de origem citotóxica ou colestática. A lesão citotóxica assemelha-se à hepatite aguda e é caracterizada por lesão dos hepatócitos com proeminentes elevações das aminotransferases (PIÑEIRO-CARRERO; PIÑEIRO, 2004).

Logo, as aminotransferases (AST e ALT) são indicadores sensíveis de lesão hepática e constituem ferramentas úteis no reconhecimento de doenças hepatocelulares agudas, como é o caso da hepatite tóxica. A AST é encontrada no fígado, miocárdio, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos, em ordem decrescente de concentração. A ALT é encontrada principalmente no fígado. As aminotransferases estão normalmente

presentes no soro em baixas concentrações e são liberadas do fígado em maiores quantidades quando há lesão da membrana celular do hepatócito, resultando em permeabilidade aumentada (PIÑEIRO-CARRERO; PIÑEIRO, 2004; PROVAN; KRENTZ, 2002).

Tendo em vista que muitas atividades da *t*-DCTN já foram comprovadas, correlacionando este diterpeno com os efeitos benéficos da sacaca como antiinflamatório, gastroprotetor, hipoglicêmico e hipolipidêmico, buscamos estabelecer estratégias farmacológicas com o intuito de amenizar os efeitos hepatotóxicos da exposição prolongada a altas doses da *t*-DCTN. Desta forma, neste estudo investigamos os efeitos do pré-condicionamento com baixas doses da *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o., por 5 dias consecutivos) ou etanol (1 g/kg, v.o., por 5 dias consecutivos) na prevenção da hepatotoxicidade induzida por alta dose de *t*-DCTN (100 mg/kg, v.o.) em camundongos.

Comumente, em toxicologia, quando se compara os efeitos tóxicos e benéficos de substâncias utilizando-se baixas doses, entra em pauta o conceito de “hormesis”. Hormesis tem sido definida como um fenômeno de dose-resposta caracterizado por respostas estimulatórias quando se utiliza baixas doses e uma resposta inibitória com o uso de altas doses. Este fenômeno parece ser uma resposta primária adaptativa ao estresse, que desencadeia reparo celular e sistemas de manutenção (CALABRESE; BALDWIN, 2003; CALABRESI, 2004).

Um exemplo de um efeito adverso que é necessário para a indução de um efeito benéfico é consumo de ácidos graxos poliinsaturados. Dietas com altos níveis desses ácidos conhecidos protegem contra lesões neoplásicas nos estágios iniciais da carcinogênese de cólon induzida quimicamente (DOMMELS *et al.*, 2003).

O condicionamento isquêmico ou farmacológico é uma ferramenta que pode ser utilizada em toxicologia clínica e experimental para avaliar o potencial terapêutico e tóxico de substâncias em estudo. A utilização prévia de drogas com o intuito de gerar possíveis efeitos protetores é relativamente recente em farmacologia, porém de valor significativo em ambiente pré-clínico.

Um exemplo de condicionamento farmacológico foi demonstrado por Xu *et al* (2006) que comprovaram o efeito protetor da concanavalina A quando utilizada em baixas

doses em modelo de condicionamento em camundongos. É sabido que a dose de 3 µg/g de concanavalina A não causa efeitos tóxicos. Por outro lado, a dose de 15 µg/g demonstra severa infiltração de células inflamatórias, macrófagos, células T, aumento das transaminases e citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-12 e TNF-α). O pré-tratamento dos camundongos com a dose de 3 µg/g 12 horas antes da dose de 15 µg/g provocou diminuição sérica de citocinas e transaminases e redução da necrose hepática induzida por concanavalina A.

Alguns trabalhos demonstram um efeito protetor do condicionamento isquêmico (PI) em modelo de isquemia e reperfusão (I/R) em fígado de suínos. Shimoda *et al* (2007) mostraram que animais que passavam por episódios de 10 min de isquemia e 10 min de reperfusão seguidos por um período maior de I/R (15 min/5min, respectivamente) apresentaram prevenção dos danos hepáticos (diminuição de necrose, diminuição dos níveis de AST, TNF-α e NO₂⁻/NO₃⁻). Tais resultados sugerem que o PI tem um potencial clínico no curso pós-operatório de paciente que passam por hepatectomia (SHIMODA, *et al.* 2007).

Os resultados do presente estudo mostraram que o pré-tratamento por cinco dias com pequenas doses de *t*-DCTN (10 mg/kg) ou Etanol (1 g/kg) foi capaz de promover um pré-condicionamento nos animais expostos a altas doses da *t*-DCTN. Isto foi verificado pela diminuição significativa dos níveis séricos de ALT e AST, quando comparado com o grupo tratado somente com *t*-DCTN (100 mg/kg). Corroborando com estes resultados, a análise histológica do tecido hepático mostrou uma diminuição evidente no infiltrado inflamatório e na área necrosada, indicando que o pré-condicionamento farmacológico com pequenas doses de *t*-DCTN ou Etanol é uma estratégia útil na prevenção da hepatotoxicidade associada a altas doses de *t*-DCTN.

Porém, os mecanismos por trás desta proteção não foram esclarecidos. Estudos anteriores indicaram que a indução da heme oxigenase-1 (HO-1) tem um papel protetor contra o dano hepático por isquemia-reperfusão e sugerem que o condicionamento com doxorubicina ou sinvastatina pode ser clinicamente útil (ITO *et al.*, 2000; LAI *et al.*, 2008). HO-1 é a enzima que controla a taxa de biossíntese e degradação da heme e, em um estudo bastante recente, não foi observada mudança alguma no nível da HO-1 no tecido hepático de ratos alimentados com etanol (ZHENG *et al.*, 2008). Por esta razão, não fizemos nenhuma tentativa para analisar o papel da HO-1 na hepatoproteção oferecida pelo condicionamento com etanol.

A administração de etanol em baixa concentração (200 mL/L) foi demonstrada por oferecer gastroproteção adaptável em ratos contra o dano gástrico induzido por uma concentração mais alta (800 mL/L), que poderia ser atenuado através da administração de NG-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), um inibidor da NO sintase (NOS) (KO *et al.*, 2004). Por analogia, nós verificamos no presente estudo se uma baixa dose de etanol (1 g/kg) ou *t*-DCTN (10 mg/kg) poderia amenizar o dano hepático associado a altas doses de *t*-DCTN (100 mg/kg). Os resultados demonstraram uma evidente hepatoproteção pela administração de baixas doses de etanol ou *t*-DCTN.

Na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido no pré-condicionamento com *t*-DCTN ou Etanol foi avaliado o papel do NO (óxido nítrico) nesta hepatoproteção. Assim, os animais foram pré-tratados com L-arginina ou D-arginina antes da indução da hepatite tóxica pela *t*-DCTN (100 mg/kg).

A L-arginina é o aminoácido precursor essencial na produção do NO. A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidinos da L-arginina, que é convertida em L-citrulina pela enzima NO-sintase (NOS) (MARLETA, 1993; MONCADA *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos mostraram que a suplementação com L-arginina foi capaz de prevenir os efeitos hepatotóxicos de *t*-DCTN, que se deve parcialmente à produção de NO e ao aumento da microcirculação. No entanto, o mesmo não pode ser verificado com a suplementação com D-arginina, já que a forma dextrógira da arginina não tem efeito na produção de NO.

A presença de NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto o NO em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são altamente citotóxicos (WALLACE; MILLER *et al.*, 2000; JOSHI *et al.*, 1999). Este achado, adicionado aos nossos resultados, pode explicar em parte o efeito hepatoprotetor de baixas doses da *t*-DCTN ou etanol, e o efeito hepatotóxico destes, quando administrados em doses mais altas, sugerindo o envolvimento do NO neste efeito. Porém, outros estudos são necessários para estabelecer o mecanismo molecular da suplementação de L-arginina no dano hepático induzido por *t*-DCTN.

Os dados obtidos neste estudo claramente mostram o potencial hepatotóxico da *t*-DCTN como comprovado pela elevada atividade das transaminases AST e ALT no soro e observações histológicas que fortalecem os resultados encontrados. Estes resultados confirmam estudos anteriormente relatados em relação a sua alta-dose associada ao dano hepático (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Porém, seu mecanismo de ação tóxica permanece inexplicado.

Alguns dos derivados de plantas ou compostos sintéticos podem induzir hepatotoxicidade agindo como pró-oxidantes. A atividade pró-oxidante pode ser um fator contribuinte para a hepatotoxicidade de agentes hipoglicemiantes como troglitazona (TAFAZOLI *et al.*, 2005).

Alterações das funções hepáticas e renais em decorrência da ação tóxica de xenobióticos podem estar associadas à lipoperoxidação tecidual (WEIJL *et al.*, 1997; NAZIROGLU *et al.*, 2004). A peroxidação lipídica interfere nas funções biológicas, por provocar alterações em organelas celulares, incluindo os peroxissomas (DE DUVE, 1969), lisossomas (DE DUVE; WATTIAUX, 1966), retículo endoplasmático (WILLS, 1971), e mitocôndrias (NOHL; HEGNER, 1978). Hemoproteínas e complexos não heme de ferro, cobre e manganês são constituintes das membranas celulares que podem formar radicais livres provocando oxidação de ácidos graxos, mudanças na fluidez e permeabilidade da membrana, resultando em alterações celulares (MIQUEI, 1989).

A formação de radicais reativos de oxigênio é causa mais provável da hepatotoxicidade de fármacos. A remoção ineficaz dos radicais livres formados durante o estresse oxidativo pode alterar a composição lipídica das membranas celulares *via* peroxidação lipídica e induzir depleção de antioxidantes celulares que resultam em danos a membranas hepáticas e outras células (CONKLIN, 2004).

Os fosfolipídios de membrana estão entre as moléculas orgânicas mais instáveis, devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (VLADIMIROV *et al.*, 1981). A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados resulta na formação de radicais peroxil e alcóxil. Estes produtos primários da peroxidação lipídica, que são altamente reativos e tem curta duração, sofrem reações formando produtos secundários da peroxidação lipídica que incluem uma variedade de aldeídos, como malondialdeído (MDA), 4-HNE (4-hidroxinonenal)

e acroleína. Os aldeídos são mais estáveis do que os produtos primários e podem se difundir através da célula, lesando os componentes da membrana e interferindo nas funções celulares. Devido às suas características eletrofílicas, os aldeídos se ligam aos grupos nucleofílicos dos aminoácidos como cisteína, lisina, histidina, serina e tirosina, os quais são componentes críticos dos sítios ativos de enzimas ou são necessários para a manutenção da estrutura terciária das proteínas. A ligação destes aldeídos a proteínas resulta na inibição enzimática e na alteração da estrutura dos receptores celulares, constituindo um evento chave da citotoxicidade de hepatotóxicos (CONKLIN, 2004).

Proteínas com grupamentos sulfidrílicos são muito sensíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio e parte dos grupos sulfidrílicos são oxidados na presença das espécies reativas de oxigênio. A modificação da estrutura dessas proteínas pelo estresse oxidativo geralmente é acompanhada do enfraquecimento de várias funções mitocondriais e quebra da homeostase intracelular do cálcio. Esses grupamentos são importantes para a atividade biológica de muitas enzimas, entre elas as ATPases e desempenham importante função na transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), responsável por disfunção mitocondrial irreversível.

A resposta ao estresse oxidativo pode ser descrita como o fenômeno pelo qual a célula responde a alterações no seu estado redox. Por estarem continuamente expostos a espécies reativas de oxigênio (EROs), os organismos diversos, desde bactérias a humanos têm desenvolvido mecanismos de manutenção da homeostase redox celular (RODRIGUES-POUSADA, *et al.*, 2005). O conjunto de defesas mitocondriais contra o estresse oxidativo inclui moléculas antioxidantes de baixo peso molecular e enzimas como: GSH, NADPH, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GRd), além das vitaminas C e E (LIU; KEHRER, 1996).

Normalmente, o ânion superóxido (O_2^-) é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é reduzido a H_2O pela glutatona peroxidase, consumindo glutatona reduzida (GSH), a qual é mantida neste estado pela glutatona redutase, que utiliza NADPH (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; SHAN; AW; JONES, 1990).

A glutathione é um tripeptídeo que contém um grupamento sulfidrílico capaz de ligar-se a compostos eletrofílicos diretamente ou através de reações catalisadas pela glutathione transferase produzindo conjugados com o ácido mercaptúrico. A glutathione também pode servir de substrato na eliminação de peróxidos resultantes da dismutação do radical superóxido, reação catalisada pelas diferentes formas da glutathione peroxidase (GOLDSTEIN; SCHELLMANN, 1994).

A NADPH é considerada uma fonte primária de equivalentes redutores para o sistema glutathione. Em muitos tecidos animais, a NADPH necessária para que ocorra a redução da GSSG é fornecida pela via das pentoses-fosfato, pela oxidação do malato em piruvato, por atividade da enzima extramitocondrial malato desidrogenase, ou pela conversão do isocitrato em α -cetoglutarato, através da ação da isocitrato desidrogenase citoplasmática (SCHAFER; BUETTNER, 2001). Logo, a NADPH é um constituinte fundamental do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, e um estresse oxidativo prolongado pode levar à produção e ao consumo permanente de NADPH, resultando em consequências incompatíveis com a sobrevivência da célula (MOTA *et al.*, 2004).

t-DCTN e seus metabólitos podem alterar o equilíbrio redox para um estado mais oxidado no fígado, no qual age de forma pró-oxidante, reduzindo as defesas antioxidantes das células e criando um estresse oxidativo, um processo danoso que pode ser um importante mediador do dano da estrutura celular, inclusive lipídios, membranas, proteínas e DNA (VALKO *et al.*, 2007). Os antioxidantes interagem com os radicais livres, neutralizando-os, protegendo o corpo contra os efeitos destrutivos destes radicais e prevenindo o dano celular (FLORA, 2007). Então, uma combinação com propriedades antioxidantes pode terapeuticamente melhorar a progressão da peroxidação lipídica e o dano hepatocelular induzidos por hepatotóxicos.

Vitamina E e N-acetilcisteína (NAC) são antioxidantes clinicamente úteis que protegem o corpo contra estresse oxidativo. É sabido que a deficiência de vitamina E aumenta a peroxidação lipídica no tecido hepático e sua suplementação altera a oxidação lipídica *in vivo* (DUTHIE *et al.*, 2005). GSH faz um papel importante aliviando o dano tissular induzido pela formação de radicais livres (HUSAIN *et al.*, 2001; MOLINA *et al.*, 2003) e sua deficiência está associada com numerosas condições patológicas.

A administração de NAC, um precursor da cisteína, aumenta os níveis intracelulares de GSH. NAC, melhor conhecido por sua utilização em estudos da toxicidade do acetaminofeno, é um seguro e bem-tolerado antídoto para deficiência de cisteína/GSH (ATKURI *et al.*, 2007). Também estudos sugerem uma interação entre GSH e vitamina E protegendo contra peroxidação lipídica (MILCHAK; DOUGLAS BRICKER, 2002). Assim, este estudo investigou os efeitos do pré-tratamento com vitamina E e NAC no dano hepático associado a uma alta-dose (100 mg/kg) de *t*-DCTN, através da análise da glutathiona e TBARS hepáticos e transaminases séricas (AST e ALT), e usando uma aproximação histológica.

A administração de *t*-DCTN (100 mg/kg) aumentou significativamente a GSH hepática e os níveis séricos de AST e ALT, e quando foram co-administrados NAC e *t*-DCTN, as atividades de AST e ALT não foram significativamente diferentes dos valores obtidos só com *t*-DCTN. Recentemente, foram relacionados mecanismos potenciais que estão por trás da hepatotoxicidade de pironas de kava e diterpenóides de germander para a depleção intracelular de glutathiona e/ou formação de quinona. (ZHOU *et al.*, 2007; LÜDE *et al.*, 2008). Como o germander, a sacaca (*Croton cajucara*) também é usada tradicionalmente como um adjuvante a suplementos dietéticos emagrecedores. De forma interessante, ao contrário de germander, *t*-DCTN aumenta a glutathiona celular possivelmente devido a uma resposta ao estresse oxidativo.

O tratamento com *t*-DCTN comprovou alterações morfológicas na histologia do fígado. Os animais do grupo controle não mostraram nenhuma anormalidade na citoarquitetura do parênquima hepático. A co-administração de NAC com *t*-DCTN mostrou nenhum sinal de alteração e o padrão morfológico foi semelhante ao grupo tratado somente com *t*-DCTN. Análises bioquímicas e histológicas mostram que o tratamento com NAC não melhora o efeito hepatotóxico da *t*-DCTN. Em contraste, a hepatotoxicidade de *t*-DCTN é significativamente reduzida através do tratamento com vitamina E, como comprovada pela diminuição dos níveis séricos de ALT e AST, de TBARS hepático e redução da gravidade das alterações histológicas, sugerindo que a vitamina E combate o estresse oxidativo (BANSAL *et al.*, 2005; ARAKAWA; ITO, 2007).

A redução, mediada pela vitamina E, nos níveis de AST, ALT e TBARS para os valores normais respectivos pode ser uma indicação de estabilização da membrana plasmática, assim como, de reparo do dano ao tecido hepático causado pela *t*-DCTN. Os

resultados encontrados estão de acordo com os estudos de Gokcimen *et al.* (2007) nos quais relataram danos hepatocelulares que poderiam ser protegidos eficazmente através da administração de vitamina E, mas não de NAC.

A medida de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é usada para avaliar a lipoperoxidação, ou seja, quando os lipídios sofrem ação dos radicais livres. TBARS reflete a quantidade de malonaldeído (MDA) formado, um produto final da peroxidação dos ácidos graxos da membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

Logo, a investigação presente mostrou que uma dose alta de *t*-DCTN pode aumentar o estresse oxidativo, como comprovado por um aumento nas atividades de ALT e AST e formação aumentada de TBARS no fígado, uma indicação de peroxidação lipídica. O aumento na GSH hepático poderia ser uma causa de defesa do hospedeiro contra o estresse oxidativo contínuo. Desde que vitamina E protegeu fígado contra a peroxidação lipídica e restabeleceu o TBARS, AST e ALT para níveis quase normais, a peroxidação lipídica pode ser a causa principal do dano hepatocelular em camundongos tratados com *t*-DCTN. A vitamina E pode ser usada como medida profilática para combater o dano hepático associado com o uso de alta dose de *t*-DCTN.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A *trans*-desidrocrotonina apresentou toxicidade hepática quando administrada em altas doses (100 e 300 mg/kg, v.o.), demonstrada por um aumento nas atividades de ALT e AST e nas lesões hepáticas.
- ✓ Doses menores de *t*-DCTN (10 e 30 mg/kg, v.o.) não elevaram os níveis das transaminases séricas, mesmo quando administradas sucessivamente, evidenciando que a toxicidade hepática associada a *t*-DCTN é dependente da dose.
- ✓ O pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN (10 mg/kg, v.o.) ou etanol (1g/kg, v.o.) foi capaz de prevenir contra a hepatite tóxica induzida por altas doses de *t*-DCTN. Isto foi confirmado pela diminuição nos níveis das transaminases (ALT e AST) e nas lesões do fígado observadas histologicamente.
- ✓ A L-arginina, um aminoácido essencial na produção de NO, foi capaz de amenizar os efeitos tóxicos induzidos por *t*-DCTN, possivelmente devido a um aumento na microcirculação hepática, porém outros estudos são necessários para estabelecer o mecanismo molecular da suplementação com L-arginina na lesão hepática.
- ✓ A toxicidade de uma alta dose de *t*-DCTN provavelmente está relacionada a um estresse oxidativo, como comprovado por um aumento nas atividades de ALT e AST e formação aumentada de TBARS no fígado, uma indicação de peroxidação lipídica. A vitamina E, um antioxidante lipossolúvel, restabeleceu o TBARS, AST e ALT para níveis quase normais, sugerindo que a peroxidação lipídica pode ser a causa principal do dano hepatocelular em camundongos tratados com *t*-DCTN.
- ✓ A suplementação com vitamina E ou o pré-condicionamento com baixas doses de *t*-DCTN ou de etanol poderiam ser uma medida profilática útil para combater a hepatotoxicidade associada a altas doses de *t*-DCTN.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. S.; BARBOSA, O. S.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v. 1, p. 1-9, 2001. Disponível em: <http://www2.ufpa.br/rcientifica/ed_anteriores/pdf/ed_02_asa.pdf>. Acesso em: 23 set. 2008.

ACERET, T.L.; BROWN, L.; MILLER, J.; COLL, J.C.; SAMMARCO, P.W. Cardiac and vascular responses of isolated rat tissues treated with diterpenes from *Sinularia flexibilis* (coelenterata: octocorallia). **Toxicol.**, v. 34, p. 1165-1171, 1996.

ADOLF, W.; DOSSAJI, S.F.; SLIP, E.H.; HECKER, E. Skin irritant diterpene orthoesters of the daphname type from *Peddiea africana* and *P. Volkensii*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2047-2049, 1985.

AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in brain stem of rat. **Neuroreport.**, v. 10, n. 8, p. 1799-1801, 1999.

AGNER, A.R.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; CÓLUS, I.M.S. Antigenotoxicity of *trans*-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 67, n. 9, p. 815-819, 2005.

AGNER, A.R.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; PAMPLONA, S.G.; COLUS, I.M. Investigation of genotoxic activity of *trans*-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v. 19, n. 6, p. 377-384, 1999.

ALBINO DE ALMEIDA, A.B.; MELO, P.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; CARLI, L.; NUNES, D.S.; HAUN, M.; SOUZA BRITO, A.R. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 472, n. 3, p. 205-212, 2003.

ALMEIDA, A.B.A.; MELO, O.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; CARLI, L.; NUNES, D.S. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 472, n. 3, p. 205-212, 2003.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology.**, v. 188, n. 2/3, p. 261-274, 2003.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. **Toxicology.**, v. 203, n. 1/3, p. 123-137, 2004.

ANDERSEN, N.R.; LORCK, H.O.B.; RASMUSSEN, P.R. Fermentation, isolation and characterization of antibiotic PR-1350. **J. Antibiot.**, v. 36, p. 753-760, 1983.

APPENDINO, G.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; CAMPAGNUOLO, C.; FATTORUSSO, E.; PETRUCCI, F.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Minor diterpenoids from cascarilla (*Croton eluteria* Bennet) and evaluation of the cascarilla extract and cascarilla effects on gastric acid secretion. **Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 24, p. 6970-6974, 2003.

ARAÚJO, V. C.; CORRÊA, G. C.; MAIA, J. M. S.; MARX, M.C.; MAGALHÃES, M. T.; SILVA, M. L.; GOTTLIEB, O. R. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazônica**, v. 1, n. 3, p. 45-47, 1971.

ATKURI, K.R., MANTOVANI, J.J., HERZENBERG, L.A., HERZENBERG, L.A. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.7, n. 4, p. 355-359, 2007.

BALUNAS, M.J.; KINCHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANSAL, A.K., BANSAL, M., SONI, G., BHATNAGAR, D. Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. **Chem. Biol. Interact.** v. 156, p. 101-111, 2005.

BARONE, M, AZZARONE, A, ANGELINI, A, ZAMPARELLA, M, DELLAQUILA, P, FRANCAVILLA, A. Effect of epomediol on taurocholate uptake in hepatocytes isolated from normal rats or rats with ethinyloestradiol-induced cholestasis. **Pharmacol. Toxicol.** v. 72, n. 4/5, p. 296-299, Apr./May 1983.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; ARAÚJO JÚNIOR, J.X. Uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004. p. 147-210.

BARTON, D.H.R.; ELAD, D.J. Colombo root bitter principles. 1. The functional groups of columbin. **J. Chem. Soc.**, p.2085-2090, 1956.

BAZAN, E.; CAMPBELL, A.K.; RAPOPORT, R.M. Effects of protein kinase C activation on norepinephrine-induced phosphatidylinositide hydrolysis in intact rat aorta. **Eur. J. pharmacol.**, v.245, n.2, p.173-177, 1993.

BELLOMO, G.; JEWELL, S.A.; THOR, H.; ORRENIUS, S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.79, p.6842-6846, 1982.

BENZI, G.; MORETTI, A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. **Free Rad. Biol. Med.**, Tarrytown, v.19, p.77-101, 1995.

BERTOLAMI, M.C. Mecanismos de Hepatotoxicidade. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 85, suppl.5, p. 25-27, out. 2005.

BIGHETTI, E.J.B.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; BRITO, A.R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 51, n. 12, p. 1447-1453, 1999.

BIGHETTI, E.J.B.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; FARIA, E.C.; OLIVEIRA, H.C.F. Chronic treatment with bark infusion from *Croton cajucara* lowers plasma triglyceride levels in genetic hyperlipidemic mice. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 82, p. 387-392, 2004.

BRAQUET, P. **Ginkgolides**: chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives. Barcelona: J.R.Prous, 1988.

BRITO, A.R.; RODRIGUEZ, J.A.; HIRUMA-LIMA, C.A.; HAUN, M.; NUES, D.S. Antiulcerogenic activity of *trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v.64, p.126-129, 1998.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, n. 4649, p. 569-573, May 1984.

CALABRESE, E.J., AND BALDWIN, L.A. Hormesis: the dose-response revolution. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 43, p. 175-197, 2003.

CALABRESE, E.J. Hormesis: From marginalization to mainstream. A case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 197, p. 125-136; 2004.

CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin Emerg. Drugs*, v.6, p. 261-279, 2001.

CAMPOS, A.R.; ALBUQUERQUE, F.A.; RAO, V.S.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**. v. 73, n. 2, p. 116-120, 2002.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBBELLO, O.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v. 71, p. 58-65, 2000.

CARDOSO, S.L. Photophysics of carotenoids and the antioxidant role of b-carotene. **Quim. Nova**, v. 20, n. 5, p. 535-540, 1997.

CARVALHO, J.C.; SILVA, M.F.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; NUNES, D.S.; LIMA, R.M.; BASTOS, J.K.; SARTI, S.J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Med.**, V.62, p.402-404, 1996.

CAVALCANTE, F.L.M. *In*: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambu, Brasil, 1998.

CHITTURI, S.; GEORGE, J. Hepatotoxicity of Commonly Used Drugs: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Antihypertensives, Antidiabetic Agents, Anticonvulsivants, Lipid-Lowering Agents, Psychotropic Drugs. **Semin. Liver Dis.**, v. 22, p. 169-183, 2002.

CHUANG, D.M. Neurotransmitter receptors and phosphoinositide turnover. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.29, p.71-110, 1989.

CLUXTON, R.J.J.R.; LI, Z.; HEATON, P.C.; WEISS, S.R.; ZUCKERMAN, I.H.; MOOMAW, C.J.; HSU, V.D.; RODRIGUEZ, E.M. Impact of regulatory labeling for triglitazone and rosiglitazone on hepatic enzyme monitoring compliance: findings from the state of Ohio Medicaid program. **Pharmacoeconomics Drug Saf.**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2005.

CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integr. Cancer Ther.**, v.3, n.4, p.294-300, Dec. 2004.

CORRÊA, D.H.A.; MELO, P.S.; CARVALHO, C.A.A.; AZEVEDO, M.B.M.; DURAN, N.; HAUN, M. Dehydrocrotonin and its beta-cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 510, n. 1/2, p. 17-24, Mar. 2005.

CRAWFORD, J.M. O fígado e o trato biliar. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.). **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 759-808.

DA SILVA MELO, P.; DURAN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and Escherichia coli. **Toxicology**, v. 59, n. 3, p. 135-141, 2001.

DALY, J.W.; PADGETT, W.; SEAMON, K.B. Activation of cyclic AMP-generating systems in brain membranes and slices by the diterpene forskolin: augmentation of receptor-mediated responses. **J. Neurochem.**, v. 38, n. 2, p.532-544, 1982.

DAVIES, N.M.; JAMALI, F. COX-2 selective inhibitors: cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. **J. Pharma Sci.**, v. 7, n. 3, p. 332-336, 2004.

DE DUVE, C.H. The peroxysome: a new cytoplasmic organelle. **Proc. R. Soc. London. Ser. B**, London, v. 173, p. 710-723, 1969.

DE DUVE, C.H.; WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 28, p. 435-452, 1966.

DELEA, T.E.; EDELSBERG, J.S.; HAGIWARA, M. Use of thiazolidinediones and risk of heart failure in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. **Diabetes Care**, v. 26, p. 2983-2989, 2003.

DEMETZOS, C.; DIMAS, K.; HATZIANTONIOU, S.; ANASTASAKI, T.; ANGELOPOULOU, D. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. **Planta Med.**, v. 67, n. 7, p. 614-618, Oct. 2001.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1996.

DI STASI, L. C.; HIRUIMA, C. A.; SANTOS, E. M. G.; et al. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, n.6, p. 529-540, 1994.

DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M.; HIRUIMA, C. A. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Ed. UNIESP, p. 127-128, 1989.

DIX, R. Experimental medicine: developing biomarkers in early discovery to bridge preclinical to clinical development. Program and abstracts of the 9th **Annual Drug Discovery Technology World Congress**; 8-13, 2004.

DO SOCORRO, S.; ROSA MDO S; MENDONCA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; DE ALMEIDA RODRIGUES, I.; SOARES, R.M.; SOUTO-PADRON, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

DOMMELS, Y.E.M.; HEEMSKERK, S.; VAN DEN BERG, H.; ALINK, G.M.; VAN BLADEREN, P.J.; VAN OMMEN, B. Effects of high fat fish oil and high fat corn oil diets on initiation of AOM-induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1739-1747, 2003.

DRODGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, Washington, v. 82, p. 356-370, 2001.

DRUCKOVA, A.; MERNAUGH, R.L.; HAM, A.J.; MARNETT, L.J. Identification of the protein targets of the reactive metabolite of teucrin A in vivo in the rat. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, p. 1393-1408, 2007.

DUARTE, D.F.; SANTANA, A.E.; CALIXTO, J.B. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 215, p.75-81, 1992.

DUBEY, M.P.; SRIMAL, R.C.; PATANAIK, G.K.; DHAVAN, B.N. Hypotensive and spasmolytic activities of coleonol, active principle of *Coleus forsholii* Briq. **Ind. J. Pharmacol.**, p. 6-15, 1974.

DUTHIE, S.J., GARDNER, P.T., MORRICE, P.C., WOOD, S.G., PIRIE, L.; DUTHIE, G.G. DNA stability and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats in vivo and colon cells in vitro: modulation by the dietary anthocyanin, cyanidin-3-glycoside. **Eur. J. Nutr.**, v. 44, p. 195-203, 2005.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde**. São Paulo: Manole, p. 163, 2001.

ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS JUNIOR, J.R.; DE MESQUITA, M.L.; MARQUIE, P.; DE PAULA, J.E.; MAMBU, L.; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *língua*. **Planta med.**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004.

FARRELL, G.C. **Drug-induced liver disease**. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone, 1994.

FARIAS, R.A.F.; RAO, V.S.N.; VIANA, G.S.B.; SILVEIRA, E.R.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Hypoglycemic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 66, p. 558-560, 1997.

FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants the sleeping giant of drug development. **Am. J. Pharm. Sci.**, v. 148, n.2, p. 46-52, 1976.

FERRER, M.; THORSTEINSDOTTIR, H.; QUACH, U.; SINGER, P.A.; DAAR, A.S. The scientific muscle of Brazil's health biotechnology. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, Suppl, p. DC8-12, Dec. 2004.

FLORA, S.J. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. **Cell. Mol. Biol.**, v. 53, p. 1-2, 2007.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinas. **Revista Eletrônica Multiciência**, v.7, p. 32, 2006.

FREIRE, A.C.; DA SILVA MELO,P.; AOYAMA, H.; HAUN, M.; DURAN, N.; FERREIRA, C.V. Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. **Planta Med.**, v. 69, n. 1, p. 67-69, 2003b.

FREIRE, A.C.; DE ASSIS, C.F. FRICK, A.O.; DA SILVA MELO,P.; HAUN, M.; AOYAMA, H.; DURAN, N.; SAUER, M.M.; KALLAS, E.G.; FERREIRA, C.V. Influence of protein phosphatase inhibitors on HL60 cells death induction by dehydrocrotonin. **Leuk. Res.**, v. 27, n. 9, p. 823-829, 2003a.

GARDEN, S.J.; MARTINS, J.R.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. In: 22ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, **Resumos**, 1999.

GERLACH, J.C.; SCHNOY, N.; ENCKE, J.; SMITH, M.D.; MULLER, C.; NEUHAUS, P. Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies. **Hepatology**, Baltimore, v.22, n.2, p.546-552, 1995.

GOKCIMEN, A.; CIM, A.; TOLA, H. T.; BAYRAM, D.; KOCAK, A.; OZGÜNER, F.; AYATA, A. Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 26, n. 6, p. 519-525, 2007.

GOLDSTEIN, R.S.; SCHELLMANN, B. Toxic Response of the Kidney; In: KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic of Poisons**. 5th ed. New York: Mc Graw-Hill, p.417-443, 1994.

GRAIM, J.F.S.; FILHO, G.J.L.; BRITO, M.V.H.; MATOS, L.T.M.B. Histologic evaluation of rat's liver after *Croton cajucara Benth* (sacaca) administration. **Acta Cir. Bras.**, v. 23, n. 2, p. 130- 134, 2008.

GRYNBERG, N.F.; ECHAVARRIA, A.; LIMA, J.E.; PAMPLONA, S.S.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. Antitumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 65, p. 687-699, 1999.

GU, W.Z.; CHIEN, R.; BRANDWEIN, S.; MCALPINE, J.; BURREN, N. Isolation, purification, and characterization of immunosuppressive compounds from triterpene: triptolide and triptolide. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 17, n. 5, p. 351-356, 1995.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p.C313 – C339, 1994.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Mol. Aspect Med.**, v. 27, p. 1-93, 2006.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.899, p.136-147, 2000.

HABTEMARIAM, S. In vitro antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperi* and *P. oligotricha*. **BMC Pharmacol.**, v. 3, n. 1, p. 6, 2003.

HALLIWELL, B.; J.M. GUTTERIDGE. Role of iron oxygen radical reactions. **Methods Enzymol.**, New York, v. 105, p. 47, 1984.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HIDEJI, I.; ICHIHARA, Y.; KOJIMA, H.; WATANABE, K.; TAKEYA, K. Nor-clerodane diterpenes from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v.28, n. 6, p.1667-1669, 1989.

HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; TOMA, W.; ALMEIDA, A.B.; PAULA, A.C.; BRASIL, D.S.; MULLER, A.H.; SOUZA BRITO, A.R. Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 94-100, 2001.

HIRUMA-LIMA, C.A.; COTA, R.H.S.; NUNES, D.S. Estudos preliminares das ações centrais do óleo das cascas de *Croton cajucara* Benth. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., Florianópolis, **Resumos**, p. 117, 1996.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SPADARI-BRATFISCH, R.C., GRASSI-KASSISSE, D.M.; BRITO, A.R. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta.Med.**, v. 65, p. 325-330, 1999a.

HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; NUNES, D.S.; SOUZA BRITO, A.R. Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, p. 341-346, 1999b.

HSIAO, S.H., LIAO, L.H., CHENG, P.N., WU, T.J. Hepatotoxicity associated with acarbose therapy. **Ann. Pharmacother.**, v. 40, p. 151-154, 2006.

HUSAIN, K; SCOTT, B. R.; REDDY, S. K.; SOMANI, S. M. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. **Alcohol.**, v. 25, n. 2, p. 89-97, 2001.

ICHIHARA, L.G.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M. FUJIKI, H.; MOTIDOME, M.; ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v.58, p. 549-551, 1992.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A.L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **Mol. Interv.**, Bethesda, v.265, p.392-400, 1993.

ISLEY, W.L. Hepatotoxicity of thiazolidinediones. **Expert. Opin. Drug. Saf.**, v. 2, n. 6, p. 581-586, Nov. 2003.

ITO, K.; OZASA, H.; SANADA, K.; HORIKAWA, S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. **Hepatology.**, v. 31, n. 2, p. 416-419, 2000.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; SHIMIZU, M.; TAKEYA, K.; MOTIDOME, M. Cajucarins A and B, new clerodanes diterpenes from *Croton cajucara*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p.701-705, 1990.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.5, n.7, p.718-724, 2000.

JAESCHKE, H., GORES, G.J., CEDEBAUM, A.I. Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 65, p. 166-176, 2002.

JANUARIO A.H.; SANTOS, S.L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.; SATO, D.N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S.V.; FRANCA, S.C., SOARES, A.M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloproteases snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): antiproteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem. Biol. Interact.**, v. 150, n. 3, p. 243-251, 2004.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, London, v. 344, p.769-778, 1994.

JIRTLE, R.L.; HAAG, J.D.; ARIAZI, E.A.; GOULD, M.N. Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transforming growth factor beta I levels during monoterpene-induced regression of mammary tumors. **Cancer Res.**, v. 53, n. 17, p. 3849-3852, 1993.

JOSHI, M.S., PONTHEIR, J.L., LANCESTER, J.R. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 1357-1366, 1999.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signaling. **Cell Signal**, Oxford, v.11, n.1, p.1-14, 1999.

KAPLOWITZ, N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury: In: Berk, P.D.; Farrell, G.C.; Liddle, C. (Ed.). **Seminars in Liver Disease**. New York: Thieme Medical Publishers, v. 22, n. 2, p. 137-144, 2002.

KELECOM, A. Isolation, structure determination and absolute configuration of barbatusol, a new bioactive diterpene with a rearranged abietane skeleton from the labiate *Coleus barbatus*. **Tetrahedron**, v. 19, p. 3603-3608, 1983.

KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nature**, v.1, p.748, 2002.

KOUZI, S.A.; MCMURTRY, R.J.; NELSON, S.D. Hepatotoxicity of germander (*Teucrium chamaedrys* L.) and on of its constituent neoclerodane diterpenes teucrin A in the mouse. **Chem. Res Toxicol.**, v. 7, n. 6, p. 850-856, 1994.

KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 12-15, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KUBO, I.; ASAKA, Y.; SHIBATA, K. Insect growth inhibitory *nor*-diterpene, *cis*-dehydrocrotonin and *trans*-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2545, 1991.

KUBO, M, MATSUDA, H, TOMOHIRO, N, YOSHIKAWA, M. Studies on alismatis rhizoma. I. anti-allergic effect of methanol extract and six terpene components from alismatis rhizome (dried rhizome of *Alisma orientale*). **Bio. Pharm. Bull.** v. 20, p. 511-516, 1987.

KULKARNI, A.P.; BYCZKOWSKI. Hepatotoxicology. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**, p.459-489, 1994.

KUTOH, E. Possible metformin-induced hepatotoxicity. **Am. J. Geriatr. Pharmacother.**, v. 3, p. 270-273, 2005.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN, L. C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, n. 1/2, p. 45-53, 2000.

LAI, I.R.; CHANG, K.J.; TSAI, H.W.; CHEN, C.F. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction. **Transplantation.**, v. 85, n. 5, p. 732-738, Mar. 2008.

LAMBERTE, T.L.; DEV, V.; RECHAVIA, E.; FORRESTER, J.S.; LITVACK, F.; EIGLER, N.L. Localized arterial with drug delivery from a polymer-coated removable metallic stent. Kinetics, distribution, and bioactivity of forskolin. **Circulation.**, v. 90, n. 2, p. 1003-1011, 1994.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.247-262, 2003.

LEE, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 474-485, 2003.

LEKEHAL, M.; PESSAYRE, D.; LEREAU, J.M.; MOULIS, C.; FOURASTE, I.; FAU, D. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A Depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 24, p. 212-218, 1996.

LI, A.P. A comprehensive approach for drug safety assessment. **Chem. Biol. Interact.**, v. 150, n. 1, p. 27-33, 2004.

LIU, H.; KEHRER, J.P. The reduction of glutathione disulfide produced by t-butylhydroperoxide in respiring mitochondria. **Free Radic Biol. Med.**, Tarrytown, v. 20, n. 3, p. 433-442, 1996.

LIU, J.; LIU, Y.; MÃO, Q.; KLAASSEN, C.D.. The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 1994.

LOPES, D.; BIZZO, H.R.; SOBRINHO, A.F.S.; PEREIRA, M.V.G. In: 30TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, Leipzig, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LÜDE, S.; TÖRÖK, M.; DIETERLE, S.; JÄGGI, R.; BÜTER, K.B.; KRÄHENBÜHL, S. Hepatocellular toxicity of kava leaf and root extracts. **Phytomedicine**, v.15, p. 120-131, 2008.

LUNA COSTA, A.M.; SILVA, J.C.; CAMPOS, A.R.; RAO, V.S.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Antiestrogenic effects of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. **Phytother. Res.**, v.13, p. 689-691, 1999.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA, A.J.; CÓLUS, I.M.S.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; FARIAS, R.A.F.; LUNA COSTA, A.M.; RAO, V.S.N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacol.** v. 70, p. 41, 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; SILVA, M.N. Terpenoides from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823-828, 1998.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; GRYNBERG, N.F. et al. Atividade antitumoral da desidrocrotonina, um diterpeno nor-clerodano de *Croton cajucara*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 11., Caxambu. **Resumos**, p. 417. 1996.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D.S. Flavanóides e cajucarinolida de *Croton cajucara*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 18. Caxambu. **Resumos**. 1995.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; CARVALHO, J. C. T.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; FARIAS, R.

A. F.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V.S. N. *In*: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, **Resumos**, Águas de Lindóia, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, A.; FILHO, V.C.; SCHIMITT, C.B.; SANTOS, A.R.S.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J.B.; MANCHE, F.D.; YUMES, R.A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**. v. 57, n. 1, p. 103-107, May 2001.

MAMBU, L.; RAMANANDRAIBE, V.; MARTIN, M.T.; BLOND, A.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F. Constituents of *Burasia madagascarensis*: a new clerodane-type diterpene. **Planta Med.** v. 68, n. 4, p. 377-379, 2002.

MARCHETTI, P.; NAVALES, R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of oral hypoglycaemic agents. An update. **Clin. Pharmacokinet.** v. 16, n. 2, p. 100-128, 1989.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.268 n. 17, p. 12231-12234, June 1993.

MARCY, T.R.; BRITTON, M.L.; BLEVINS, S.M. Second-generation thiazolidinediones and hepatotoxicity. **Ann. Pharmacother.**, v. 38, n. 9, p. 1419-1423, 2004.

MARTINS, J.R. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

MARTINS, J. E. C. **Plantas Medicinais de uso na Amazônia**. Belém: Centro de Estudos Jurídicos do Pará, 1989.

MASSOTI, L.; LENA, G.; SPISNI, A.; URRY, D.W. Effect of phospholipids on the protein conformation in the inner mitochondrial membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.56, p.892-897, 1974.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas medicinais no Nordeste do Brasil. 1. ed., vol. II, Fortaleza: Editora IOCE, 1989a.

MATOS, F.A., VIANA, G.S.B., BANDEIRA, M.M. **Guia Fitoterápico**. Fortaleza: Governo do Estado do Ceará, 2001.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** v. 52, p. 711-760, 1983.

MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Derivatives of drhydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. **Hum. Exp. Toxicol.** v. 21, n. 5, p. 281-288, 2002.

MELO, P.S.; JUSTO, G.Z.; DURAN, N.; HAUN, M. Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 487, p. 47-54, 2004.

MILCHAK, L.M.; DOUGLAS BRICKER, J. The effects of glutathione and vitamin E on iron toxicity in isolated rat hepatocytes. **Toxicol. Lett.**, v. 126, n. 3, p. 169-177, Feb 2002.

MIQUEL, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In: MIQUEL, J. **Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine**. Boca Raton: CRC Press., v. 1, p. 3-13, 1989.

MIRANDA, F.J.; ALABADI, J.A.; ORTI, M.; CENTENO, J.M.; PINON, M.; YUSTE, A.; SANZ-CERVERA, J.F.; MARCO, J.A.; ALBORCH, E. Comparative analysis of the vascular actions of diterpenes isolated from *Euphorbia canariensis*. **J. Pharmacol.** v.50, p. 237-241, 1998.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. **Nature**, London, v.191, p.144-148, 1961.

MOLINA, M.F.; SANCHEZ-REUS, I.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 10, p.1398-1402, 2003.

MONCADA, S; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n.2, p. 109-142, 1991.

MOTA, M.P.; FIGUEIREDO, P.A.; DUARTE, J.A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Rev. Port. Ciênc. Desporto**, Lisboa, v.4, n. 1, p. 81-110, 2004.

MUJOO, K.; HARIDAS, V.; HOFFMANN, J.J.; WACHTER, G.A.; HUTTER, L.K.; LU, Y et al. Triterpenoid saponins from *Acácia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. **Cancer Res.**, v. 61, p. 5486-5490, 2001.

MÜLLER, A.H.; OSTER, C.; LUNA, M.S. Terpenóides de *Croton cajucara* Benth. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 38., 1986, Curitiba. **Resumos**, p. 631.

NABETA, K.; ISHIKAWA, T.; OKUYAMA, H. Sesqui- and di-terpene biosynthesis from C-13 labelled acetate and mevalonate in cultured cells of *Heteroscyphus planus*. **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.**, v. 1, n. 24, p. 3111-3115, 1995.

NAKANISHI, K.; GOTO, T.; ITO, S.; NATARI, S.; NOZOE, S. Diterpenes. **Natural products chemistry**. New York: Academic Press, p.185, 1974.

NAZIROGLU, M.; KARAOGLU, A.; AKSOY, A. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. **Toxicology**, Limerick, v. 195, p. 221-230, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIEMINEM, A.L.; DAWASON, T.L.; GORES, G.J.; KAWNISCH, T.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Protection by acidic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibition, ionophores and oxidant chemicals. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 167, p. 600-606, 1990.

NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science**, v. 223, n. 4761, p. 305-312, 1986.

NOHL, H.; HEGNER, D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 82, p. 863-868, 1978.

ODEK-OGUNDE, M.; RAJAB, M.S. Antihypertensive effect of the clerodane diterpene ajugarin 1 on experimentally hypertensive rats. **East Afr. Med. J.**, v. 71, n. 9, p. 587-590, 1994.

OLIVER, C.N.; STARKE-REED, B.; STADMAN, E.R.; LIU, G.J.; CARNEY, J.M.; FLOYD, R.A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia reperfusion-induced injuries to gerbil brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 5144-5147, 1990.

OLIVEIRA, M.C.; BORRÁS, M.R.L.; SILVA, E.A.; ROLAND, I.A. *In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE)*, Serra Negra, **Resumos**, 1995.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10, n. 7, p. 281-285, 1989.

PERAZZO, F.F.; RODRIGUES, M.; CARVALHO, J.C.T.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R. *In: III JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS*, Campinas, **Resumos**, 1997.

PIMENTEL, M.E.L.; MORAES, M.O.; MELO, G.S.; VIANA, G.S.B.; BECERRA, F.A.F. Estudo da toxicologia clínica do Elixir de Aroeira do Sertão – *Myracrodrum urudeuwa* Fr. All. (Fitoterápico). *In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL*, 13, Caxambu, Minas Gerais. **Anais**. Caxambu:[s.n.], p.133, 1998.

PIÑEIRO-CARRERO, V.M.; PIÑEIRO, E.O. Liver. **Pediatrics**, v. 113, n.4, p. 1097-1106, 2004.

PITTLER, M.H.; ERNST, E. Sistematic review: hepatotoxic events associated with herbal medicinal products. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 451-471, 2007.

POERSCH, A., DOS SANTOS, F.V., MACIEL, M.A., DE CÂMARA, J.K., DE CASTRO DANTAS, T.N., DE SYLLOS CÓLUS, I.M. Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. **Mutat Res.**, v. 629, p. 14-23, 2007.

POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. The role of lipid peroxidation in liver damage. **Chem. Phys. Lipids**, Limerick, v. 45, p. 117-142, 1987.

POZZI, E. Sobrerol and chronic bronchitis. **Arch. Monaldi Mal. Torace.**, v. 44, n. 84-6, p. 797-806, 1989.

PRATT, D.S.; KAPLAN, M.M. Avaliação da função hepática *In*: HARRISON, T. R. Medicina Interna. 15. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil., v. 2, cap. 293, p. 1814-1815, 2002.

PROVAN, D.; KRENTZ, A. Gastroenterology. *In*: PROVAN, D.; KRENTZ, A. (Ed.). **Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigation**. 1st ed, New York: Oxford University Press, p. 325-354, 2002.

RAHN, C.A.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 16, p. 435-448, 1991.

RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, E.A.; BRITTON, R.S. Free Radical Damage and Lipid Peroxidation. *In*: MEEKS, R.G.; HARRISON, S.D.; BULL, R.J. **Hepatotoxicology**, p. 401-436, 1991.

REED, D.J. Mechanisms of chemically induced injury and cellular protection mechanisms. *In*: HODGSON, E.; LEVI, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**, Appleton & Lange, Connecticut, p. 265-294, 1994.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 295-302, 2007.

RODRIGUES-POUSADA, C.; NEVITT, T.; MENEZES, R. Review article. The yeast stress response. Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors. The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. **FEBS J.**, Oxford, v. 272, p. 2639-2647, 2005.

RODRIGUEZ, J.A.; HAUN, M. Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 Cells and rat hepatocytes. **Planta Med.**, v. 65, p. 522-526, 1999.

RODRIGUEZ, J.A.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Human Exp. Toxicol.**, v. 23, n. 9, p. 455-461, Aug. 2004.

ROENGSUMRAN, S.; MUSIKUL, K.; PETSOM, A.; VILAIVAN, T.; SANGVANICH, P.; PORNPAAKAKUL, S.; PUTHONG, S.; CHAICHANTIPYUTH, C.; JAIBOON, N.; CHAICHIT, N. Croblongifolin, a new anticancer clerodane from *Croton oblongifolius*. **Planta Med.**, v. 68, n. 3, p. 274-277, 2002.

ROGERS, D.; UNAL, G.G.; WILLIAMS, D.J. Crystal-structure of 3-epicryptoptin and the reversal of the currently accepted absolute-configuration of clerodin. **Chem. Soc. Chem. Commun.**, v. 3, p. 97-99, 1979.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUNOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mutat. Res.**, v. 585, p. 147-155, 2005.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents Mechanisms of Free-Radical Induced Toxicity and Glutathione-dependent Protection. **Pharmac. Ther.**, Oxford, v.37, p.231-249, 1988.

ROSSER, B.G.; GORES, G.J. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 108, p. 252-275, 1995.

RUSSO, M.W., JACOBSON, I.M. How to use statins in patients with chronic liver disease. **Cleve. Clin. J. Med.**, v. 71, n.1, p. 58-62, Jan. 2002.

SAI PRAKASH, C.V.; HOCH, J.M.; KINGSTON, D.G. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 2, p. 100-107, 2002.

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Rad. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHIFF, L.; SCHINI, V.; CAVIGLIOLI, G.; VIALE, M. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochlorid in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 442, p. 265-272, 2002.

SCHOUTEN, E.G.; DEKKER, J.M.; MEPPINK, P.; KOK, F.J.; VANDENBROUCKE, J.P.; POOL, J. QT interval prolongation predicts cardiovascular mortality in an apparently healthy population. **Circulation.**, v. 84, n. 4, p. 1862-1865, 1991.

SCHULZE, J., RAASCH, W., SIEGERS, C.P. Toxicity of kava pyrones, drug safety, and precautions—a case study. **Phytomedicine.**, v. 10, p. 68–73, 2003.

SEAMON, K.B.; PADDGETT, W.L.; DALY, J.W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylyl cyclase in membranes and intact cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3367-3369, 1981.

SEDLACK, J.; LINDSAY, R.H.; Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SENTUERKER, S.; KARAHALIL, B.; INAL, M.; YILMAZ, H.; MUESLUEMANOGLU, H.; GEDIKOGLU, G.; DIZDAROGLU, M. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. **FEBS Lett.**, v. 416, n. 3, p. 286, Oct. 1997.

SHAN, X.Q.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SHEN, Y.C.; WANG, C.H.; CHENG, Y.B.; WANG, L.T.; GUH, J.H.; CHIEN, C.T.; KHALLIL, A.T. New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 3, p. 316-321, 2004.

SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M.; AMES, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 91, p. 10771-10778, 1994.

SHIMODA, M., IWASAKI, Y., SAWADA, T., KUBOTA, K. Protective Effect of Ischemic Preconditioning against Liver Injury after Major Hepatectomy Using the Intermittent Pringle Maneuver in Swine. **Pathobiology.**, v. 74, n. 1, p. 42-49, 2007.

SHIRAKABE, H.; TAKEMOTO, T.; KOBAYASHI, K.; OGOSHI, K.; KIMURA, K.; NAKAMURA, K.; WATANABE, H. Clinical evaluation of teprenone, a mucosal protective agent, in the treatment of patients with gastric ulcers: a nationwide, multicenter clinical study. **Clín. Ther.**, v. 17, n. 5, p. 924-935, 1995.

SILVA, R.M., SANTOS, F.A., MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., RAO, V.S. Effect of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-*nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (tyloxapol) in mice. **Planta Med.**, v. 67, n. 8, p. 763-765, 2001b.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C. The lipid-lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in mice fed on high-fat diet. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, n. 4, p. 535-539, 2001c.

SILVA, R.M. **Estudo dos efeitos da *trans*-desidrocrotonina, um diterpeno 19-*nor*-clerodano do *Croton cajucara* Benth. em hiperlipidemia e hiperglicemia experimental.** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Blood glucose- and triglycerid- lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism.** v. 3, p. 452-456, 2001a.

SILVA, V. M.; CHEN, C.; HENNING, G. E.; WHITELEY, H. E.; MANAUTOU, J. E. Changes in susceptibility to acetaminophen-induced liver injury by organic anion indocyanine green. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 271-278, 2001.

SIMÕES, J.C.; SILVA, A.J.R.; SERRUYA, H.; *et al.* Dehydrocrotonina, a new *nor*-diterpenoid from *Croton cajucara*. **Ciênc. Cult.**, v. 31, n. 10, p. 1140-1141, 1979.

SOARES, M.C. Would *sacaca*, *Croton cajucara* benth (Euphorbiaceae) be an hepatotoxic plant like germander, *Teucrium chamaedrys* L. (Labiatae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37 Suppl 2, p. 96-97, 2004.

SÖDERGREN, E., CEDERBERG, J., VESSBY, B., BASU, S. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. **Eur. J. Nutr.**, v. 40, p. 10-16, 2001.

STARAKIS, I., SIAGRIS, D., LEONIDOU, L., MAZOKOPAKIS, E., TSAMANDAS, A., KARATZA, C. Hepatitis caused by the herbal remedy *Teucrium polium* L. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 18, p. 681-683, 2006.

STEDMAN, C. Herbal hepatotoxicity. **Sem. Liver. Dis.**, v. 22, p. 195-206, 2002.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 8, n. 6, p. 583-599, 1990.

SUNDARESAN, P.R., SLAVOFF, S.A., GRUNDEL, E., WHITE, K.D., MAZZOLA, E., KOBLLENZ, D., RADER, J.I. Isolation and characterisation of selected germander diterpenoids from authenticated *Teucrium chamaedrys* and *T. canadense* by HPLC, HPLC-MS and NMR. **Phytochem. Anal.**, v. 17, p. 243-250, 2006.

SWARTZ, M.N. Mitochondrial toxicity-new adverse drug effects. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 333, n.17, p.1146-1148, 1995.

TAFAZOLI, S., WRIGHT, J.S., O'BRIAN, P.J. Prooxidant and antioxidant activity of vitamin E analogues and troglitazone. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 18, p. 1567-1574, 2005.

TASHMUKHAMEDOVA, M.A.; MUKHINA, O.A.; SYROV, V.N.; KHUSHBAKTOVA, Z.A.; KATKOVA, S.P.; KOSOVSKII, M.I. Hypoglycemic activity of bicyclic diterpenoids of the clerodane series as compared to adegbit and maninil. **Probl. Endokrinol.**, v. 38, n. 1, p. 48-50, 1992.

THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, Bethesda, v. 279, p. 1005-1028, 2000.

TOLMAN, K.G.; CHANDRAMOULI, J. Hepatotoxicity of the thiazolidinediones. **Clin. Liver Dis.**, v. 7, n. 2, p. 369-379, 2003.

TORRES, L.M. GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry.**, v. 55, n. 6, p. 617-619, 2000.

TORSSELL, K.G.B. **The melavonic acid pathway**. New York: John Wiley, 1983. v.189.

TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K. Calcium-mediated cell injury and cell death. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, p. 219-228, 1995.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz. J. pharmac. Sci.**, v. 42, p. 289-306, 2006.

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

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia**: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2ª Ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993. (Coleção Adolpho Ducke).

VANDERLINDE, F.A.; SOUCCAR, C.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M.; PAMPLONA, S.G.E.R.; LAPA, A.J. *In: XV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FARMACOLOGIA*, Cartagena de Índias, Colômbia, **Resumos**, 1997.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

VLADIMIROV, Y.A.; OLENOV, V.I.; SUSLOVA, T.B.; CHEREMISINA, Z.P. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. **Adv. Lipid. Res.**, New York, v. 17, p. 73-78, 1981.

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J. Nitric Oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v.119, p.512-520, 2000.

WALLACE, K.B.; BELLS, J.T.; MADEIRA, M.C.; CORTOPASSI, G.; JONES, D.P. Mitochondria-mediated cell injury. **Fundam. Applied Toxicol.**, v. 38, p. 23-37, 1997.

WEBSTER, G. L. The genera of the Eupobiaceae in the South-Eastern United States. **J. Arnold. Arbor**, v.48, p. 303, 1967.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat Rev.**, London, v. 23, p. 209-240, 1997.

WELLS, P.G.; KIM, P.M.; LAPOSA, R.R.; NICOL, C.J.; PARMANA, T.; WINN, L.M. **Mutat. Res.**, v. 396, p. 65, 1997.

WILLS, E.D. Effects of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of the endoplasmic reticulum. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 123, p. 983-991, 1971.

WIEACKER, P.; MUELLER, C.R.; MAYEROVA, A.; GRZESCHIK, K.H.; ROPERS, H.H. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann.Génét.**, v.23, p.73-77, 1980.

WILSON, E. R.; NEUBERT, L. A.; HUFFMAN, J. C. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from croton californicus. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, n. 12, p. 3669-3374, 1976.

XU, X.; WEI, H.; DONG, Z.; CHEN, Y.; TIAN, Z. The differential effects of low dose and high dose concanavalin A on cytokine profile and their importance in liver injury. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 144-152, 2006.

YAMAHARA, J., YAMADA, T., KIMURA, H., SAWADA, T., FUJIMURA, H. J. **Pharmacobiodyn.** v. 5, p. 921-929, 1982.

YUNES, R.A.; CHECHINEL, FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. *In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

ZENILK, R., LAVIE, D., LEVY, E.C., WANG, A.H.J., PAUL, Z.C. **Tetrahedron**. v. 33, p. 1457-1467, 1977.

ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L.; DAVIES, K.J.A. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 27-31, 1990.

ZHOU, S.F., XUE, C.C., YU, X.Q., WANG, G. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. **Curr. Drug. Metab.**, v. 8, p. 526-553, 2007.

ZIMMERMAN, H.J.; MADDREY, W.C. Toxic and drug-induced hepatitis. *In*: SCHIFF, L; SCHINI, V.; CAVIGLIOLI, G.; VIALE, M. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochlorid in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 442, p. 265-272, 2002.