

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

“Efeito hepatoprotetor da Curcuma zedoaria induzida pelo
paracetamol em ratos machos tipo Wistar”

Margarida Tamura Kuga

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, como complementação dos créditos
necessários para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

São José dos Campos, SP

2004

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

“Efeito hepatoprotetor da Curcuma zedoaria induzida pelo
paracetamol em ratos machos tipo Wistar”

Margarida Tamura Kuga

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, como complementação dos créditos
necessários para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ribeiro

São José dos Campos, SP

2004

K97e

Kuga, Margarida Tamura

Efeito hepatoprotetor da Curcuma zedoaria induzida pelo paracetamol em ratos machos tipo Wistar / Margarida Tamura Kuga. São José dos Campos: UniVap, 2004.
//p.: il.; 30cm.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1.Fígado 2. Curcuma 3. Acetaminofen I. Ribeiro, Wellington, Orient. II. Título

CDU:633.88

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Data:

**Dedico este trabalho ao meu marido
e as minhas duas filhas.**

Agradecimentos

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap.

A Secretaria do IP&D e Biblioteca Setorial.

Prof. Doutor Wellington Ribeiro, orientador do trabalho.

Aos colegas Rafaela, Karina, Pombo, Miné, Gustavo, Carli.

Ao jardineiro Joaquim (que cuidou da herborização).

Aos profs. Doutores José Carlos Cogo, Rodrigo A.B. L Martins, Milton

Beltrame, Newton Soares, Cristina Pacheco Soares, Liliane Auxiliadora

Avelar Pasin.

A Deus e aos meus antepassados.

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito hepatoprotetor da *Curcuma zedoaria*. Para avaliar a ação hepatoprotetora da planta foi realizado um modelo experimental com ratos machos tipo Wistar, divididos em 4 grupos a seguir: i) grupo controle (grupo sem tratamento); ii) grupo Zedoaria (zed), tratado com extrato cetônico liofilizado (300mg/kg) de 12/12horas por 4 dias via oral e depois sacrificados; iii) grupo Zed + Acp, grupo pré-tratado com extrato cetônico liofilizado da zedoaria (300mg/kg) de 12/12horas por 4 dias via oral, onde 1 hora após a última dose é aplicado uma dose tóxica de paracetamol (Acp) (650mg/kg) e após 24 horas é sacrificado; e iv) o grupo Acp, onde é administrado uma dose tóxica de Acp (650mg/kg) por via oral e sacrificado após 24horas. A coleta sanguínea é realizada antes do bloqueio intracardíaco com KCl a 20% para análise enzimática das transaminases ALT (alaninaaminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), e FA (fosfatase alcalina). O estudo histomorfológico do fígado é feito através da sua remoção e fragmentado para uma solução de formol a 10%, processado por técnica da parafina. O efeito hepatoprotetor da planta é avaliado através do estudo da atividade enzimática plasmática juntamente com o estudo histomorfológico do fígado dos diferentes grupos. O resultado da atividade enzimática das transaminases ALT e AST e FA e o estudo histomorfológico foram analisados comparativamente. Na atividade enzimática plasmática do ALT podemos observar que entre o grupo controle e o grupo zed não ocorreu nenhuma diferença estatisticamente significativa. E ao compararmos o grupo zed + Acp e o grupo controle podemos observar que há um aumento estatisticamente significativo. Resultado semelhante foi encontrado para o grupo Acp e o grupo controle, onde podemos observar um aumento estatisticamente significativo. Na atividade plasmática do AST podemos observar um aumento significativo ao compararmos o grupo Acp com o grupo controle. Contudo, ao compararmos o grupo zed e o grupo zed + Acp com o grupo controle podemos observar que não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa. Na atividade plasmática enzimática da FA podemos observar que no grupo zed e no grupo zed + Acp em relação ao grupo controle ocorreu um aumento estatisticamente significativo. E ao compararmos o grupo Acp

versus controle podemos observar um aumento estatisticamente significativo. Pelas análises histomorfológicas, o grupo zed em relação ao grupo controle, não apresentou nenhuma alteração. Comparando o Grupo zed + Acp e o grupo controle podemos observar a degeneração moderada do tecido hepático, indicando uma possível regeneração celular. Comparando o grupo Acp em relação ao grupo controle podemos observar a tumefação celular, infiltrado inflamatório, congestão de vasos, desintegração nuclear, perda do potencial de membrana e alteração do citoesqueleto, caracterizando necrose. No grupo tratado com paracetamol em doses tóxicas, os níveis de soros bioquímicos do ALT, do AST, e da FA foram elevados. De acordo com os dados obtidos nesta pesquisa sugere-se que o extrato liofilizado da *Curcuma zedoaria* atenua a intoxicação do fígado intoxicado com paracetamol, com efeito hepatoprotetor que é comprovado através das provas bioquímicas e análises histomorfológicas.

Palavras chaves: *Curcuma zedoaria*, hepatoproteção, hepatotoxicidade, paracetamol

Abstract

The present study has the objective of investigating the hepatoprotection effect of *Curcuma zedoaria*. In order to evaluate the hepatoprotection action of the plant it was performed an experimental model with “Wistar” male rats, divided in 4 groups as follows: i) control group (group with no treatment); ii) Zedoaria group (zed), treated with liophilized cetic extract (300mg/kg) every 12/12 hours for 4 days *per os* and then sacrificed; iii) group Zed + Acp, pre-treated with liophilized cetic extract (300mg/kg) every 12/12 hours for 4 days *per os* where one hour after the last dose it was applied a toxic dose of paracetamol (Acp) (650mg/kg) and 24hours later the group was sacrificed; and iv) the Acp group where it was applied a toxic dose of Acp (650 mg/kg) *per os* and 24hours later the group was sacrificed. The blood collection was carried before the intracardiac blockage with KCl at 20% for enzym analysis of transamin (ALT and AST) and FA. The histomorphological study of the liver is made through its extraction and fragmentation at 10% formalin solution, and processing by the paraffin technique. The hepatoprotection effect of the plants is evaluated through study of plasmatic activity of the enzym together with histomorphological study of the liver from the differents groups. The result of enzym activities of transamins (ALT, AST) and FA as well as the histomorphological study were comparatively analysed. In the plasmatical enzym activities of ALT we can observe that between the control group and Zed group it did not occur any statistically significant difference. However, when comparing the group zed + Acp with the group control we can note that there is a statistically significant increase. Similar results were found for ACP group and control group, where we can observe an expressive statistical increase. In the plasmatical activity of AST we can note a remarkable increase when comparing the group Acp with control group. Nevertheless, when comparing both the group Zed and the group zed + Acp with group control we can observe that they did not present any statistically expressive difference. In the plasmatical enzym activity of FA we can observe that zed group and zed + Acp group compared to the control group a statistically significant increase occurred. When comparing the group Acp *versus* control group we note a statistically significant increase.

Through histomorphological analysis, it is seen that zed group did not present any change with respect to the control group. Comparing the group zed + Acp with the control group we can see a moderate hepatic degeneration, with the presence of inflammation and congestion of capillar sinusoides. Comparing the Acp group with the control group we observe cloudy swelling, loss of membran potential, and cito-skeleton change. In the Acp group, treated with toxic doses of paracetamol, the level of serum biochemical of ALT, AST and FA was high. The histological analysis showed effects on the celular permeability of the hepatocities with congestion of vases, nuclear desintegration, sinusoids and hiperplasia of Kupffer cells. From the exposed it is suggested that liophilized extract of *Curcuma zedoaria* weaken the intoxication of the liver damaged by paracetamol, with hepatoprotection effect which is assessed by means of biochemical proofs and histomorphological analyses.

Key words: *Curcuma zedoaria*, hepatoprotection, hepatotoxicity, acetaminophen.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	1
1.1. <i>Curcuma zedoaria</i>	1
1.1.1 Constituintes Químicos.....	3
1.1.2 Revisão Bibliográfica	4
1.2 FÍGADO.....	6
1.2.1 Anatomia.....	6
1.2.2 Arquitetura histológica.....	7
1.3 Atividade enzimática.....	8
1.4 Paracetamol (acp).....	9
1.5 Cálcio.....	11
2. Objetivo	13
3. Material e Métodos.....	14
3.1 Material Botânico	14
3.2 Identificação da <i>Curcuma zedoária</i>	15
3.2.1 Materiais	15
3.2.2 Método para identificação dos fármacos aromáticos para raízes e rizomas (COSTA, 1986)	15
3.2.3 Caracterização Macroscópica (Costa, 1986).....	16
3.3 Identificação histológica da <i>Curcuma zedoaria</i> (KATO; FISCHER, 1996)	16
3.3.1 Materiais	16
3.3.2 Técnica de coloração	17
3.4 Procedimentos gerais para obtenção do extrato bruto	18
3.4.1 Materiais	18
3.4.2 Método	18
3.5 Grupos experimentais	21
3.5.1 Coleta sanguínea do rato macho tipo Wistar	22
3.5.1.1 Materiais	22
3.5.1.2 Procedimento Cirúrgico	22
3.5.1.3 Coleta do tecido hepático	23
3.5.1.4 Retirada do sangue	23
3.6 Análise Enzimática para comprovação hepatoprotetora	24
3.6.1 Materiais	24
3.6.2 Transaminase Pirúvica (TGP, GTP ou ALT)	24
3.6.3 Transaminase Oxalacética (TGO, GOT, AST)	25
3.6.4 Fosfatase Alcalina (FA)	26
3.7 Análise histológica do fígado do rato macho tipo Wistar	26

3.7.1 Materiais	26
3.7.2 Análise Histológica.....	27
3.7.2.1 Microscopia Óptica	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Caracterização Macroscópica da <i>Curcuma zedoaria</i>	28
4.2 Caracterização Microscópica da <i>Cucuma zedoaria</i>	28
4.3 Estudos bioquímicos da atividade enzimáticas plasmáticas do ALT, AST e FA dos diferentes grupos experimentais	31
4.4 Resultados para a enzima ALT	32
4.5 Resultados para enzima AST	33
4.6 Resultado para enzima FA	34
4.7 Estudo Histomorfológico do fígado de rato macho tipo Wistar dos grupos experimentais	35
4.7.1 Estudo Histomorfológico do fígado de rato macho tipo Wistar do grupo controle	35
4.7.2 Estudo histomorfológico do fígado de rato macho tipoWistar do Grupo zedoaria	38
4.7.3 Estudo histomorfológico do fígado de rato macho tipo Wistar do grupo zed + Acp	41
4.7.4 Estudo histomorfológico do fígado de rato macho tipo Wistar do grupo Acp	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	50
Referências Bibliográficas	51
Anexo A	
Anexo B	

Lista de Figuras

Figura 1 – Fotografia de plantas do gênero <i>Curcuma</i>	2
Figura 2 – Fotografia da planta <i>Curcuma zedoaria</i> durante a floração.....	4
Figura 3 – Mecanismo da hepatotoxicidade do paracetamol	12
Figura 4 – Zedoaria em cultivo no campus da Univap	14
Figura 5 – Fotografia das rizomas da <i>Curcuma zedoaria</i>	15
Figura 6 – Esquema de obtenção do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i>	20
Figura 7A - Fotomicrografia do corte transversal da rizoma da <i>Curcuma zedoaria</i> (H.E.100x)	29
Figura 7B – Fotomicrografia do corte transversal da rizoma da <i>Curcuma zedoaria</i> (H.E. 400x)	29
Figura 7C – Fotomicrografia do corte transversal da rizoma da <i>Curcuma zedoaria</i> (H.E.1000x)	30
Figura 8 – Atividade enzimática plasmática ALT para os diferentes grupos experimentais	32
Figura 9 – Atividade enzimática plasmática AST para os diferentes grupos experimentais	33
Figura 10 – Atividade enzimática plasmática FA para os diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 11 A – Fotomicrografia do tecido hepático de rato macho tipo Wistar – grupo controle (H.E. 100x)	35
Figura 11B – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo controle (H. E. 400x).....	36
Figura 11C - Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo controle) na região do sistema porta (H.E. 1000x).....	37
Figura 12A - Fotomicrografia do tecido hepático do rato Wistar após a administração do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i> (300mg/kg) v.o , de 12/12 horas, durante 4 dias consecutivos. (H.E. 100x)	38
Figura 12B - Fotomicrografia do tecido hepático do rato Wistar após a administração do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i> (300mg/kg) v.o, de 12/12 hs, durante 4 dias consecutivos (H.E. 400x).....	39
Figura 12C - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após administração do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i> (300mg/kg) v. o de 12 em 12hs, durante 4 dias consecutivos . (H.E. 1000x).....	40
Figura 13A - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i> (300mg/kg) v.o., de 12 em 12 hs, durante 4 dias consecutivos e após 1 hora da última dose do extrato, foi administrado Acp (650mg/kg) por 24 hs . (H.E. 100x)	41

Fig. 13B - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i> (300mg/kg) v.o de 12 em 12 hs, durante 4 dias e após a última dose do extrato foi administrado Acp (650mg/kg) v. o . por 24 hs. (H.E. 400x).	42
Figura 13C - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do extrato bruto da <i>Curcuma zedoaria</i> (300mg/kg) v. o de 12 em 12 hs, durante 4 dias consecutivos e após 1 hora da última dose a administração do Acp (650mg/kg) v.o . por 24 hs. (H.E. 1000x).	43
Figura 14A - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração Acp (650mg/kg) via oral por 24 hs (H.E. 100x).....	44
Figura 14B - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do ACP (650mg/kg) por 24 hs (H.E. 400x).....	45
Fig.14C - Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após administração do ACP (650mg/kg) por 24 hs. (H.E. 1000x).	46

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Ad libitum – a vontade

ALT – alaninaaminotransferase

AST - aspartatoaminotransferase

Acp - paracetamol, acetaminophen

Ca⁺² – cálcio

CCl₄ – tetracloreto de carbono

CZ-1 – *Curcuma zedoaria* 1

CZ-2 – *Curcuma zedoaria* 2

CMC – carboxi metil celulose

dl – decilitro

E.P.M. – erro padrão médio

FA – fosfatase alcalina

Fe⁺² – ferro

HPLC – cromatografia de alta performance

K⁺¹ – potássio

KCl – cloreto de potassio

Kg – quilograma

LPS - lipopolissacaride

Mg⁺² – magnésio

mmol/l – milimol por litro

Na⁺¹ – sódio

NAPQI - n-acetilbenzoquinona-imina

NO – óxido nítrico

TNF – fator de necrose tumoral

U/l - unidades por litro

I – INTRODUÇÃO

1.1 *Curcuma zedoaria*

Nestes últimos anos o consumo de plantas medicinais como opção de cura, prevenção e tratamento está crescente e intenso nas mais diversas classes sociais e culturais do mundo.

No Brasil, o uso da fitoterapia tem sido ampla e tradicional desde os tempos do descobrimento até os dias de hoje, devido principalmente à forte tendência da moda naturalista e ao alto custo dos medicamentos industrializados. O interesse científico pela fitoterapia vem ganhando força tanto nas universidades, como nos grandes laboratórios das indústrias farmacêuticas, resultando em pesquisas e publicações cada vez mais abundantes sobre o assunto.

A *Curcuma zedoaria* (ROSCOE), chamada popularmente de zedoaria, “gajitsu”, é uma planta nativa do Ceilão, Indonésia e Índia, ou seja, é muito conhecida e consumida na cultura asiática. No Brasil esta planta adaptou-se no Estado de São Paulo e Paraná. A denominação da Curcuma vem da palavra Persa “Kurkum”, que significa açafrão. Pertence à família *Zingiberaceae*, com um rizoma principal piriforme ou arredondado, carnudo, com ramificações secundárias laterais compridas. A parte onde se encontra os princípios ativos é o rizoma. Existe cerca de quarenta espécies de plantas perenes que pertencem ao gênero *Curcuma* (Figura 1). A planta é acaule e de seu rizoma partem de 4 até 5 folhas longamente pecioladas, alternas lanceoladas, lisas, de cor verde pálida, marcadas por sulcos oblíquos na face inferior, de 25 a 50 cm de comprimento e de 12 a 16 cm de largura, formando na parte inferior, pela justaposição, uma espécie de estirpe. As flores são brancas amareladas e acham-se em uma longa espiga central verde envolvida pela bainha das folhas (Figura 2). A raiz forma um rizoma grosso, central, arredondado, de onde partem 3 ou 4 tuberas laterais. Dos rizomas laterais podem nascer outras tantas plantas independentes que podem também viver isoladas da planta originária. (COSTA, 1986), (KATO E FISCHER, 1996).

O rizoma da planta, tem sido utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (MELLO et al., 2000). Na indústria fitoterápica é comercializado em forma de cápsulas e na indústria alimentícia como condimento.



Fig. 1 – Fotografia de plantas do gênero *Curcuma*

1.1.1 Constituintes Químicos

O rizoma da zedoária é constituída de curcumenona (ciclopropanosesquiterpeno) e 2 espirolactonas (curcumanolide A e curcumanolide B), cineol (óleo essencial 1 a 9%), pigmentos curcumina, amido (50%), resina (3,5%), albuminóides, vitaminas B1, B2, e B6; Minerais : Ca⁺², Mg⁺², Fe⁺³, Na⁺¹, K⁺¹ (TESKE ;TRENTINI, 1997). Os óleos essenciais são compostos simples, em geral com estrutura cíclica, chamados de terpenos, que dão sabor picante e são aromáticos (BOTSARIS ; MACHADO, 1999; HONG et al., 2001). Os terpenóides também chamados de terpenos são constituídos de hidrocarboneto isopreno (C₅H₈). A *Curcuma zedoaria* é constituída de 3 isoprenos chamado de sesquiterpenóides (RAVEN et al., 2001). Segundo Matsuda (1998), os sesquiterpenos da *Curcuma zedoaria* é composto por furanodiene, germacrone, curdione, neocurdione, curcumenol, isocurcumenol, aerogidiol, zedoarondiol , curcumenona e curcumin. A curcumina na avaliação comercial consiste numa mistura de curcumin, demethoxycurcumin e bisdemethoxycurcumin, onde Jayaprakasha (2002), isolou estes três componentes pelo método HPLC e identificou através de estudo espectroscópico. Porém para Hong et al., (2001) os dois sesquiterpenoides da *Curcuma zedoaria* foram isoladas e identificadas como α -turmerone(1) e β -turmerone (2).

1.1.2 Revisão bibliográfica

A *Curcuma zedoaria* (ROSCOE), (Figura 2) é uma planta que vem sendo estudada e investigada devido a sua grande potencialidade terapêutica e ação farmacológica possibilitando inúmeros resultados científicos que tendem a confirmar o uso medicinal popular.



Fig. 2 – Fotografia da planta *Curcuma zedoaria* (ROSCOE) durante a floração

Assim vários autores como Rana e Avadhoot (1991) avaliaram a atividade hepatoprotetora da *Curcuma zedoaria* comparando com outra planta *Gymnema sylvestre*. Enquanto Matsuda et al. (1998), Matsuda et al. (2001), estudaram os constituintes hepatoprotetores da zedo, que são os sesquiterpenos, curcumenolactones A, B e C. Já Marotta et al. (2003) fez um estudo in vitro com cultura de hepatócito para verificar o efeito hepatoprotetor do curcumin sobre a lesão induzida pelo CCl₄, através das provas com glutathione, glutathione oxidado e aumento das transaminases.

Investigações sobre aplicação em citotoxicidade isolando um dos componentes ativos curcuminóides chamada demethoxycurcumin demonstrando sua atividade inibitória contra as células OVCAR-3 (células cancerígenas do ovário) foram realizadas por Syu et al. (1998).

Kim et al., (2000) estudaram sua aplicação em atividade tumorais e sugeriram que CZ1-III, que é a fração polissacarídica da *Curcuma zedoaria* diminuiu o tumor e previniu a mutação mitocondrial. Em 2001 a mesma equipe investigaram a atividade enzimática lisossomal, bem como a produção de NO e TNF- α para avaliar o aumento da atividade do polissacarídeo das células tratadas com CZ-1 e CZ-1 III da *Curcuma zedoaria* como resposta imune.

Pesquisas sobre a atividade biológica do sesquiterpenóide da *Curcuma zedoaria* ou seja 2 sesquiterpenóides que foram identificadas como α -turmerone (1) e β -turmerone (2) foram estudados por Hong et al., (2001).

Yoshioka et al., (1998) isolaram dehydrocurdione, um dos sesquiterpenos da zedoaria e testaram in vivo e in vitro como ação anti-inflamatória. Enquanto Jang et al., (2001) estudaram o curcuminóide e sesquiterpenos da *Curcuma zedoaria* como inibidor da produção do TNF- α , que é anti-inflamatório. Já Chae et al., 2002, pesquisaram o efeito inibitório do sesquiterpeno isolado: β -turmerone e α -turmerone nos mediadores da inflamação que são as prostaglandinas E₂ e óxido nítrico através das culturas de células. Foram pesquisado por Hong et al., (2002) vários extratos de plantas, inclusive da *Curcuma zedoaria*, isolando um dos componentes que inibem a ação da prostaglandinas, produzindo óxido nítrico, que são mediadores potentes na inflamação e na ação quimiopreventiva do câncer.

Sob aspecto anti-fúngico Gupta et al., (1976) isolaram methyl-p-methoxycinnamate, um dos princípios ativos fungicidas da *Curcuma zedoaria* e

confirmaram a sua ação fungicida. Enquanto Ficker et al., (2003) estudaram a ação fungicida das várias plantas da família *Zingiberácea*. Já Navarro et al., (2002) estudaram a fitoquímica e analisaram propriedades analgésicas da *Curcuma zedoaria* cultivada no Brasil.

Na Revista Fapesp (2004) citou-se que na Índia, o índice de mortalidade de idosos com doenças de Alzheimer é menor em relação ao Ocidente devido ao grande consumo da Curcuma como tempero para dar cor e sabor picante ao alimento. É recomendado também para pessoas com Aids e Câncer por causa das propriedades antioxidante e anti-inflamatória. Acredita-se que a propriedade anti-inflamatória ajuda a reduzir o inchaço observado nas células neuronais, no caso de doenças de Alzheimer e Parkinson, que são doenças degenerativas.

1.2 FÍGADO

1.2.1 Anatomia

O fígado é a maior víscera do corpo humano, correspondendo a 1/5 do peso corporal em adultos e 1/20 do peso corporal de um neonato. Situa-se no quadrante superior direito do abdômen, aderido à superfície inferior do diafragma. É, essencialmente, uma massa de células permeada por um complexo mas organizado sistema de canais que transportam o suprimento sanguíneo e a bile. Recebe 25-30% do débito cardíaco.

É composto por lobos anatômicos (D e E) separados pelo ligamento falciforme. Cirurgicamente, esta divisão é feita ao nível do porta-hepatis (local onde a artéria hepática e a veia porta se dividem em ramos D e E). Os lobos D e E cirúrgicos podem ser subdivididos em 8 segmentos os quais são usados para orientar as ressecções.

Suprimento sanguíneo P veia porta (70-80%) e artéria hepática. Pela veia porta chega ao fígado todo material absorvido nos intestinos, com exceção de parte dos lipídios que é transportada por via linfática. Graças a essa característica, ele se encontra em posição privilegiada para metabolizar e acumular nutrientes e neutralizar e eliminar substâncias tóxicas absorvidas. A veia porta é formada pela junção da veia mesentérica superior e veia esplênica e se dirige para o lobo D a medida que se aproxima do porta-

hepatis. Ramifica-se num tronco curto D (lobo superior D, área à direita da vesícula, porção ântero-superior do fígado) e num tronco E mais longo (região lateral do lobo E, lobos quadrado e caudado). Cada ramo terminal tem um território nitidamente definido.

A artéria hepática e seus ramos são bem menos constantes. Em 55% das pessoas ela se origina diretamente da artéria celíaca mas, no restante, pode se originar da mesentérica superior, gastroduodenal, gástrica D ou E ou até mesmo da aorta. Dentro do fígado, seguem os ramos da veia porta. A maior parte do fluxo vai para o estroma, ductos biliares e vesícula biliar. As veias hepáticas são retas e drenam posteriormente para a veia cava posterior (a D drena o lobo superior D, a E drena o lobo E e a intermediária drena a área suprida pelas ramos D e E da veia porta). (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

1.2.2 Arquitetura histológica

O fígado é constituído principalmente por células hepáticas ou hepatócitos. Estes se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos. Cada lóbulo está cercado por uma linha não corada que é a região onde existia tecido adiposo, o qual é eliminado com a fixação. No centro de cada lóbulo, existe a veia centro-lobular, para onde convergem diversos capilares chamados sinusóides. Os hepatócitos se dispõem em placas orientadas radialmente. Cada placa é constituído por uma só camada. Em algumas regiões, os lóbulos ficam separados por tecido conjuntivo e vasos. Estas regiões ocupam os cantos do poliedro e recebem o nome de espaços-porta.

Cada espaço-porta é composto por uma vênula e uma arteríola, um ducto biliar, vasos linfáticos e nervos. Este conjunto é cercado por uma capa de tecido conjuntivo, contínua com a cápsula de Glisson, que recebe o nome de placa limitante. O espaço-porta também pode receber o nome de tríade portal pois, suas estruturas predominantes são a vênula, a arteríola e o ducto biliar. Da tríade, o sangue atravessa a placa limitante através de canais controlados por esfíncter. Esses canais descarregam o sangue numa rede de capilares chamada de sinusóides.

Os sinusóides são capilares que ocupam o espaço entre as placas de hepatócitos. Suas paredes são revestidas de células endoteliais típicas e macrófagos que, no fígado, recebem o nome de células de Kupffer. As células de Kupffer têm função fagocitária e pertencem ao sistema retículo endotelial. O estreito espaço que separa o sinusóide dos hepatócitos recebe o nome de espaço de Disse o qual é composto por fibras reticulares. Os capilares sinusóides desembocam em uma veia localizada no centro do lóbulo chamada veia centrolobular a qual é o ramo inicial da veia hepática.

As veias centrolobulares atravessam os lóbulos em sentido longitudinal e, ao saírem destes, desembocam em ângulo reto nas veias sublobulares que penetram nas trabéculas do estroma hepático e se unem para formar as veias hepáticas. (GAYOTTO ; ALVES, 2001).

Os hepatócitos são geralmente resistentes ao TNF- α induzido pela citotoxicidade. Quando há a participação da absorção intestinal de uma endotoxina e seguido de um estresse hepatocelular, as células de Kupffer são ativadas promovendo a tumefação provocando a morte celular. Este estresse osmótico é degradado pelo aumento citosólico do Ca²⁺ e finalmente resultando na ruptura da membrana plasmática do tecido hepático. (GRATTAGLIANO et al., 2002).

1.3 Atividade enzimática

Quando há uma lesão celular no fígado produz-se a liberação de diferentes enzimas celulares. Quando esta lesão é extensa, é possível identificar quase todas as enzimas tissulares, como as amino transferases que são indicadores de integridade celular. (SCHAFFNER ; SCHAFFNER, 1991).

As transaminases (aminotransferases) são enzimas intracelulares que catalisam a transferência de um grupo amino de um aminoácido a um hidrocarboneto para formar um aminoácido diferente. As atividades da aspartatoaminotransferase (AST ou TGO) e alaninaaminotransferase (ALT ou TGP) têm sido usada como indicadores de danos hepatocelulares desde 1955. A AST está presente em muitos órgãos além do fígado, incluindo o coração e o músculos, enquanto que a ALT é encontrada só no fígado. Oitenta por cento da AST nos hepatócitos está na mitocôndria, enquanto que

a ALT está localizada em outra parte do citoplasma (SCHAFFNER ; SCHAFFNER, 1991).

A ALT é a enzima mais utilizada para medir processo inflamatório ou necrótico do fígado. Quando a lesão hepática é leve, a elevação da concentração plasmática da AST deve-se basicamente ao componente citoplasmático, porém quando a lesão se agrava, participa também a AST das mitocôndrias, razão pela qual altos níveis de AST traduzem alteração total do hepatócito (GAYOTTO ; ALVES, 2001).

As isoenzimas da fosfatase alcalina (FA), a fosfo-hidrolase ortofosfórica monoéster, estão amplamente distribuídas em todos os órgãos do corpo, incluindo fígado, ossos, rins, intestinos e placenta. No fígado, esta enzima está histoquimicamente localizada tanto no lado sinusoidal como no canalicular do hepatócito e sua fisiologia está mediada por transportadores de membrana. O aumento de FA na enfermidade hepática tanto pode ser devido ao aumento de sua produção como também a deficiência de sua excreção (GAYOTTO ; ALVES, 2001).

1.4 Paracetamol (acp)

O paracetamol (denominado acetaminofeno nos Estados Unidos) é um dos agentes analgésicos e antipiréticos não narcóticos mais utilizados. Tem apenas atividade anti-inflamatória fraca. O paracetamol é administrado por via oral e é bem absorvido, e as concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 30-60 minutos. A meia vida plasmática do paracetamol em doses terapêuticas é de 2 a 4 horas, no entanto em doses tóxicas, a meia vida pode estender-se para 4 a 8 horas. O paracetamol ingerido em doses terapêuticas comuns é conjugado ao ácido glicurônico ou ao sulfato e excretado pelos rins. A overdose do paracetamol causa náuseas, vômitos e depois de 24 a 48 horas, ocorre a lesão hepática potencialmente fatal, devido a saturação das enzimas de conjugação normais, fazendo com que a droga seja convertida por oxidases de função mista em N-acetil-benzoquinona imina (NAPQI). A hepatotoxicidade verifica-se pelos hepatócitos que são expostos a metabólitos reativos de fármacos quando formados através da ação de enzimas P450. O metabólito eletrolítico formado (NAPQI) liga-se de forma co-valente (arilação) a proteínas, prováveis resíduos de cisteína. O glutatião o

protege da ligação co-valente induzida pelo paracetamol, prevenindo a lesão hepática, pela reação com os metabólitos eletrofílicos e formação de 3-(glutatião-S-yl)-paracetamol (GAYOTTO, 2001). A Figura 3 mostra esquematicamente esse mecanismo.

O glutatião é um tripeptídeo (L-gamaglutamyl-L/cisteinil-glicina) e contém cerca de 99% nos hepatócitos em forma reduzida (GSH), é um redutor intracelular. E participa também na catálise, metabolismo e transporte celular. As funções citoprotetoras do GSH são conferidas pelo grupo sulfidril, podendo participar das reações de transferência de tiol, protegendo proteínas e membranas celulares.

A hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol só se manifesta quando o nível hepático total de GSH cai abaixo de 10%, nível requerido para depletar o glutatião mitocondrial. (KALIL et al., 2001).

As doses tóxicas de paracetamol tem sido usado amplamente como modelo experimental para avaliar a hepatoproteção com outras plantas medicinais.

Assim Ali et al., (2003) investigaram o extrato aquoso do *Hibiscus sabdariffa L* sobre a lesão hepática induzido pelo paracetamol analisando bioquimicamente e histologicamente. Enquanto Janbaz et al., (2002), estudaram efeito hepatoprotetor da rutina sobre a lesão hepática induzida pelo paracetamol e CCl₄ em roedores.

A administração de doses repetidas de paracetamol para avaliar o grau do stress oxidativo no fígado do rato foram investigado por O'Brien et al., (2000)

Echard et al., (2001) investigaram a hepatoproteção para verificar combinação de várias ervas medicinais sobre a lesão hepática induzida pelo paracetamol e álcool.

Efeito hepatoprotetor do *Osbeckia octandra* sobre a lesão hepática induzida pelo paracetamol foram estudado por Thabrew et al., (1995).

Lores et al., (1995) avaliaram o comportamento do fígado da cobaia induzido pelo paracetamol através do stress oxidativo.

1.5 Cálcio

O Cálcio regula uma série de funções celulares tais como secreção, movimentação comunicação intercelular, proliferação e diferenciação. Quando há uma hepatotoxina , como exemplo o paracetamol, há um acúmulo de cálcio nos tecidos lesados, como vemos na fig.3. Este acúmulo é devido a presença de ácidos graxos ionizados e de outras macromoléculas que ligam a este íon. Algumas hepatotóxicas alteram a homeostase celular do cálcio, aumentando a concentração do cálcio e pode ativar outros mecanismos catabólicos destrutivos como a apoptose. (GAYOTTO ; ALVES, 2001).

Stoyanovsky e Cedebaum(1999) ; Ray et al., (1990;1993), verificaram que as doses tóxicas de paracetamol in vivo provocavam homeostasia do cálcio ou seja houve acúmulo de Cálcio, resultando em necrose. Boulares e Ren (2004) verificaram que doses tóxicas de paracetamol em estudo in vitro com culturas de células houve a alteração do Ca^{2+} . A ingestão de doses altas do paracetamol faz com que o metabolito formado esgote o glutathione hepático e nestas circunstâncias , a reação com os grupos sulfidrilicos das proteínas hepáticas é aumentada e pode haver necrose, e talvez uma parte da acumulação intracelular do Ca^{2+} , ative a endonuclease dependente do Ca^{2+} . (Goodman ,1996).

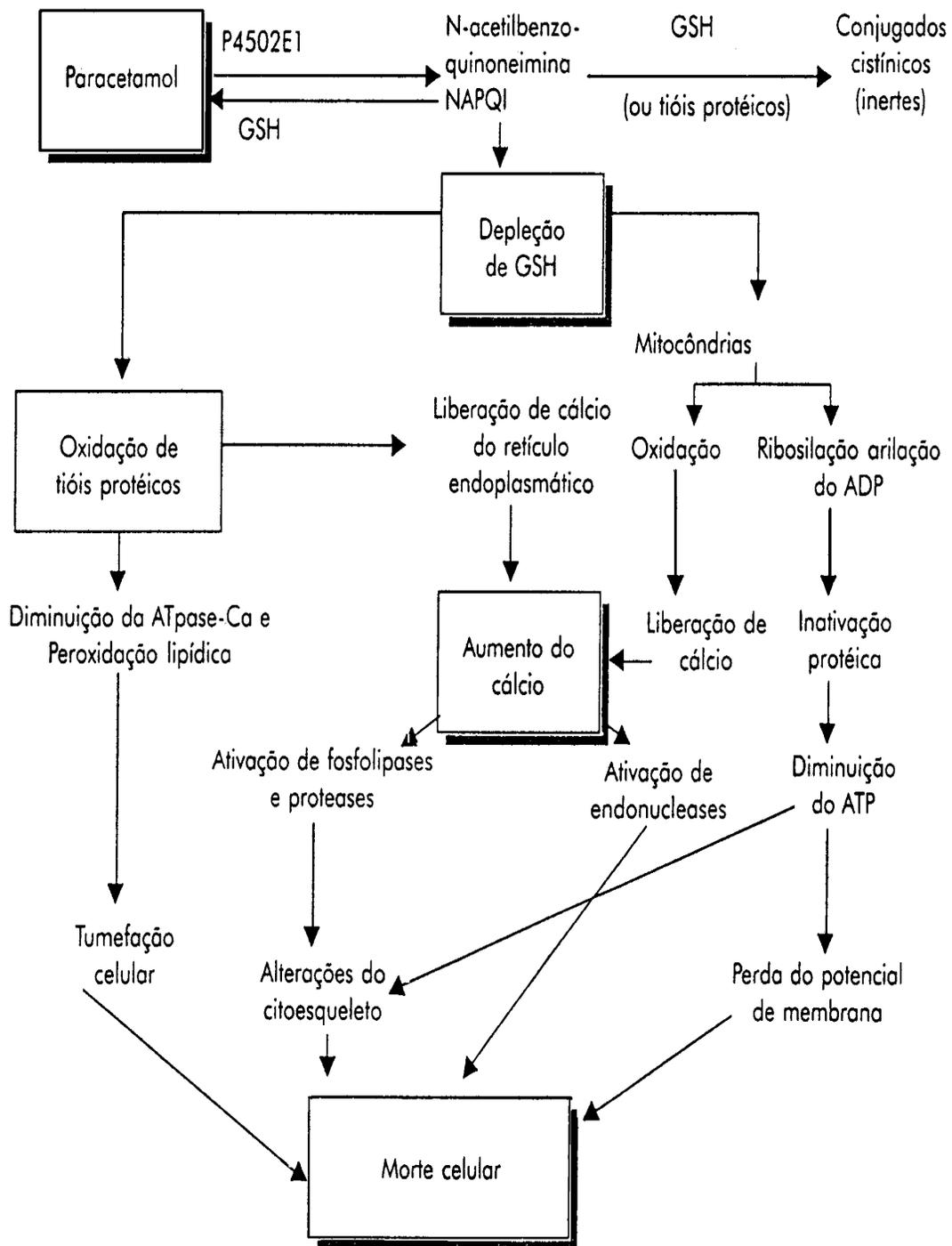


Fig. 3 - Mecanismo da hepatotoxicidade do paracetamol
(GAYOTTO ; ALVES, 2001)

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi:

- a) Identificar macroscopicamente e microscopicamente a planta *Curcuma zedoaria* presente na região do Vale Paraiba.
- b) Realizar um procedimento geral para a obtenção do extrato bruto
- c) Avaliar a ação hepatoprotetora do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* considerando a atividade enzimática (ALT, AST e FA) através da realização de provas bioquímicas da função hepática (ALT, AST e FA) e da análise histomorfológica do fígado dos diferentes grupos experimentais.

3. Material e Métodos

3.1 Material Botânico

As amostras da *Curcuma zedoaria* foram coletadas na cidade de Caçapava, Vale do Paraíba e trazidas à Univap para a realização do processo de herborização. (Figura 4).

A identificação morfológica, microscópica e macroscópica do rizoma da *Curcuma zedoaria*, seguiu o método de Kato e Fisher (1996) do Departamento de Farmacognosia da Universidade de São Paulo, sendo realizada no laboratório do Serpentário da Univap. A confirmação da identificação macroscópica da *Curcuma zedoaria* foi obtida na Casa de Agricultura de Paraibuna (SP) pelo engenheiro agrônomo Marcelo Crivelli onde foi enviada a excicata (Anexo A) para a emissão do Certificado (anexo B).



Fig. 4 - Zedoária em cultivo no campus da Univap

3.2 Identificação da *Curcuma zedoária*

3.2.1 Materiais

- Rizoma da *Curcuma zedoaria*
- Solução de amônia 2%
- Ácido bórico saturado
- Ácido sulfúrico P.A.
- Papel de filtro
- Bastão de vidro
- Bequer

3.2.2 Método para identificação dos fármacos aromáticos para raízes e rizomas (COSTA,1986).

Os rizomas tem formatos ovóides (cúrcuma redonda) ou cilíndricos (cúrcuma longa) de dimensões variáveis, até 15cm de comprimento por 2,5 cm de espessura, inteiros ou seccionados, de cor amarelo acinzentada (Figura 5).



Fig. 5 – Fotografia das Rizomas da *Curcuma zedoaria*

Fractura córnea + hidróxido alcalino = coloração vermelha

Fractura cornea + ácido = coloração violeta

0,5g de rizoma + 5ml álcool = coloração amarelo

rizoma + solução saturada de ácido bórico = coloração vermelho laranja

rizomas + gotas de amonia = coloração azul escuro

rizomas cozidos + hidroxido alcalino = coloração vermelho

rizomas cozidos + ácido sulfúrico = coloração violeta

O cheiro e o sabor são aromáticos. A saliva cora de amarelo (ibid).

3.2.3 Caracterização macroscópica (COSTA, 1986)

A *Curcuma zedoaria* (Roscoe) é constituída de rizomas e raízes, como mostra na fig. 5.

Os rizomas cortados transversalmente, encontram-se na forma de discos de 3-4 cm de diâmetro, com odor canforáceo e sabor amargo. A superfície externa mostra coloração castanho acinzentada, superfície brilhante. A superfície transversal, cinza-azulada opaca, com cilindro central, de coloração mais intensa.

As raízes são cilíndricas, não tuberosas de coloração castanha, possuem estriações longitudinais, diâmetro de cerca de 2 mm e de 5-10 cm de comprimento.

3.3 Identificação histológica da *Curcuma zedoaria* (KATO ; FISCHER, 1996)

3.3.1 Materiais

- Formol 37%
- Ácido acético glacial (Synth)
- Etanol 90%0
- Hipoclorito de sódio a 2%
- Água destilada

- Violeta genciana a 1%
- Hematoxilina eosina 2%
- Lâmina de vidro
- Lamínula
- Glicerina
- Microscópio Eletrônico Olympus CH30 com câmera fotográfica

3.3.2 Técnica de coloração

Solução Fixadora: Formol 37% - 5ml

Ácido acético glacial (Synth) - 5ml

Etanol 90% - 90 ml

Os rizomas foram limpos e colocados na solução fixadora por 24 – 48hs.

Após o período de fixação, realizou-se uma série de cortes do tecido vegetal, seguido do processo de acondicionamento em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 5 a 10 minutos, observando a destruição do conteúdo celular. Em seguida foram lavados em água acética (solução de ácido acético a 2%) durante 5 minutos, para retirar o excesso da solução hipoclorito de sódio a 2%.

Os cortes foram lavados durante 5 minutos em água destilada.

A fase seguinte coloriu-se com violeta de genciana a 1% durante 3 minutos.

Lavou-se em água destilada durante 15 minutos, para retirar o excesso do corante.

Em seguida coloriu-se com solução de hematoxilina eosina 2% por 5 minutos.

Lavou-se-se em água durante 15 minutos.

Retirou-se o excesso do corante em álcool a 90%.

Lavou-se em água corrente.

Os cortes foram finalmente colocados numa lâmina de vidro. Pingou-se uma gota de água glicerinada.

Colocou-se-se uma lamínula sobre o corte corado. Observou-se então ao microscópio óptico com câmera fotográfica no aumento 100x, 400x e 1000x.

3.4 Procedimentos gerais para obtenção do extrato bruto

Foi utilizado o rizoma da *Curcuma zedoaria* que foi colhido durante o período de dormência, ou seja quando a planta perde todas as folhagens e se tornam totalmente secas, tipicamente nos meses de julho, agosto, setembro e outubro.

Para a extração, utilizamos a técnica de Maceração, segundo Prista et al., (1981), onde o rizoma e o solvente são colocados em contato, durante certo tempo, à temperatura ambiente. Utilizou-se como solvente, a acetona (MATSUDA et al., 1998), (MATSUDA et al., 2001), por ser um líquido semipolar e induzir um certo grau de polaridade nas moléculas de solventes não polares com outro polar. Assim a acetona favorece a extração do sesquiterpeno, que é a substância ativa da planta que dá o odor típico canforáceo.

3.4.1 Materiais

- Agitador mecânico
- Mixer (processador doméstico)
- 200g rizoma fresco e descascado
- acetona P.A. (Synth)
- água destilada
- atadura de gaze
- papel de filtro

3.4.2 Método

200g da rizoma *Curcuma zedoaria* cortada e não descascada

640ml acetona P.A. (Synth) (MATSUDA et al., 1998)

160ml água destilada

Os rizomas foram misturadas no mixer (processador doméstico) até dilaceração completa com uma solução de acetona 80% e em seguida homogenizado com um agitador mecânico por 2 horas em temperatura ambiente. Repousou-se por 24h.

Filtrou e reservou o primeiro filtrado. O resíduo foi tratado novamente com solução acetona a 80% com 2x o seu peso, para obter um rendimento melhor do extrato bruto.

Agitou-se e misturou-se no mixer. Repousou-se por 12 hs.

Filtrou-se e obteve o segundo filtrado. misturou-se o primeiro filtrado com o segundo filtrado e filtrou-se na atadura de gaze.

Os filtrados foram liofilizados.

A liofilização foi realizado na Unicamp pelo Prof. Dr. Stephen Hyslop do Departamento de Farmacologia .

A liofilização consiste em uma técnica especial que permite a secagem de um corpo após prévia congelação (-20°C), onde a água congelada é removida por sublimação através de um vácuo intenso, de modo a dar-se, diretamente, a passagem do estado sólido ao gasoso, sem que em qualquer momento da operação o gelo formado retome o estado líquido.

O processo de liofilização pode oferecer as seguintes vantagens:

- 1) A baixa temperatura de operação evita qualquer alteração química das substâncias decompostas pelo calor. Desta forma o extrato seco obtido por esta técnica, mantém inalterada a sua composição química original, assegurando sua atividade terapêutica e outras propriedades características. O acondicionamento e o armazenamento adequados poderá manter inalterado as características do extrato durante um longo período .

- 2) A perda de constituintes voláteis está reduzida ao mínimo.

- 3) Os produtos liofilizados apresentam um estrutura esponjosa, o que contribui para a sua rápida dissolução, assegurando-se, assim, a reprodução fiel do produto original.

- 4) Durante a secagem, o desenvolvimento de microorganismos e as reações enzimáticas são inibidas pelas baixas temperaturas de operação, o mesmo acontece nos produtos secos, pois o seu teor em água é pouco o que torna impossível qualquer manifestação vital (PRISTA 1981).

Após a liofilização o extrato da *Curcuma zedoaria* foi armazenado a temperatura de 5°C e no momento do uso foi ressuspendido em uma solução coloidal Carboxi Metil Celulose (CMC) a 1% na concentração desejada 300mg/kg (Rana, 1991), (Sertie,1992) e (Eun-Jeon, 2000).

Peso final do extrato bruto = 22,0g

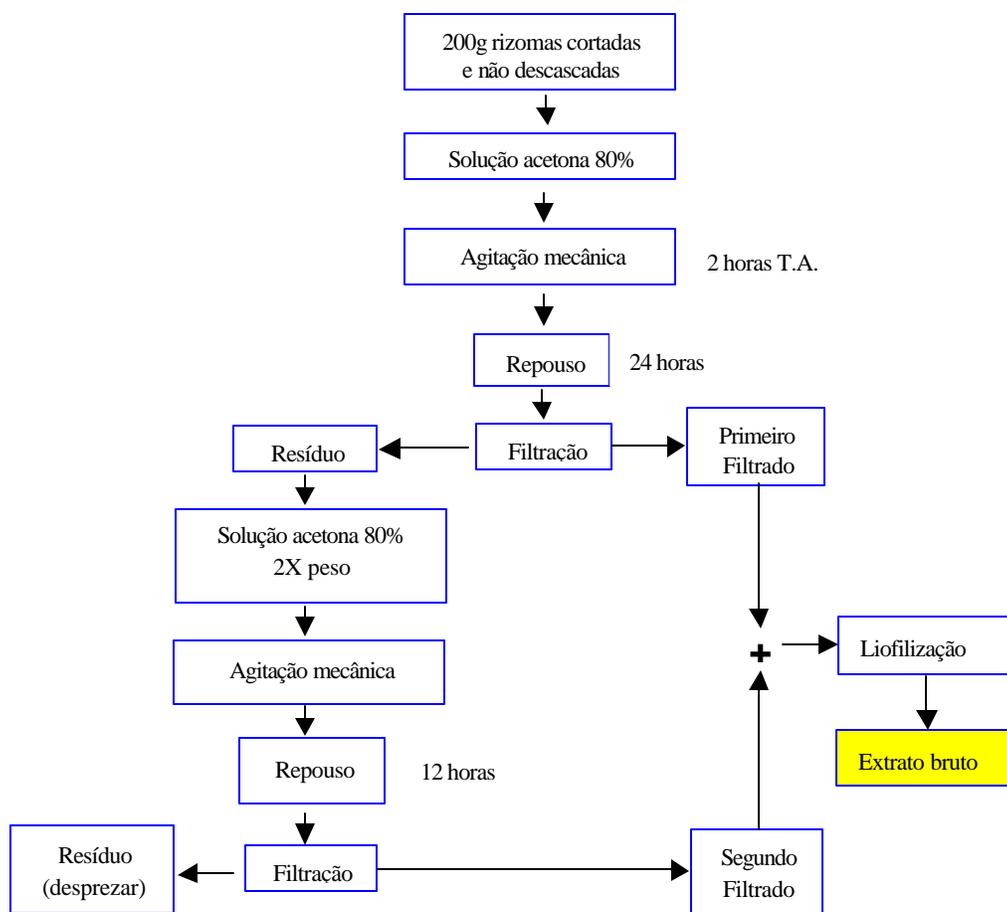


Fig.6 - Esquema de Obtenção do Extrato Bruto da *Curcuma zedoaria*

3.5 Grupos experimentais

Foram utilizados 36 ratos machos tipo Wistar pesando em torno de (215 ± 10) g provenientes do biotério da Fazenda Bem-te-vi – São Paulo. Sendo os experimentos realizados de acordo com os preceitos do Código Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e as normas do CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences), Código de Ética para experimentação animal (WHO, 1985). Os animais permaneceram no biotério de passagem do Instituto Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade Vale do Paraiba, São José dos Campos.

Os animais foram mantidos em ambiente limpo e seco com temperatura e umidade relativa adequados, acondicionados em caixa de polipropileno, com ração e água *ad libitum* monitorados diariamente em relação à troca de palha e água.

Neste trabalho pretende-se investigar a atividade hepatoprotetora da *Curcuma zedoaria* com um pré tratamento de 4 dias via oral induzido pela dose tóxica do paracetamol (650mg/kg), via oral por 24 horas. Como foi descrito por (UDEM et al., 1997; EUN-JEON et al., 2000; ALI et al., 2001). Doses tóxicas de paracetamol tem sido usado como modelo animal para teste de hepatotoxicidade com plantas medicinais, conforme Janbaz et al., (2002); Echard et al., (2001), Hessel et al., (1996), Thabrew et al., (1995), e Lin et al., (1994).

Para o estudo da atividade hepatoprotetora da *Curcuma zedoaria* os animais experimentais foram dividido em 4 grupos, onde cada grupo constituiu-se de 9 animais:

O Grupo 1 foi o grupo controle, sem nenhum tratamento

O grupo 2 tratado com zedoaria(300mg/kg) a cada 12 horas, ou seja 600mg /dia, ressuspendido numa solução de CMC 1% e administrado via oral durante 4 dias consecutivos.

O Grupo 3 tratado com zedoaria (300mg/kg) a cada 12 horas, ou seja 600mg/dia, ressuspendido na solução CMC 1% e por via oral durante 4 dias e, após 1 hora da última dose do extrato, foi administrado paracetamol (650mg/kg) via oral por 24 horas.

No Grupo 4 tratado só com paracetamol 650mg/kg via oral por 24horas .

3.5.1 Coleta sanguínea do rato macho tipo Wistar

3.5.1.1 Materiais

- Pinça cirúrgica
- Tesoura cirúrgica
- Luvas
- ketamina
- Éter sulfúrico (Synth)
- Algodão
- Prancha de madeira para apoiar o animal
- Bequer
- Seringa de 5ml com agulha 25x7
- Tubo Falcon
- Tubo Eppendorf
- Centrífuga Fanen – Centrífuga Excelsa II Mod 206 BL
- Balança Eletrônica NARK 2200 Classe II

3.5.1.2 Procedimento Cirúrgico

O animal foi colocado em uma câmara anestésica contendo algodão embebido com éter para obter uma certa analgesia e sedação. Em seguida aplicou-se ketamina (100mg/kg) via IM (FIDECKA,1987; CREMONESE et al., 2001; JANBAZ et al., 2002 e PORRO et al., 2004) que é um agente anestésico geral. Após a realização do procedimento anestésico, foi realizado uma incisão retilínea, através do emprego de uma tesoura de ponta romba, da linha longitudinal até o prolongamento final da parede abdominal à borda posterior do esterno. Em seguida foi realizado de cada lado da borda uma incisão transversal, ao longo da borda posterior da caixa torácica, e a parede ventral foi fixada.

Posteriormente, foi realizada a coleta da amostra sanguínea, com uma seringa de 5ml de calibre 25X7, num volume de 4 a 5ml, seguida da retirada do tecido hepático.

Colocou-se no tubo Falcon e centrifugou-se a 4000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação o sangue separou-se em plasma e soro. Utilizou-se o soro para análise enzimática.

Segundo (JONES et al., 1987) o éter não provoca disfunção e toxicidade no tecido hepático, este promove apenas uma ação depressora no SNC (Sistema Nervoso Central), e foi utilizado em diversos trabalhos nos quais estudou-se a função hepática (ZARAGOZA et al., 2000; YAMANE, Abe,1996; BARBOSA et al., 2003). Para a realização dos experimentos os animais foram anestesiados por inalação do dietileter e o nível da anestesia foi monitorado através de indicadores como perda do reflexo corneano (2 a 5 minutos), frequência respiratória, relaxamento da musculatura abdominal e da mandíbula e respostas reflexas.

A ketamina é um potente agente hipnótico e analgésico. Um agente inalatório no caso, o éter prolonga a ação anestésica da ketamina. A ketamina é metabolizada no fígado e conjugando com o ácido glucurônico e eliminado pelos rins sem provocar nenhuma disfunção hepática. (MILLER, 1994).

3.5.1.3 Coleta do tecido hepático

O tecido hepático foi removido imediatamente após o sacrifício do animal, limpo em solução salina 0,9% resfriado e pesado. Foi retirado um fragmento do lóbulo direito do fígado, pois todo o material absorvido vem do intestino através da veia porta. (Junqueira; Carneiro, 1999). Um fragmento do lóbulo direito do fígado, foi colocado em formol a 10% para posterior análise histológica.

Os animais foram sacrificados através da administração de KCl 20% intracardíaco ainda sob efeito anestésico (COBEA, 1991; GUTIÉRREZ-SALINAS et al, 1999; THEOCHARIS et al, 2001; BARBOSA et al., 2003).

3.5.1.4 Retirada do sangue

Para retirada do sangue, foram coletadas amostras da veia cava inferior com auxílio de uma seringa de 5 ml, através do emprego de uma agulha de calibre 25x7. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, por 15 minutos a uma

temperatura de 4°C. Em seguida, foram separadas amostras de soro para a realização das determinações das atividades enzimáticas (ALT, AST e FA).

3.6 Análise Enzimática para comprovação hepatoprotetora

3.6.1 Materiais

- Amostra sanguínea
- Espectrofotometro Shimadzu – UV 1650 PCUV visible - Spectrophotometer
- Banho Maria na temperatura constante de 37°C
- Pipetas para medir padrão, amostras e reagente.
- Cronometro
- Centrifuga FANEN Excelsa II Mod 206 BL
- Kit para análise Transaminase Pirúvica (TGP, GTP ou ALT) fabricado pela LABTEST DIAGNOSTICA S.A.®
- Kit para análise Transaminase Oxalacética (TGO, GOT ou AST) fabricado pela LABTEST DIAGNOSTICA S.A.®
- Kit para análise enzimática Fosfatase Alcalina (FA) fabricado pela LABTEST DIAGNOSTICA S.A.®

3.6.2 Transaminase Pirúvica (TGP, GTP ou ALT)

Finalidade: Sistema para determinação da atividade da transaminase pirúvica (TGP) ou alanina aminotransferase (ALT) no sangue por fotolorimetria.

Princípio: A ALT especificamente catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato formado reage com a 2-4 difenilhidrazina formando a hidrazona que adquire a coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade da coloração é monitorada fotometricamente e neste caso, uma vez que não obedece a Lei de Lambert-Beer, os cálculos são definidos através da curva padrão e a intensidade varia de acordo com a atividade enzimática.

Metodologia: Reitman e Frankel

Reagentes:

- 1 – ALT Substrato: Tampão 50 mmol/L pH 7,4; ácido alfacetoglutárico 2 mmol/L; L-alanina 100 mmol/L, e azida sódica 15,4 mmol/L.
- 2 – Reagente de cor: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/l ácido clorídrico 1,0 mol/L.
- 3 – Solução de NaOH – estoque: Hidróxido de sódio 10 mmol/L
- 4 – Solução padrão: Piruvato de sódio 22 mg/dL.

3.6.3 Transaminase Oxalacética (TGO, GOT, AST)

Finalidade: Sistema para determinação da atividade da transaminase oxalacética (TGO) ou aspartato aminotransferase (AST) no sangue por fotolorimetria.

Princípio: A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para cetoglutarato, com a formação de glutamato e oxalacetato. O oxalaceto formado reage com a 2-4 difenilhidrazina formando a hidrazona que adquire a coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração varia de acordo com a atividade enzimática e neste caso, uma vez que não obedece a lei de Lambert-Beer, os cálculos são definidos através da curva-padrão.

Metodologia: Reitman e Frankel

Reagentes:

- 1 – AST substrato: Tampão fosfato 67mmol/l PH 7,4; ácido alfacetoglutárico 2 mmol/L; ácido L aspartático 99 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/L
- 2 – Reagente de cor: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L
- 3 – Solução de NaOH – estoque: Hidróxido de sódio 10 mmol/L
- 4 – Solução padrão: Piruvato de sódio 22mg/dL

3.6.4 Fosfatase Alcalina (FA)

Finalidade: Sistema para determinação da atividade da fosfatase alcalina (FA) no sangue por fotolorimetria.

Princípio: a FA do soro hidrolisa o substrato da timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Pela adição de álcali a ação enzimática é inibida e a timolftaleína adquire a cor azul. A intensidade da coloração é proporcional a atividade enzimática.

Metodologia: Roy modificado; metodologia com especificidade para fosfatases de origem hepática, óssea e intestinal, o que não ocorre para a isoenzima de origem placentária.

Reagentes:

- 1 – Substrato: Timolftaleína monofosfato 23mmol/L
- 2 – Reagente de cor: Carbonato de sódio 50 mmol/L de hidróxido de sódio 50mmol/L
- 3 – Tampão: tampão 300mmol/L, pH 10,1 e surfactante
- 4 – Padrão: Fosfatase alcalina em solução 45 U/L

3.7 Análise histológica do fígado do rato macho tipo Wistar

3.7.1 Materiais

- Solução salina 0,9%
- Solução de ácido acético 5%
- Solução de Ácido clorídrico 5%
- Soluções de Álcool etílico: 50%, 60%, 70% e 95 %
- Álcool Etílico Absoluto (SYNTH)
- Xilol (SYNTH)
- Solução Formol 10%
- Eosina 1%
- Solução hematoxilina (DOLES®)
- Estufa Quimis
- Banho Maria Quimis

- Microtomo – marca LEICA RM 2125 RT
- Termometro B-D

3.7.2 Análise Histológica

3.7.2.1 Microscopia Óptica

As amostras do fígado foram fixadas em uma solução de formol a 10% no mínimo 36 horas. Posteriormente os cortes histológicos foram desidratados e submetidos a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (Synth). Em seguida os cortes foram diafanizados com Xilol (Synth) por 4 horas.

Para impregnação e inclusão os cortes histológicos foram colocados em recipientes de alumínio adequados, com parafina fundida por 4 horas para impregnação do tecido.

Após a impregnação do corte histológico, este foi colocado em um pequeno recipiente coberto com parafina fundida por inteiro e deixado para endurecer, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT. Os cortes em lâminas de vidro de extremidade fosca (Perfecta) são levados pra o banho-maria onde são cobertos com gelatina (USP- Synth).

Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes são fixados em lâminas a serem corados, através do emprego do corante Hematoxilina-Eosina (H.E.). Após coloração os cortes foram montados em lâminas permanentes para posterior estudo microscópio optico (marca LEICA) e fotografadas no aumento de 100x, 400x e 1000x.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização macroscópica da *Curcuma zedoaria*

A *Curcuma zedoaria* (Roscoe) é constituída de rizomas e raízes, como mostra na Fig. 5.

Os rizomas cortados transversalmente, encontram-se na forma de discos de 3-4 cm de diâmetro, com odor canforáceo e sabor amargo. A superfície externa mostra coloração castanho acinzentada, superfície brilhante. A superfície transversal, cinza-azulada opaca, com cilindro central, de coloração mais intensa.

As raízes são cilíndricas, não tuberosas de coloração castanha, possuem estriações longitudinais, diâmetro de cerca de 2 mm e de 5-10 cm de comprimento.

4.2 Caracterização Microscópica da *Curcuma zedoaria*

Ao examinarmos os cortes da rizoma ao microscópio óptico podemos observar na região mais externa cerca de 6 a 10 camadas de células suberosas, alongadas no sentido periclinal, constituindo os parenquimas de reserva. Este parenquima são tecidos especializados no acúmulo de substâncias, podendo apresentar grãos de amido oval-elíptico e células oleíferas disseminadas. O parenquima da camada vertical média possui grandes células poliédricas, de ângulos arredondados e no centro do rizoma nota-se em corte transversal, um círculo de fchos fibro-vasculares apertados uns com os outros formando uma espécie de bainha ao redor da medula. O parenquima limitado exteriormente por este círculo é atravessado por fchos espaçados; suas células encerram grãos arredondados ou ângulos de amido; em algumas células encontram-se também pequenos granulos de resina, coloridos de arroxeadado mais intenso, e todo o tecido do rizoma é impregnado de uma matéria corante amarela, que são gotas de óleo essencial. Segue as fotos tiradas ao microscópio, na Figura 7A, 7B, 7C.

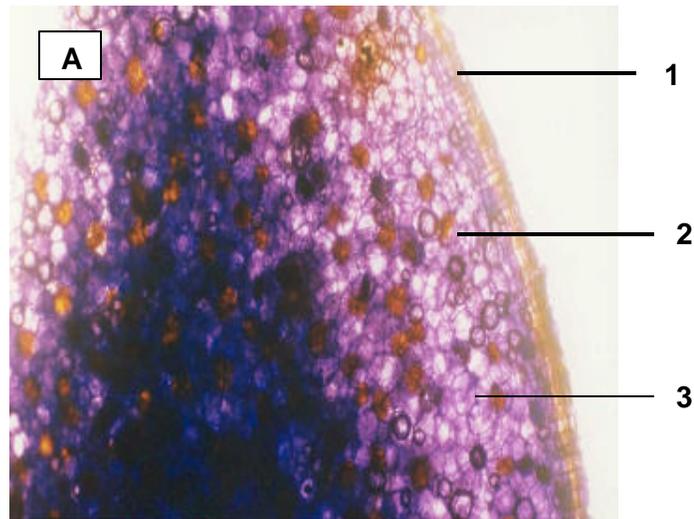


Fig.7A Fotomicrografia do corte transversal da rizoma da *Curcuma zedoaria* (H.E. 100X)

Legenda: 1 - Tecido de revestimento
2 - Célula oleífera
3 - Parênquima amilífero

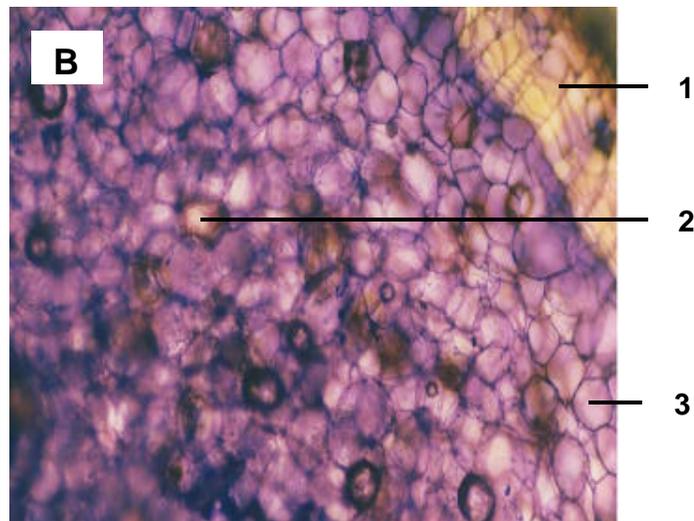


Fig.7B Fotomicrografia do corte transversal da rizoma da *Curcuma zedoaria* (H.E. 400X)

Legenda: 1 - Tecido de revestimento
2 - Célula oleífera
3 - Parênquima amilífero

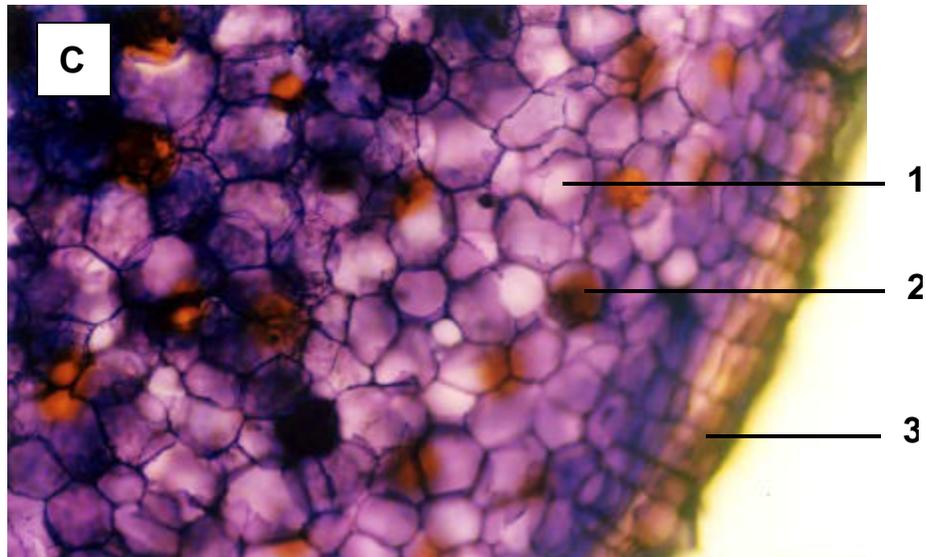


Fig.7C Fotomicrografia do corte transversal da rizoma da *Curcuma zedoaria* (H.E. 1000X)

Legenda: 1 - Parênquima amilífero
2 - Célula oleífera
3 - Tecido de revestimento

4.3 Estudos bioquímicos da atividade enzimáticas plasmáticas do ALT, AST e FA dos diferentes grupos experimentais

A tabela I mostra a correlação obtida entre as diferentes atividades enzimáticas plasmáticas com os diferentes grupos experimentais e seus respectivos pesos \pm EPM. As análises estatísticas foram feitas através da análise de variância (ANOVA) e do teste T de Student com nível de significância de $p < 0,05$.

Tratamento dos grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/l)	ALT (U/l)	FA(U/l)	Peso do animal (g)	Peso do fígado (g)
Controle	-	88.30 \pm 1.72	53.55 \pm 2.06	53.46 \pm 2.30	210.46 \pm 6.10	9.06 \pm 0.28
Zed.	300	79.85 \pm 0.94	50.59 \pm 1.94	88.40 \pm 2.27	203.67 \pm 3.88	8.22 \pm 0.22
Zed.+Acp	300+650	90.24 \pm 4.70	69.60 \pm 3.98	91.10 \pm 2.59	226.08 \pm 4,42	10.75 \pm 0.32
Acp	650	106.42 \pm 5.88	81.37 \pm 3.26	120.13 \pm 2.92	220.83 \pm 3,73	10.45 \pm 0.28

Tabela I: Correlação entre as diferentes atividade enzimática plasmática e dos diferentes grupos e seus respectivos pesos.

4.4 Resultados para a enzima ALT

A figura 8 representa a atividade enzimática plasmática dos diferentes grupos experimentais : **Controle, Zed, Zed+Acp e Acp**

Ao compararmos as atividades enzimática plasmática da ALT para o grupo **Zed** (50.59 ± 1.94) em relação ao grupo **Controle** (53.55 ± 2.06) podemos observar que não ocorreu nenhum aumento estatisticamente significativo.

Já quando observamos as atividades enzimática plasmática da ALT para o grupo **Zed + Acp** (69.60 ± 3.98) em relação ao grupo **Controle** (53.55 ± 2.06) podemos observar que houve um aumento estatisticamente significativo.

Resultado semelhante foi encontrado para o grupo **Acp** (81.37 ± 3.26) em relação ao grupo **Controle** (53.55 ± 2.06) podemos observar um aumento estatisticamente significativo, de 15%.

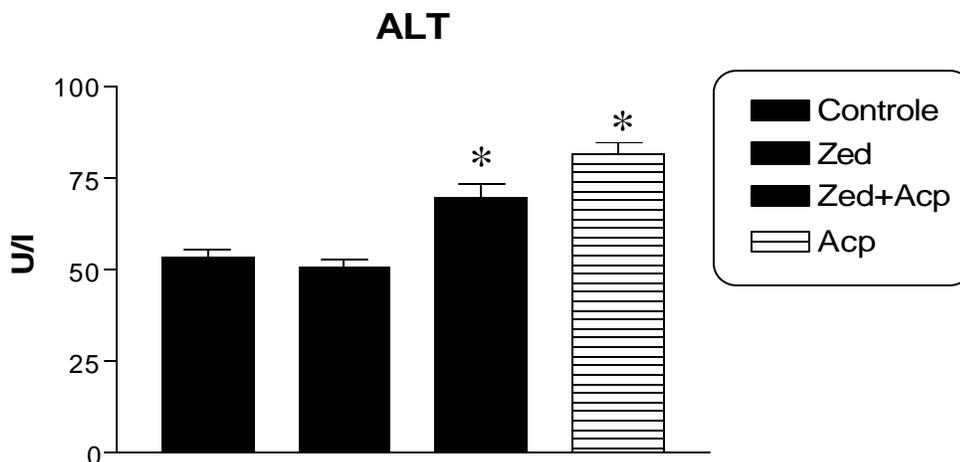


Fig. 8 Atividade enzimática plasmática da ALT para os diferentes grupos experimentais. Os dados representam a média \pm E.P.M., $n=9$, $p<0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla). (*) Representa valores significativamente diferentes do controle

4.5 Resultados para enzima AST

A figura 9 representa a atividade enzimática plasmática dos diferentes grupos experimentais: **Controle, Zed, Zed + Acp e Acp.**

Ao compararmos o grupo **Zed** (79.85 ± 0.94) em relação ao grupo **Controle** (88.30 ± 1.72) não ocorreu nenhuma diferença estatisticamente significativa da atividade enzimática plasmática da AST.

Resultado semelhante foi encontrado para a atividade enzimática plasmática do AST no grupo **Zed + Acp** (90.24 ± 4.70) *versus* grupo **Controle** (88.30 ± 1.72), não apresentou dados estatisticamente significativos.

Ao compararmos o grupo **Controle** *versus* **Acp** grupo podemos observar um aumento estatisticamente significativo da atividade enzimática plasmática da AST de 88.30 ± 1.72 para 106.42 ± 5.88 , de 16%.

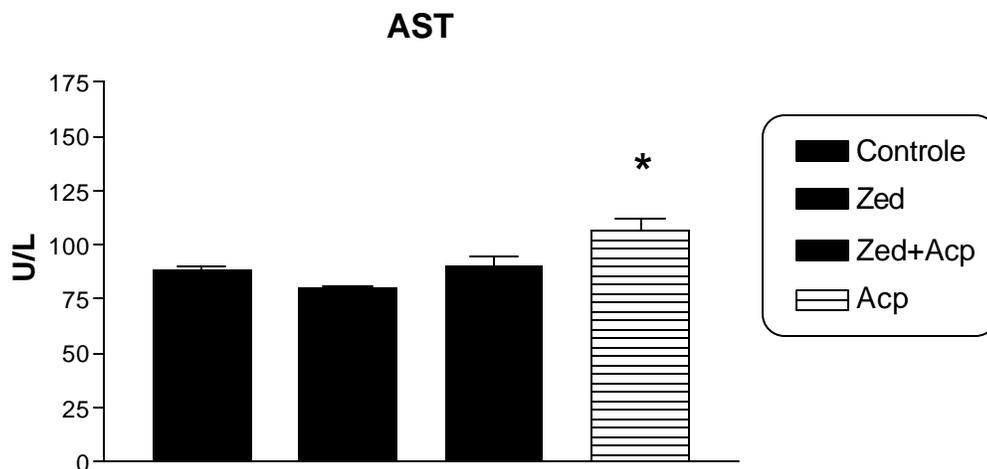


Fig. 9 Atividade enzimática plasmática do AST para os diferentes grupos experimentais. Os dados representam a média \pm E.P.M., $n=9$, $p<0,05$ quando comparado com a resposta obtida para o grupo controle (Anova, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

(*) Representa valores significativamente diferentes do controle

4.6 Resultado para enzima FA

A figura 10 representa a atividade enzimática plasmática dos diferentes grupos experimentais: controle, **Zed**, **Zed + Acp** e **Acp**.

Ao compararmos a atividade enzimática plasmática da FA para o grupo **Zed** (88.40 ± 2.27) em relação ao grupo **Controle** (53.46 ± 2.30) podemos observar um aumento estatisticamente significativo.

Resultado semelhante foi observado para os grupos **Zed + Acp** (91.10 ± 2.59) em relação ao grupo **Controle** (53.46 ± 2.30), onde também observou-se um aumento estatisticamente significativo.

Ao compararmos o grupo **Controle** *versus* o grupo **Acp** podemos observar um aumento estatisticamente significativo da atividade enzimática plasmática da FA de 53.46 ± 2.30 para 120.13 ± 2.92 , respectivamente, de 25%

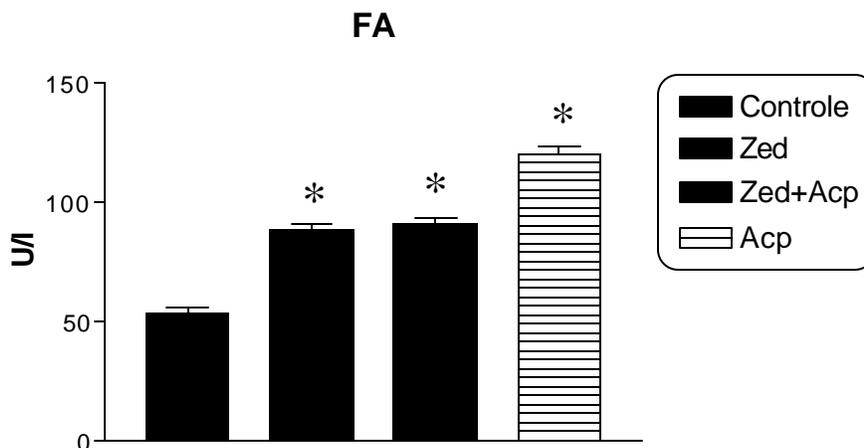


Fig. 10 Atividade enzimática plasmática da FA para os diferentes grupos experimentais. Os dados representam a média \pm E.P.M., n=9, $p < 0,05$ quando comparado com a resposta obtida para os grupos * controle (Anova, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

(*) Representa valores significativamente diferentes do controle

4.7 Estudo Histomorfológico de fígado de rato macho tipo Wistar dos grupos experimentais

As figuras seguintes ilustram o corte histológico do tecido hepático característico de cada grupo, em microscópio óptico (marca Leica) com aumento em 100x, 400x e 1000x , acoplado a camera fotográfica.

4.7.1 Estudo Histomorfológico do fígado de rato macho tipo Wistar grupo controle

A figura 11 A , B e C ilustram a visão geral do fígado do grupo controle , ou seja sem tratamento em aumento 100x, 400x e 1000x respectivamente

Na figura 11 A podemos observar a visão geral normal do tecido hepático com a presença do espaço porta, os capilares sinusóides que aparecem em áreas claras entre os cordões celulares. O Espaço porta é formado pela artéria hepática, ducto biliar e veia porta., que constituem a tríade portal.

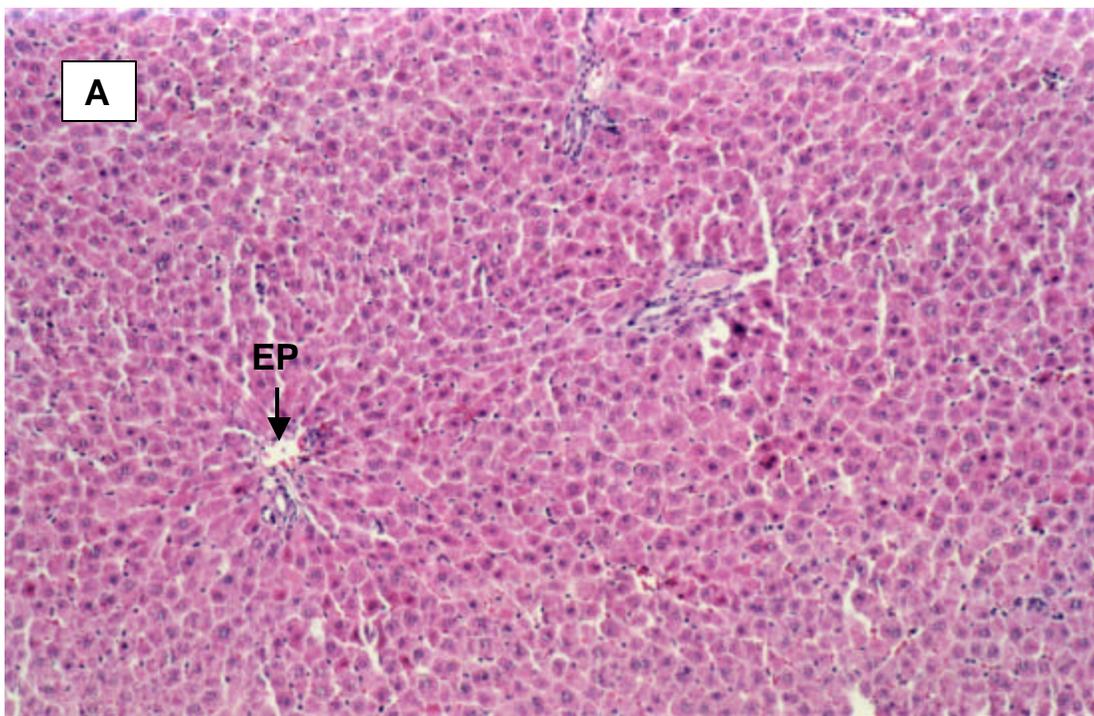


Fig. 11A -Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar grupo controle- (H.E. 100x)
Observar Espaço porta (EP)

Na Figura 11 B podemos observar o parenquima hepático normal, na região do espaço porta hepático, hepatócitos,. O hepatócito tem a forma poliédrica e apresenta núcleo esférico, em posição central. O núcleo do hepatócito contém um ou mais nucleólos aglomerados. O espaço porta abrigam ramos do ducto hepático, da artéria hepática e da veia porta, que constituem a tríade portal. As células de Kupfer são reconhecidas pela forma de seus núcleos que parecem ovóides , e em geral projetam-se para luz. Estas células derivam da medula óssea e pertencem ao sistema mononuclear fagocítico, correspondendo a cerca de 80 a 90% dos macrófagos fixos do corpo humano.

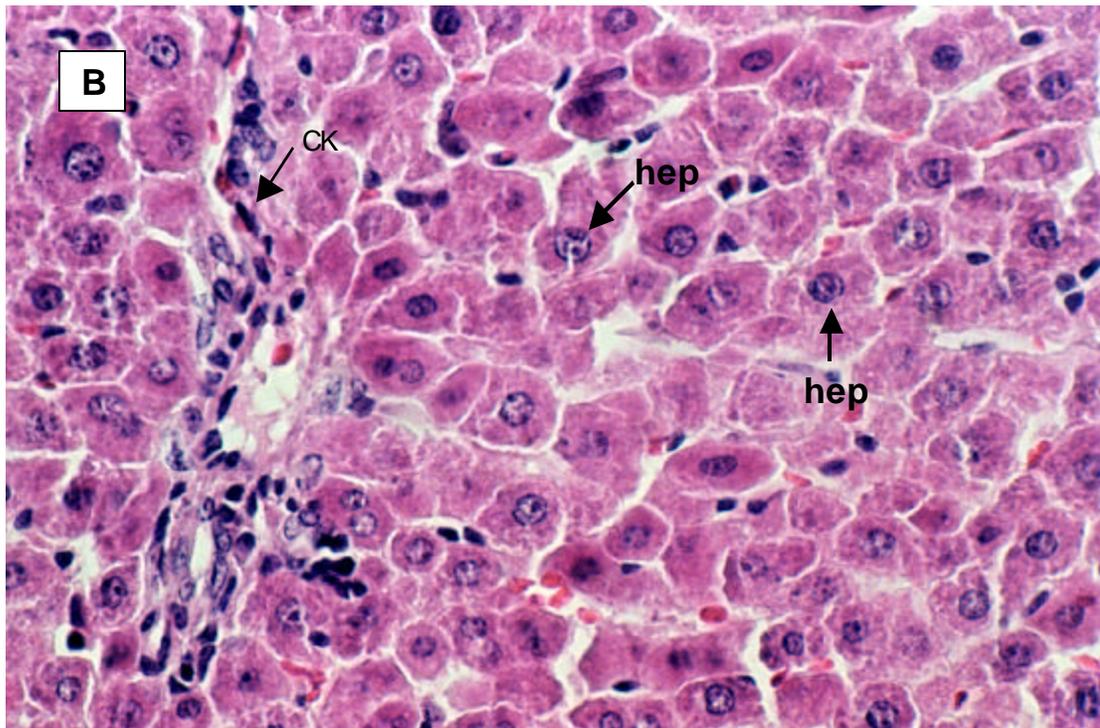


Fig. 11B – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo controle (H. E. 400x) Observar hepatócitos (hep) e células de Kupfer (CK)

Nesta figura podemos observar na região do espaço porta os hepatócitos com sua forma poliédrica, os ductos biliares, a artéria hepática, os espaços sinusóides.

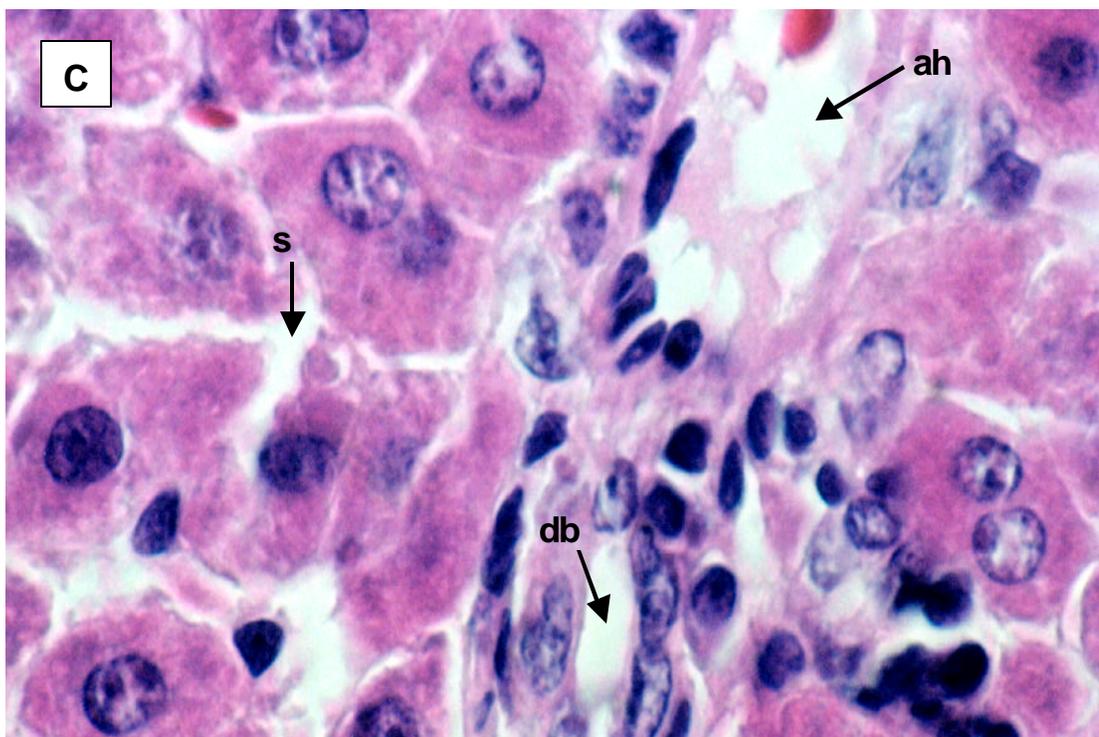


Fig. 11C – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar do grupo controle na região do sistema porta (H.E. 1000x). Observar artéria hepática (ah), ducto biliar (db) e os espaços sinusóide (s).

4.7.2 Estudo histomorfológico do fígado de rato macho tipo Wistar do Grupo zedoaria

As figuras 12A , B e C ilustram o estudo histomorfológico do fígado do rato Wistar tratado com extrato liofilizado da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) 12/12 hs durante 4 dias por via oral no aumento 100x, 400x e 1000x.

Na figura 12A podemos observar a visão geral do tecido hepático com veia centro lobular, espaço porta, os sinusóides hepáticos desembocando na veia centrolobular onde atravessam o lóbulo no sentido longitudinal. A veia centro lobular fica no centro do lóbulo, e a partir dela os cordões hepatocitários se dispõem de forma radiada pelos sinusóides.

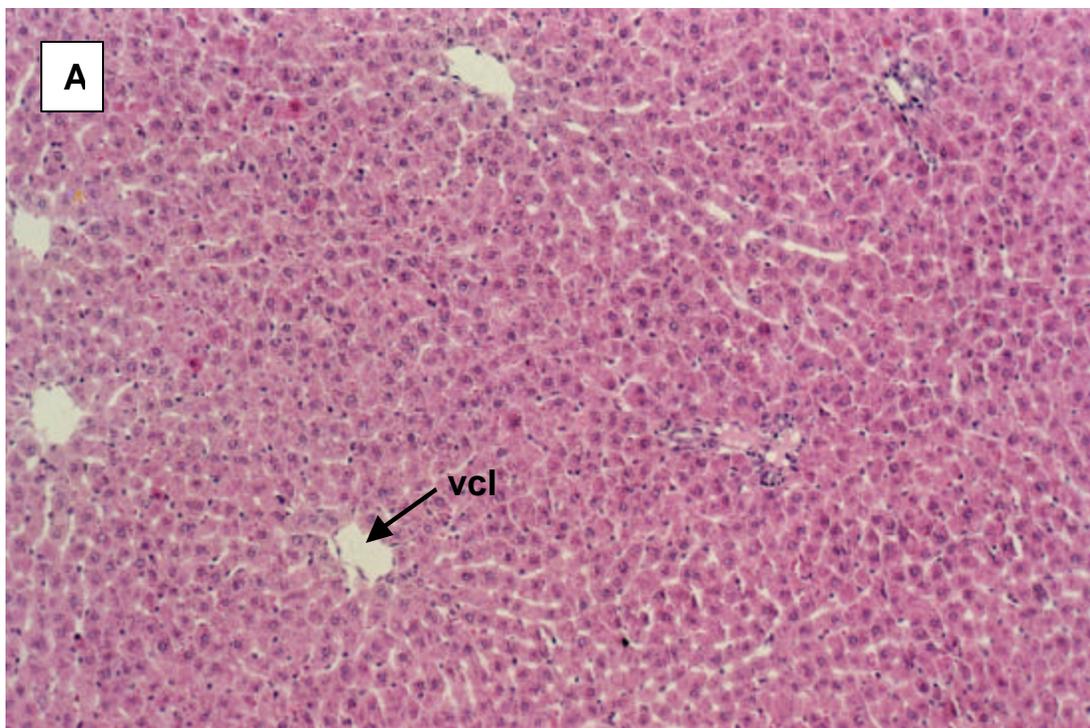


Fig. 12A Fotomicrografia do tecido hepático do rato Wistar após a administração do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) v.o , de 12/12 horas, durante 4 dias consecutivos. (H.E. 100x). Observar veia centrolobular (vcl).

Na figura 12 B podemos observar a região do espaço porta com artéria hepática, ducto biliar, veia hepática, formando a tríade portal. As células de Kupffer dirigindo na luz da artéria hepática, os hepatócitos em sua forma poliédricas.

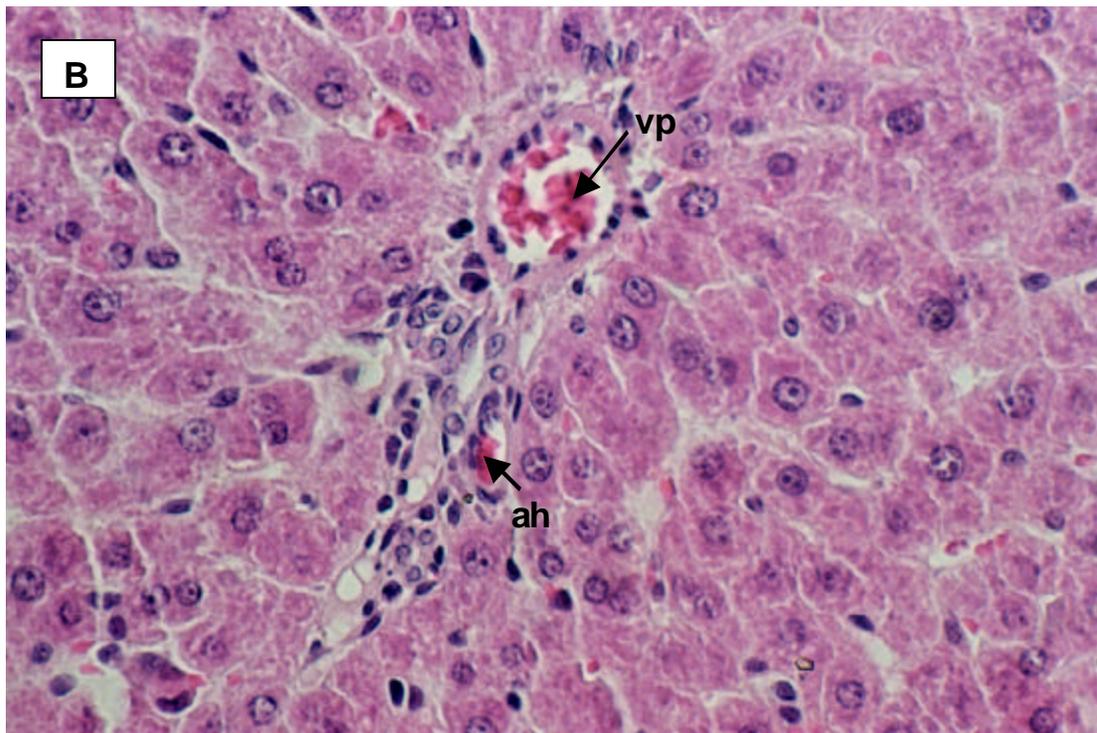


Fig. 12B Fotomicrografia do tecido hepático do rato Wistar após a administração do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) v.o, de 12/12 hs, durante 4 dias consecutivos (H.E. 400x). Observar artéria hepática (ah) e veia porta (vp).

Na Figura 12 C podemos observar o ducto biliar, a artéria hepática, os hepatócitos na forma poliédrica, os sinusóides hepáticos na região do espaço porta.

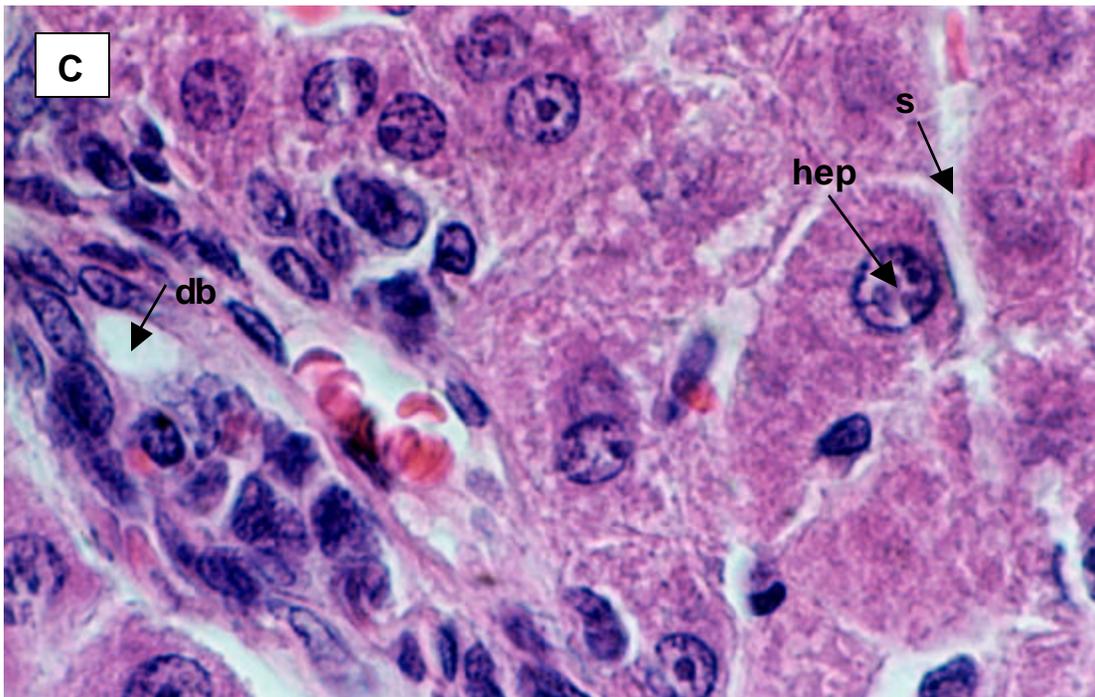


Fig. 12C Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após administração do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) v. o de 12 em 12hs, durante 4 dias consecutivos . (H.E. 1000x). Observar ducto biliar (db), hepatócito (hep) e Espaço sinusóide (s).

4.7.3 Estudo histomorfológico do fígado de rato do grupo zed + Acp

A Figura 13A, B, e C ilustra o tecido hepático do grupo com tratamento zed + Acp, com aumento de 100x , 400x e 1000x respectivamente.

Na fig.13 A podemos observar a visão geral do tecido hepático com congestão do espaço porta hepático.

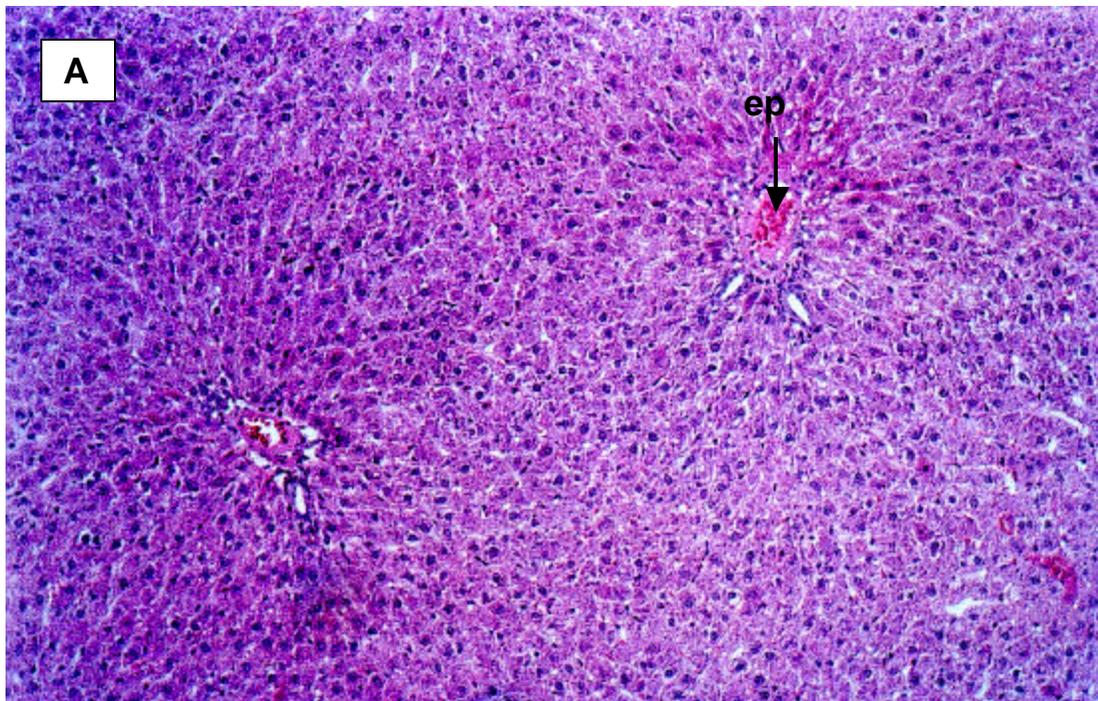


Fig. 13A Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) v.o .,de 12 em 12 hs, durante 4 dias consecutivos e após 1 hora da última dose do extrato, foi administrado Acp (650mg/kg) por 24 hs . (H.E. 100x). Observar espaço porta (ep).

Na figura 13B podemos observar a presença área mais corada, os parenquimas dos hepatócitos íntegros, caracterizando hepatoproteção.

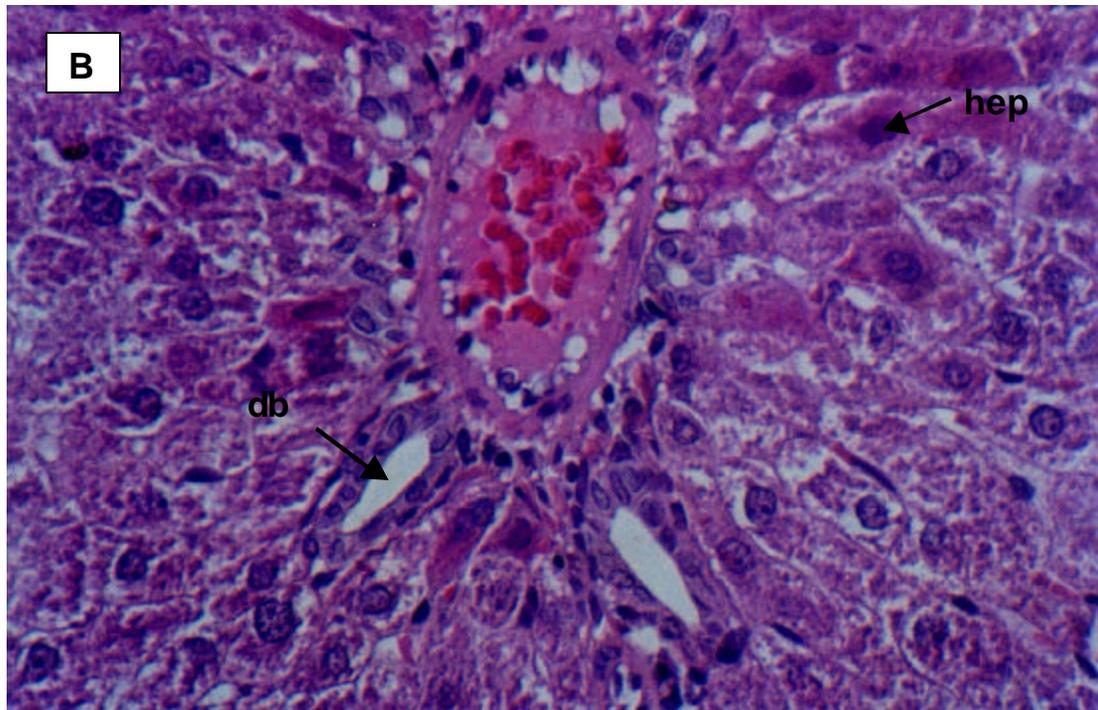


Fig. 13B Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) v.o de 12 em 12 hs, durante 4 dias e após a última dose do extrato foi administrado Acp (650mg/kg) v. o . por 24 hs. (H.E. 400x). Observar os hepatócitos (hp), ducto biliar (db).

Na figura 13C Em aumento de 1000x podemos observar o citoplasma dos hepatócitos com aspecto floculado caracterizando hepatoproteção celular.

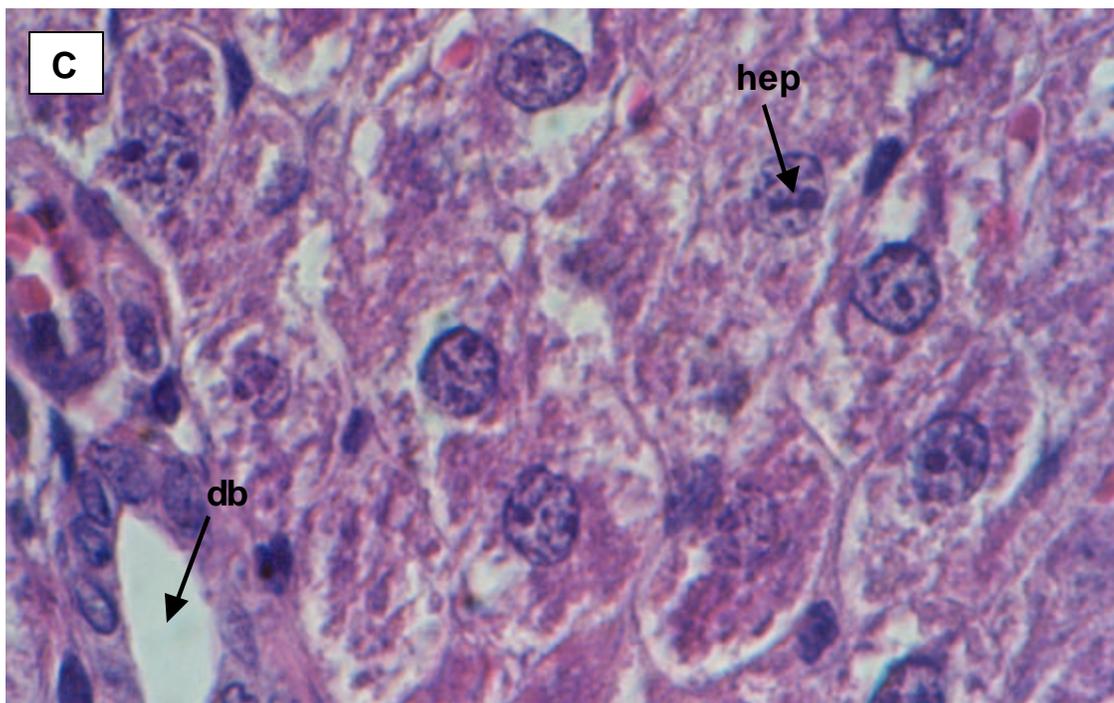


Fig. 13C Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) v. o de 12 em 12 hs, durante 4 dias consecutivos e após 1 hora da última dose a administração do Acp (650mg/kg) v.o . por 24 hs. (H.E. 1000x). Observar o ducto biliar (db) e hepatócito (hep).

4.7.4 Estudo histomorfológico do fígado de rato do grupo Acp

A figura 14A, B e C ilustram o tecido hepático do grupo tratado com Acp no aumento de 100x, 400x e 1000x respectivamente.

Na figura 14A podemos observar a ação tóxica do paracetamol pela presença de infiltrado inflamatório (1), com capilares sinusóides congestionados (2), e espessamento de vasos (3), caracterizando necrose.

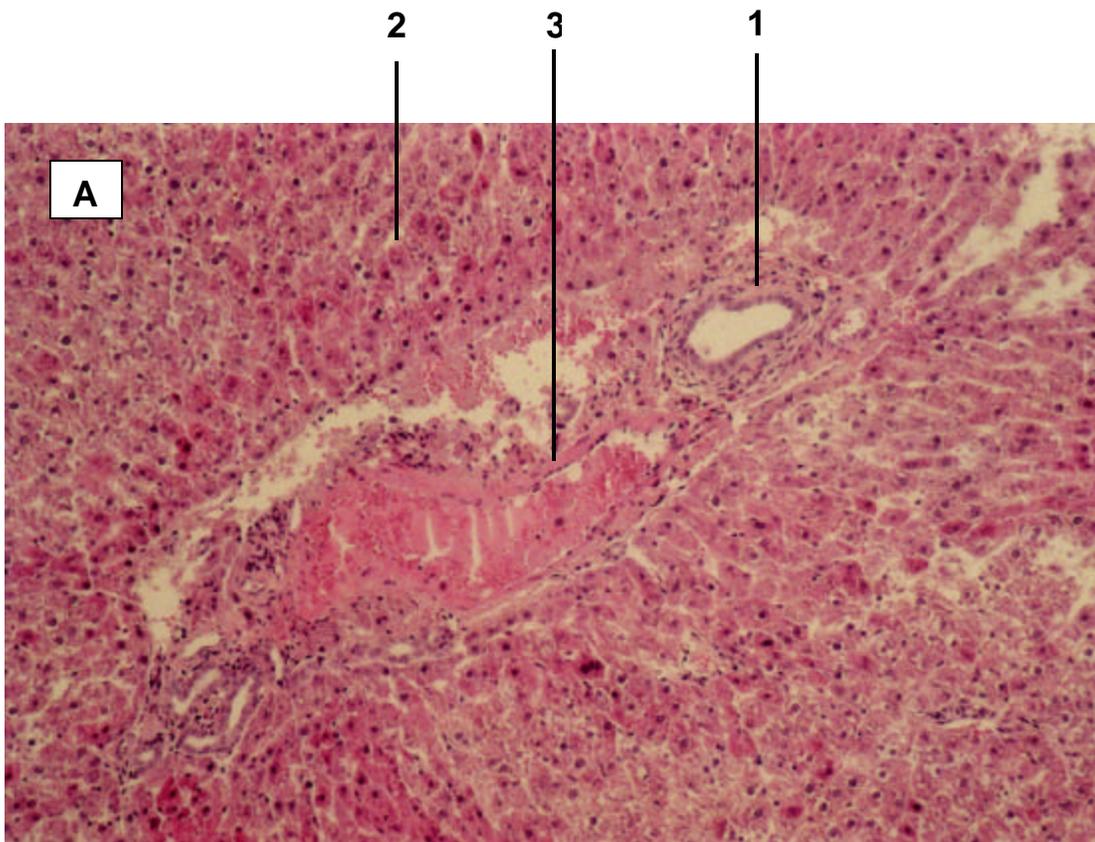


Fig. 14A Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração Acp (650mg/kg) via oral por 24 hs (H.E. 100x)

Na figura 14B podemos observar o citoplasma dos hepatócitos mais condensados e o espaço sinusóide congestionado.

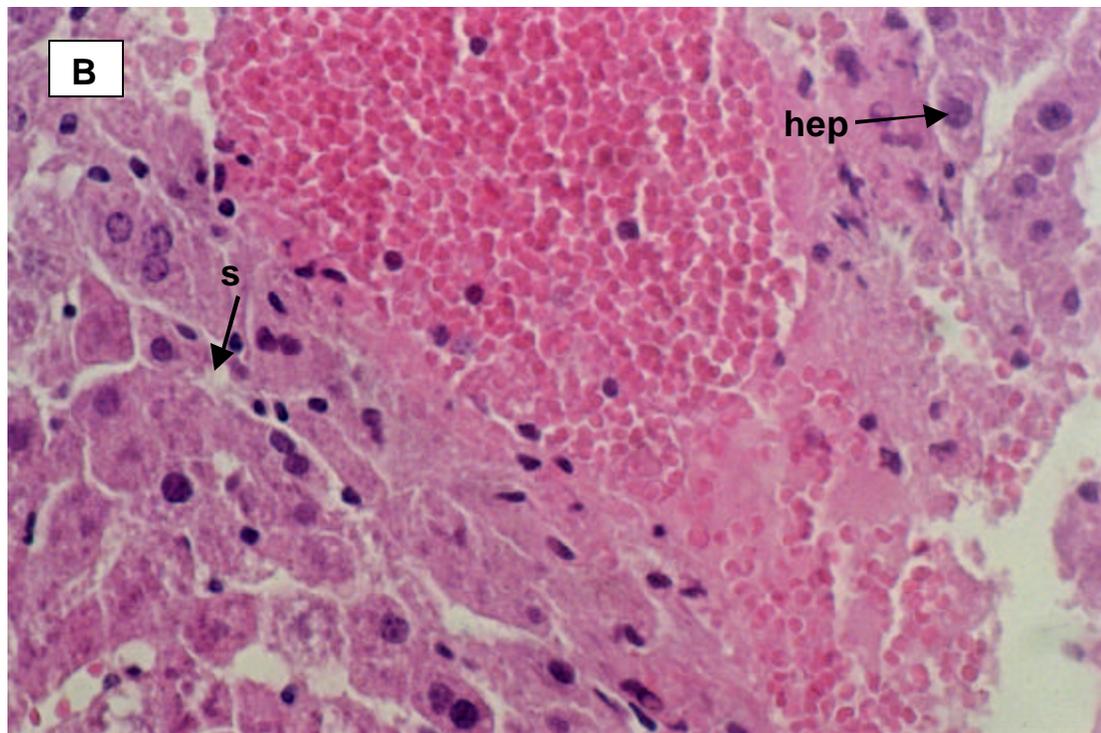


Fig. 14B Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após a administração do ACP (650mg/kg) por 24 hs (H.E. 400x) Observar espaço sinusóide(ep), Hepatócito (hep).

Nesta figura 14C podemos observar o desarranjo citoplasmático dos hepatócitos, proliferação dos ductos biliares, espaços sinusoides congestionados caracterizando necrose .

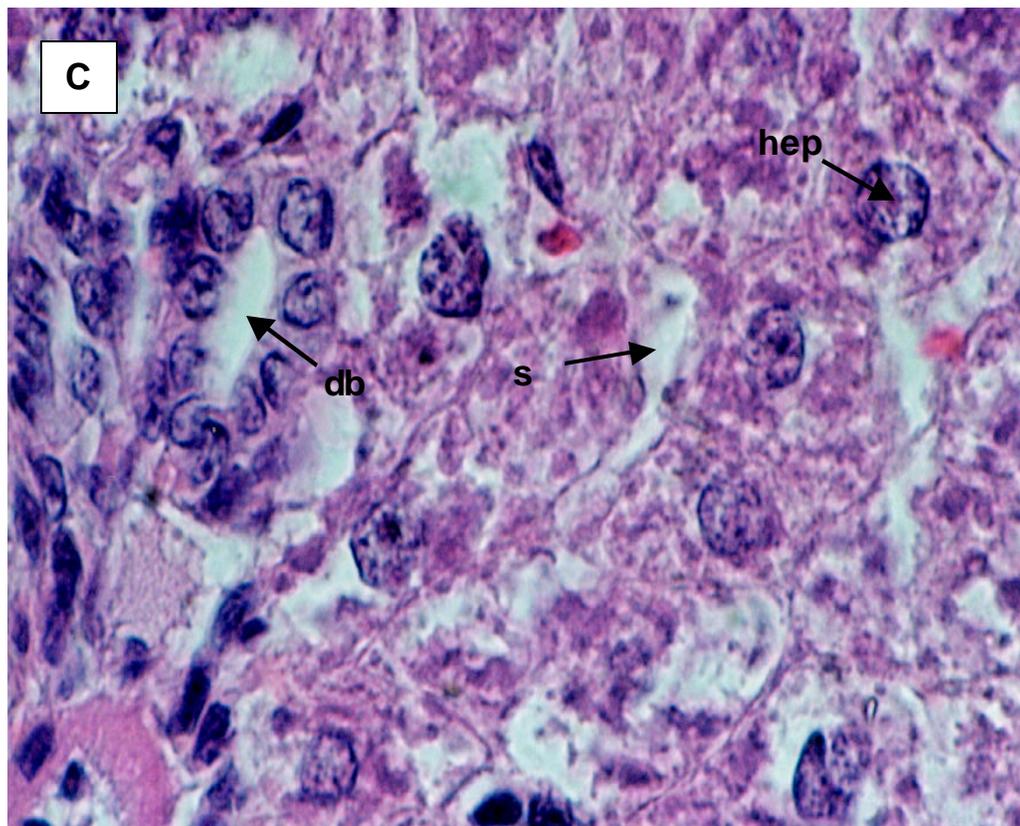


Fig. 14C Fotomicrografia do tecido hepático do rato macho tipo Wistar após administração do ACP (650mg/kg) por 24 hs. (H.E. 1000x). Observar espaço sinusóide (es) , ducto biliar (db) e hepatócitos.

5. DISCUSSÃO

Desde de 1950 tem se procurado testes de avaliações das condições do fígado. As determinações bioquímicas prontamente disponíveis e usadas universalmente são os testes das transaminases (ALT e AST) e Fosfatase Alcalina (FA) (SCHAFFNER ; SCHAFFNER, 1991). As aminotransferases são indicadores de integridade celular e são enzimas intracelulares. As provas de laboratório para medir essas enzimas baseiam-se na ação sobre diferentes substratos que no final vão fornecer os substratos alanina glutamato ou aspartato.

O resultado do presente estudo sobre a hepatoproteção da *Curcuma zedoaria* foi avaliado através das provas bioquímicas – as transaminases (ALT e AST) e FA, bem como da análise microscópica do tecido hepático.

Diversos trabalhos sobre hepatoproteção com plantas medicinais correlacionaram os parâmetros bioquímicos com análise histológica, como Hessel et al., (1996), Jayasekhan et al., (1997), Ali et al., (2001) e Hewawasam et al., (2003). Segundo Gayotto e Alves (2001) apenas o resultado bioquímico não é suficiente e muitas vezes só pode ser confirmado pelo exame histopatológico de fragmento do tecido hepático.

Sabe-se que o paracetamol em doses tóxicas provoca lesão no fígado através da ação do metabólito tóxico N-acetil-p-benzoquinonaimine (NAPQI), pela ação sobre citocromo P-450 do sistema enzimático. Segundo Gayoto e Alves (2001), quando o paracetamol é administrado em doses terapêuticas, o NAPQI formado é rapidamente conjugado ao glutation intra-hepático que protege as macromoléculas da ligação covalente com NAPQI, e da oxidação.

Doses tóxicas de paracetamol causam lesão hepática potencialmente fatal em decorrência da saturação das enzimas de conjugação normais, fazendo com que a droga seja convertida por oxidases de função mista em N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI). Este NAPQI, se não for inativada por conjugação com glutation, reage com proteínas celulares e causa a morte celular (RANG et al., 2001). Possivelmente no grupo Zed+Acp, a zedoaria protegeu as macromoléculas da ligação NAPQI e da oxidação, diminuindo a lesão hepática produzida por altas doses de paracetamol. Pelas análise

histológicas podemos observar que houve uma preservação dos parênquimas dos hepatócitos, caracterizando hepatoproteção.

O paracetamol em doses elevadas (650mg/kg) é uma substância considerada hepatotóxica previsível ou seja induz a lesão hepática em curto espaço de tempo e sendo dose dependente ocorre uma agressão regular, ou seja, pode ser reproduzido em modelos animais. (KALIL et al., 2001).

A ALT é a enzima mais utilizada para medir o processo inflamatório ou necrótico do fígado. A ALT é encontrada no fígado e está localizada no citosol da célula hepática (SHAFFNER; SCHAFFNER, 1991). Quando existe alguma alteração do hepatócito esta enzima libera-se facilmente do citoplasma. Ao compararmos a atividade enzimática plasmática do grupo Zed+Acp (69.60 ± 3.98) com o grupo Controle (53.55 ± 2.06) podemos observar que não ocorreu uma redução da atividade enzimática plasmática próximo aos valores observados no grupo controle. Já ao observarmos o grupo Acp (81.37 ± 3.26) em relação ao grupo Controle (53.55 ± 2.06) podemos observar um aumento estatisticamente significativo, caracterizando hepatotoxicidade. E ao compararmos os grupos Acp (81.37 ± 3.26) versus Zed+Acp (69.60 ± 3.98) podemos observar que houve uma redução da atividade enzimática plasmática em 15%. Esta redução da atividade enzimática plasmática da ALT demonstrou que a Zed protegeu da lesão hepática provocada pelo paracetamol, promovendo a hepatoproteção.

A enzima AST é uma enzima que se encontra tanto no citoplasma como nas mitocôndrias dos hepatócitos. Esta enzima está presente em muitos órgãos além do fígado, incluindo coração e músculos (SHAFFNER; SCHAFFNER, 1991). Segundo Gayoto e Alves (2001) a AST é muito útil na caracterização de doenças hepáticas crônicas. Os resultados para a enzima AST do grupo Zed+Acp (90.24 ± 4.70) em relação ao controle (88.30 ± 1.72) não apresentou dados estatisticamente significativos. E ao compararmos o grupo Acp (106.42 ± 5.88) em relação ao grupo Zed+Acp (90.24 ± 4.70) podemos observar que houve uma redução da atividade enzimática plasmática da AST, estando estes valores próximos ao grupo controle, caracterizando uma hepatoproteção. Resultados semelhantes foram encontrados para grupo Acp (81.37 ± 3.26) em relação ao grupo Zed+Acp (69.60 ± 3.98), onde podemos observar uma redução de 16% da atividade enzimática da AST, caracterizando hepatoproteção.

Na atividade enzimática plasmática da FA do grupo Acp (120.13 ± 2.92) em relação ao grupo controle (53.46 ± 2.30) podemos observar um aumento estatisticamente significativo, indicando hepatotoxicidade. E ao compararmos a atividade enzimática plasmática do grupo Acp (120.13 ± 2.92) em relação ao grupo Zed+Acp (91.10 ± 2.59) podemos observar que ocorreu uma redução da atividade enzimática plasmática da FA em 25%, caracterizando hepatoproteção. E ao compararmos os grupos Zed versus Acp, podemos observar também um aumento da atividade enzimática plasmática (88.40 ± 2.27 versus 120.13 ± 2.92), sugerindo que o extrato bruto na dose empregada promoveu um aumento da sua atividade.

A hepatotoxicidade representada pelo grupo tratado com Acp revelou um aumento da atividade enzimática plasmática (ALT, AST e FA) em relação aos outros 3 grupos, que veio a se confirmar pelo exames histopatológicos. Podemos observar pela análise histológica, que este grupo apresentou danos na arquitetura celular, congestão nos espaços sinusóides, infiltrado inflamatório, espessamento de vasos e proliferação dos ductos biliares, enfim a alteração celular, caracterizando necrose no tecido hepático.

Ao compararmos o grupo Controle em relação ao grupo Zed observamos que não houve nenhuma alteração histomorfológica.

6. CONCLUSÃO

A *Curcuma zedoaria* (ROSCOE) obtida em Caçapava recebeu a Certificação da planta da Casa de Agricultura de Paraibuna. E as características macroscópicas, microscópicas e morfológicas da planta apresentaram as mesmas características descritas pelo método Kato e Fischer (1996).

Ao avaliarmos a dose tóxica do paracetamol (650mg/kg) em ratos machos tipo Wistar, podemos concluir que a dose empregada promoveu hepatotoxicidade que foi detectada através do aumento das concentrações das atividades enzimáticas plasmáticas da ALT, AST e FA e pelos exames histomorfológicos.

Os resultados obtidos neste trabalho, permitiram concluir que o pré tratamento durante 4 dias com o extrato bruto da *Curcuma zedoaria* (300mg/kg) de 12/12hs em ratos submetidos a lesão hepática com paracetamol (650mg/kg) promoveu um efeito hepatoprotetor. Este resultado foram conferidos pela análise da atividade enzimática plasmática da ALT, AST e FA e pelas análises histomorfológicas. Assim em relação ao extrato bruto, podemos também concluir que o método da maceração apresentou um bom rendimento, pois o efeito hepatoprotetor da zedoaria foi satisfatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, B.H. et al, Effect of the traditional Medicinal Plants *Rhazya stricta*, *Balanitis aegyptiaca* and *Haphophyllum tuberculatum* on paracetamol induced hepatotoxicity in mice. **Phytotherapy Research Phitother. Res.** v.15,p.598-603, 2003.

ARE, C. et al., Carbon dioxide pneumoperitoneum alters acute-phase response induced by lipopolysaccharide. **Surg Endosc**, Jun 2002.

BARBOSA, R.C.C. , et al., Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos a queimadura por água fervente (escaldadura) **Acta Cir. Bras:** v.18, n.6, Nov/Dez, 2003.

BAYNES, J.; DOMINICZAK. M.H. **Bioquímica Médica.** São Paulo: Manole, 2000, 566p.

BAVEJA, R. et al.. LPS-induced imbalanced expression of hepatic vascular stress genes in cirrhosis: possible mechanism of increased susceptibility to endotoxemia. **Shock**, v.17, n.4, p.316-21, Apr 2002.

BAVEJA, R. et al., Endothelin 1 impairs oxygen delivery in livers from LPS-primed animals.**Shock**, v.17, n.5,p.383-388, May 2002.

BOULARES, A.H. , Ren T., Mechanism of acetaminophen – induced apoptosis in cultured cells. Roles of caspase-3, DNA fragmentation factor and the Ca²⁺ and Mg²⁺ endonuclease DNA S1L3. **Basic Clin Pharmacol. Toxicol.** v.94, n.1, p. 19-29, 2004.

Noções sobre Fitoquímica. In: BOTSARIS, A.S., MACHADO, P.V., **Memento terapêutico.** Rio de Janeiro: Flora Medicinal, 1999, p. 18-19.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA) **Princípios Éticos na Experimentação Animal**, São Paulo, 1991.

CHAE, H. et al. Inhibitory Effects of Natural Sesquiterpenoids isolated from the rhizomes of *Curcuma zedoaria* on prostaglandin E2 e nitric oxide production. **Letter Planta Med** , p.545-547, 2002.

COLICHON, A. et al. Métodos diagnósticos: Provas de função hepática. Em: GAYOTTO, L.C.C. E ALVES, V.A.F.(ed.) **Doenças do fígado e vias biliares**, São Paulo: Atheneu, 2001, p. 139-150.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, , 1986. 3v.

CREMONESE, R.V. et al., Cirrose Experimental induzida pela inalação de tetracloreto de amoneo: adaptação de técnica e avaliação da peroxidação lipídica. **Arq. Gastroenterol**, v.38, n.1, jan/mar, 2001.

EUN-JEON, P. et al., Protective Effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon Tetrachloride. **J. Pharm. Phatmacol**. v.52, p.437-440, 2000.

ECHARD, B.W. et al., Hepatoprotective ability of a novel botanical formulation on mild liver injury in rats produced by acute acetaminophen and/ or alcohol ingestion. **Res.Commun Mol Pathol Pharmacol**. v.110, n.1-2, p.:73-85. Jul-Aug, 2001.

FICKER, C.E. et al. Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberacea used by Kenyah . **J. Ethnopharmacology** . v.85, n.2-3, p. 289-93, Apr 2003.

FIDECKA, S. Opioid mechanisms og some behavioral of effects of ketamina . **Pol. J. Pharmacol Pharm**. v.39, n.4, p.353-60, Jul-Aug 1987.

GAYOTTO, L.C.C., ALVES, V.F. **Doenças do Fígado e Vias Biliares**. São Paulo: Atheneu , 2001.

GOODMAN, S.L.; GILMAN, A. 1996. **The pharmacology basis of therapeutics.** 9.ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996, 1436p.

GUO-QING et al. Expression of lipopolysaccharide binding protein and its receptor CD14 in experimental alcoholic liver disease. **World J. Gastroenterology** , v.7,n.6,p. 836-840, Dec 2001.

GUPTA, S.R.; BANERJEE, A.B.; ACHARI, B. Isolation of Ethyl p-metoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. **Lloydia.** v.39,n.4, p.218-22, Jul-Aug 1976.

GUTIÉRREZ-SALINA, J. et al . Redox state and energy metabolism during liver regeneration; alterations produced by acute ethanol administration. **Biochemical Pharmacology**, v.58, p.1831-1839, 1999.

HESSEL, G. et al., Correlation between the severity of acute hepatic necrosis induced by acetaminophen na serum aminotransferase levels in fastes and sucrose-fed rats. **Brazilian Journal of Medical and biological Research** v.29, p. 793-796.1996.

HEWAWASAM, R. P. et al., Protective effect of *Astecantha longifolia* extract in mouse liver injury by carbon tetrachloride and paracetamol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** n.55, p. 1413-1418.2003.

HONG, C.H. et al. Sesquiterpenoids from the rhizome of *Curcuma zedoaria*. **Arch. Pharm. Res.**, v.24, n.5, p.424- 426 Oct. 2001.

HONG, et al., Evaluation of natural products on inhibition of inducible ciclooxigenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. **J Ethnopharmacology** ,v.83, n.1-2, p.153-9, Nov 2002.

JANBAZ, et al. Protective effect of rutin of paracetamol and CCl₄ induced hepatotoxicity in rodents, **Fitoterapia**, v.73, n.7-8, p.557-563, Dec.2002.

JANG, M.K.; SOHN, D.H.; RYU, J.H., A curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF-alpha release from Curcuma zedoaria. **Planta Med**, v.67, n.6,p.550-552, Aug. 2001.

JAYASEKHAN, P. et al. Hepatoprotective activity of acetate extract of Acacia catechu. **Indian Journal of Pharmacology**. v.29, p. 426-428 , 1997.

JAYAPRAKASHA, G.K. et al. Improved HPLC method for the determinatio of curcumin, demethoxycurcumin e bisdesmethoxycurcumin. **J Agric. Food Chem**, v.50, n13, p. 3668-72, Jun 19, 2002.

JONES, L.M.; BOOTH, N.H.; MCDONALD, L.E. **Farmacologia e terapeutica veterinária**. 4.ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1987, 1000p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Basica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KALIL, A N.; COELHO, J.; STRAUS, E. **Fígado e Biliares** . Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

KATO, E.T.M; FISCHER, D.C.H. Estudo morfo-histológico e cromatográfico em camada delgada comparativo de raízes e de rizomas de Curcuma zedoaria (bergius) Roscoe- Droga, óleo essencial e extrato fluido. **Revista de Farmácia e Biologia**, v.14, n.2, p. 9-26, Jul/dez 1996.

KIM, K.L. et al., Antitumor, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from curcuma zedoaria. **Mol. Cells**, v.10, n.4, p.:392-398, 2000.

_____. Effects of polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.65, n.11, p. 2369-77, Nov 2001.

KONO, T. et al., Protective effect of pretreatment with low-dose lipopolysaccharide on D-galactosamine-induced acute liver failure. **Int J Colorectal Dis**, v.17, n.2, p.98-103, Mar. 2002.

LATIF, M. et al., Toxicity of shoti (Indian arrowroot): *Curcuma zedoaria* for rats and chicks. **Br. J. Nutr**, v.41, n.1, p. 57-63, 1979.

LIN, C.C.; HUANG, P.C; LIN, J.M., Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. **Am J Chin Med.**, v. 28, n.1, p. 87-96, 2000.

LIN, S.C. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine: *Wedelia chinensis* on three hepatotoxin-induced hepatotoxicity. **Am J. Chin. Med.**, v. 22, n.2, p. 155-68, 1994.

LIN, S.C. et al., Protective and therapeutic effects of *curcuma xanthorrhiza* on hepatotoxin-induced liver damage. **AM. J.Chin. Med.**, v.23, n.3-4, p.243-254, 1995.

LORES, A. et al., Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. **Free Radic Biol. Med.**, v.19, n.3, p.303-310. Sep 1995.

LUKITA-ATMADJA, W. et al., Effect of curcuminoids as anti-inflammatory agents on the hepatic microvascular response to endotoxin. **Shock**, v.17, n.5, p.399-403, May 2002.

MAROTTA, F. et al. Hepatoprotective effect of curcumin/absinthium compound in experimental severe liver injury. **Chinese Journal of Digestive Diseases**, v.3, n.4, p. 122, oct, 2003.

MATSUDA, H. et al., Inhibitory effect and action mechanism of sesquiterpenes from Zedoarie Rhizoma on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.8, n.4, p. 339-344, Feb. 1998.

_____. Hepatoprotective constituents from Zedoarie Rhizoma: Absolute stereostructures of three new carabrane-type sesquiterpenes, curcumenolactones A, B, and C. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v.9, n. 4, p. 909-916, 2001.

MELLO, M.O.; AMARAL, A.F. C.; MELLO, M. Quantificação da micropropagação de Curcuma zedoaria Roscoe. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 703-707, out.-dez. 2000.

MESA, M.D. et al., Efeitos farmacológicos y nutricionales de los extractos de Cucuma longa y de los curcuminoide. **Ars Pharmaceutica**, 41(3) 307-321, 2000.

NAVARRO, de D. et al., Phytochemical and analysis and analgesic properties of Curcuma zedoaria grown in Brasil. **Phytomedicine** v.9 , n.5, p. 427-32 jul 2002.

O'BRIEN, P.J.; SLAUGHTER, M.R; SWAIN, A.; BIRMINGHAM, R.W.; ELCOCK, F.; BUGELKI, P.J. Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system. **Hum Exp Toxicol** , v.19, n5, p.277-83, May 2000.

PORRO, C.A. et al., Effects of ketamine anesthesia on central nociceptive processing in the rats: a 2-deoxyglucose study. **Neuroscience**, v.125, n.2, p.485-494,2004

PRISTA, L.N. et al., **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica** . Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981, 3v.

RANA, A.C.; AVADHOOT, Y. Experimental evaluation of hepatoprotective activity of *Gymnema sylvestre* and *Curcuma zedoaria*. **Fitoterapia**, v.63, n.1, p.60-62,1992.

RANG, H.P. et al., **Farmacologia** .4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 703p.

RAY, S.D. et al., Early loss of large genomic DNA in vivo with accumulation of Ca²⁺ in the nucleus during acetaminophen-induced liver injury. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.106, n.2, p. 346-351, nov 1990.

_____. Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. **Faseb J.**, v.7, n.5, p.:453-463, Mar 1993.

RAVEN, P.H. et al., **Biologia Vegetal** . 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001

REVISTA Pesquisa Fapesp , São Paulo, n. 99, p.44, maio 2004

ROSS, Michael H. **Histologia: texto e atlas** . 2.ed..São Paulo: Panamericana ,1993.

ROSEN, G.M. et al., Acetaminophen hepatotoxicity. Na Alternative mechanism. **Biochem Pharmacol** . v.32, n.13, p.2053-2059, Jul 1983.

SERTIE, J.A.A. et al., Preventive anti-ulcer activity of the rhizome extract of Zingiber officinale. **Fitoterapia**, v.63, n.1, 1992.

SCHAFFNER, J.A.; SCHAFFNER, F. Avaliação das condições do fígado. In: HENRY, R. J. **Bioquímica Clínica**. Barcelona: Ed. Jims, 1991.

SINGHAL, S.S. et al., The effect of curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. **Toxicol Lett** , v.109, n.1-2, p.87-95, Sep 20, 1999.

STOYANOVSKY, D.A. , Cedebaum A. Metabolites of acetaminophen trigger Ca²⁺ release from liver microsomes. **Toxicol. Lett.** , v.106, n.1, p.23-29, May, 20, 1999.

SYU, W.J. et al., Citotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from Curcuma zedoaria. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 12, p. 1531-1534, 1998.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium**, Compêndio de Fitoterapia. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317p.

THABREW, M.I. et al. Protective effects of *Osbeckia octandra* against paracetamol-induced liver injury. **Xenobiotica** . v.25, n.9, p.1009-1017, Sep 1995.

THEOCHARIS, E.S., et al Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: na immunohistochemical study. **Toxicology**, v.161, p. 129-138, 2001.

UDEM, S.C. et al., Anti-hepatotoxic effects of the ethanolic extracts of *Combretum dolichopetalum* root bark and *morinda lucida* leaf. **Fitoterapia**. v. 68, n.1, p. 21-25, 1997.

WHEELER, M.D. et al., Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. **J. Biol. Chem**, v. 276, n.. 39, p. 36664-36672, Sep. 2001.

YAMANE, M.; ABE, A. , High performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry of 5,6-dihydroxyeicosatrinoate- 1,5 – lactone from tissue homogenates. **Journal of Chromatography B**, v.678, p. 339-343,1996.

YOSHIOKA, T. et al., Antiinflammatory potency of dehydrocurdione, a zedoary – derived sesquiterpene. **Inflamamation Res.**, v.47, n.12, p. p.476-481, dec 1998.

ZARAGOZA, A.; ANDRÉS, D.; SARRION, D. Potentiation of hioacetmide hepatotoxicity by phenobarbital, pretreatment in rats. Induibility of Fad monooxygenase system and age effect . **Chemico- Biologica Interactios**, v.124,p.87-101, 2000.