

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**YASMIN VENDRUSCOLO PITON**

**Avaliação da citotoxicidade e hepatoproteção de  
*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, Asteraceae (marcela)  
em células HepG2**

**PORTO ALEGRE, 2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

YASMIN VENDRUSCOLO PITON

**Avaliação da citotoxicidade e hepatoproteção de  
*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, Asteraceae (marcela)  
em células HepG2**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito à obtenção do grau de  
Farmacêutico.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath**

**PORTO ALEGRE, 2023**

## RESUMO

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC é uma planta nativa da América do Sul e popularmente conhecida como “marcela”. *A. satureioides* é amplamente utilizada para problemas gástricos, hepáticos e digestivos, através da infusão de suas partes aéreas. Estudos sobre a planta têm demonstrado atividades diversas, como hepatoproteção, ação anti-inflamatória, sedativa, antioxidante, entre outras. Os principais constituintes da “marcela” são os flavonoides quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e aquiróbichalcona. O objetivo deste estudo foi avaliar a segurança da planta, investigando *in vitro* o efeito citotóxico dos extratos aquoso e etanólico, bem como de seus produtos isolados (quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e aquiróbichalcona) e também o efeito hepatoprotetor frente aos danos induzidos pelo paracetamol, em células de hepatoblastoma humano HepG2. Foram utilizadas as inflorescências de *A. satureioides* para o preparo dos extratos aquoso e etanólico e as concentrações testadas foram de 0,1, 1, 5 e 10 µg/mL e dos produtos isolados, 10, 25, 50 e 100 µM. A citotoxicidade foi avaliada a partir dos testes de redução do MTT e incorporação do vermelho neutro. Para avaliação da atividade hepatoprotetora, os extratos aquoso e etanólico e o produto isolado quercetina foram co-incubados com paracetamol 30 mM, durante 3 h e a avaliação da morte celular foi feita pelo teste de redução do MTT. Foi observado que ambos os extratos não apresentaram atividade citotóxica, apenas os produtos isolados demonstraram citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100 µM. O efeito protetor foi observado nas concentrações de 5 e 10 mg/mL para os extratos, e nas concentrações de 50 e 100 µM para quercetina. Reforçando assim, os efeitos hepatoprotetores de *A. satureioides* e de seu isolado quercetina.

**Palavras-chave:** uso popular; citotoxicidade; hepatoproteção, *Achyrocline satureioides*

## ABSTRACT

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC is a plant native to South America and popularly known as “marcela”. *A. satureioides* is widely used for gastric, liver and digestive problems, through the infusion of its aerial parts. Studies on the plant have demonstrated diverse activities, such as hepatoprotection, anti-inflammatory, sedative, antioxidant action, among others. The main constituents of “marcela” are the flavonoids quercetin, luteolin, 3-O-methylquercetin and achyrobichalcone. The aim of this study was to evaluate the safety of the plant, investigating *in vitro* the cytotoxic activity of aqueous and ethanolic extracts, as well as of its isolated products (quercetin, luteolin, 3-O-methylquercetin and achyrobichalcone) and also the hepatoprotective activity against paracetamol-induced damage in HepG2 human hepatoblastoma cells. Inflorescences of *A. satureioides* were used for the preparation of aqueous and ethanolic extracts and the tested concentrations were 0.1, 1, 5 and 10 µg/mL and 10, 25, 50 and 100 µM of the isolated products. Cytotoxicity was evaluated using MTT reduction and neutral red incorporation tests. To evaluate the hepatoprotective activity, the aqueous and ethanolic extracts and the isolated quercetin product were co-incubated with 30mM paracetamol for 3 h and the cell death was evaluated through the MTT reduction assay. It was observed that both extracts did not show cytotoxic activity, only the isolated products showed cytotoxicity at concentrations of 50 and 100 µM. The protective effect was observed at concentrations of 5 and 10 mg/mL for the extracts, and at concentrations of 50 and 100 µM for quercetin. Thus reinforcing the hepatoprotective effect of *A. satureioides* and its isolate quercetin.

**Keywords:** popular use; cytotoxicity; hepatoprotection, *Achyrocline satureioides*

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>6</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiais e métodos</b>	<b>10</b>
3.1. Reagentes	10
3.2 Coleta de material vegetal	10
3.3 Obtenção dos extratos	10
3.4 Avaliação do perfil de citotoxicidade	10
3.4.1 Cultura celular	10
3.4.2 Testes de citotoxicidade	10
3.4.3 Teste de redução do MTT	11
3.4.4 Teste de incorporação do vermelho neutro (VN)	12
3.4.5 Análise da atividade hepatoprotetora	12
3.5 Análise estatística	12
<b>4. Resultados e discussão</b>	<b>13</b>
4.1 Citotoxicidade	13
4.2 Hepatoproteção	16
<b>5. Conclusão</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>19</b>

## 1. Introdução

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, Asteraceae, é uma planta nativa da América do Sul, mais comum na região que percorre os estados de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, e popularmente conhecida como “marcela” ou “macela”. A planta cresce preferencialmente em solos arenosos ou pedregosos e em terrenos montanhosos ou planos (Retta et al., 2012). *A. satureioides* é tradicionalmente utilizada pela população para problemas gástricos, hepáticos e digestivos. O uso medicinal popular se dá pela infusão de suas partes aéreas, bem como na forma de decocção e maceração, para problemas digestivos e respiratórios, além de também ser utilizada como anti-inflamatório e sedativo. No Rio Grande do Sul, o chá de *A. satureioides* é mais utilizado para o tratamento de problemas gástricos (da Silva et al., 2007).

Estudos sugerem que *A. satureioides* possua atividade hepatoprotetora e colerética (Kadarian et al., 2002), anti-inflamatória, analgésica, miorelaxante, sedativa e antiespasmódica (Simões et al., 1986; Simões et al., 1988a; De Souza et al., 2007), ação depressora central (Simões et al., 1986), antiúlcera gástrica (Santin et al., 2010), antioxidante (Leal et al., 2006), citoprotetora (Arredondo et al., 2004) e anti-hiperglicemiante (Carney et al., 2002). Os flavonoides são os principais constituintes ativos da planta, mas também é descrita a presença de outros componentes como o aquinofurano, um dibenzofurano responsável pelo efeito anti-hiperglicemiante (Retta et al., 2012).

Os principais flavonoides são quercetina, luteolina, e 3-O-metilquercetina, associados com a alta capacidade antioxidante da *A. satureioides* (Polydoro et al., 2004). A quercetina é o principal flavonoide encontrado em diversos estudos conduzidos com a planta, que relatam suas propriedades relacionadas com a inibição da peroxidação lipídica, eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e quelação de íons metálicos responsáveis pela geração de EROS (Polydoro et al., 2004). Além disso, Martínez-Busi et al (2019) sugere uma atividade neuroprotetora mais eficaz para a quercetina do que para a luteolina, já a 3-O-metilquercetina não demonstrou efeito neuroprotetor.

Mais recentemente, foi relatada a identificação de um novo constituinte com atividade importante em *A. saturoioides*, a aquirobichalcona (Holzshuh et al., 2010). As chalconas são caracterizadas por apresentarem atividade antimalárica (Li et al., 1995), citotóxica, anti-inflamatória e anticancerígena (Singh et al., 2014; Patil et al., 2009).

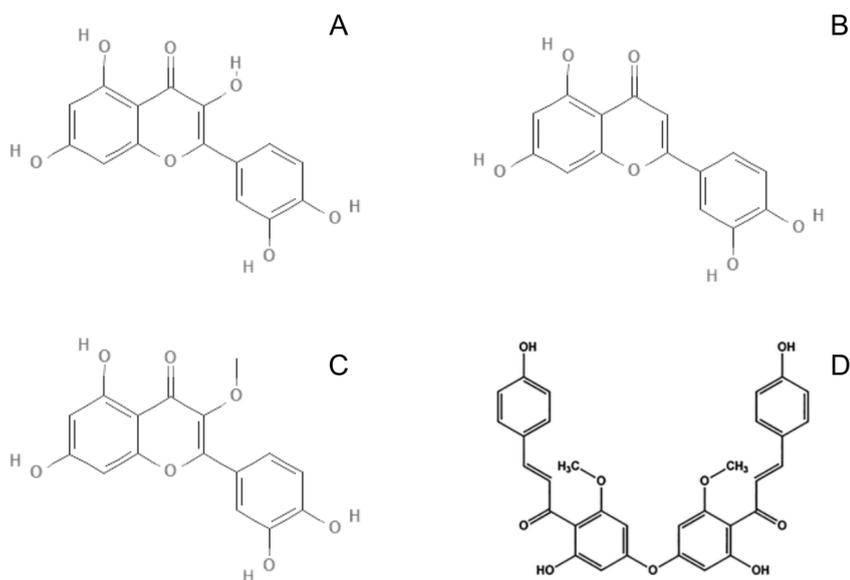


Figura 1: Principais componentes encontrados em *A. saturoioides*: quercetina (A), luteolina (B), 3-O-metilquercetina (C) e aquirobichalcona (D).

O fígado é um dos mais importantes órgãos do corpo devido ao seu papel de regulação de diversos processos fisiológicos, além de estar envolvido em funções vitais como o metabolismo, excreção e armazenamento. Sendo assim, as disfunções hepáticas podem desempenhar importantes e graves danos ao corpo humano e desencadear doenças que impactam o sistema de saúde. Os principais causadores de danos hepáticos são os xenobióticos, em principal o paracetamol e o álcool. Os danos aparecem, em grande parte, por danos oxidativos como a esteatose e a hepatite alcoólica e, em casos mais graves, cirrose hepática (Adewusi e Afolayan, 2010).

Existe uma forte crença na população de que produtos, por serem naturais, não apresentam qualquer efeito prejudicial à saúde, são seguros e uma forma barata e eficaz de tratar enfermidades, sendo comum a associação de produtos naturais com a terapia convencional, sem nenhum tipo de restrição. Porém, é fundamental

que a planta utilizada seja conhecida e corretamente identificada, para não causar qualquer prejuízo à saúde do paciente (Campos et al., 2016).

Neste trabalho, foi investigado o efeito dos extratos aquoso e etanólico da “marcela” e seus flavonoides isolados, em células hepáticas, a fim de validar a segurança da planta usada popularmente no Brasil, normalmente por meio da infusão das partes aéreas, decocção ou maceração.

## **2. Objetivo**

O presente estudo teve como principais objetivos investigar a citotoxicidade e atividade hepatoprotetora *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico de *A. saturoioides*, bem como, de seus produtos isolados (quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e aquiobichalcona) em células de hepatoblastoma humano HepG2.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Reagentes**

Foram utilizados os extratos aquoso e etanólico de *A. saturoioides*, obtidos através de processos de decocção e maceração, respectivamente. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo-se os extratos em DMSO, não ultrapassando 0,1% de solvente, nas concentrações de 10.000 e 1.000 µg/mL. Os produtos isolados luteolina, aquirobichalcona e 3-O-metilquercetina foram obtidos da Isobio - Tecnologia em Produtos Naturais - LTDA (Porto Alegre, RS, BR). A quercetina foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os isolados foram dissolvidos em DMSO e preparados em solução estoque com concentração de 100 mM. Dulbecco Modified Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina, anfotericina, tripsina-EDTA, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-brometo de 5-difeniltetrazólio (MTT), corante vermelho neutro (VN), tampão fosfato (PBS), paracetamol e silimarina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Triton X-100, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e ácido acético glacial foram adquiridos da Neon (Suzano, SP, BR).

#### **3.2 Coleta de material vegetal**

A solicitação de autorização para coleta da espécie vegetal foi feita junto ao SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado) por meio do preenchimento do formulário online. As partes aéreas de *A. saturoioides* foram coletadas em abril de 2019, no Jardim Botânico de Porto Alegre - RS. A identificação botânica da espécie vegetal foi realizada pela botânica Priscila Ferreira (FZB-RS) e o espécime da exsicata foi depositado no herbário do Jardim Botânico (HAS 94412). Após a coleta, a planta foi seca naturalmente ao abrigo da luz solar e posteriormente foi triturada e acondicionada para posterior preparação dos extratos.

#### **3.3 Obtenção dos extratos**

Os extratos etanólico e aquoso foram preparados na proporção (1:10 e 1:100 p/v, respectivamente) com as partes aéreas do material vegetal seco e triturado. Os extratos alcoólicos foram preparados por maceração e os aquosos por decocção. A

proporção de droga: solvente empregada é a mesma definida no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 2a Ed. (2021) para preparações obtidas desta espécie.

### **3.4 Métodos de cultura celular**

#### **3.4.1 Cultura celular**

Células de hepatoblastoma humano HepG2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e regularmente cultivadas em frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, utilizando meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica. As células foram mantidas em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. O meio foi trocado a cada 2-3 dias. Ao atingirem a confluência de 70-80%, as células foram subcultivadas após tripsinização (0,25% de tripsina/1 mm EDTA). Os experimentos foram realizados em um máximo de 10 passagens. Para a realização dos experimentos, as células foram semeadas na densidade de 30.000 células/poço em placas de 96 poços, com volume final de meio de cultura de 100 µL/poço, para obter uma monocamada confluenta em 24 h.

#### **3.4.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro***

As células foram incubadas com 0,1, 1, 5 e 10 µg/mL dos extratos aquoso e etanólico e nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µM dos compostos isolados em meio de cultura celular 24h após o plaqueamento. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo o estoque em meio de cultura celular. As concentrações de DMSO no meio de cultura não ultrapassaram de 0,1%, nessa situação. Em todos os experimentos foi utilizado um controle de solvente a 0,1% de DMSO em meio de cultura. As substâncias foram testadas em três experimentos independentes e cada concentração foi testada em 3 réplicas dentro de cada ensaio.

#### **3.4.3 Teste de redução do MTT**

O teste de redução do MTT mede a atividade de desidrogenases celulares, um indicador de células metabolicamente ativas, e foi usado para estimar a viabilidade celular. Após as 24h de exposição, as células foram mantidas a 37°C com PBS contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após 2h, a solução de MTT foi retirada e o DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi medida em 585 nm em um leitor de placas (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5,

Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como porcentagem de morte celular em relação ao controle versus concentração.

#### **3.4.4 Teste de incorporação do vermelho neutro (VN)**

O vermelho neutro (VN) é incorporado por transporte passivo através da membrana plasmática da célula e armazenado dentro dos lisossomos viáveis. Portanto, células mortas não conseguem reter o corante. Após 24h de exposição, as células foram mantidas a 37°C com PBS contendo 50 µg/mL de VN. Após 2h, a solução de VN foi retirada, uma lavagem com PBS foi realizada e a lise das células foi feita com solução de 50% etanol e 1% de ácido acético glacial. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de placas. A porcentagem de morte celular em relação ao controle foi utilizada como medida de citotoxicidade.

#### **3.4.5 Análise da atividade hepatoprotetora**

Para as análises de hepatoproteção dos extratos aquoso e etanólico e da quercetina, as células HepG2 foram subcultivadas a uma densidade de 30.000 células/poço em placas de 96 poços, com volume final de 100 µL de meio de cultura por poço. Após 24h, as células foram co-incubadas com solução de paracetamol 30 mM e 0,1, 1, 5 e 10 µg/mL dos extratos e 10, 25, 50 e 100 µM do flavonoide quercetina. Silimarina 10 µg/mL foi utilizada como controle positivo. Após 3h de exposição, a viabilidade celular foi determinada usando o teste de redução do MTT. O resultado final foi expresso como três experimentos independentes, cada concentração foi testada em 3 réplicas dentro de cada experimento.

#### **3.5 Análise estatística**

Os experimentos envolvendo análises de citotoxicidade e atividade hepatoprotetora *in vitro* foram realizados de forma independente com três replicatas nas mesmas condições. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Para avaliação estatística, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram avaliados considerando a diferença média em relação ao controle. A diferença estatisticamente significativa foi estabelecida em  $p < 0,05$ . Os dados foram processados no software GraphPad Prism 5.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada a partir dos testes de redução do MTT e incorporação do VN e os resultados estão expostos nas figuras 1 e 2. As figuras mostram as concentrações testadas em relação a porcentagem de viabilidade celular.

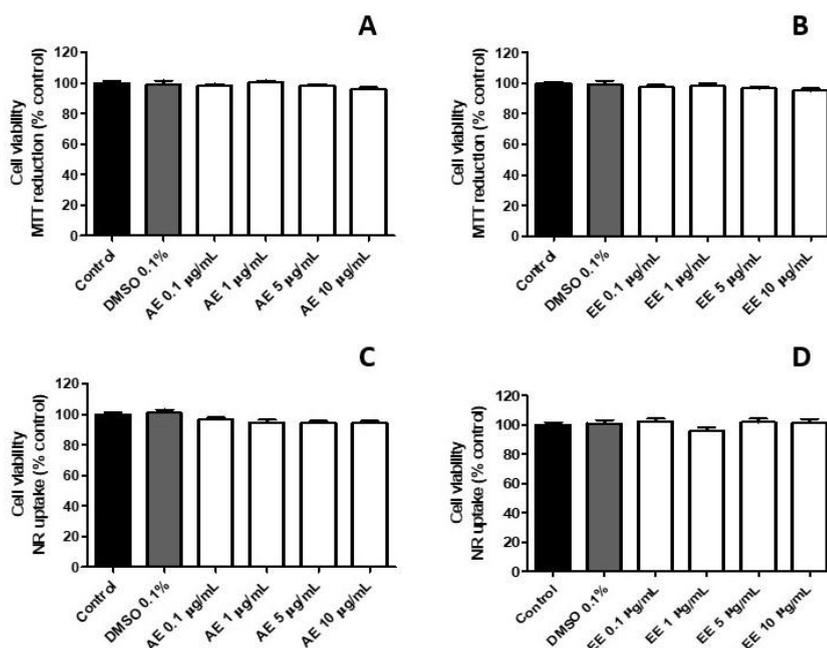


Figura 2: Citotoxicidade do extrato aquoso de *A. saturoioides* (A e C) e do extrato etanólico (B e D), nos testes de redução do MTT (A e B) e incorporação do VN (C e D). Dados analisados por ANOVA/Bonferroni - \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

A partir dos testes de viabilidade celular, observa-se que os extratos aquoso e etanólico de *A. saturoioides* não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Ruffa et al. (2001), que investigou a citotoxicidade do extrato metanólico de *A. saturoioides* em células da linhagem HepG2, determinou o valor da concentração inibitória mínima ( $IC_{50}$ ) em 237 µg/mL, após 48 horas de exposição. Outro estudo avaliou a citotoxicidade do extrato aquoso de *A. saturoioides* em linhagem celular de rim de macaco (Vero) e determinou a concentração do extrato que reduziu em 50% o número de células viáveis, pelos métodos de exclusão do azul de tripan e redução do MTT, como sendo de 1080 e 2189,5 µg/mL, respectivamente (Sabini et al., 2013). De modo geral, os resultados

dos artigos citados corroboram com os resultados apresentados, confirmando que os extratos não apresentam citotoxicidade nas concentrações testadas.

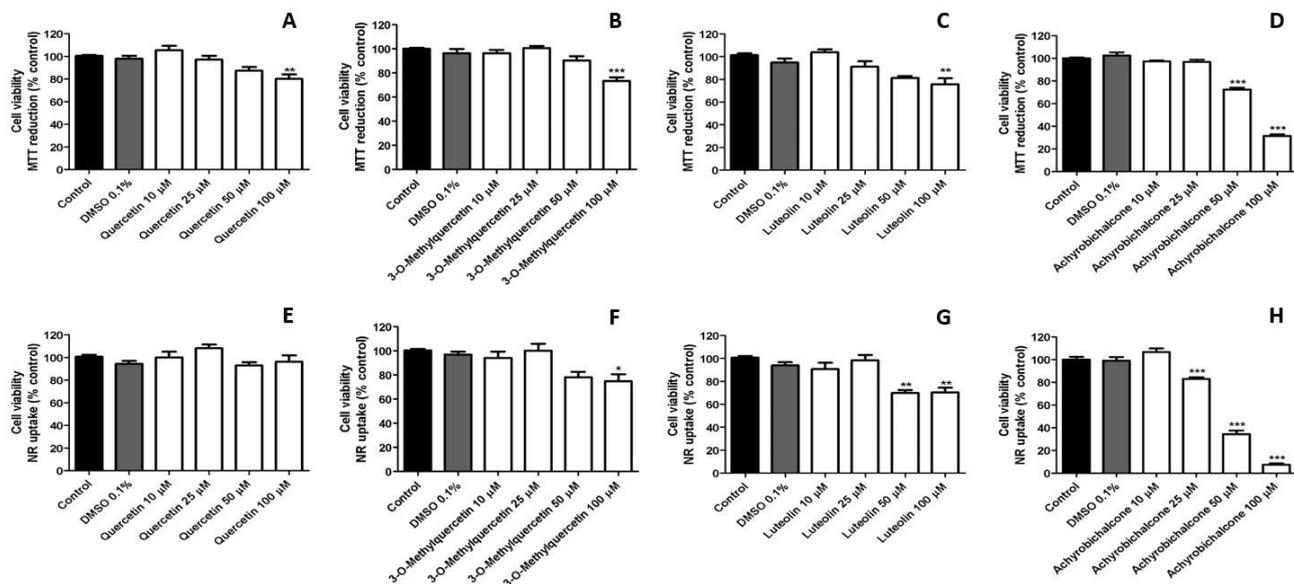


Figura 3: Citotoxicidade dos flavonoides quercetina (A e E), 3-O-metilquercetina (B e F), luteolina (C e G) e aquiróbichalcona (D e H), nos testes de redução do MTT (A, B, C e D) e incorporação do VN (E, F, G e H). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 em relação ao controle.

Já em relação aos produtos isolados, foi observado que a quercetina apresentou citotoxicidade somente no teste de redução do MTT, na concentração de 100 µM, quando comparado ao controle. Testes realizados em células de carcinoma pulmonar humano (A549) mostram que a quercetina, em baixas concentrações (1-20 µM) promoveu a proliferação celular e, em concentrações mais altas (50-200 µM), mostrou citotoxicidade dependente da concentração. A menor concentração de quercetina testada no estudo (10 µM) produziu aumento no número de células vivas (Jaganathan e Mandal, 2009). Além disso, diversos estudos relatam a atividade anticâncer da quercetina em estudos realizados *in vitro*, testando um intervalo de concentrações do flavonoide que vão de 40-160 µM, demonstrando como principais efeitos biológicos a atividade de indução da apoptose em células de fígado (HepG2 e HCT116) (Tan et al., 2009; Choi et al., 2008) e atividade antiproliferativa em células de bexiga (235J), na concentração de 50 µM (Kim et al., 2011), reforçando, assim, o resultado encontrado para a concentração de 100 µM no teste de MTT.

A 3-O-metilquercetina apresentou citotoxicidade na concentração de 100  $\mu\text{M}$  no teste de redução do MTT e, de forma confirmatória, no teste de incorporação do VN, quando comparados ao controle. Já foram demonstrados resultados em que a viabilidade de células em linhagem de fígado de camundongo (FL83B) foi diminuída pela exposição a 3-O-metilquercetina, com concentrações variando de 10 a 60  $\mu\text{M}$  do composto. Cerca de 81,7% e 66,6% das células permaneceram viáveis nas concentrações de 40 e 60  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tseng et al., 2012).

A luteolina apresentou citotoxicidade no teste de redução do MTT somente na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , mas no teste de VN apresentou maior morte celular na concentração de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , quando comparados ao controle. Um estudo que avaliou a diminuição da citotoxicidade induzida por doxorrubicina quando co-incubada com luteolina, também avaliou a citotoxicidade da luteolina por 48h, em células de câncer de mama humano (MCF-7) e foi observado o aumento gradual da viabilidade das células após o tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de luteolina, porém em concentrações maiores de 30  $\mu\text{M}$ , a luteolina inibiu a viabilidade celular (Satto et al., 2015), corroborando com os resultados já citados, principalmente no teste de incorporação do VN. A luteolina apresenta grandes propriedades anticâncer e diversos estudos citam como principal atividade biológica do flavonoide a indução da apoptose em concentrações de 25-100  $\mu\text{M}$  em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e em concentrações de 20-80  $\mu\text{M}$  em células de câncer pulmonar (A549) (Hwang et al., 2011; Cai et al., 2011).

Já o isolado aquiróbichalcona demonstrou citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  no teste de redução do MTT e nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  no teste de incorporação VN. Por ter sido recentemente identificado por Holzschuh et al. (2010), ainda são encontrados poucos estudos na literatura que tragam dados de citotoxicidade da desta chalcona. As propriedades citotóxicas da aquiróbichalcona em linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) e linhagem celular epitelial de mama não tumorigênica (MCF-12A) após 24 e 48h de incubação, com maior atividade citotóxica após 48 h de incubação, com valor de concentração inibitória máxima ( $\text{IC}_{50}$ ) de 8,43  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{50}$  de 23,57  $\mu\text{M}$  após 24 h de incubação (Bianchi et al., 2020), confirmando os resultados encontrados no teste de VN, que mostrou citotoxicidade a partir da concentração de 25  $\mu\text{M}$ .

## 4.2 Avaliação da hepatoproteção

A viabilidade celular foi avaliada a partir do teste de redução do MTT e os resultados estão expostos na figura 3, que mostra as concentrações testadas em relação à porcentagem de viabilidade celular.

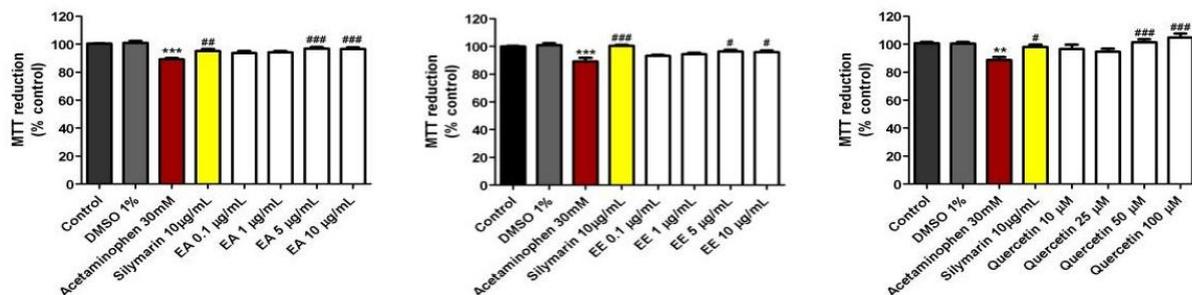


Figura 4: Hepatoproteção dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) e do flavonoide quercetina (C), no teste de redução do MTT. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  em comparação com 30  $\mu\text{M}$  de paracetamol.

Pode-se observar, em todos os testes, o dano induzido pelo paracetamol 30  $\mu\text{M}$  nas células HepG2 em relação ao controle, e também a atividade de proteção da silimarina 10  $\mu\text{g/mL}$  quando co-incubada com o paracetamol. O extrato aquoso de *A. saturoioides* apresentou proteção significativa nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  e o resultado foi igualmente observado para o extrato etanólico e para o flavonoide quercetina.

Um teste para avaliar a atividade citoprotetora da infusão de *A. saturoioides* foi realizado em células PC12. As células foram expostas durante 30 minutos ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  e depois concentrações crescentes da infusão foram adicionadas. Observou-se atividade protetora significativa nas células tratadas com concentrações de 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$  da infusão (Arredondo et al., 2004).

Foi demonstrado efeito hepatoprotetor e colerético do extrato aquoso de *A. saturoioides* nas concentrações de 100 e 300  $\text{mg/kg}$  em camundongos fêmeas, num modelo de toxicidade hepática induzida por bromobenzeno. Os animais foram tratados com o extrato de marcela 24 h antes da ingestão de bromobenzeno e, 17 h após a ingestão, foram tiradas amostras de sangue para avaliação. Na dose de 300  $\text{mg/kg}$  o extrato aquoso demonstrou inibição significativa no aumento de ALT e AST no fígado e no aumento do conteúdo de TBARS induzido por bromobenzeno, além

de aumentar significativamente os níveis de depleção de glutathiona no fígado (Kadarian et al., 2001).

Costa et al. (2021) testaram, em modelo animal com artrite reumatóide, os efeitos da quercetina e do metotrexato - tratamento de primeira linha para artrite reumatóide - na inflamação e toxicidade sistêmica. Os ratos foram divididos em diversos grupos e, entre eles, o grupo que recebeu somente metotrexato e o grupo que recebeu metotrexato + quercetina. No grupo que recebeu somente o tratamento com metotrexato, foi possível observar alterações patológicas no fígado e níveis mais elevados de transaminases, enquanto o grupo que teve quercetina co-administrada com metotrexato conseguiu reverter esta hepatotoxicidade, demonstrando assim, os efeitos anti-inflamatórios e hepatoprotetores da quercetina.

Os resultados apresentados reforçam a atividade hepatoprotetora dos extratos e do flavonoide quercetina, pois as maiores concentrações foram capazes de proteger as células HepG2 da mesma maneira que o controle positivo utilizado (silimarina 10 µg/mL) e conforme reforçam outros estudos realizados anteriormente sobre a planta.

A quercetina teve ação citotóxica na concentração de 100 µM, ao passo que também apresentou ação protetora na mesma concentração. Como já citado anteriormente, a quercetina possui alta atividade antioxidante e, levando isso em consideração, acredita-se que o resultado observado se deve ao fato de que, em altas concentrações, o potencial antioxidante da quercetina foi tóxico, por reduzir muito o ambiente celular. Um excesso de antioxidantes redutores pode levar a inibição da proliferação celular, por prevenir o estado transitório de oxidação e diminuir a adaptação ao estresse oxidativo (Cerqueira et al., 2007). Entretanto, quando co-incubada com um agente causador de dano, a redução do ambiente celular não foi tão pronunciada, pois o paracetamol age como um oxidante no meio e a redução causada pela quercetina auxilia no combate ao dano, mostrando proteção.

## 5. Conclusão

Com base nos resultados deste trabalho, observou-se que os extratos aquoso e etanólico de *A. saturoioides* não apresentaram citotoxicidade em células HepG2 e, quando co-incubados com o paracetamol 30 mM, as concentrações de 5 e 10 µg/mL foram eficazes em proteger contra o dano gerado.

Os produtos isolados quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina foram citotóxicos somente na concentração de 100 µM, enquanto achirobichalcona mostrou toxicidade nas concentrações de 50 e 100 µM. Quercetina apresentou efeito protetor nas concentrações de 50 e 100 µM.

O estudo reforça os potenciais efeitos protetores de *A. saturoioides* e seu isolado quercetina e, como perspectivas futuras, serão avaliados os efeitos hepatoprotetores de luteolina, 3-O-metilquercetina e achirobichalcona.

## REFERÊNCIAS

Adewusi EA, Afolayan AJ. A review of natural products with hepatoprotective activity. *J Med Plants Res.* 2010; 4(13): 1318-34

Alerico GC, Beckenkamp A, Vignoli-Silva M, Buffon A, von Poser GL. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology.* 2015; 176:305–10.

Arredondo MF, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, et al. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004; 91(1):13–20.

Bianchi SE, Pegues MA, Dias CK, Mascia F, Doneda E, Pittol V, et al. *Achyrocline satureioides* compounds, achyrobichalcone and 3- O -methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. *IUBMB Life.* 2020; 72(10):2133–45.

Campos SC, Silva CG, Campana PRV, Almeida VL. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2016; 18(1 suppl 1):373–82.

Carini JP, Klamt F, Bassani VL. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Adv.* 2014; 4(7):3131–44.

Carney JR, Krenisky JM, Williamson RT, Luo J. Achyrofuran, a New Antihyperglycemic Dibenzofuran from the South American Medicinal Plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of Natural Products.* 2002; 65(2):203–5.

Cerqueira FM, Medeiros MHG de, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova.* 2007; 30:441–9.

Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Archives of Pharmacal Research.* 2008; 31(10):1281–5.

Costa AC de F, de Sousa LM, dos Santos Alves JM, Goes P, Pereira KMA, Alves APNN, et al. Anti-inflammatory and Hepatoprotective Effects of Quercetin in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation.* 2021; 44(5):2033–43.

De Souza KCB, Bassani VL, Schapoval EES. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine.* 2007; 14(2-3):102–8.

Doneda E, Bianchi SE, Pittol V, Kreutz T, Scholl JN, Ibañez IL, et al. 3-O-Methylquercetin from *Achyrocline satureioides*-cytotoxic activity against A375-derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021; 11(5):2151–68.

Holzschuh MH, Gosmann G, Schneider PH, Schapoval EES, Bassani VL. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. *Die Pharmazie*. 2010; 65(9):650–6.

Hwang J-T. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2011; 28(1).

Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009; :e830616.

Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Iriti M, Wojtyczka RD, Buszman E, et al. Flavonoids, bioactive components of propolis, exhibit cytotoxic activity and induce cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 - a comparative study. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*. 2018; 64(8):1–10.

Kadarian C, Broussalis AM, Miño J, Lopez P, Gorzalczy S, Ferraro G, et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides*(Lam) D. C. *Pharmacological Research*. 2002; 45(1):57–61.

Kim Y, Kim W-J, Cha E-J. Quercetin-induced Growth Inhibition in Human Bladder Cancer Cells Is Associated with an Increase in Ca-activated K Channels. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2011; 15(5):279–83.

Kumar ADN, Bevara GB, Kaja LK, Badana AK, Malla RR. Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in lung and liver cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016; 16(1):376.

Li R, Kenyon GL, Cohen FE, Chen X, Gong B, Dominguez JN, et al. *In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995; 38(26):5031–7.

Lin Y, Shi R, Wang X, Shen H-M. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Current Cancer Drug Targets*. 2008; 8(7):634–46.

Martínez-Busi M, Arredondo F, González D, Echeverry C, Vega-Tejido MA, Carvalho D, et al. Purification, structural elucidation, antioxidant capacity and neuroprotective potential of the main polyphenolic compounds contained in *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (Compositae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019; 27(12):2579–91.

Polydoro M, de Souza KCB, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*. 2004; 74(23):2815–26.

Rajesh MG, Latha MS. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 91(1):99–104.

Retta D, Dellacassa E, Villamil J, Suárez SA, Bandoni AL. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products*. 2012; 38:27–38.

Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79(3):335–9.

Sabini MC, Cariddi LN, Escobar FM, Mañas F, Comini L, Reinoso E, et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 60:463–70.

Salgueiro ACF, Folmer V, da Rosa HS, Costa MT, Boligon AA, Paula FR, et al. *In vitro* and *in silico* antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 194:6–14.

Santin JR, Lemos M, Júnior LCK, Niero R, de Andrade SF. Antiulcer effects of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 130(2):334–9.

Sato Y, Sasaki N, Saito M, Endo N, Kugawa F, Ueno A. Luteolin attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity to MCF-7 human breast cancer cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2015; 38(5):703–9.

Simões CMO, Schenkel EP, Bauer L, Langeloh A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988; 22(3):281–93.

Simões CMO, Rech N, Lapa AJ. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., compositae (Marcela). *Cad farm.* 1986;37–54.

Singh P, Anand A, Kumar V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2014; 85:758–77.

Souza PO de, Bianchi SE, Figueiró F, Heimfarth L, Moresco KS, Gonçalves RM, et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro.* 2018; 51:23–33.

Tan J, Wang B, Zhu L. Regulation of Survivin and Bcl-2 in HepG2 Cell Apoptosis Induced by Quercetin. *Chemistry & Biodiversity.* 2009; 6(7):1101–10.

Tseng H-L, Li C-J, Huang L-H, Chen C-Y, Tsai C-H, Lin C-N, et al. Quercetin 3-O-methyl ether protects FL83B cells from copper induced oxidative stress through the PI3K/Akt and MAPK/Erk pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2012; 264(1):104–13.

Vestena A, Piton Y, de Loretto Bordignon SA, Garcia S, Arbo MD, Zuanazzi JA, et al. Hepatoprotective activity of *Verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside. *Journal of Ethnopharmacology.* 2019; 239:111906.

da Silva RE, Machado R, Ritter MR. Espécies de “macela” utilizadas como medicinais no Rio Grande do Sul. <http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/volumes/058/058.html>. 2007.