



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

ANA CARLA SILVA NASCIMENTO

**EFEITO DA BIOCHANINA A NA INTOXICAÇÃO INDUZIDA POR DIQUAT EM
CAMUNDONGOS**

**SÃO CRISTÓVÃO-SE
2023**

ANA CARLA SILVA NASCIMENTO

**EFEITO DA BIOCHANINA A NA INTOXICAÇÃO INDUZIDA POR DIQUAT EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Grespan

**SÃO CRISTÓVÃO-SE
2023**

ANA CARLA SILVA NASCIMENTO

**EFEITO DA BIOCHANINA A NA INTOXICAÇÃO INDUZIDA POR DIQUAT EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Grespan

Presidente da Banca: Prof^a Dr^a Renata Grespan

Examinador 1: Prof^o Dr^a Ana Mara de Oliveira e Silva

Examinador 2: Dr^a Jéssica Maria Dantas Araújo Aragão

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão.”

Jean de la Bruyere.

Agradecimentos

Dou início aos meus agradecimentos a todos que, por menores que tenham sido as contribuições, me ajudaram a no meu crescimento pessoal, profissional e possibilitou que eu pudesse enxergar que mesmo pequenas coisas são fundamentais e fazem a diferença.

Dessa forma, pude aprender que a ciência não precisa ser competitiva e que todos nós podemos contribuir e agregar no trabalho e na vida de todos, dando suporte nos exercícios das nossas funções e também emocional. Sendo assim, rendendo bons frutos que podem ser fundamentais a todos, e que o conhecimento precisa ser difundido e não guardado a sete chaves, porque não existe ninguém melhor ou pior, estamos todos no mesmo barco.

Aqui trago uma grande lista de pessoas especiais a quem devo agradecer. Porém, quero primeiro agradecer a minha noiva, Wesla Santos, quem mais me incentivou e me impulsionou a continuar na pesquisa, me mostrando que eu conseguiria, me ajudando efetivamente, perdendo noites e finais de semana comigo e acordando cedinho pra que eu pudesse atingir minhas realizações. Wesla é a responsável por eu ter continuado e pela minha dedicação, porque sem o seu apoio e incentivo, eu jamais teria conseguido.

Agradeço aos meus pais, por ter me concedido a vida e por confiarem no meu potencial. Deus em sua infinita bondade, me concedeu vida e saúde para conquistar minhas realizações.

Minha eterna gratidão a Maria José Rocha Santana, minha eterna incentivadora, de quem tenho imenso orgulho, sendo um grande exemplo, não somente para mim, mas para toda a família. Obrigada por acreditar mim mais do acreditei em mim mesma, por comprar meus sonhos e por fazer parte da minha vida, pois a senhora foi o melhor presente que Deus poderia ter colocado em minha vida.

Devo também agradecer a minha orientadora, Dr^a Renata Grespan, que mesmo diante das dificuldades que tive ao desempenhar minhas funções, acreditou em mim e me incentivou. Sua positividade e direcionamento foram fundamentais para que eu pudesse enxergar as possibilidades na pesquisa, sem isso, com certeza, eu não teria conseguido realizar esse trabalho. Além das

palavras que levarei para minha vida, que com certeza contribuirá para minha vida profissional, agradeço imensamente.

Ao Drº Enilton Camargo, que, com seu “coração peludo”, sempre esteve disposto a ajudar e direcionar tantos nos projetos, vivência de laboratório e conselhos que levarei para a vida, com sua gentileza e sabedoria ímpar.

Aos amigos e colegas de laboratório, Aline Barreto, Daniel Souza e Laíza Bianco, com quem sempre pude contar para me ajudar na prática experimental e análises, mas também para desabafar, receber direcionamentos e conselhos.

Minha gratidão a Camila Carlini, amiga com quem sempre pude contar, não somente para realização das análises e experimento, mas também para desabafar e aconselhar nos momentos de dificuldade pessoal.

Agradeço especialmente a Jéssica Aragão, de quem tenho muito orgulho, com quem aprendi e aprendo muito, devo agradecer pelas sensatas palavras de apoio, momentos de descontração e tantas outras situações que a fizeram um verdadeiro apoio profissional e emocional.

Agradeço grandemente também a Wemerson de Santana, quem sempre me incentivou e me mostrou o lado positivo da prática experimental, mesmo que os resultados obtidos não fossem os esperados e por toda a sua ajuda na elaboração do meu trabalho.

Agradeço à CAPES, agência de fomento, sem a qual esse trabalho não seria possível, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de estudos durante todo o período do mestrado.

À Universidade Federal de Sergipe, pela sua existência, por ser essencial na vida dos alunos que por aqui passam e passaram, por ceder todo o espaço e estrutura que possibilitaram o desenvolvimento e realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação (PROCFIS), agradeço aos coordenadores, professores e especialmente Luiz Cesar, pela disposição em ajudar, e presteza em responder a qualquer solicitação.

RESUMO

EFEITO DA BIOCHANINA A NA INTOXICAÇÃO INDUZIDA POR DIQUAT EM CAMUNDONGOS, Ana Carla Silva Nascimento. São Cristóvão, 2023.

O Diquat (DQ) é um herbicida utilizado para controlar ervas daninhas. Uma série de resultados toxicológicos revelaram que o DQ pode causar lesões em diversos órgãos de animais e humanos. A Biochanina A (BCA) surge como uma alternativa natural para prevenir os efeitos deletérios causados pelo DQ, pois se trata de uma isoflavona com efeito antioxidante e anti-inflamatório descrito na literatura. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do uso profilático da BCA na intoxicação induzida por Diquat em camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), fêmeas, que foram divididos em 6 grupos (salina, BCA 100 mg/kg, DQ, BCA 25 mg/kg + DQ, BCA 50 mg/kg + DQ e BCA 100 mg/kg + DQ) (n=8), tratados durante 12 dias. No 12º dia, os animais foram desafiados com DQ 25 mg/kg ou salina, via intraperitoneal (i.p). Após 24 horas do desafio, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta de sangue e órgãos (fígado, jejuno, pulmão e rim). Posteriormente foram realizadas dosagens de TBARS, -SH, nos tecidos, ALT/AST, creatinina, ureia, no sangue, atividade de MPO e análise histológica. Foi observado que a BCA 100 mg/kg demonstrou maior efeito antioxidante no fígado e por conta disso, as análises foram focadas nesse órgão. Os animais tratados com BCA (25, 50, 100 mg/kg) apresentaram menores concentrações de TBARS, associado a peroxidação de lipídica. Por outro lado, a concentração de grupos -SH foi maior em animais tratados com BCA. Os animais tratados com BCA também apresentaram quantidade menor de AST e ALT no sangue. Ainda, pode-se observar uma redução significativa da quantidade de ureia no grupo tratado com BCA, no entanto essa redução não ocorreu para a creatinina. A BCA reduziu a atividade da MPO e a quantidade de TNF- α no tecido hepático, mas não houve diferenças para a IL-10. A análise histológica demonstrou que a BCA protegeu a arquitetura hepática. Dessa forma, concluiu-se que a BCA tem potencial antioxidante e anti-inflamatório, com consequente hepatoproteção.

Palavras-chave: Herbicida, Isoflavona, antioxidante, estresse oxidativo e hepatoproteção.

ABSTRACT

EFFECT OF BIOCHANIN A IN DIQUAT-INDUCED INJURY ON MICE, ANA CARLA SILVA NASCIMENTO. SÃO CRISTÓVÃO, 2023.

Diquat (DQ) is a herbicide, used to control weeds. A series of toxicological results revealed that DQ is capable of causing lesions in several organs of animals and humans, with the liver being one of the main targets due to the excessive production of ROS. Biochanin A (BCA) appears as a natural alternative to prevent the deleterious effects caused by DQ, being an isoflavone, and having an anti-inflammatory effect described in the literature, we assume that it can prevent the action of DQ. The aim of this study was to evaluate the preventive effect of Biochanin A on intoxication induced by Diquat in mice. Female Swiss albino mice (*Mus musculus*) were divided into 6 groups (saline, BCA 100 mg/kg, DQ, BCA 25, BCA 50 and BCA100 mg/kg), with N=8 animals/groups, treated for 12 days. On the 12th day, the animals were challenged with DQ 25 mg/kg or saline, intraperitoneally (I.P.). After 24 hours of challenge, the animals were sedated for blood collection, with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and euthanized, with cervical dislocation, for organ collection. Animals treated with BCA (25, 50, 100 mg/kg) tolerated lower concentrations of TBARS, remaining associated with lower rates of lipid peroxidation. While the -SH concentration was shown to be higher in animals treated with BCA, they were associated with a lower level of oxidative stress. Animals treated with BCA also showed significant reductions in AST and ALT, which we associate with hepatoprotection. We could also observe a significant reduction of urea in the group treated with BCA, however this reduction does not occur in the creatinine dosage. BCA also accompanied MPO activity and TNF- α production, but there was no increase in IL-10. During histology analysis, BCA demonstrated protection of liver architecture. Thus, it is concluded that BCA has antioxidant and anti-inflammatory potential, with consequent hepatoprotection.

Keywords: Herbicide, Isoflavone, antioxidant, oxidative stress and hepatoprotection.

RESUMO DIRECIONADO À SOCIEDADE

EFEITO DA BIOCHANINA A NA INTOXICAÇÃO INDUZIDA POR DIQUAT EM CAMUNDONGOS, Ana Carla Silva Nascimento. São Cristóvão, 2023.

O Diquat (DQ) é um herbicida, agrotóxico utilizado para controlar ervas daninhas em diversas plantações como café, milho e trigo. Estudos científicos revelaram que o DQ pode causar lesões em diversos órgãos de animais e humanos, sendo o fígado um dos principais alvos desse agrotóxico. A Biochanina A (BCA) surge como uma alternativa natural para prevenir os danos causados pelo DQ, pois se trata de um composto que possui efeitos antioxidante e anti-inflamatório descrito na literatura, podendo ser encontrada em diversas fontes naturais como o trevo vermelho, soja, grão de bico, entre outras. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do uso prévio da BCA na intoxicação induzida por Diquat em camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), fêmeas, que foram divididos em 6 grupos (salina, BCA 100 mg/kg, DQ, BCA 25 mg/kg + DQ, BCA 50 mg/kg + DQ e BCA100 mg/kg + DQ) (n=8), tratados durante 12 dias. No 12º dia, os animais foram intoxicados com DQ 25 mg/kg ou salina, via intraperitoneal (i.p). Após 24 horas do desafio, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta de sangue e órgãos. Em seguida, esses tecidos foram levados para realização de análises para determinar se a BCA exerceu um efeito protetor contra o DQ. Os animais que receberam as doses de BCA mostraram menores danos causados por estresse oxidativo, além de apresentarem menores concentrações de enzimas hepáticas, estando relacionado a um efeito hepatoprotetor. Ainda pode-se observar um efeito anti-inflamatório da BCA, enquanto que os animais que receberam apenas DQ mostraram maior inflamação, os animais que foram pré tratados com BCA mostraram inflamação reduzida, frente ao grupo DQ. Dessa forma, concluiu-se que a BCA tem potencial antioxidante e anti-inflamatório, com consequente hepatoproteção.

Palavras-chave: Herbicida, Isoflavona, antioxidante, estresse oxidativo e hepatoproteção.

ABSTRACT DIRECTED TO SOCIETY

EFFECT OF BIOCHANIN A ON DIQUAT-INDUCED POISONING IN MICE, Ana Carla Silva Nascimento. São Cristóvão, 2023.

Diquat (DQ) is a herbicide, a pesticide used to control weeds in various crops such as coffee, corn and wheat. Scientific studies have revealed that DQ can cause damage to various organs of animals and humans, with the liver being one of the main targets of this pesticide. Biochanin A (BCA) appears as a natural alternative to prevent the damage caused by DQ, as it is a compound that has antioxidant and anti-inflammatory effects described in the literature, and can be found in several natural sources such as red clover, soy, chickpeas, among others. The aim of this study was to evaluate the effect of previous use of BCA on Diquat-induced intoxication in mice. Female Swiss albino mice (*Mus musculus*) were divided into 6 groups (saline, BCA 100 mg/kg, DQ, BCA 25 mg/kg + DQ, BCA 50 mg/kg + DQ and BCA100 mg/kg + DQ) (n=8), treated for 12 days. On the 12th day, the animals were intoxicated with DQ 25 mg/kg or saline, intraperitoneally (i.p). After 24 hours of challenge, the animals were euthanized and blood and organs were collected. These tissues were then taken for analysis to determine whether BCA exerted a protective effect against DQ. The animals that received the doses of BCA showed less damage caused by oxidative stress, in addition to having lower concentrations of liver enzymes, which is related to a hepatoprotective effect. An anti-inflammatory effect of BCA can still be observed, while the animals that received only DQ showed greater inflammation, the animals that were pre-treated with BCA showed reduced inflammation, compared to the DQ group. Thus, it was concluded that BCA has antioxidant and anti-inflammatory potential, with consequent hepatoprotection.

Keywords: Hebicide, Isoflavone, antioxidant, oxidative stress and hepatoprotection.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras, entre 2000 e 2020	13
Figura 2. Fórmula estrutural do Diquat	16
Figura 3. Representação esquemática da ciclagem redox da geração de $DQ^{+\bullet}$ e EROs e RNS	18
Figura 4. Estrutura química da Biochanina A	26
Figura 5. Biotransformação da BCA	27
Figura 6. Delineamento experimental	32
Figura 7. Percentual de sobrevivência dos grupos de animais que receberam as doses DQ	36
Figura 8. Avaliação da peroxidação nos tecidos, pela da determinação de TBARS no fígado, jejuno, pulmão e rim	37
Figura 9. Avaliação da peroxidação nos tecidos, pela da determinação de TBARS no fígado, jejuno, pulmão e rim	38
Figura 10. Representação da determinação de TBARS no tecido hepático.....	38
Figura 11. Representação da determinação de grupos sulfidrilas no tecido hepático.....	39
Figura 12. Representação do peso dos animais ao longo do delineamento experimental.	39
Figura 13. Quantificação de ALT e AST no sangue dos animais controles e tratados com Biochanina A.....	40
Figura 14. Quantificação de Ureia e Creatinina no sangue dos animais controles e tratados com Biochanina A.....	41
Figura 15. Determinação da determinação da atividade de MPO no tecido hepático dos animais controles e tratados com Biochanina A	41

Figura 16. Concentração de TNF-α e IL-10 no tecido hepático dos animais controles e tratados com Biochanina A.....	42
Figura 17. Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE mostrando as principais alterações patológicas observadas na análise dos tecidos hepáticos	43
Figura 18. Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE	44
Figura19. Determinação da gradação histológica de parâmetros morfológicos de doença hepática gordurosa não alcoólica nos grupos experimentais	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP – Hidrogênios Alílicos de Ácidos Graxos Poliinsaturados

ALT – Alanina Aminotransferase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AREs - Elementos De Resposta Antioxidante

AST – Aspartato Aminotransferase

BAX – Proteína X

BCA - Biochanina A

CAT – Catalase

COX2 - Ciclo-oxigenenase-2

DP – Doença de Parkinson

DPM – Desvio Padrão da Média

DQ – Diquat

G6PD – Fosfato Desidrogenase

Gen – Genisteína

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione

GST – Glutathione-S-transferase

-OH – Radical Hidroxila

JNK - c-Jun N-terminal cinase

LOOH – Hidroperóxidos Lipídicos

LPO – Peroxidação Lipídica

LPS - Lipopolissacarídeos

MDA – Malonaldeído

MPO – Mieloperoxidase

NaCl – Cloreto De Sódio

NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico sintase

Nrf2 - Fator Nuclear Derivado do Eritróide 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVA – Ovalbumina

DAMP's – Padrões Moleculares Associados ao Danos

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxico em Alimentos

PGE2 – Prostaglandina E2

PPAR-γ – Receptor Ativado de Peroxissoma Gama

PQ – Paraquat

Redox - Oxidação-redução

RL – Radicais Livres

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

-SH – Grupo Sulfidrila

SH-Px – Glutathione Peroxidase

SINAN - Sistema de Agravos de Notificações

SOD – Superóxido Dismutase

TLRs – Receptores do tipo Toll

TNF-α - Fator de Necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Revisão de literatura	13
2.1 Uso de Herbicidas.....	13
2.2 Diquat	15
2.2.1. Propriedades físico-químicas.....	15
2.2.2. Farmacocinética.....	16
2.2.3- Toxicidade	20
2.3 Estresse oxidativo	22
2.4. Uso de Produtos naturais.....	24
2.4.1 Biochanina A.....	26
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Material e métodos	31
4.1. Animais	31
4.2. Reagentes.....	31
4.3. Delineamento experimental	31
4.4. Coleta de amostras	32
4.5. Avaliações Bioquímicas	32
4.6. Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	33
4.7. Determinação de grupos sulfidrilas no tecido hepático	33
4.8. Mensuração da atividade da Mieloperoxidase no tecido hepático	34
4.9. Quantificação de citocinas no tecido hepático	34
4.10. Histologia	34
4.10.1. Análise histopatológica das amostras de fígado	35
4.11. Análise estatística	35
5. Resultados	37
5.1. Padronização do modelo experimental	37
5.1.1. Determinação da Dose de Diquat.....	37
5.2 Efeito antioxidante da BCA em órgãos	38
5.3 Efeitos da BCA sobre as aminotransferases- ALT e AST	41
5.4 Efeitos da BCA sobre a Ureia e Creatinina	41
5.5. Efeito da BCA sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO)	42

5.6. Efeito da BCA sobre as citocinas pró e anti-inflamatória	43
5.7. Efeito da BCA sobre os padrões morfológicos do fígado	43
6.Discussão.....	47
7. Conclusão	53
8. Perspectivas futuras	53
Referências	54

1. Introdução

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, uma posição alcançada em virtude do aumento da produção agrícola (BAMA, 2020). A utilização de agrotóxicos por ingredientes ativos no Brasil expandiu de 162.461,96 toneladas em 2000 para 686.349,87 toneladas em 2020, resultando no aumento de 282% em apenas 20 anos (IBAMA, 2020). Nesse sentido, o país se tornou o maior importador de agrotóxicos do planeta desde 2012 (Fiocruz, 2014; Bombardi, 2017).

Apesar das vantagens para o setor produtivo, a utilização de agrotóxicos está associada a inúmeros casos de intoxicação, tanto em áreas urbanas como nas áreas rurais. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), os registros associados à intoxicação por agrotóxicos aumentaram em 139% do ano de 2007 (4.964 casos) a 2015 (11.863 casos). Associado à utilização crescente de agroquímicos por agricultores e afins, a incidência de diversos tipos de câncer, distúrbios endócrinos, bem como o desenvolvimento de doenças neurológicas, renais, respiratórias e hepáticas é maior nessa população, quando comparada à população em geral (Londres, 2011).

Em muitos países o Diquat (DQ) se tornou gradualmente um dos mais importantes herbicidas bipiridínicos utilizados, sendo o substituto do Paraquat, que teve seu uso proibido devido à alta toxicidade. No Brasil, o DQ é vastamente utilizado nas plantações de diversos vegetais (ANVISA, 2019), fato que pode ser justificado por sua facilidade de manuseio, alta solubilidade em água e rápida ação (Pateiro-Moure, Arias-Estévez e Simal-Gándara, 2013). Contudo, esse herbicida tem causado preocupação generalizada em virtude dos riscos à saúde, uma vez que apresenta ações deletérias em humanos e animais (Wang et al., 2017).

O DQ pode ser absorvido por via oral, pulmonar, ocular ou dérmica, sendo a ingestão de formulações concentradas a mais comum. Apesar de haver uma baixa absorção intestinal (<10%), volumes entre 15 e 50 mL, com concentração de 20%, são geralmente fatais (Bradberry et al., 2000; Magalhães, Carvalho e Dinis-Oliveira, 2018). A metabolização do DQ ocorre majoritariamente no tecido hepático, através de enzimas do citocromo P450 (FAO/WHO, 2013).

O DQ pode levar ao estresse oxidativo devido à sua capacidade de gerar Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (EROs e RNS) intracelularmente. Esse fenômeno ocorre através do processo de oxirredução (redox), havendo redução de NADPH e Glutathione Reduzida (GSH), além de inflamação, levando lesões em múltiplos órgãos e posterior mal funcionamento e morte celular (Circu, Maloney e Aw, 2017 e Sanchez-Valle et al., 2012).

De forma geral, o fígado é um dos órgãos alvo da toxicidade pelo DQ (Sanchez-Valle et al., 2012). A toxicidade hepática leva a danos graves como a degeneração dos hepatócitos, inflamação, disfunção mitocondrial e apoptose, associada à promoção e ativação de fatores pró-apoptóticos, como p53 e proteína X (Bax) (Chen, Y. P. et al., 2021; Wu, Zhang e Klaassen, 2012; Yang et al., 2016).

As enfermidades causadas pela exposição a agrotóxicos como o DQ caracterizam um grande problema de saúde pública. Isso estimula a necessidade de mais estudos acerca de como prevenir os danos associados ao consumo de agrotóxicos (Londres, 2011).

Nesse sentido, as fontes naturais são excelentes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes na prevenção desses agravos causados pelos agrotóxicos (Sarfraz et al., 2020). Zhang et al. (2022) observaram que pré-tratamento com ácido elágico amenizou os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pelo DQ no intestino delgado de camundongos, reduzindo malonaldeído (MDA) e aumentando a atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

A Biochanina A é uma isoflavona metoxilada encontrada em diversos vegetais como soja, alfafa, amendoim, carqueja, grão de bico e, principalmente, no trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) (Yu et al., 2019; Sarfraz et al., 2020). Essa isoflavona apresenta importantes efeitos biológicos antioxidante, anti-inflamatório e hepatoprotetor (SARFRAZ et al., 2020).

Foi demonstrado por Breikaa et al. (2013), em um modelo de hepatotoxicidade, em ratos, induzido por tetracloreto de carbono, que a BCA exerceu efeito hepatoprotetor através da redução de peroxidação lipídica, associada a redução MDA e aumento de enzimas antioxidantes como SOD, CAT

e GR. Dessa forma, esse trabalho tem como intuito avaliar o efeito da BCA na intoxicação induzida por DQ, uma vez que, a Biochanina A se apresenta como grande promissora para o efeito hepatoprotetor em modelo de intoxicação por DQ em camundongos.

2. Revisão de literatura

2.1 Uso de Herbicidas

O Brasil encontra-se no posto de um dos maiores produtores agrícolas, no entanto, concomitantemente à necessidade de melhorar a produtividade, também se tornou um dos líderes na utilização de agrotóxicos (IBAMA, 2020). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISAS, 2012), houve um crescimento de 93% na comercialização de agrotóxicos entre os anos de 2000 e 2010, ao passo em que o comércio nacional cresceu em 190% e, em 2014, atingiu a marca de US\$ 12,2 bilhões de faturamento líquido (SINDIVEG, 2016).

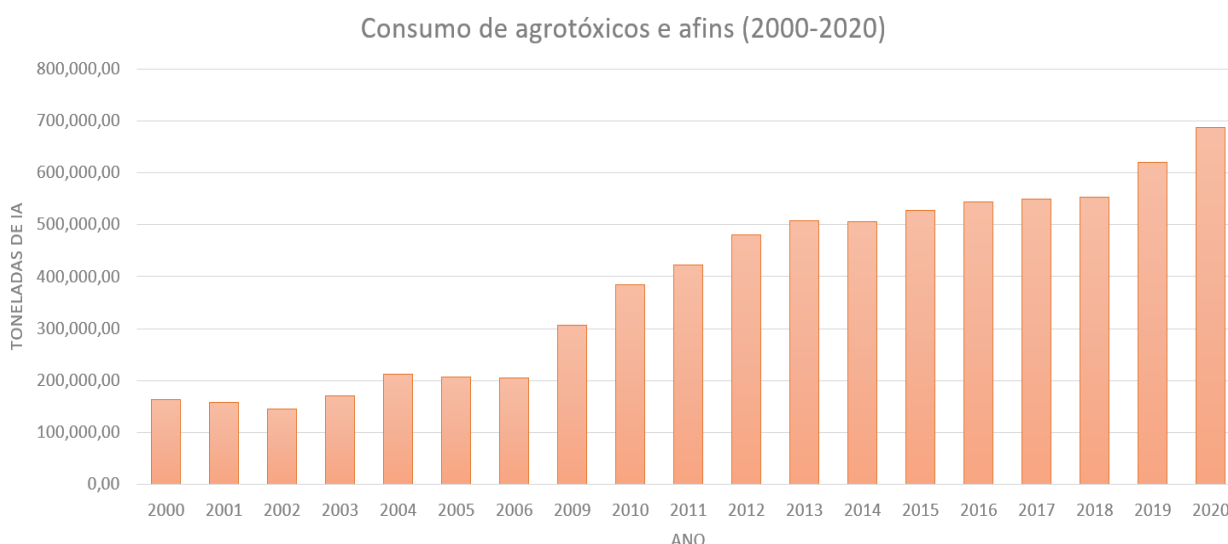


Figura 1. Consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras, entre 2000 e 2020. Os anos de 2007 e 2008 não foram compilados pelo IBAMA. IA: Ingredientes ativos. Fonte: IBAMA

A utilização de agrotóxicos por ingredientes ativos no Brasil expandiu de 162.461,96 toneladas em 2000 para 686.349,87 toneladas em 2020, resultando em um aumento de 282% num período de apenas 20 anos (Figura 1) (IBAMA, 2020). Nesse sentido, o país se tornou o maior importador de agrotóxicos do planeta desde 2012 (FIOCRUZ, 2014; Bombardi, 2017). Além disso, em 2019 o Brasil adquiriu do exterior 27,7% (171.931,39 toneladas) dos ingredientes ativos utilizados em território nacional (IBAMA, 2020).

O uso excessivo de agrotóxicos está diretamente associado a inúmeros casos de intoxicação, tanto em áreas urbanas como no campo. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), os registros

associados à intoxicação por agrotóxicos aumentaram em 139% do ano de 2007 (4.964 casos) a 2015 (11.863 casos). Destes casos, o trabalhador agrícola foi a ocupação mais associada a notificações de intoxicação pelos agrotóxicos, correspondendo a 28,8% (BRASIL, 2018).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que há uma subnotificação das intoxicações por agrotóxicos na ordem de 1:50, ou seja, a cada notificação registrada existem outros 50 casos não relatados (Paraná, 2018). Em relação a isso, o Ministério da Saúde estima que haja mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos em todo o território nacional, o que resulta em cerca de 4 mil mortes por ano (Carneiro et al., 2015).

Outro fator associado ao uso exacerbado de agrotóxicos é a contaminação hídrica e do solo. Devido à toxicidade, associado ao crescente aumento dos teores de agrotóxicos encontrados em diversos compartimentos ambientais, o consumo dessas águas ou suas reutilizações na agricultura podem resultar em riscos à saúde humana e animal (Silvério et al., 2012). Ainda, é importante ressaltar que os valores da concentração máxima de agrotóxicos permitidos na água potável utilizados no Brasil são superiores aos limites máximos de resíduos de agrotóxicos recomendados em outras localidades como na União Europeia (Bombardi, 2017).

Além da contaminação do solo e de recursos hídricos, é possível observar a persistência dos resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem animal ou vegetal (CARNEIRO et al., 2015). Recentemente, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da ANVISA, apresentou resultados alarmantes que demonstraram que mais da metade dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminada por agrotóxicos (ANVISA, 2019). O PARA avaliou alimentos presentes na dieta da população brasileira e observou que, de 4.616 amostras analisadas, 51% estavam contaminadas por agrotóxicos. Ademais, destes, cerca de 23% ultrapassaram o limite máximo de resíduos considerados aceitáveis e/ou possuíam ingredientes ativos não autorizados para determinado cultivo (ANVISA, 2019).

Associado à utilização crescente de agroquímicos por agricultores e afins, a incidência de diversos tipos de câncer, distúrbios endócrinos, bem como o desenvolvimento de doenças neurológicas, renais, respiratórias e hepáticas é maior nessa população, em comparação à população em geral (Londres, 2011).

Em muitos países o DQ se tornou gradualmente um dos mais importantes herbicidas bipiridínicos utilizados, sendo substituto do Paraquat, que teve seu uso proibido por conta de sua alta toxicidade, com uma dose letal de 3 mg/mL. No entanto, o elevado consumo de DQ também causa preocupação generalizada sobre seus riscos à saúde biológica, uma vez que o DQ também apresenta ações deletérias no organismo de humanos e animais (Wang et al., 2017).

No Brasil, o DQ é vastamente utilizado nas plantações de algodão, arroz, batata, beterraba, café, cebola, feijão, girassol, milho, pêssego e soja (ANVISA, 2019). A facilidade de manuseio, alta solubilidade em água e ação rápida fazem do DQ um herbicida apropriado para as necessidades da agricultura (Pateiro-Moure, Arias-Estévez e Simal-Gándara, 2013).

Além disso, apresenta uma alta eficácia contra ervas daninhas e gramíneas, pode atuar como desfolhante para algodão, soja e lúpulo, diminuindo o teor de umidade de grãos, economizando custos de secagem de sementes e antecipando a safra de arroz sem influenciar a germinação (Pateiro-Moure, Arias-Estévez e Simal-Gándara, 2013). É importante salientar que as patologias associadas exposição a agrotóxicos como o DQ caracterizam um grande problema de saúde pública, havendo a necessidade de que haja a investigação para busca de novos meios para limitar e prevenir os efeitos agressores desse herbicida (Londres, 2011).

2.2 Diquat

2.2.1. Propriedades físico-químicas

O Diquat (1,10-ethylene-2,20-bipyridinium) (Figura 2) é um herbicida pertencente à classe dos bipiridílios, possui aspecto escuro, característica hidrofílica, peso molecular (PM): 344,05, apresenta pH em torno de 6,0 e normalmente já se encontra como um concentrado diluído (Syngenta S.A., São Paulo, SP., Brasil).

Esse herbicida é composto por anéis de piridina, ou seja, dois anéis aromáticos em que um átomo de carbono é substituído por um átomo de nitrogênio acoplado por uma ponte saturada (Bradberry et al., 2000). Dessa forma, torna-se um composto catiônico bivalente altamente polar, que é

facilmente reduzido a um mono cátion de radical livre ($DQ^{+\bullet}$, instável) (Zielonka et al., 2006).

O DQ foi sintetizado pela primeira vez pelo Dr. Fielden e utilizado como herbicida por Jealott's Hill (1955), que observou a relação entre a sua estrutura química e o efeito herbicida, pois a atividade só estava presente quando: (i) havia uma ponte entre os anéis de piridina, (ii) essa ponte era formada por apenas dois tomos de carbono e (iii) todas as estruturas assumem uma configuração coplanar

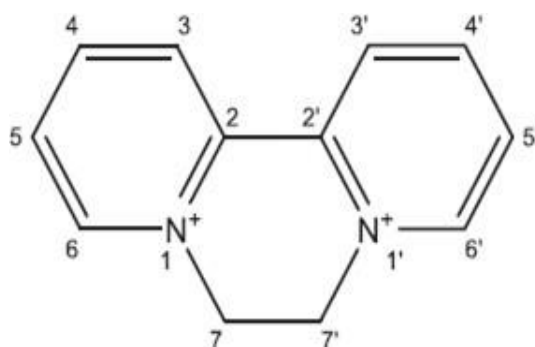


Figura 2. Fórmula estrutural do Diquat (Magalhães, Carvalho e Dinis-oliveira, 2018).

A ação do DQ tem início logo após sua rápida penetração através da superfície da folha, que é aumentada com a alta intensidade de luz, umidade e adjuvante específico, que garante uma boa penetração na folhagem. Dessa forma, o DQ age secando rapidamente uma planta inteira devido à ruptura das membranas celulares, o que permite que a água escape (Pateiro-Moure, Arias-Estévez e Simal-Gándara, 2013).

A ação herbicida do DQ está ligada ao seu potencial redox, uma vez ele é reduzido no sistema de elétrons primário do fotossistema I dentro dos cloroplastos, gerando Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e inibindo a fotossíntese através da quebra da clorofila, vazamento de íons e fragmentação do DNA (Magalhães, Carvalho e Dinis-Oliveira, 2018).

2.2.2. Farmacocinética

Nos seres humanos, o DQ pode ser absorvido por via oral, pulmonar, ocular ou dérmica, sendo a ingestão de formulações concentradas a mais comum. Apesar de haver uma baixa absorção intestinal do DQ (<10%), volumes entre 15 e 50 mL, com concentração de 20%, são geralmente fatais (Bradberry

et al., 2000; Magalhães, Carvalho e Dinis-Oliveira, 2018). O DQ possui a capacidade de atravessar a membrana celular, normalmente por difusão e, em menor grau, por transporte ativo de bombas catiônicas. Isso ocorre lentamente por conta da sua natureza hidrofílica (FAO/WHO, 2013).

A via dérmica é a mais improvável de desencadear uma intoxicação sistêmica (FAO/WHO, 2013). Segundo Felmann e Maibach (1974), a pele é uma forte barreira contra a absorção do DQ, onde apenas 0,3% é absorvido. Contudo, esse valor aumenta para 3,8% na pele lesionada (Feldmann e Maibach, 1974). Dessa forma, é importante ressaltar que o contato prolongado com esse produto provoca irritações na pele, facilitando a sua própria penetração (Charles, Abou-Donia e Menzel, 1978). Devido à sua natureza hidrofílica, a absorção pulmonar do DQ é cerca de 37 vezes menor que outros herbicidas como o amitrole, que possui características lipofílicas e importante para absorção pulmonar (Magalhães, Carvalho e Dinis-Oliveira, 2018).

Após a absorção, ocorre uma rápida distribuição por todo o corpo na fase aquosa, atingindo o pico dos níveis teciduais e sanguíneos após 2 h, seguido de rápido declínio e eliminação (Bradberry et al., 2000). Ao contrário do Paraquat (PQ), o DQ não é concentrado seletivamente nos pulmões e sua meia-vida é cerca de cinco vezes menor. Dessa forma, observa-se lesão leve e reversível nos pneumócitos tipo I, mas não há danos em células do tipo II (Dinis-Oliveira et al., 2009). Em contrapartida, órgãos como fígado, rim e o trato gastrointestinal apresentam maiores níveis de resíduos (Magalhães, Carvalho e Dinis-Oliveira, 2018).

A metabolização do DQ é majoritariamente hepática, por meio de enzimas do citocromo P450 e através da oxidação dos anéis de piridina, sendo eliminado principalmente através da urina e fezes (FAO/WHO, 2013). A eliminação do DQ é observada majoritariamente nas fezes, como foi descrito por Zielonka et al. (2006), em um estudo com ratos, após administração de DQ, via oral (45 mg/kg), o herbicida foi excretado, praticamente inalterado, na urina e fezes (6% e 89% da dose, respectivamente). Ainda, reportaram que o seu metabólito DQ monopiridona estava presente principalmente nas fezes (5% da dose) e em menor extensão na urina (Zielonka et al., 2006).

Embora não se ligue covalentemente a macromoléculas, o DQ pode levar ao estresse oxidativo devido à sua capacidade de gerar EROs intracelularmente, através do processo de oxirredução. O DQ é reduzido ao receber um único elétron de NADPH, em uma reação catalisada pelo citocromo P450 redutase, formando NADP^+ e uma molécula altamente instável de DQ, com um elétron a mais ($\text{DQ}^{\bullet+}$), que por sua vez, transfere um elétron para molécula de Oxigênio (O_2) para gerar o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). O $\text{DQ}^{\bullet+}$ então retorna à sua forma inicial e pode passar por esse processo contínuo para gerar grandes quantidades de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Circu, Maloney e Aw, 2017) (Figura 3).

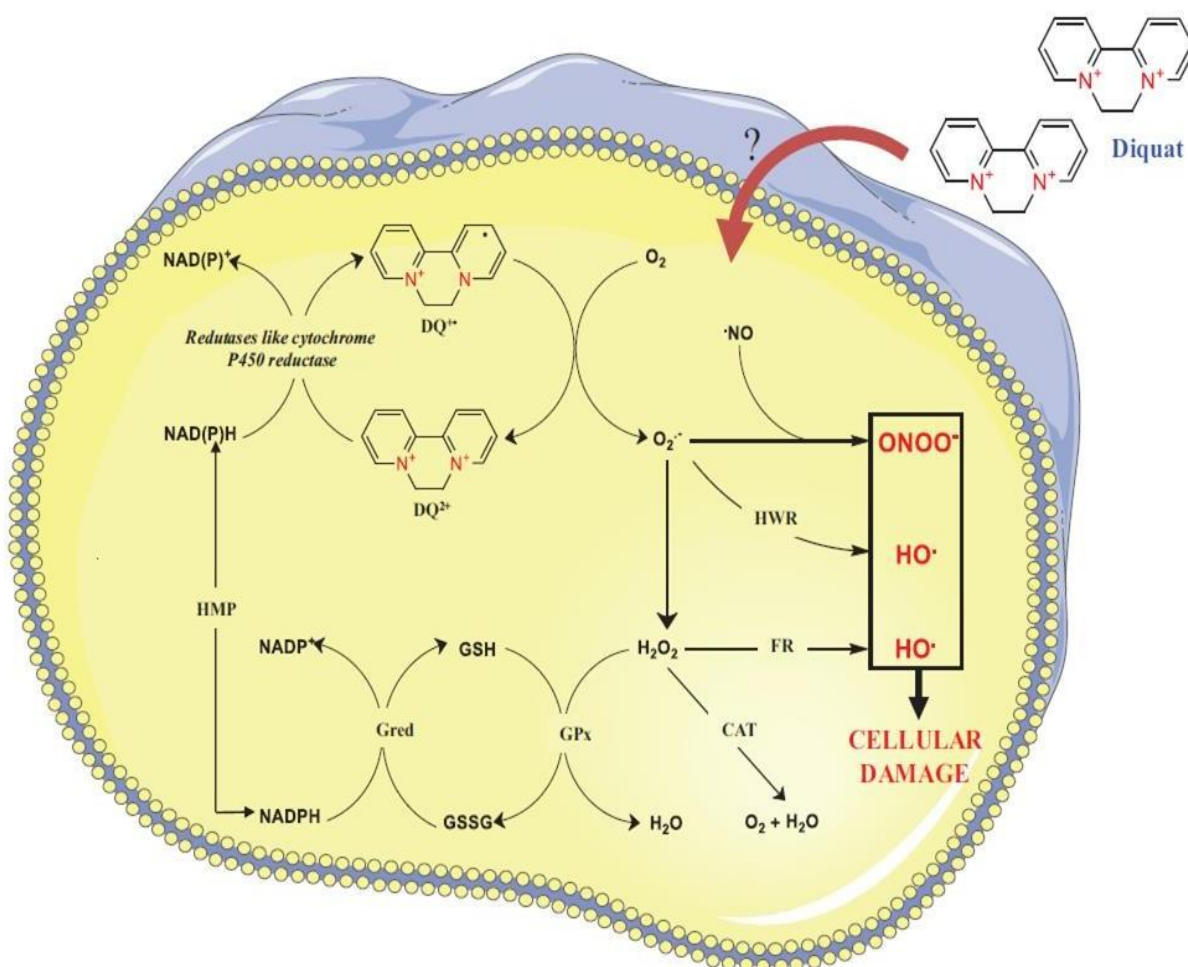


Figura 3. Representação esquemática da ciclagem redox da geração de $\text{DQ}^{\bullet+}$ e EROs e RNS. As redutases celulares, como a redutase do citocromo P450, catalisam a redução de um elétron de DQ^{2+} , formando o radical livre monocatión DQ ($\text{DQ}^{\bullet+}$). Este, na presença de oxigênio, forma o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), regenerando o composto original. A atividade de ciclo redox DQ requer NADPH que é produzido a partir da glicose via glicose-6-fosfato desidrogenase, a primeira enzima do HMP. O mecanismo de captação celular de DQ é desconhecido. DQ: diquat ou 1,1-etileno-2,2'-bipiridínio; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNS: espécies reativas de nitrogênio; SOD, superóxido dismutase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; HMP: via hexose monofosfato; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; Gred: glutatona redutase; FR: Reação de Fenton; HWR: Reação de Haber-Weiss (Magalhães, Carvalho e Dinis-oliveira, 2018).

Além da produção ROS, na oxidação induzida por DQ também foi evidenciada a geração de RNS, ou seja, o aumento do Óxido Nítrico (NO) e da produção de Peroxinitrito (ONOO- reação de O₂ e NO) em hepatócitos (Figura 3) (Circu, Maloney e Aw, 2017).

O DQ+• e O₂•- liberam ferro de forma redutiva (ferritina), que possuem a capacidade de converter íons férricos (Fe³⁺) em íons ferrosos (Fe²⁺), sendo esse um processo tóxico relevante para a toxicidade do DQ, pois Fe²⁺ participa da catalisação da reação de Fenton, formando o radical hidroxila (HO) (Abe et al., 2006).

O ciclo redox pode ser neutralizado enzimaticamente via Superóxido Dismutase (SOD) para produzir o Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e o O₂ (Circu, Maloney e Aw, 2017). Em condições normais, H₂O₂ é convertido na água pela Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). O aumento do consumo de NADPH também deve ser observado com atenção, pois a atividade da enzima GPx, é NADPH dependente, de forma que, a redução desse também limita a atividade dessa enzima (Lehane et al., 2012).

Sendo assim, quando as enzimas antioxidantes não são o bastante com o aumento excessivo de EROs e RNS, os mecanismos de proteção celular, sejam eles não enzimáticos (glutathione (GSH), tioredoxina, selênio, vitaminas C e E) ou mediante as enzimas antioxidantes, tornam-se sobrecarregados, levando ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, disfunção e lesão celular (Sies, 1991).

A grande quantidade de EROs e RNS podem danificar os Hidrogênios Alílicos de Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGP) presentes nas membranas celulares, gerando radicais peroxil que removem AGP adjacentes para criar Hidroperóxidos Lipídicos (LOOH), levando à Peroxidação Lipídica (LPO) (Valavanidis et al., 2006). Esse fenômeno diminui a fluidez e aumenta a permeabilidade da membrana, podendo ocorrer a ruptura da membrana e, conseqüentemente, a necrose dos tecidos. A LPO pode inativar receptores ou enzimas ligados à membrana, levando à interrupção da função celular normal e seus produtos podem induzir mutações e modificar padrões de expressão gênica através da formação de DNA (Xu et al., 2007).

De forma geral, o estresse oxidativo e a inflamação são processos intimamente relacionados, um dos quais pode ser facilmente induzido pelo outro, sendo que, se o estresse oxidativo aparecer como anormalidade primária, a inflamação acabará se desenvolvendo e acentuará ainda mais o estresse oxidativo (Biswas, 2016). O estresse oxidativo causado por elevada produção de EROs e RNS está associado ao infiltrado de neutrófilos e macrófagos, pois os danos causados à membrana celular são capazes de causar a liberação de certas proteases teciduais, capazes de interagir com o sistema complemento para produzir quimio atraentes potentes, como Padrões Moleculares Associados ao Danos (PAMP's) (Anton et al., 2002).

Os neutrófilos expressam proteínas de adesão, fixam-se e migram através do endotélio, causando destruição de tecidos, através de enzimas proteolíticas e peroxidase, levando ao aumento da atividade do Fator de transcrição Nuclear Kappa B (NF- κ B), e, conseqüentemente, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-1 (Biswas, 2016). Além disso, evidências têm mostrado que os radicais livres especialmente H₂O₂ e NO podem responder como mensageiros secundários para estimular citocinas pró-inflamatórias (Yuan et al., 2017).

Durante o processo inflamatório, as células fagocíticas ativadas, como neutrófilos e macrófagos, produzem grandes quantidades de EROs e espécies reativas de nitrogênio e cloro, incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio, radical livre de hidroxila, óxido nítrico, peroxinitrito e ácido hipocloroso para matar os agentes invasores (Biswas, 2016). Desse modo, gerando mais EROs, estabelecendo um ciclo de danos teciduais (Miranda et al., 2004). Sendo assim, é importante que haja uma maior investigação quanto aos danos associados ao contato com DQ.

2.2.3- Toxicidade

Meng Na e colaboradores (2022) relataram que ocorreram 86 casos de intoxicação por DQ entre 2019 e 2021 em um hospital Chinês. Esses indivíduos apresentaram danos em múltiplos órgãos, principalmente insuficiência hepática e renal; além disso, os danos neurológicos graves foram os principais responsáveis pela morte (Meng et al., 2022).

Em um relato de caso foi observada lesão hepática aguda após absorção do DQ através da pele, devido ao manuseio do herbicida sem nenhum equipamento apropriado (Peiró et al., 2007). Nesse caso, um senhor de 69 anos, agricultor, queixou-se de colúria e dor abdominal no quadrante superior direito. Durante o exame físico foi observada icterícia subconjuntival e hepatomegalia; já nos exames bioquímicos, pode-se observar níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) muito acima dos níveis aceitáveis. Além disso, a biópsia hepática evidenciou a existência de colestase intra-hepática e epitélio necrótico dos ductos biliares, associada à infiltração de neutrófilos e macrófagos nos tecidos intraductal e periductal, e não foram observados sinais de lesão alcoólica ou fibrose (Peiró et al., 2007).

Xing e colaboradores (2020) relataram o caso de um jovem de 21 anos, diagnosticado com depressão, porém não apresentava outras doenças físicas. O indivíduo ingeriu 100 mL de DQ (20 g/100mL) e, 15 minutos após a ingestão, apresentou náuseas e vômito. Os exames bioquímicos mostraram um relevante aumento de ALT/AST e Creatinina, associados a danos hepáticos e renais, respectivamente (Xing et al., 2020). Além disso, ao exame de imagem de ressonância magnética de cabeça, indicada após o paciente apresentar tetraplegia, mostrou desmielinização aguda e, 15 dias após ingestão do DQ, o paciente faleceu por disfunção múltiplas de órgãos (Xing et al., 2020).

As lesões em múltiplos órgãos estão diretamente associadas ao ciclo redox, levando à morte celular e posterior perda do funcionamento desses órgãos. Como exemplo, pode ser citada a depleção de tight junctions, que formam uma importante barreira no intestino delgado que permite o controle de permeabilidade de solutos e nutrientes, limitando o seu bom funcionamento e a chegada e nutrientes a outros órgãos (Zhang et al., 2021).

Compostos como DQ e PQ estão associados à Doença de Parkinson (DP), uma condição neurodegenerativa multifatorial (Baltazar et al., 2014). Em um estudo *in vitro* realizado em culturas mesencefálicas primárias de ratos Sprague-Dawley, foi observado que o DQ induziu significativa mudança na morfologia e no número de neurônios dopaminérgicos. Além disso, o DQ também reduziu a captação de dopamina em mais de 80% dos neurônios dopaminérgicos (Bonneh-Barkay, Langston e Monte, Di, 2005). Isso sugere que o ciclo redox do

herbicida, associado à elevada produção de ROS, leva ao estresse oxidativo, e consequentemente à degeneração das células dopaminérgicas (Bonneh-Barkay, Langston e Monte, Di, 2005).

De forma geral, o fígado é um dos órgão alvo da toxicidade pelo DQ e, a produção excessiva de ROS, associada ao estresse oxidativo e super produção de superóxidos, podem alterar diferentes atividades funcionais do fígado, como metabolismo, desintoxicação e resposta imune (Sanchez-Valle et al., 2012). Essa toxicidade hepática leva à degeneração dos hepatócitos, inflamação, disfunção mitocondrial e até apoptose, associado à promoção e ativação de fatores pró-apoptóticos, como p53 e proteína X (Bax) ((Wu, Zhang e Klaassen, 2012; Chen et al., 2021; Yang et al., 2016).

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo também exerce um papel protetor na geração de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade, defesa celular e síntese de substâncias biológicas. No entanto, quando em excesso, apresenta efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e a oxidação de proteínas, enzimas, carboidratos e ácidos nucleicos (Barreiros; David; David, 2006).

A LPO ocorre através do ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie reativa capaz de sequestrar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos, inativando enzimas e receptores associados à membrana, levando ao aumento da permeabilidade de Ca^{2+} . Consequentemente, ocorre um aumento na permeabilidade das membranas biológicas, o que promove alterações irreversíveis na função celular e ocasiona sua morte (Loureiro; Di Mascio; Medeiros, 2002; Sánchez, 2012).

A cascata de LPO pode ser dividida em iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre quando um radical de elevada reatividade como o $\bullet\text{OH}$ extrai um átomo de hidrogênio do ácido graxo da membrana lipídica e forma o $\text{L}\bullet$ (radical lipídico) e H_2O . A propagação dá continuidade à cascata quando o $\text{L}\bullet$ reage rapidamente com o O_2 , produzindo o radical Peroxil ($\text{LOO}\bullet$), que consequentemente irá abstrair hidrogênio de outro ácido graxo, gerando novamente o $\text{L}\bullet$. Isso conduz à etapa de propagação, que acontece quando os

radicais gerados pelas etapas anteriores originam produtos não radicalares. Dentre os compostos não radicalares formados está o Malondialdeído (MDA), considerado um radical extremamente tóxico ao organismo e um ótimo marcador biológico de injúria à membrana celular (Lima; Saes; Abdalla, 2001; Sánchez, 2012; Halliwell; Gutteridge, 2015).

A química da oxidação proteica é complexa, uma vez que há mais de 20 aminoácidos, cada um capaz de gerar vários produtos oxidativos. No entanto, aminoácidos como tirosina, triptofano, fenilalanina, metionina, cisteína, histidina, lisina, leucina, valina, prolina, arginina, treonina e isoleucina são mais suscetíveis a danos (Sánchez, 2012; Halliwell; Gutteridge, 2015). O $\bullet\text{OH}$ exerce diversas ações nocivas às proteínas, mas o H_2O_2 , $\text{NO}\bullet$ ou $\text{O}_2\bullet^-$ em concentrações fisiológicas possuem poucos efeitos diretos sobre as proteínas, embora o H_2O_2 possa reagir com grupos facilmente oxidáveis, como os grupos sulfidrilas ($-\text{SH}$) (Halliwell; Gutteridge, 2015).

Os danos oxidativos às proteínas podem levar à modificação do papel das enzimas reparadoras do DNA, perda da fidelidade das DNAs polimerases em replicar o DNA, aumento ou redução da susceptibilidade à proteólise, alteração nas vias de sinalização, aumento da imunogenicidade e agregação proteica e modificação na transcrição gênica (Sánchez, 2012; Halliwell; Gutteridge, 2015).

O sistema de defesa antioxidante tem o papel de inibir ou diminuir os danos promovidos pela ação dos RL e/ou das espécies reativas. Tais efeitos podem ocorrer por meio de diferentes mecanismos de ação: barrando a produção de Radicais Livre (RL) (sistema de prevenção), limitando os danos causados por essas células (sistema de varredores) e favorecendo o reparo das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). Nesse aspecto, os meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em enzimáticos, classificadas em primárias (SOD, CAT, Fosfato Desidrogenase (G6PD), Glutathione Peroxidase (SH-Px)) e não enzimáticos (Rover Júnior et al., 2001; Caroch, Ferreira, 2013).

Os sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticos possuem a capacidade de evitar o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com as espécies reativas (Caroch; Ferreira, 2013). O grupo desses antioxidantes pode

ter origem biológica (glutathione redutase, o ácido úrico, a bilirrubina, os hormônios sexuais, a melatonina, o ácido lipoico, os α -cetoácidos e a coenzima Q) ou fonte dietética como as vitaminas C, E e A, os carotenoides, os polifenóis e as substâncias sintéticas como a N-acetilcisteína (Barbosa et al., 2010; Halliwell; Gutteridge, 2015).

2.4. Uso de Produtos naturais

As fontes naturais são excelentes para fortalecer o sistema antioxidante, uma vez que tais produtos são uma fonte inesgotável de novos compostos para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes para o tratamento e a prevenção de inúmeras patologias (Sarfraz et al., 2020). De fato, os produtos naturais são considerados a fonte mais rica de mediadores de funções biomoleculares que podem melhorar a saúde humana, sendo utilizado para novas formulações acessíveis (Zafar et al., 2018).

Diversos compostos concentrados na natureza podem estar associados com a regulação do estresse oxidativo. Zhang et al., 2022 demonstraram que o pré-tratamento com ácido elágico, muito encontrado na *Punica Granatum*, popularmente conhecida como romã, é capaz de reduzir parâmetros de estresse oxidativo induzidos pelo DQ no intestino delgado de camundongos, como MDA e aumento de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx. Tais achados podem estar associados ao aumento do Nrf2, uma proteína crucial na defesa celular contra o estresse oxidativo como fator de transcrição de enzimas antioxidantes como CAT, SOD, GPx (Liu et al., 2021).

A cúrcuma, pertencente à família *Zingiberaceae*, também demonstrou exercer papel antioxidante em um modelo de obesidade induzida em camundongos C57BL/6. Nesse estudo, a cúrcuma foi capaz de reduzir a quantidade de MDA, importante marcador de estresse oxidativo, enquanto aumentou a expressão de Nrf2 e Heme Oxigênase-1 (HO-1), associados ao aumento da produção de enzimas antioxidantes. Além disso, foi observado uma redução da glicose da corrente sanguínea, apresentando assim um potencial efeito antidiabético (He, 2012).

As vitaminas, no geral, são de grande importância no combate ao estresse oxidativo, como relatado por Zhang et al.(2021). Os autores observaram que o pré-tratamento suplementar com Vitamina D3 em um modelo de estresse oxidativo em camundongos reduziu parâmetros associados ao estresse oxidativo, como MDA, e pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- α e IL-1 β e o Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF κ B); ainda, foi observado aumento da citocina pró-resolutiva IL-10.

O extrato de folha de *Camellia sinensis*, conhecido popularmente como chá verde, também demonstrou efeitos antioxidantes. Por ser rico em muitos polifenóis como catequina, epicatequina, epicatequina-3-galato, epigallocatequina e epigallocatequina-3-galato, o chá verde foi capaz de controlar fatores de transcrição sensíveis a redox, como NF κ B (negativamente) e Nrf2 (positivamente) (Na e Surh, 2008; Stangl et al., 2007).

Assim como o extrato citado acima, a utilização do extrato de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentou efeito cardioprotetor e antioxidante em um modelo de lesão cardíaca em ratos, melhorando a performance cardíaca, aumentando a atividade de SOD, CAT, GPx, GST, GR, GSH e a redução da LPO (Pérez-Torres et al., 2019).

A combinação de compostos isolados encontrados em fontes naturais como resveratrol, presente na uva, e a quercetina, presente na cebola, demonstram um grande potencial antioxidante. Rubio-Ruiz e colaboradores (2019) relataram que esse tratamento associado aumenta a atividade da SOD, CAT, Glutathione-S-transferase (GST), GR e a atividade de Nrf2 em um modelo de síndrome metabólica em ratos.

As isoflavonas, como a genisteína, também agem como fatores antioxidantes, pois são capazes de bloquear os efeitos nocivos das EROs e atuar no aumento de enzimas antioxidantes como GSH. Além disso, a genisteína também é capaz de reduzir a inflamação, ativando a proteína c-Jun N-terminal cinase (JNK), responsável por regular a proliferação e apoptose celular e inibir a atividade de NF- κ B, TNF- α e IL-6 (Behloul e Wu, 2013). Nesse sentido, a Biochanina A, enquanto isoflavona, torna-se uma molécula promissora para exercer efeitos protetores contra os efeitos do estresse oxidativo.

2.4.1 Biochanina A

A Biochanina A (BCA) é uma isoflavona metoxilada encontrado em produtos naturais e pode ser isolada de leguminosas da família *Fabaceae*, majoritariamente das folhas e do caule do trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)(Yu *et al.*, 2019) . A BCA também pode estar presente em outras plantas como soja (*Glycine max* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), amendoim (*Arachis hypogaea*), carqueja (*Genista tridentata* L.) e grão de bico (*Cicer arietinum* L) (Sarfraz *et al.*, 2020).

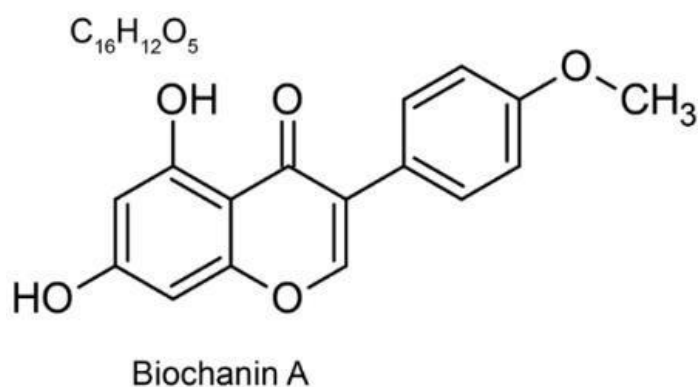


Figura 4. Estrutura química da Biochanina A (Felix *et al.*, 2020)

A BCA possui uma baixa biodisponibilidade, porém, apresenta uma rápida absorção, associada à sua alta permeabilidade a despeito da eliminação biliar e o metabolismo extenso, no qual podem ser os principais fatores responsáveis pela sua baixa biodisponibilidade (Moon *et al.*, 2006).

Em sua biotransformação (figura 5), a BCA sofre *O*-desmetilação, produzindo genisteína (GEN) como metabólito ativo em maior proporção e outros metabólitos em menores proporções. A sua metabolização é atribuída às enzimas microssomias hepáticas humanas, mas as microssomas intestinais de ratos realizam a mesma biotransformação (Tolleson *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2004). Sendo assim, várias isoformas das enzimas hepáticas CYP, incluindo CYP1A2 e CYP1B1, participam das reações de desmetilação (Hu *et al.*, 2003; Tolleson *et al.*, 2002).

As principais vias metabólicas para a BCA são 4'-*O*-desmetilação, seguida por conjugação direta, convertendo BCA em GEN. A principal reação de conjugação no fígado de rato e preparações de microssoma intestinal foi a de glicuronidação. Assim, os glicuronídeos de BCA são derivados do ácido

glicurônico 7-OH e 5-OH e os metabolitos resultantes (como 3', 6- ou 8-hidroxi BCA ou GEN) servem como uma importante fonte de agliconas celulares sobre hidrólise enzimática (Jia et al., 2004; Moon et al., 2006). No entanto, apesar da metabolização da BCA resultar em genisteína, seus efeitos biológicos observados *in vivo* não são idênticos (Yu et al., 2019).

Apesar da biodisponibilidade baixa, a BCA apresentou importantes efeitos biológicos antioxidantes, anticâncer, anti-inflamatórios, antidiabéticos, hepatoprotetor e dentre outros. Todos os efeitos já observados continuam sendo extensivamente investigados (SARFRAZ et al., 2020).

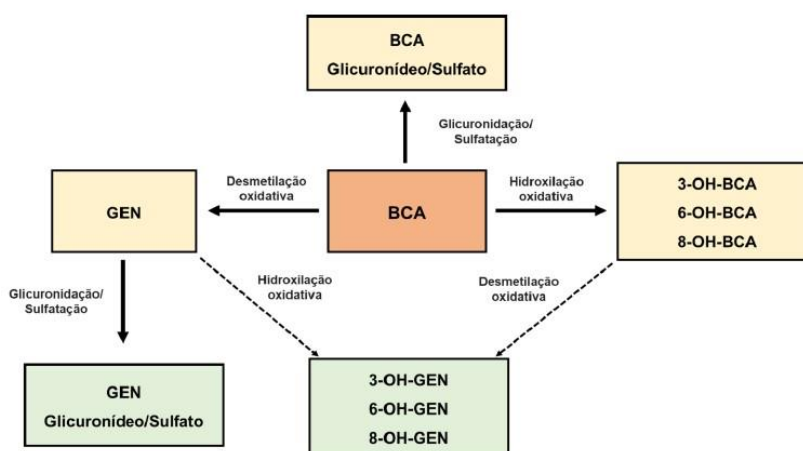


Figura 5. Biotransformação da BCA- BCA- Biochanina A; GEN- Genisteína (adaptada de SUNDARESAN; RADHIGA; DEIVASIGAMANI, 2018).

A BCA demonstrou efeito imunorregulador inibindo a via de sinalização TLR4/NF- κ B e aumentando a expressão do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama (PPAR- γ) em lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Diante disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, o infiltrado de neutrófilos e macrófagos e a atividade da Mieloperoxidase (MPO) foram suprimidos com o tratamento com a BCA (Hu et al., 2020).

Recentemente foi visto que o tratamento com a BCA é eficaz na redução da inflamação em um modelo de asma induzida por Ovalbumina (OVA) em camundongos. O tratamento por via oral com a BCA (50mg/kg) reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e IgE no soro, bem como no lavado broncoalveolar, e reduziu a infiltração de células inflamatórias e danos nos pulmões. Funcionalmente, esses efeitos eram dependentes da ativação do (PPAR- γ), uma vez que o tratamento com o antagonista do PPAR- γ GW9662

reverteu completamente os efeitos inibitórios mediados pela BCA (Derangula, 2021).

Nesse sentido, a BCA mostra ser eficiente no papel resolutivo e anti-inflamatório. Oh et al. (2016) relataram a capacidade da BCA de inibir a degeneração da cartilagem, por antagonizar os efeitos catabólicos do Óxido Nítrico Sintase (NOS), Ciclo-oxigenase-2 (COX2), Prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas pró-inflamatórias, induzidas por IL-1 β em condrócitos. A inibição dessas moléculas está associada à inibição da fosforilação e translocação do NF- κ B para o núcleo das células (Oh et al., 2016).

Além disso, Felix et al. (2020) demonstraram em modelo de artrite induzida por zimosan, o efeito anti-inflamatório da BCA induzido pela modulação da sobrevivência e morte celular dos neutrófilos, bem como sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , e anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 (Felix et al., 2020).

Como já citado, a BCA também possui efeitos farmacológicos contra o câncer, em um modelo *in vitro* de carcinoma de cabeça e pescoço, o tratamento com BCA inibiu a proliferação de células cancerígenas, além de inibir a atividade de NF- κ B, ou seja, limitando a produção de fatores inflamatórios (Cho et al., 2017). Youssef e colaboradores (2016) relataram que o tratamento de Sorafenibe combinado com BCA mostrou um potencial antiproliferativo e pró-apoptótico, com a regulação positiva da caspase-9 e da proteína X (BAX) e a regulação negativa da proteína BCL-2.

Os efeitos neuroprotetores da BCA também se mostram muito relevantes, Wu e colaboradores (2018) identificaram o papel neuroprotetor da BCA em um modelo experimental de hemorragia subaracnóidea em ratos Sprague-Dawley. Os autores observaram redução da apoptose neuronal devido à baixa expressão de BAX, caspase-3 e 9, assim como a diminuição da atividade das vias TLRs e NF- κ B. Além disso, o tratamento com BCA conseguiu reduzir a porcentagem de micróglia ativas e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Wu et al., 2018).

Segundo Guo e colegas (2019), o tratamento com BCA em modelo de isquemia cerebral em ratos Sprague-Dawley não só reduziu fatores

inflamatórios, como a atividade do NF- κ B, mas também reduziu ROS, marcadores de peroxidase lipídica (MDA) e promoveu um aumento de enzimas antioxidantes (SOD e GPx), associado ao aumento da atividade de Nrf2.

Recentemente, o efeito da BCA foi investigado em ratos Wistar com cardiomiopatia induzida durante a obesidade e se observou que, em resposta ao estresse oxidativo e a estímulos inflamatórios, a BCA promoveu suprarregulação da sinalização do Nrf-2, inibindo a produção exacerbada de RL e citocinas pró-inflamatórias, bem como restringiu a ativação do NF- κ B e aumento da produção de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx e GR (Rani et al., 2021). Além disso, a BCA apresentou efeito hepatoprotetor com a redução significativa de AST e ALT (Rani et al., 2021).

Liu e colaboradores (2016) observaram, em modelo de lesão aguda hepática induzida por lipopolissacarídeo/D-galactosamina em camundongos, que a BCA exerceu efeito hepatoprotetor através da regulação positiva de Nrf2, podendo observar aumento de enzimas antioxidantes e redução de MDA e a regulação negativa do inflamassoma NLRP3, além de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, ALT e AST foram reduzidas nos grupos tratados com BCA. Dessa forma, é importante que haja maiores estudos acerca dos mecanismos de ação da BCA como isoflavona antioxidante e hepatoprotetora.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor da Biochanina A na intoxicação induzida por Diquat em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a padronização do modelo experimental de intoxicação por Diquat;
- Avaliar os efeitos da Biochanina A na intoxicação induzida por Diquat sobre:
 - Os marcadores para estresse oxidativo;
 - A atividade da Mieloperoxidase;
 - A quantificação de citocinas pró e anti-inflamatória;
 - As alterações morfológicas nos tecidos.

4. Material e métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), fêmeas, não prenhes, híginas, pesando entre 25-35 g e com 8-12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com 21 ± 2 °C de temperatura, $60 \pm 5\%$ de umidade e ciclo de 12/12 horas claro/escuro, além de alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo nº 2912230322 (ANEXO A).

4.2. Reagentes

Foram utilizados, Diquat (Syngenta S.A., São Paulo, SP., Brasil) 25 mg/kg dissolvida em sódio 0,9%, para administração; Biochanina A (Chengdu pufeide biotech co., ltd), diluída em Tween 20, a 5% (Vetec, Rio de Janeiro, BR), e solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%; Cloridrato de Cetamina (Ketamina®, Agener União) 100 mg/kg e o Cloridrato de Xilazina (Calmiun®, Agener União) 10 mg/kg.

4.3. Delineamento experimental

Para padronização do modelo de intoxicação por DQ, foram selecionadas 5 doses de DQ (25, 50, 75, 100 e 150 mg/kg) considerando a literatura pertinente (Wu, Zhang e Klaassen, 2012; Wu *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2022). Os animais foram separados de acordo com as doses determinadas e submetidos à administração (i.p.) do DQt. Posteriormente, foi calculado o percentual de sobrevivência desses animais de acordo com a seguinte fórmula: (% de sobrevivência no grupo DQ / % mortalidade grupo controle) x 100.

Após a determinação a dose de DQ, os animais foram divididos em 6 grupos: 1- Salina; 2- BCA 100 mg/kg; 3- DQ 25 mg/kg; 4- BCA 25mg/kg + DQ 25 mg/kg; 5- BCA 50 mg/kg + 25 mg/kg; e 6- BCA 100 mg/kg + DQ 25 mg/kg, de acordo com o delineamento abaixo (Figura 6). Antes da realização do experimento os animais foram submetidos a um período de sete dias para ambientação.

Após esse período, os animais receberam os tratamentos com BCA ou salina, durante 12 dias, por via oral (v.o.). No 12º dia, além do tratamento com a BCA, os animais também receberam o DQ ou salina, por via intraperitoneal (i.p.). Por fim, no 13º dia, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (i.p.) e submetidos ao deslocamento cervical.

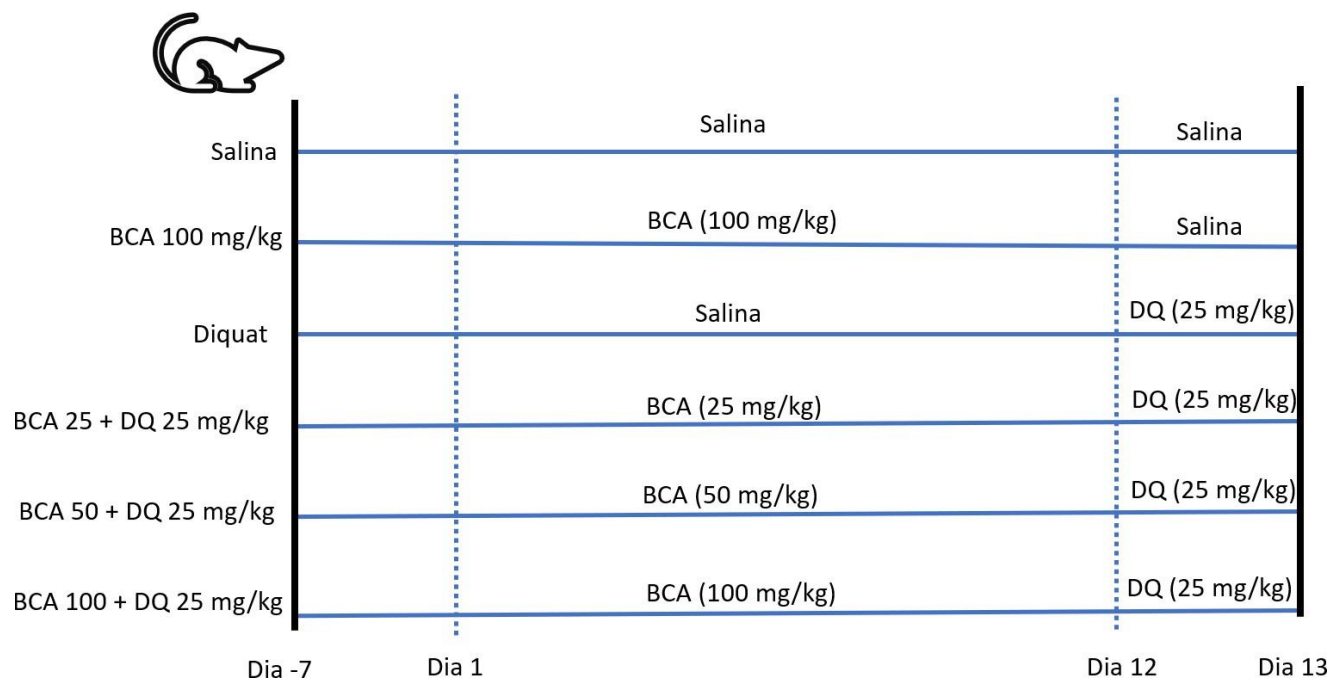


Figura 6. Delineamento experimental demonstrando os procedimentos realizados para pré tratamento dos animais com BCA e indução de hepatotoxicidade com DQ (n=8/grupo). BCA- Biochanina A. Os animais foram pré tratados por 12 dias com BCA ou salina e desafiados no último dia, ou não com DQ. Por fim, 24 horas após o desafio, os animais foram eutanasiados e levados para coleta de sangue e tecidos.

4.4. Coleta de amostras

Após 24 horas da administração do DQ, os animais foram eutanasiados. Posteriormente, foi realizada a coleta de sangue, através do plexo retro orbital, e coletados os seguintes órgãos: fígado, jejuno, pulmões e rins, que foram armazenados a -80°C ou em formaldeído 10% (para as análises histológicas). Para realização do ensaio da atividade de MPO a coleta foi realizada 6 horas após a administração de DQ.

4.5. Avaliações Bioquímicas

O sangue obtido foi centrifugado a 10 000 g, a 10°C, por 10 minutos, para separação do soro, e este foi armazenado a -80°C para posterior análise. As amostras de soro foram submetidas a quantificação de AST, ALT, Creatinina e

Ureia. Os testes foram realizados segundo as orientações do fabricante (Labtest®).

4.6. Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O homogenato do tecido foi preparado em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) a uma proporção de tecido para tampão de 1:9 (m/ v). O homogenato foi então centrifugado a 800xg, a 4°C, durante 15 min, e o sobrenadante foi utilizado para a realização do teste. A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com modificações.

Resumidamente, o homogenato do tecido (100 µL em tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0) foi adicionado a 350 µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,36%) e foi incubado por 1 hora a 85°C. Em seguida, os tubos foram resfriados em gelo e centrifugados a 500xg durante 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 532 nm.

4.7. Determinação de grupos sulfidrilas no tecido hepático

O conteúdo de grupamentos sulfidril (SH) foi dosado de acordo com o método descrito por Ellman (1959) e se baseia na reação dos grupos tióis livres das proteínas com o DTNB (reagente de Ellman). Grupamentos tióis indicam padrão redox do meio celular de forma que a maior quantidade de SH sugere que o meio se encontra redutor. Os grupos SH livres principalmente nas proteínas reagem com DTNB, resultando na formação da proteína tionitrofenilada e um ânion (2-nitro-5-tiobenzoato) amarelado. As amostras do tecido hepático foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) (1:10, p/v).

Em seguida, o homogenato do tecido hepático foi centrifugado a 10 000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas e para o ensaio. As amostras foram pipetadas em placa de 96 poços e foi adicionado até 165 µL de PBS, seguido de 35 µL de tampão forte (ácido bórico 100 mmol/L, pH 8,5, contendo EDTA 0,2 mmol/L) e 10 µL de DTNB que foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação foi realizada a leitura a 412 nm. Os dados foram expressos em µmol/mg de proteína.

4.8. Mensuração da atividade da Mieloperoxidase no tecido hepático

A análise da atividade da MPO, presente principalmente nos neutrófilos, foi utilizada como medida indireta do infiltrado desse tipo celular no tecido hepático. Os tecidos foram homogeneizados em Tampão Fosfato de Sódio (PBS) e HTAB (0,5%), na proporção de 1mL/100mg de tecido. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14000 g. Foram utilizados 20 µL de sobrenadante para a reação juntamente com 200 µL da solução contendo O-dianisidina e, por fim, a absorbância das amostras foi determinada em 460 nm através de um espectrofotômetro (Bradley et al., 1982).

4.9. Quantificação de citocinas no tecido hepático

As citocinas TNF- α e IL-10 foram quantificadas utilizando kits para ELISA (Invitrogen® e R&D®, respectivamente). As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão de extração de citocinas (PBS contendo coquetel de inibidor de protease, PMSF, NaCl, EDTA e Tween 20) e centrifugadas. Cerca de 50µL do sobrenadante foi adicionado à placa de 96 poços de alta ligação, com o anticorpo de captura previamente aderido e a placa bloqueada. Posteriormente, as amostras foram incubadas (3 a 24 horas), lavadas e adicionadas ao anticorpo de detecção. Em seguida, o conjugado foi adicionado à placa e, por fim, acrescentado o substrato. As placas foram analisadas em espectrofotômetro de acordo com o protocolo do fabricante.

4.10. Histologia

As amostras de fígado foram mantidas em formalina tamponada 10% a 25°C por no mínimo 24 h, para a fixação. Após fixação, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II), diafanizados em banhos de xilol, e impregnados em parafina, e por fim, foram incluídos em blocos de parafina.

O material parafinado foi seccionado em micrótomo, em fragmentos com espessura de 5 µm e estendidos em lâminas. As Lâminas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) para análise ao microscópio acoplado à câmera digital (Leica DM 500).

4.10.1. Análise histopatológica das amostras de fígado

A análise histológica dos tecidos hepáticos foi baseada nos parâmetros morfológicos da doença hepática gordurosa não alcoólica em roedores relatados por Liang et al (2014): inflamação lobular (avaliação geral de todos os focos inflamatórios), inflamação portal, microgranulomas (pequenos agregados de macrófagos), grandes lipogranulomas, células baloniformes e corpos acidófilos (apoptose hepática) e fibrose. Além disso, o sistema de graduação usado para classificar as alterações histológicas é apresentado na Tabela 1. Para realizar uma análise histológica robusta e objetiva, cinco campos histológicos (0,025 mm², com aumento de 100x) foram analisados em cada amostra de fígado. Os campos histológicos foram selecionados por randomização sistemática, de modo que para cada campo selecionado seguiam-se dois campos descartados. O sistema de escores foi aplicado a cada campo e o escore final de cada caso foi obtido pela média de todos os escores de cada amostra analisada.

Tabela 1. Sistema de gradação histológica para doença hepática gordurosa não alcoólica em roedores.

Característica histológica	Escore			
	0	1	2	3
Esteatose				
Macrovesicular	<5%	5–33%	33–66%	>66%
Microvesicular	<5%	5–33%	33–66%	>66%
Hipertrofia/Balonização celular	<5%	5–33%	33–66%	>66%
Inflamação				
Número de focos/campo	<0.5	0.5–1.0	1.0–2.0	>2.0

(Liang et al., 2014).

4.11. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, após confirmada a normalidade dos dados, procedeu-se os testes t e ANOVA de uma e duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. A análise foi realizada através do programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média ± Desvio padrão (DP), considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

Os dados sobre a gradação histológica da doença hepática gordurosa não alcoólica em modelo murino foram expressos como média e IC95%. Como as medidas de pontuação são consideradas dados não gaussianos por natureza, as medianas de cada grupo foram comparadas entre si usando o teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas *pos-hoc* de Dunn. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Padronização do modelo experimental

5.1.1. Determinação da Dose de Diquat

A escolha da dose de DQ que será utilizada no presente estudo foi determinada através da realização de um experimento, utilizando as doses de 25, 50, 75, 100 e 150 mg/kg, selecionadas com base em estudo da literatura (Figura 7) (Wu, Zhang e Klaassen, 2012; Wu et al., 2022; Xu et al., 2007; Zhang et al., 2022). Os animais que receberam a dose de 150 mg/kg morreram em 3 horas, enquanto os animais que receberam 100 mg/kg morreram em 4 horas e, 62,5% daqueles que receberam 50 mg/kg de DQ morreram em até 24 horas. Dos animais que receberam a dose de 75 mg/kg, 71,42 % morreram em 6 horas.

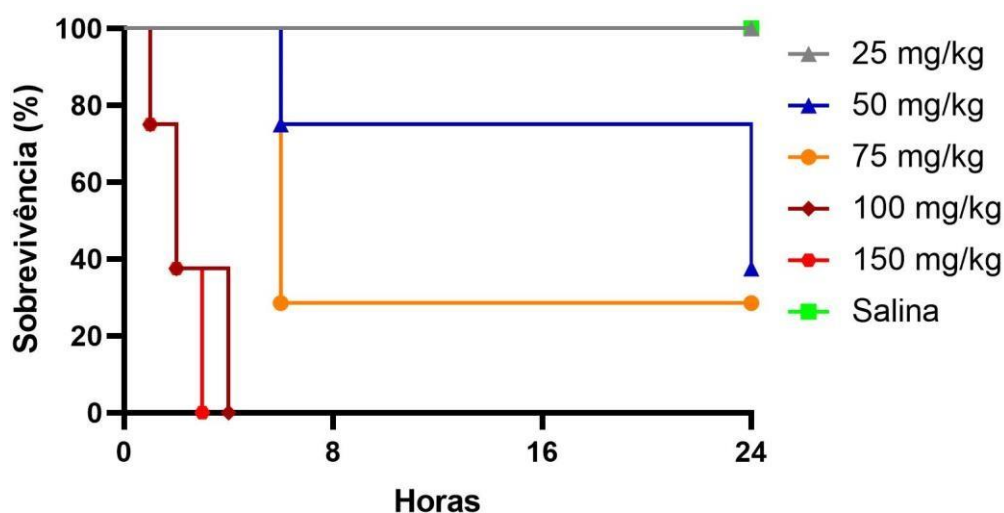


Figura 7. Percentual de sobrevivência dos grupos de animais que receberam as doses DQ de 25, 50, 75, 100 e 150 mg/kg, no período de 24 horas (n=8/grupo).

Os animais que receberam a dose de 25 mg/kg se mantiveram vivos durante as 24 horas de experimento. Dessa forma, a dose de 25 mg/kg de DQ foi determinada para ser utilizada nos experimentos futuros (Xu et al., 2007; Wu, Zhang e Klaassen, 2012). Ainda, é importante ressaltar que não houve mortalidade no grupo salina.

Para a análise de estresse oxidativo os tecidos, o fígado, jejuno, pulmão e rim foram coletados. Foi observado que houve peroxidação lipídica, demonstrada pela quantificação do TBARS, em todos os tecidos, exceto o rim, no grupo DQ quando comparado ao grupo salina (Figura 8). Dessa forma, foi possível observar que a dose de 25 mg/kg se mostrou eficaz em causar danos em múltiplos órgãos sem reduzir a taxa de sobrevivência.

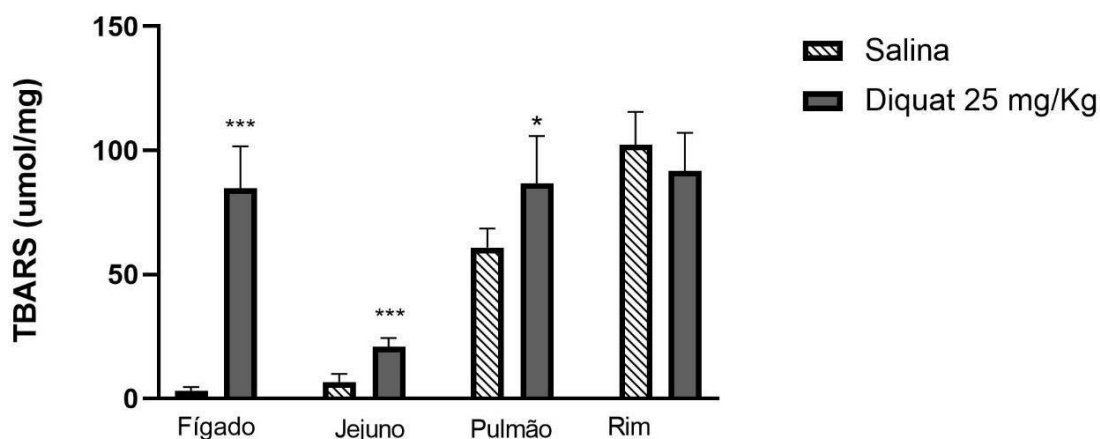


Figura 8. Avaliação da peroxidação nos tecidos, pela da determinação de TBARS no fígado, jejuno, pulmão e rim. Os animais foram desafiados ou não (i.p.) com DQ, 24 hrs depois, foram eutanasiados e em seguida foram coletados fígado, jejuno, pulmão e rim. Dados foram expressos como média $\pm$ DP, analisados pelo Teste-t. Os resultados foram considerados significativos quando $*p<0,05$, $***p<0,001$ quando comparados ao grupo DQ.

5.2 Efeito antioxidante da BCA em órgãos

O efeito protetor da BCA foi avaliado sobre fígado, jejuno, pulmão e rim, utilizando a dose de 100 mg/kg de BCA (Alauddin et al., 2018; Breikaa et al., 2013; Xue et al., 2020). A partir da quantificação de TBARS foi possível observar uma redução significativa no tecido hepático do grupo tratado com a BCA, quando comparado ao grupo DQ. Jejuno, pulmão e rim apresentaram diferença significativa somente entre os grupos salina e DQ (Figura 9).

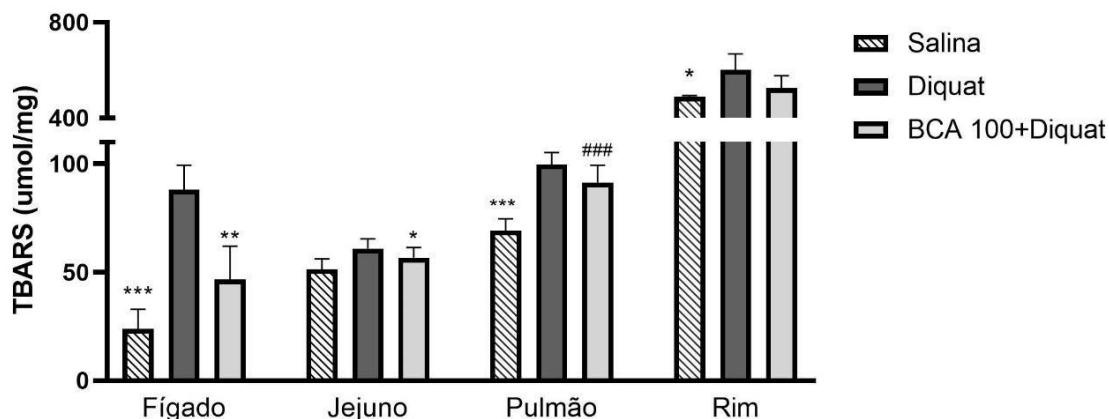


Figura 9. Avaliação da peroxidação lipídica nos tecidos, pela da determinação de TBARS no fígado, jejuno, pulmão e rim, após tratamento com BCA 100 mg/kg. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA 100 mg/kg e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, sendo que 24 hrs depois, foram eutanasiados e em seguida coletados fígado, jejuno, pulmão e rim, que foram levados para análise. Dados expressos como média $\pm$ DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós teste de Turkey. Os resultados foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com grupo DQ e #### $p < 0,001$ quando comparados com o grupo salina.

Após investigação do efeito tóxico pró-oxidante do DQ nos tecidos, foi observado que o fígado sofreu maior efeito do agroquímico e, portanto, optou-se por continuar a investigação nesse tecido. Desse modo, o efeito protetor da BCA no fígado foi avaliado também em doses menores de 25, 50 e 100 mg/kg, através do ensaio de determinação de TBARS. Como demonstrado na Figura 10, o grupo DQ apresentou quantidade de TBARS maior do que o grupo salina.

Todas as doses de BCA reduziram a quantidade de TBARS com relação ao grupo DQ, no entanto a dose de 100 mg/kg mostrou maior redução da quantidade TBARS. Também foi possível notar diferença entre o grupo que recebeu a dose de 25 mg/kg e a dose de 100 mg/kg.

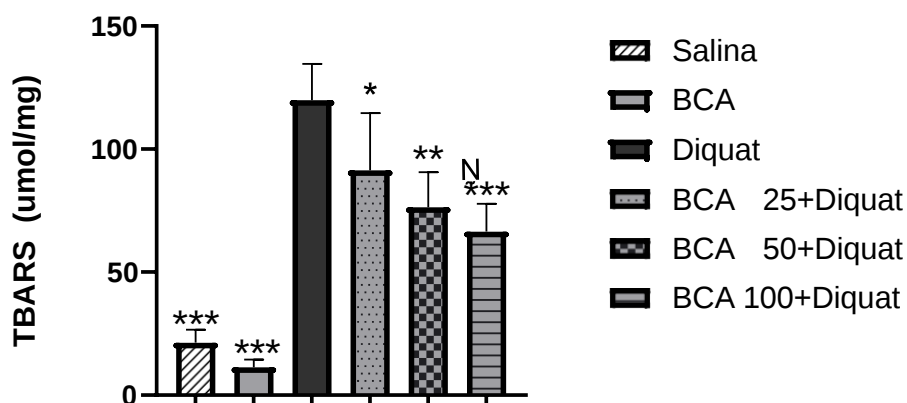


Figura 10. Representação da determinação de TBARS no tecido hepático dos animais controles e tratados com BCA nas doses de 25mg/kg, 50mg/kg e 100 mg/kg, a fim de avaliar a peroxidação lipídica no fígado. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, sendo que 24 hrs depois, foram eutanasiados e em seguida coletado o fígado e levados para análise. Resultados expressos como média $\pm$ DPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Os Resultados foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com grupo DQ e $\Delta < 0,05$ quando comparados com o grupo BCA 25 mg/kg.

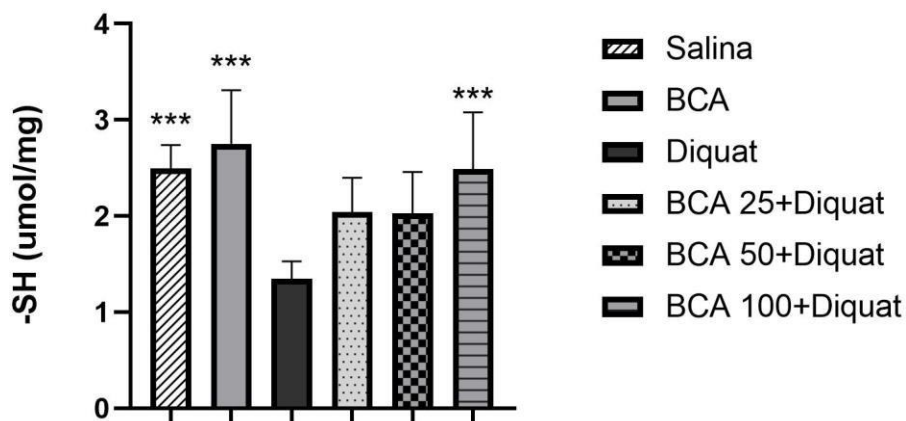


Figura 11. Representação da determinação de grupos sulfidrilas no tecido hepático dos animais controles e tratados com Biochanina A 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100 mg/kg, como medida de ambiente antioxidante. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o) com BCA e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ, sendo que 24 hrs depois, foram eutanasiados e em seguida foi coletado o fígado e levado para análise. Resultados expressos como média $\pm$ DPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com *** p <0,001 quando comparados com o grupo DQ.

O potencial antioxidante da BCA também foi avaliado pela determinação de grupos -SH. Assim, observou-se que houve diferença significativa entre o grupo salina e DQ, mostrando uma redução de -SH nos animais que receberam somente DQ (Figura 11). Também foi possível demonstrar que a BCA na dose de 100 mg/kg exerceu um efeito antioxidante, mantendo a quantidade de grupos -SH semelhante ao grupo salina (Figura 11).

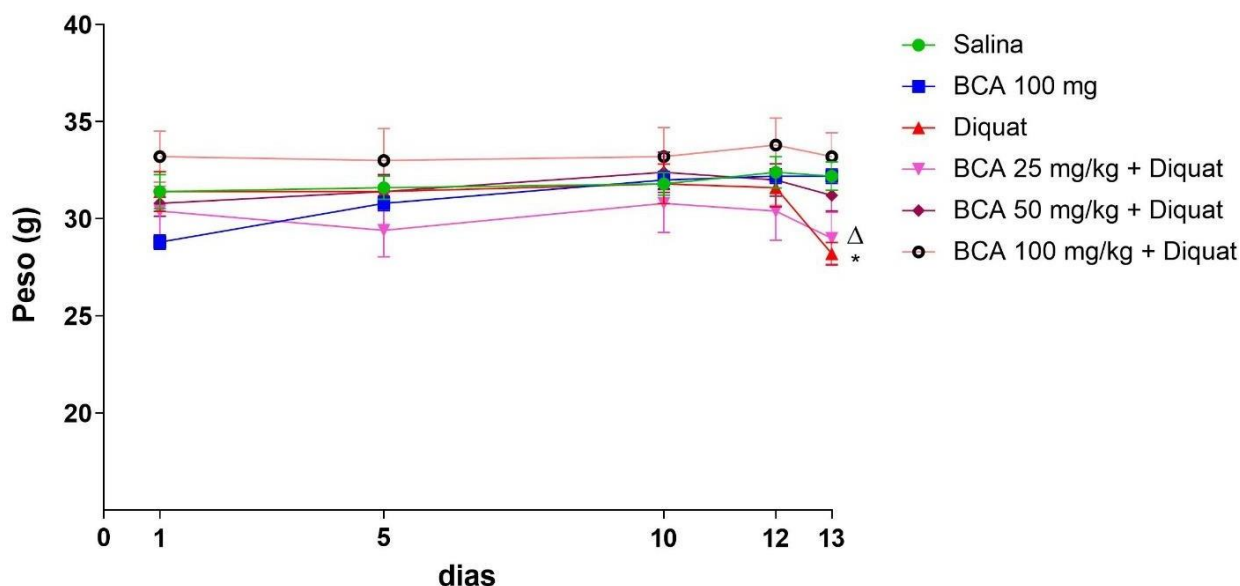


Figura 12. Representação do peso dos animais ao longo do delineamento experimental. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, o peso dos animais foi aferido diariamente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e avaliados por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey. Resultados foram considerados significativos quando * p <0,05 e *** p <0,001, quando comparados com grupo DQ e Δ <0,05 quando comparados com o grupo BCA 100 mg/kg.

Como já esperado, os animais mantiveram o peso inicial, sem nenhuma diferença significativa até o 12º dia. Porém, os animais que receberam o DQ

apresentaram perda de peso, havendo perda de peso significativa nos animais do grupo DQ, quando comparado com grupos salina e BCA 100 mg/kg. A dose BCA 25 mg/kg+DQ apresentou perda de peso significativa quando comparada com a dose de BCA 100 mg/kg (Figura 12).

5.3 Efeitos da BCA sobre as aminotransferases- ALT e AST

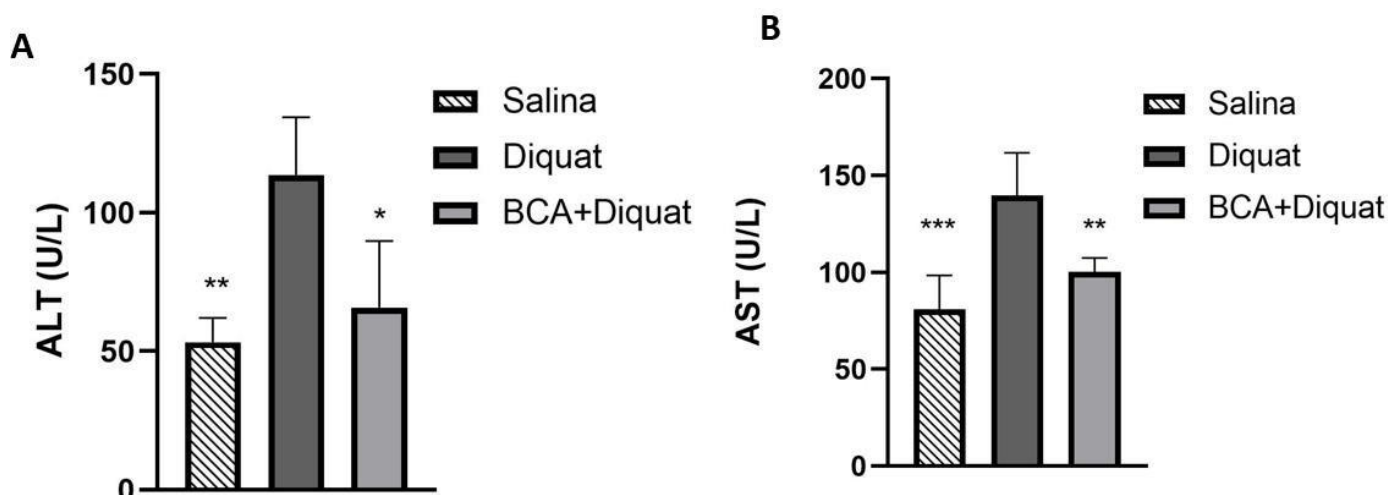


Figura 13. Quantificação de ALT (A) e AST (B) no sangue dos animais controles e tratados com Biochanina A 100 mg/kg. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA 100 mg/kg e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, sendo que 24 hrs depois, foram anestesiados e em seguida coletado o sangue, utilizado para análise. Resultados expressos como média $\pm$ DPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com grupo DQ.

A atividade das enzimas ALT e AST é um importante marcador de lesão hepática (Zhang et al., 2020). Na figura 13, foi possível observar que o grupo que recebeu apenas DQ mostrou um aumento da dosagem de ALT e AST, havendo diferença significativa entre o grupo salina, que apresenta quantidade reduzida de ALT e AST. Os resultados observados mostram também que o pré-tratamento com a BCA reduziu a atividade da ALT e AST quando comparado ao grupo DQ (Figura 13).

5.4 Efeitos da BCA sobre a Ureia e Creatinina

A mensuração de ureia e creatinina foi realizada através de amostra de sangue de animais tratados com BCA e injetados por DQ. Observa-se que os animais do grupo DQ apresentaram elevadas quantidades de ureia, havendo diferença significativa entre os grupos DQ e salina. Os resultados mostram que a BCA foi capaz de reduzir significativamente a concentração de ureia, em relação ao grupo DQ (Figura 14). Contudo, apesar de haver um aumento da

quantidade de creatinina nos animais que receberam apenas DQ, não houve diferença significativa para a quantificação de creatinina (Figura 14).

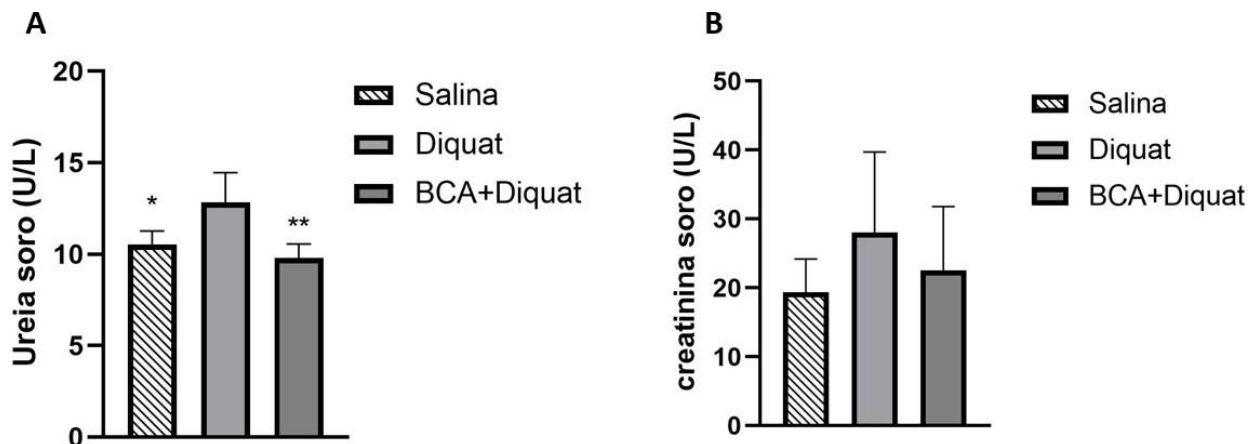


Figura 14. Quantificação de Ureia (A) e Creatinina (B) no sangue dos animais controles e tratados com Biochanina A 100 mg/kg. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA 100 mg/kg e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, sendo que 24 hrs depois, foram anestesiados e em seguida foi coletado o sangue, utilizado para análise. Resultados expressos como média $\pm$ DP, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo DQ.

5.5. Efeito da BCA sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima MPO foi avaliada no tempo de 6 horas após a administração de DQ, para determinar indiretamente o infiltrado de neutrófilos para o fígado. A administração de DQ levou ao aumento da atividade de MPO, como pode ser visto na figura 15, enquanto que o grupo salina mostrou a atividade de MPO reduzida. Foi observado que o grupo tratado com BCA reduziu significativamente a atividade de MPO, quando comparado ao grupo DQ (Figura 15).

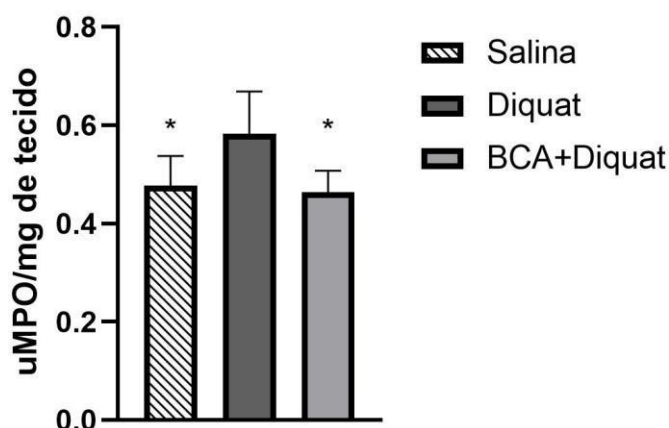


Figura 15. Determinação da atividade de MPO no tecido hepático dos animais controles e tratados com Biochanina A 100 mg/kg, com intuito de avaliar infiltrado de neutrófilos. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA 100 mg/kg e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, sendo que 06 hrs depois, foram eutanasiados e em seguida coletado o fígado e levado para análise. Resultados expressos como média $\pm$ DPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com * $p < 0,05$, quando comparados com o grupo DQ.

5.6. Efeito da BCA sobre as citocinas pró e anti-inflamatória

Para a avaliação do perfil pró-inflamatório foi realizada a quantificação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) no tecido hepático. Foi observado que houve uma redução significativa da quantidade de TNF- α no grupo BCA quando comparado ao DQ (Figura 16).

Com relação ao perfil anti-inflamatório, foi realizada a quantificação da citocina IL-10 no tecido hepático. No entanto, foi observado que não houve diferença significativa para IL-10 entre os grupos (Figura 16).

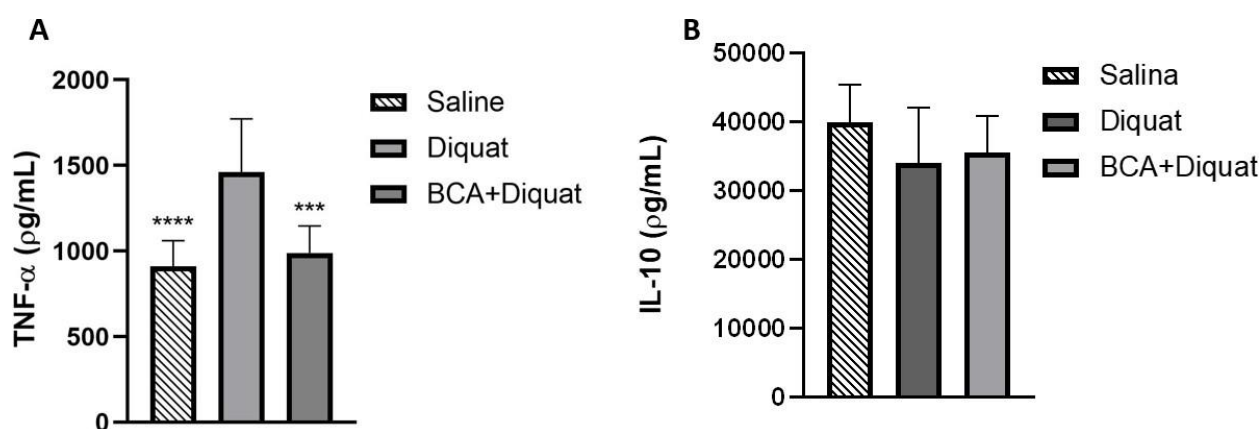


Figura 16. Concentração de TNF- α (A) e IL-10 (B) no tecido hepático dos animais controles e tratados com Biochanina A 100 mg/kg. Os animais receberam durante 12 dias o pré-tratamento (v.o.) com BCA e no 12º também foram desafiados (i.p.) com DQ 25 mg/kg, sendo que 24 hrs depois, foram eutanasiados e em seguida foi coletado o fígado e levado para análise. Resultados expressos como média $\pm$ DPM, analisados pela ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Dados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo DQ.

5.7. Efeito da BCA sobre os padrões morfológicos do fígado

As principais alterações histológicas observadas nas amostras hepáticas analisadas neste estudo foram: leve inflamação perivenular, intralobular e portal, células baloniformes associadas a vacuolização citoplasmática, que foi interpretada como esteatose macrovesicular e microvesicular, acúmulo focal de macrófagos (microgranulomas), hepatócitos apoptóticos e acúmulo focal de pigmento granular acastanhado compatível com bilirrubina dentro dos ductos biliares. Fotomicrografias mostrando todas as alterações histológicas observadas nas amostras de fígado são apresentadas na Figura 17.

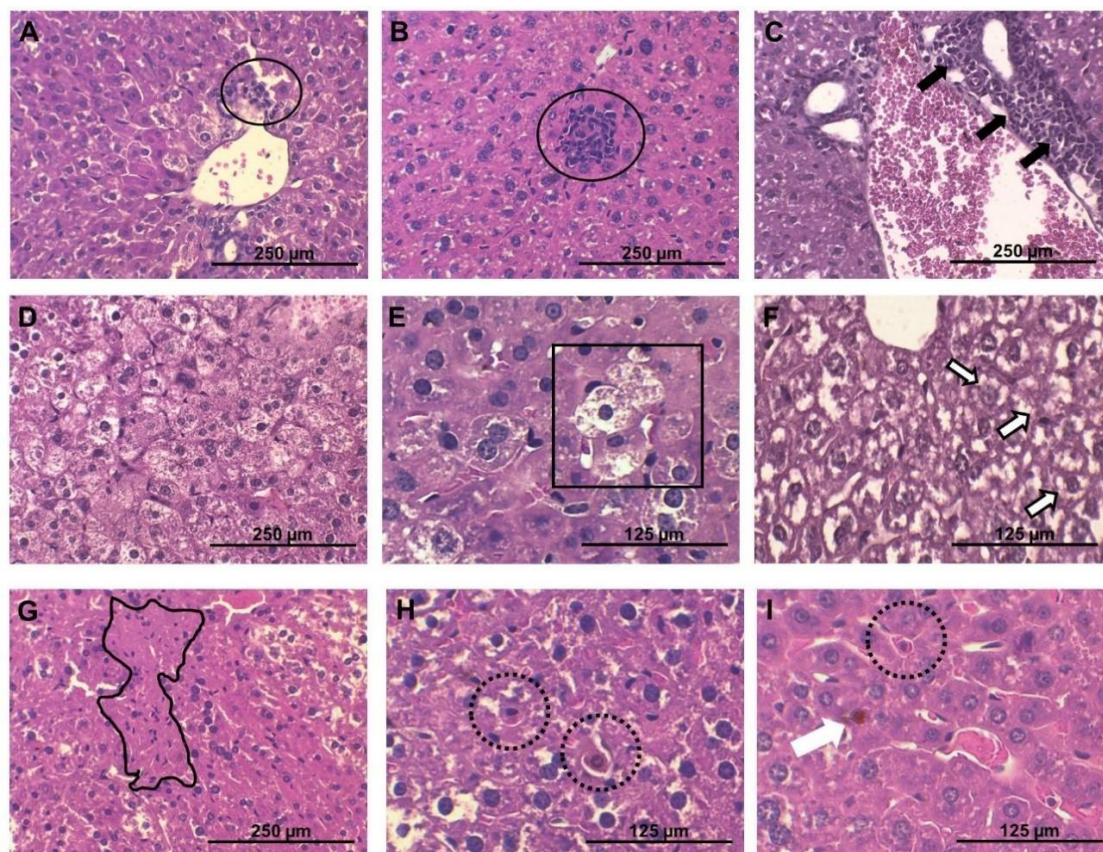


Figura 17. Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE mostrando as principais alterações patológicas observadas na análise dos tecidos hepáticos. (A) Foco de inflamação (círculos) próximo à veia centrolobulillar, (B) no interior do lóbulo hepático e (C) no espaço periportal (400x). (D) Balonização de hepatócitos com vacuolização citoplasmática variável (400 x), compatível com (E) macrovesicular (quadrado) e (F) esteatose microvesicular (seta branca com contorno preto) (1000 x). (G) Acúmulo focal de macrófagos substituindo o parênquima hepático, compatível com microgranuloma (área delimitada pela linha preta) (400 x). (H/I) Corpos apoptóticos (círculos pontilhados) e (I) acúmulo focal de pigmento acastanhado compatível com bilirrubina nos ductos biliares (seta branca sem contorno) (1000 x).

Embora uma variedade de características histopatológicas tenha sido encontrada nas amostras de fígado, a principal alteração morfológica observada foi a vacuolização citoplasmática dos hepatócitos, compatível com esteatose, acompanhada ou não de hipertrofia (balonização). Os grupos DQ e BCA 25 mg/kg + DQ exibiram alterações histológicas mais severas, principalmente a vacuolização citoplasmática esteatótica. Embora a esteatose tenha sido facilmente identificada nos grupos BCA 50 mg/kg + DQ e BCA 100 mg/kg + DQ, tal alteração foi menos intensa nesses grupos em comparação com os grupos DQ e BCA 25 mg/kg + DQ, enquanto no grupo salina a esteatose foi focal e raramente encontrada (Figura 18).

A distribuição e intensidade das demais alterações patológicas variaram consideravelmente entre os grupos estudados. Focos de leve inflamação intralobular, perivenular e portal foram observados nos tecidos hepáticos dos grupos DQ e BCA 25 mg/kg + DQ, mas não nos grupos BCA 50 mg/kg + DQ e

BCA 100 mg/kg + DQ e Salina. O acúmulo focal de macrófagos, formando microgranulomas foi a alteração menos comum, observada em apenas duas amostras do grupo DQ (40%) e uma amostra do grupo BCA 25 mg/kg + DQ (20%). Finalmente, o acúmulo focal de pigmento granular acastanhado compatível com bilirrubina nas vias biliares foi encontrado em apenas uma amostra do grupo DQ.

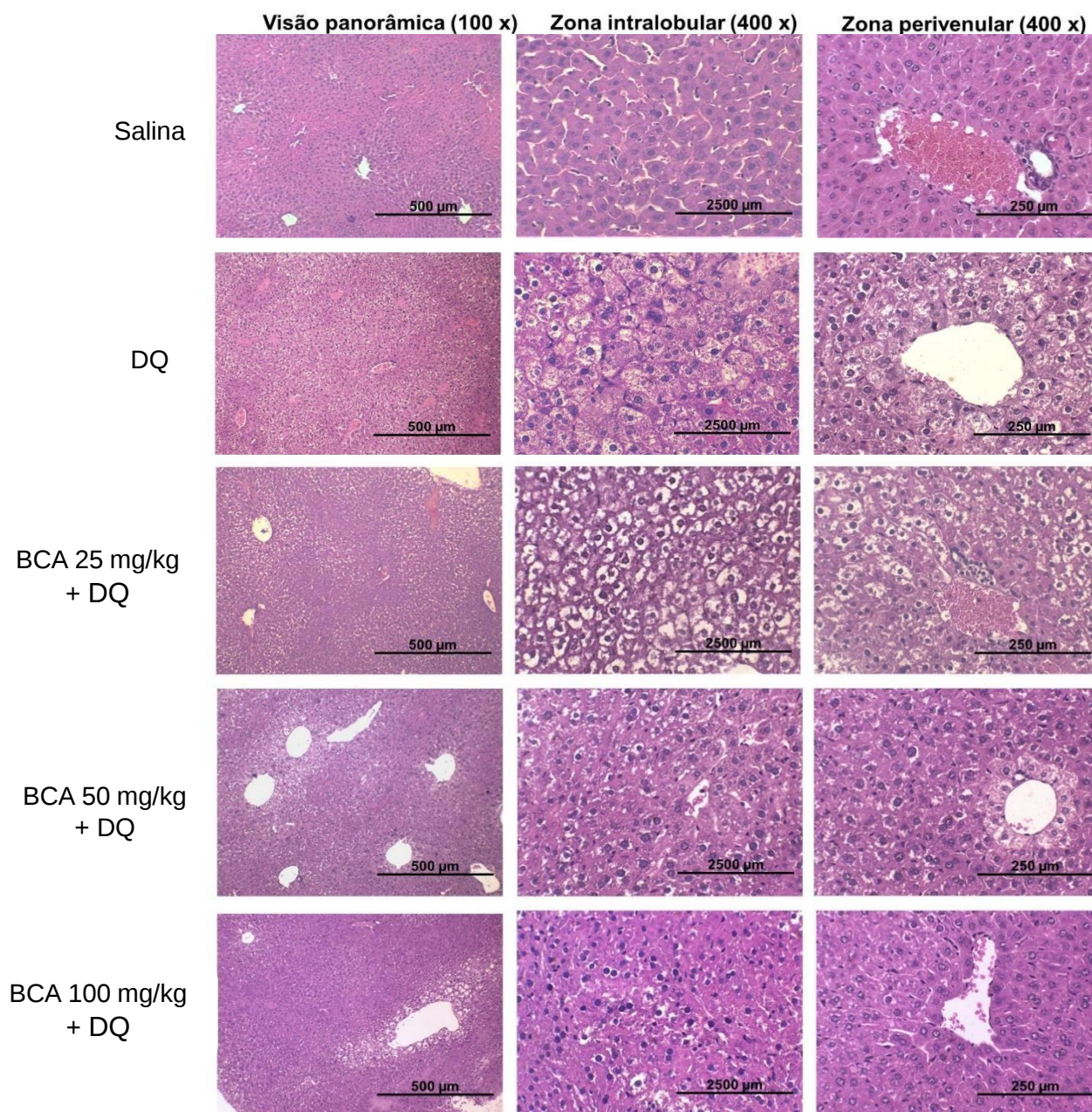


Figura 18. Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE mostrando a principal alteração patológica observada na análise dos tecidos hepáticos caracterizada por vacuolização citoplasmática gordurosa associada ou não ao balonismo dos hepatócitos nos grupos experimentais. As alterações da vacuolização são marcadamente mais intensas nos grupos Diquat e BCA 25 mg/kg +Diquat, mas praticamente ausentes no grupo salina.

Os dados estatísticos são apresentados na Figura 19. Não houve diferença significativa entre os grupos DQ e BCA 25 mg/kg + DQ em nenhum dos parâmetros histológicos avaliados neste estudo ($p>0,05$). Os grupos BCA 50 mg/kg + DQ e BCA 100 mg/kg + DQ apresentaram uma diminuição significativa na graduação da esteatose (macro e microvesicular) e hipertrofia (células baloniformes) em comparação com o grupo DQ ($p<0,05$). O grupo salina apresentou os menores escores de gradação histológica.

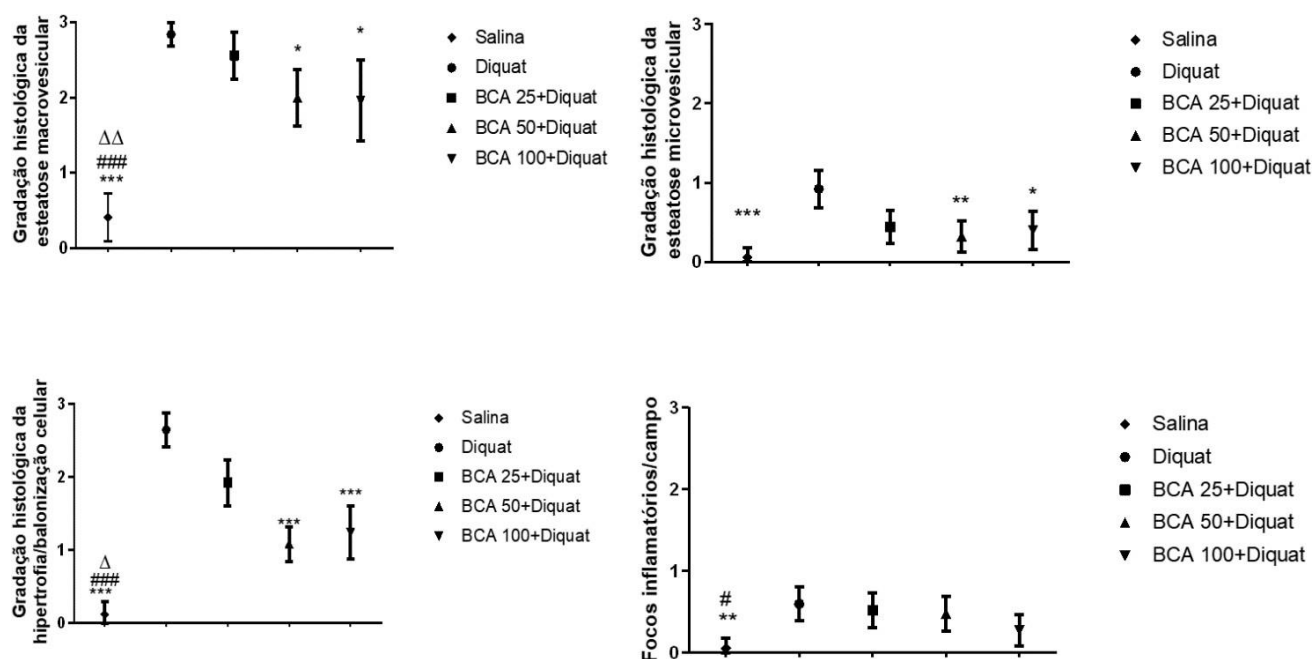


Figura 19. Determinação da gradação histológica de parâmetros morfológicos de doença hepática gordurosa não alcoólica nos grupos experimentais. Dados expressos como média e IC95%. Diferenças significativas em comparação com o grupo Salina estão expressas como: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; e * $p<0,001$. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças significativas em relação ao grupo BCA 25 + DQ estão expressas como: # $p<0,05$ e ### $p<0,001$. Diferenças significativas em relação aos grupos BCA 50 + DQ e BCA 100 + DQ estão expressas como: $\Delta p<0,05$ e $\Delta\Delta p<0,01$.**

6. Discussão

O DQ é um herbicida de ação tóxica que sofre ciclos de oxidação e redução, levando à produção de superóxido (Magalhães, Carvalho e Dinis-Oliveira, 2018). Como resultado, ocorre uma elevada produção de ROS e, consequentemente, causando estresse oxidativo e lesão múltipla de órgãos (Bradberry et al., 2000). Sendo assim, a utilização do DQ como modelo para investigação de substâncias utilizadas no campo, que agem como agentes oxidantes, é de grande interesse (Wu, Zhang e Klaassen, 2012).

O modelo de intoxicação por DQ, foi padronizado pela primeira vez, sobre as condições do nosso laboratório. Para isso, inicialmente foi necessário que houvesse a determinação da dose de DQ a ser utilizada (Wu, Zhang e Klaassen, 2012; Wu et al., 2022; Xu et al., 2007; Zhang et al., 2022).

No entanto, houve certa limitação, uma vez que há poucos estudos que utilizam DQ como agente tóxico em camundongos, além disso, existe uma janela entre os anos 90 e 2020, período no qual as publicações a respeito desse agente são ainda mais escassas. Devido à proibição do uso do PQ, um análogo do DQ, e o aumento exponencial do uso do DQ (Wang et al., 2017), tornou-se maior o interesse pelos investigadores para avaliar os danos que podem ser desencadeados pelo uso do DQ, e consequentemente, também aumentou a busca por compostos protetores para esses danos.

Neste trabalho, foi evidenciado que animais que receberam doses maiores de DQ (100 e 150 mg/kg) morreram em 4 horas, enquanto a menor dose (50 mg/kg) mostrou uma taxa de sobrevivência de apenas 37,5%. Lock (1979) determinou que a dose média letal de DQ foi de 140 mg/kg em ratos Wistar, o que se correlaciona com os resultados do presente estudo, uma vez que foram observadas menores taxas de sobrevivência quando os animais receberam as doses mais altas de DQ. Ademais, Wu, Zhang e Klaassen (2012) observaram que os camundongos que receberam DQ na dose de 125 mg/kg (i.p.) começaram a morrer 3 horas após a injeção e 40% morreram em 4 horas.

A fim de determinar uma dose que não reduzisse a taxa de sobrevivência dos animais, a utilização da dose de 25mg/kg de DQ possibilitou a sobrevivência de todos animais em 24 horas, sendo essa a escolhida para ser utilizada nos

experimentos seguintes. Segundo Xu e colaboradores (2007), quando administrada a dose de 75 mg/kg nos animais, 56,5% morrem em 24 horas, refletindo pouca viabilidade para utilização dessa dose. Por outro lado, a dose de 25 mg/kg parece ser eficiente, uma vez que mostrou ser capaz de induzir lesões em múltiplos órgãos sem causar a morte desses animais (Zhang et al., 2022).

Uma vez padronizada a dose de DQ a ser utilizada, foram avaliados os danos causados pelo ciclo oxirredução do DQ nos tecidos, através da quantificação dos níveis de LPO nos tecidos avaliados. A LPO é resultante da ação dos RL sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular (Lima; Saes; Abdalla, 2001).

No presente estudo, a avaliação de LPO foi realizada através da quantificação de MDA, um aldeído formado como um produto secundário durante a LPO, considerado extremamente tóxico ao organismo e um bom indicador de injúria à membrana celular (Halliwell; Gutteridge, 2015). Dessa forma, para determinação de MDA foi realizado o teste de determinação de TBARS, uma vez que a condensação do MDA com o Ácido Tiobarbitúrico (TBA) é capaz de formar produtos que podem ser identificados por espectrofotômetro (Lima; Saes; Abdalla, 2001).

Neste trabalho, observamos que o fígado foi o órgão que apresentou maior aumento na concentração de TBARS, em relação ao grupo salina. Esse dado pode ser explicado pelo fato de que o DQ é majoritariamente metabolizado no fígado (FAO/WHO, 2013). Sendo assim, o fígado é um dos órgãos alvos da toxicidade do DQ, induzindo aumento do estresse oxidativo, que está associado a níveis elevados de superóxido e que pode alterar diferentes atividades funcionais teciduais (Sanchez-Valle et al., 2012).

Além disso, o estresse oxidativo, associado à toxicidade, pode afetar as atividades de diferentes enzimas antioxidantes e interferir nos mecanismos de defesa antioxidante no fígado e no sangue (Zhang et al., 2020). A administração de DQ leva a hepatotoxicidade e induzi a redução das concentrações de GPx e

SOD, ao passo em que aumenta as concentrações de MDA e EROs, podendo levar a perda da função do órgão (Zhang et al., 2022).

Diante disso, iniciou-se a investigação acerca do efeito da BCA sobre a proteção contra esses efeitos associados à toxicidade induzida por DQ. A BCA é uma isoflavona bem conhecida por sua gama de propriedades farmacológicas. Por conseguinte, a BCA tem sido muito utilizada em modelos experimentais *in vivo*, principalmente por seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Felix et al., 2022). Nesse sentido, a BCA é considerada uma alternativa promissora para a hepatoproteção contra o DQ (Hu et al., 2020).

Os dados observados no presente estudo mostram que a utilização de BCA 100 mg/kg reduziu os altos níveis de TBARS, causados pela administração de DQ, agindo como antioxidante. Foi observada uma redução do TBARS no fígado dos animais tratados com BCA, portanto, as investigações seguiram com o foco para a proteção do fígado. Com intuito de determinar se doses menores de BCA também poderiam apresentar esse efeito antioxidante, foram investigadas duas doses (25 e 50 mg/kg). Ambas as doses também foram eficazes na redução de TBARS, no entanto, a dose de 100 mg/kg mostrou melhor efeito antioxidante.

Esses resultados concordam com os achados de Breikaa et al. (2013) que observaram, em um modelo de hepatotoxicidade, em ratos, induzido por tetracloreto de carbono, que a BCA exerceu efeito hepatoprotetor através da redução de LPO, associada a redução MDA e aumento de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GR. Liu e colaboradores (2016) que observaram, em um modelo de lesão aguda hepática induzida por lipopolissacarídeo/D-galactosamina, que a BCA atuou como modulador da atividade de Nrf2, podendo observar aumento de enzimas antioxidantes e redução de MDA.

O Nrf2 é um fator de transcrição de vários genes que protege contra o estresse oxidativo (Klaassen e Reisman, 2011). Mediante os estímulos de estresse oxidativo, o Nrf2 é liberado da Keap1 e translocado para o núcleo (Jeyapaul e Jaiswal, 2000). No núcleo, o Nrf2 modula a transcrição de Elementos de Resposta Antioxidante (AREs) (Jeyapaul e Jaiswal, 2000). Sendo assim, Nrf2 está envolvido na síntese de GSH, SOD e CAT (Wu, Zhang e Klaassen, 2012).

De acordo com Wu, Zhang e Klaassen (2012), o Nrf2 é um importante fator protetor contra o estresse oxidativo e os danos causados por DQ, evidenciado pelo aumento da mortalidade de ratos Nrf2-nulos e aumento da concentração de MDA circulante nesses animais. Além disso reduziu a concentração de GSH no fígado de animais sem nenhuma interferência farmacológica e ainda mais nos animais Nrf2-nulos, no entanto isso não foi observado nos animais que apresentavam baixa expressão de Keap1, indicando uma forte relação entre ativação de Nrf2 e as concentrações celulares de GSH (Wu, Zhang e Klaassen, 2012).

Os tióis não proteicos, como GSH, produzidas principalmente no fígado, cooperam para manutenção das concentrações de grupos -SH, responsáveis pela expressão e manutenção de proteínas do DNA (Markovic et al., 2007; Meister e Anderson, 1983). Dados deste estudo demonstra também que a BCA foi manteve os níveis de -SH semelhantes ao grupo salina, sendo que a dose de 100 mg/kg foi a que apresentou melhor potencial antioxidante.

Também referidos como Tióis, os -SH são onipresentes em peptídeos em todo organismo, sendo importantes para a função e estrutura de inúmeras proteínas. Essas moléculas são consideradas os maiores e mais frequentes antioxidantes encontrados no organismo, atuando também como desintoxicador celular e na regulação da atividade enzimática (Li et al., 2017). Sendo assim, o dano de macromoléculas como proteínas pode ser mensurado através da determinação de -SH, sendo que a proporção da sua quantidade é inversamente proporcional ao dano (Halliwell; Gutteridge, 2015).

A administração de DQ ocasiona em lesões hepáticas, como descrito por Chen et al. (2021) que observou o aumento da concentração de ALT e AST, em um modelo de hepatotoxicidade induzida por DQ em frangos de corte. As atividades de ALT e AST são importantes marcadores de lesão hepática e por isso, foi realizada a mensuração dessas enzimas, sendo possível observar que o pré-tratamento com a BCA 100 mg/kg reduziu os níveis dessas enzimas, quando comparado ao DQ (Zhang et al., 2020).

Concomitante a isso, a análise histológica corrobora com os resultados encontrados para as dosagens de ALT/AST. Assim, observou-se fígados com

aumento de hepatócitos vacuolizados e apoptóticos no grupo DQ, enquanto que os animais tratados com BCA mostraram essas características mais atenuadas. Esses dados histológicos foram observados também por Zhang et al. (2021), que observou vacuolização dos hepatócitos e aumento do núcleo dessas células, no grupo dos animais que receberam DQ.

A exposição ao DQ também pode produzir as lesões renais, estando associado ao aumento significativo das concentrações plasmáticas de ureia e creatinina na primeira meia hora após a administração (Wu et al., 2022). Os resultados obtidos no presente trabalho mostram uma redução significativa na quantidade de ureia nos animais tratados com BCA, no entanto, o mesmo não foi observado para a dosagem de creatinina.

De modo geral, o estresse oxidativo e a inflamação são processos que se correlacionam. O estresse oxidativo pode estar associado à inflamação, causada pela infiltração de neutrófilos, atraídos quimicamente por Padrões Moleculares Associados ao Danos (DAMP's), que são detectados por receptores transmembranares, do tipo Toll e NOD, presente em neutrófilos e macrófago (Anton et al., 2002).

A ativação do NF- κ B, um fator crucial responsável por induzir a resposta inflamatória promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-1, que são liberados por macrófagos (Biswas, 2016). Correlacionando com dados da literatura, Yuan et al. (2017) relatou que a exposição de DQ à porcos mostrou um aumento da atividade de MPO, assim como o aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Além disso. No presente estudo, o infiltrado de células inflamatórias e MPO pode ser claramente observado no tecido hepático, no grupo dos animais que receberam DQ.

Ainda, o pré-tratamento com BCA reduziu a atividade da MPO. Corroborando esses dados, Hu e colaboradores (2020) reportaram que a BCA demonstrou efeito imunorregulador inibindo a via de sinalização TLR4/NF- κ B e aumentando a expressão do PPAR- γ em lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Diante disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β

e IL-6, o infiltrado de neutrófilos e macrófagos e a atividade da MPO podem ser suprimidos com o tratamento com a BCA (Hu et al., 2020).

Já é bem estabelecido que a produção de citocinas pró-inflamatórias está associada à ativação das principais vias de sinalização, incluindo o receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e o NF- κ B (AZAM et al., 2019). Com isso, Zhang et al. (2021) relatou que animais que receberam DQ, apresentaram aumento da atividade de NF- κ B e consequentemente o aumento de citocinas pró- inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a redução de citocina anti-inflamatória, como IL-10. Nossos resultados mostram que a BCA apresentou um efeito imunomodulador, reduzindo as concentrações de TNF- α , porém o mesmo não é observado quando avaliada a quantidade de IL10. Felix et al. (2020) demonstraram, em um modelode artrite induzida por zimosan, o efeito pró-resolutivo da BCA aumentando a apoptose de neutrófilos, bem como diminuindo a produção de citocinas pró- inflamatórias, TNF- α e IFN- γ , e aumentando as anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4(Felix et al., 2020).

Finalmente, a intoxicação por DQ aumentou o estresse oxidativo e a inflamação no tecido hepático. Assim, é imprescindível o aumento dos esforços no sentido de investigar os efeitos de compostos que possam atuar como protetores contra as lesões desencadeadas pela exposição ao DQ. Tomando como base as propriedades farmacológicas observadas, sugere-se que a BCA pode agir como um agente imunomodulador e antioxidante contra o estresse oxidativo e inflamação causados pelo DQ.

7. Conclusão

A BCA impediu o estresse oxidativo no fígado, mediante a regulação da quantidade de MDA e -SH. Além disso, as enzimas associadas ao dano hepático (ALT e AST), e renais (creatinina), não aumentaram após exposição ao DQ. Ainda, o pré-tratamento com BCA também exerceu um papel anti-inflamatório, protegendo o tecido do aumento do infiltrado de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias promovidos pelo DQ.

8. Perspectivas futuras

Espera-se investigar aos mecanismos pelos quais a BCA exerce seu efeito hepatoprotetor, em modelo de estresse oxidativos induzido por Diquat. Nesse sentido, deve-se investigar a atividade da Biochanina A através de análises antioxidantes, como determinação de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx), e ensaios envolvendo fatores de transcrição, como atividade de Nrf2, auxiliando na comprovação do efeito hepatoprotetor da Biochanina A.

Referências

ABE, T.; KINDA, T.; TAKANO, Y.; CHIKAZAWA, S.; HIGUCHI, M.; KAWASAKI, N.; ORINO, K.; WATANABE, K. Relationship between body iron stores and diquat toxicity in male Fischer-344 rats. **BioMetals**, v. 19, n. 6, p. 651–657, 2006.

ALAUDDIN; CHATURVEDI, S.; MALIK, M. Y.; AZMI, L.; SHUKLA, I.; NASEEM, Z.; RAO, C. V.; AGARWAL, N. K. Formononetin and biochanin A protects against ritonavir induced hepatotoxicity via modulation of NfκB/pAkt signaling molecules. **Life Sciences**, v. 213, p. 174–182, 2018.

ANVISA (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatórios das Amostras Analisadas no Período de 2017-2018. Primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020**. Gerência Geral de Toxicologia 2019.

ANTON, P. M.; THEODOROU, V.; ROY, S.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Pathways involved in mild gastrointestinal inflammation induced by a low level exposure to a food contaminant. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 6, p. 1308–1315, 2002.

BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; LOURDES BASTOS, M. DE; TSATSAKIS, A. M.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 85–103, 2014.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BEHLOUL, N.; WU, G. Genistein: A promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 31–38, 2013.

BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 17–19, 2016.

BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**, 2011. Disponível em: http://www2.fct.unesp.br/nera/artigodomes/9artigodomes_2011.pdf. Acesso em: 03 jan 2023.

BONNEH-BARKAY, D.; LANGSTON, W. J.; MONTE, D. A. DI. Toxicity of Redox Cycling Pesticides in Primary Mesencephalic Cultures. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 5–6, p. 649–653, maio 2005.

BRADBERRY, S. M.; WATT, B. E.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Mechanisms of Toxicity, Clinical Features, and Management of Acute

Chlorophenoxy Herbicide Poisoning: A Review. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 111–122, 4 jan. 2000.

BREIKAA, R. M.; ALGANDABY, M. M.; EL-DEMERDASH, E.; ABDEL-NAIM, A. B. Biochanin a protects against acute carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, n. 5, p. 909–916, 2013.

BRASIL (2018). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 22 dez de 2022.

CARNEIRO, F.F.; AUGUSTO, L.G.S.; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CHARLES, J. M.; ABOU-DONIA, M. B.; MENZEL, D. B. Absorption of paraquat and diquat from the airways of the perfused rat lung. **Toxicology**, v. 9, n. 1–2, p. 59–67, 1978.

CHEN, J.; SU, Y.; LIN, R.; LIN, F.; SHANG, P.; HUSSAIN, R.; SHI, D. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. August, p. 1–10, 2021.

CHEN, Y. P.; GU, Y. F.; ZHAO, H. R.; ZHOU, Y. M. Dietary squalene supplementation alleviates diquat-induced oxidative stress and liver damage of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, 2021.

CHO, I. A. *et al.* Biochanin-A induces apoptosis and suppresses migration in FaDu human pharynx squamous carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 38, n. 5, p. 2985–2992, 2017.

CIRCU, M. L.; MALONEY, R. E.; AW, T. Y. Diquat-induced cellular pyridine nucleotide redox changes and alteration of metabolic enzyme activities in colonic carcinoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 264, p. 43–51, 2017.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; PONTES, H.; BASTOS, M. L.; REMIÃO, F.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. An effective antidote for paraquat poisonings: The treatment with lysine acetylsalicylate. **Toxicology**, v. 255, n. 3, p. 187–193, 2009.

FELDMANN, R. J.; MAIBACH, H. I. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 126–132, abr. 1974.

FELIX, F. B.; ARAÚJO, J. M. D.; SOUZA, E. V. DE; PINHO, V.; CAMARGO, E. A.; CORRÊA, C. B.; GRESPAN, R. Biochanin A attenuates zymosan-induced arthritis in mice similarly to 17- β estradiol: an alternative to hormone replacement therapy? **Inflammation Research**, 25 set. 2020.

FELIX, F. B.; VAGO, J. P.; BELTRAMI, V. A.; ARAÚJO, J. M. D.; GRESPAN, R.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. **Biochanin A as a modulator of the inflammatory response: An updated overview and therapeutic potential** *Pharmacological Research*, 2022.

FIOCRUZ (2014). Fundação Oswaldo Cruz. **Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos no mundo**. Disponível em: <http://redesfio.far.fiocruz.br/index.php/noticias/58-brasil-consome-14-agrotoxicos-proibidos-no-mundo>. Acesso em: 13 dez 2022.

GUO, M.; LU, H.; QIN, J.; QU, S.; WANG, W.; GUO, Y.; LIAO, W.; SONG, M.; CHEN, J.; WANG, Y. Biochanin A provides neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by Nrf2-mediated inhibition of oxidative stress and inflammation signaling pathway in rats. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 8975–8983, 2019.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 5th ed. New York: Oxford University Press, 2015.

HE, H.-J. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. **World Journal of Diabetes**, v. 3, n. 5, p. 94, 2012.

HU, M.; KRAUSZ, K.; CHEN, J.; GE, X.; LI, J.; GELBOIN, H. L.; GONZALEZ, F. J. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 7, p. 924–931, 2003.

HU, X. *et al.* Biochanin A protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by regulating TLR4/NF- κ B and PPAR- γ pathway. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, n. October 2019, p. 103846, 2020.

IBAMA (2020). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Dados Atualizados: 15/08/2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>. Acesso em: 13 jan 2023.

JALALUDEEN, A. M.; HA, W. T.; LEE, R.; KIM, J. H.; DO, J. T.; PARK, C.; HEO, Y. T.; LEE, W. Y.; SONG, H. Biochanin a ameliorates arsenic-induced hepatoand hematotoxicity in rats. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2016.

JIA, X.; CHEN, J.; LIN, H.; HU, M. Disposition of flavonoids via enteric recycling: Enzyme-transporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 3, p. 1103–1113, 2004.

LEHANE, A. M.; MCDEVITT, C. A.; KIRK, K.; FIDOCK, D. A. Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium - Is the redox system involved? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 47–57, 2012.

LI, C.; FENG, F.; XIONG, X.; LI, R.; CHEN, N. Exercise coupled with dietary restriction reduces oxidative stress in male adolescents with obesity. **Journal of Sports Sciences**, v. 35, n. 7, p. 663–668, 2017.

LIMA, E. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIU, J. J.; ZHAO, G. X.; HE, L. L.; WANG, Z.; ZIBRILA, A. I.; NIU, B. C.; GONG, H. Y.; XU, J. N.; SOONG, L.; LI, C. F.; LU, Y. Lycium barbarum polysaccharides inhibit ischemia/reperfusion-induced myocardial injury via the Nrf2 antioxidant pathway. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 657–667, 2021.

LIU, XINGKAI; WANG, T.; LIU, XUESHIBOJIE; CAI, L.; QI, J.; ZHANG, P.; LI, Y. Biochanin A protects lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 324–331, 2016.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA-Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LOCK, E. A. The effect of paraquat and diquat on renal function in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 327–336, 1979.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim Nova**, v. 25, n. 5, p. 777–793, 2002.

MAGALHÃES, N.; CARVALHO, F.; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Human and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, n. 11, p. 1131–1160, 2018.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. GLUTATHIONE. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711–760, jun. 1983.

MIRANDA, L. E. C.; VIARO, F.; CENEVIVA, R.; EVORA, P. R. B. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2004.

MOON, Y. J.; SAGAWA, K.; FREDERICK, K.; ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. **AAPS Journal**, v. 8, n. 3, p. 433–442, 2006.

NA, H. K.; SURH, Y. J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1271–1278, 2008.

OH, J. S. *et al.* Biochanin-A antagonizes the interleukin-1 β -induced catabolic inflammation through the modulation of NF κ B cellular signaling in primary rat chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 723–730, 2016.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

PATEIRO-MOURE, M.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Critical Review on the Environmental Fate of Quaternary Ammonium Herbicides in Soils Devoted to Vineyards. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 4984–4998, 21 maio 2013.

PEIRÓ, A. M.; ZAPATER, P.; ALENDA, C.; RAMÍREZ, A.; GUTIÉRREZ, A.; PÉREZ-MATEO, M.; SUCH, J. Hepatotoxicity related to paraquat and diquat absorption through intact skin. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 11, p. 3282–3284, 2007.

PÉREZ-TORRES, I.; TORRES-NARVÁEZ, J. C.; GUARNER-LANS, V.; DÍAZ-DÍAZ, E.; PEREZPEÑA-DIAZCONTI, M.; PALACIOS, A. R.; MANZANO-PECH, L. Myocardial protection from ischemia-reperfusion damage by the antioxidant effect of hibiscus sabdariffa linnaeus on metabolic syndrome rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

RANI, J. I. R.; UDDANDRAO, V. V. S.; G, SANGEETHADEVI; G, SARAVANAN; P, C.; S, S.; P, T.; P P, S.; VADIVUKKARASI, S. Biochanin A attenuates obesity cardiomyopathy in rats by inhibiting oxidative stress and inflammation through the Nrf-2 pathway. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 2021.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUBIO-RUIZ, M. E.; GUARNER-LANS, V.; CANO-MARTÍNEZ, A.; DÍAZ-DÍAZ, E.; MANZANO-PECH, L.; GAMAS-MAGAÑA, A.; CASTREJÓN-TELLEZ, V.; TAPIA-CORTINA, C.; PÉREZ-TORRES, I. Resveratrol and quercetin administration improves antioxidant DEFENSES and reduces fatty liver in metabolic syndrome rats. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019.

SANCHEZ-VALLE, V.; C. CHAVEZ-TAPIA, N.; URIBE, M.; MENDEZ-SANCHEZ, N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 4850–4860, 2012.

SARFRAZ, A. *et al.* Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature. **Science of the Total Environment**, v. 722, 2020.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 C, p. S31–S38, 1991.

SINDIVEG (2016). Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **BALANÇO 2015**: Setor de agroquímicos confirma queda de vendas.

Disponível em: <https://sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>. Acesso em: 15 dez 2022.

SILVÉRIO, F.O.; SILVA, J.G.S.; AGUIAR, M.C.S.; CACIQUE, A.P.; PINHO, G.P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012.

STANGL, V.; DREGER, H.; STANGL, K.; LORENZ, M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 348–358, 2007.

TOLLESON, W. H.; DOERGE, D. R.; CHURCHWELL, M. I.; MARQUES, M. M.; ROBERTS, D. W. Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4783–4790, 2002.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006.

WANG, Y.; ZHU, W.; WANG, D.; TENG, M.; YAN, J.; MIAO, J.; ZHOU, Z. 1H NMR-based metabolomics analysis of adult zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to diniconazole as well as its bioaccumulation behavior. **Chemosphere**, v. 168, p. 1571–1577, fev. 2017.

WU, K. C.; ZHANG, Y.; KLAASSEN, C. D. Nrf2 protects against diquat-induced liver and lung injury. **Free Radical Research**, v. 46, n. 10, p. 1220–1229, 2012.

WU, L. Y. *et al.* Biochanin a reduces inflammatory injury and neuronal apoptosis following subarachnoid hemorrhage via suppression of the TLRs/TIRAP/MyD88/NF-κB pathway. **Behavioural Neurology**, v. 2018, 2018.

WU, Y.; CUI, S.; WANG, W.; JIAN, T.; KAN, B.; JIAN, X. Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 23, n. 4, p. 2–10, 2022.

XING, J.; CHU, Z.; HAN, D.; JIANG, X.; ZANG, X.; LIU, Y.; GAO, S.; SUN, L. Lethal diquat poisoning manifesting as central pontine myelinolysis and acute kidney injury: A case report and literature review. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 7, 2020.

XU, J.; SUN, S.; WEI, W.; FU, J.; QI, W.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin reduces mortality and oxidatively mediated hepatic and renal damage due to diquat treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 166–171, 2007.

XUE, Z.; LI, A.; ZHANG, X.; YU, W.; WANG, J.; LI, Y.; CHEN, K.; WANG, Z.; KOU, X. Amelioration of PM2.5-induced lung toxicity in rats by nutritional supplementation with biochanin A. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, n. June, p. 110878, 2020.

YANG, L.; YU, Z.; HOU, J.; DENG, Y.; ZHOU, Z.; ZHAO, Z.; CUI, J. Toxicity and oxidative stress induced by T-2 toxin and HT-2 toxin in broilers and broiler hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 87, p. 128–137, 2016.

YOUSSEF, M. M.; TOLBA, M. F.; BADAWY, N. N.; LIU, A. W.; EL-AHWANY, E.; KHALIFA, A. E.; ZADA, S.; ABDEL-NAIM, A. B. Novel combination of sorafenib and biochanin-A synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on hepatocellular carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–12, 2016.

YU, C.; ZHANG, P.; LOU, L.; WANG, Y. Perspectives Regarding the Role of Biochanin A in Humans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2019.

YUAN, D.; HUSSAIN, T.; TAN, B.; LIU, Y.; JI, P.; YIN, Y. The Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Eucommia ulmoides Flavones Using Diquat-Challenged Piglet Models. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

ZAFAR, M.; SARFRAZ, I.; RASUL, A.; JABEEN, F.; SAMIULLAH, K.; HUSSAIN, G.; RIAZ, A.; ALI, M. Tubeimoside-1, triterpenoid saponin, as a potential natural cancer killer. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 5, p. 643–650, 2018.

ZHANG, H.; CHEN, YANAN; LI, Y.; JIA, P.; JI, S.; CHEN, YUEPING; WANG, T. Protective effects of pterostilbene against hepatic damage, redox imbalance, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress in weanling piglets. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 10, p. 1–16, 2020.

ZHANG, H.; LIU, Y.; FANG, X.; GU, L.; LUO, C.; CHEN, L.; WANG, Q. Vitamin D3 Protects Mice from Diquat-Induced Oxidative Stress through the NF- κ B/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

ZHANG, X.; WANG, S.; WU, Y.; LIU, X.; WANG, J.; HAN, D. Ellagic Acid Alleviates Diquat-Induced Jejenum Oxidative Stress in C57BL/6 Mice through Activating Nrf2 Mediated Signaling Pathway. **Nutrients**, v. 14, n. 5, 2022.

ZIELONKA, J.; RYBAK, M.; CELIŃSKA, J.; ADAMUS, J.; MARCINEK, A.; GEBICKI, J. Effect of heparin on viologen-stimulated enzymatic NADH depletion. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 668–673, 2006.

ZHANG, H.; LIU, Y.; FANG, X.; GU, L.; LUO, C.; CHEN, L.; WANG, Q. Vitamin D3 Protects Mice from Diquat-Induced Oxidative Stress through the NF- κ B/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

ANEXOS

ANEXO A



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Cristóvão, 07 de fevereiro de 2023
CEUA N [2912230322](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Renata Grespan
Área: Farmacologia

Título da proposta: "Efeito da Biochanina A em modelo de asma induzida por ovoalbumina em camundongos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFS (ID 000190)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 19/dezembro/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Diante de problemas com relação a padronização do modelo de asma, utilizando ovalbumina, solicito a mudança do agente inflamatório para o uso do Diquat, alterando também o modelo de protocolo de asma alérgica para estresse oxidativo. Porém, a Biochanina A ainda será o composto a ser investigado. Dessa forma, o projeto mudaria para: Efeito hepatoprotetor da Biochanina A na intoxicação induzida por Diquat, conforme segue anexo. Vale ressaltar que todos os procedimentos já aprovados, serão repetidos nesse novo projeto. "

Comentário da CEUA: "APROVADO - O projeto em tela já foi APROVADO em reuniões anteriores. A única mudança solicitada pela pesquisadora, por conta da dificuldade em padronizar o modelo de asma utilizando-se a ovalbumina, que será substituída pelo Diquat. No entanto, a Biochanina será o composto a ser investigado. Assim sendo, o projeto terá o seguinte título [Efeito hepatoprotetor da Biochanina A na intoxicação induzida por Diquat]. Convém ressaltar, que todos os procedimentos já aprovados, serão repetidos no novo projeto. Diante do exposto SOU FAVORÁVEL a solicitação da pesquisadora."

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe



UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO
(Título atualizado)

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito hepatoprotetor da Biochanina A na intoxicação induzida por Diquat**". Registrada no sistema CEUA com o nº **2912230322**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Renata Grespan** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 23/05/2022.

Ensino (X) Pesquisa Científica ()	Finalidade
Início: 09/2022 Término: 09/2024	Vigência da autorização
Camundongos isogênicos	Espécie/linhagem/raça
168	Nº de animais
a 30 g /8 a 12 semanas 20	Peso/Idade
Fêmeas	Sexo
Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório	Origem

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSEMAR SENA BATISTA
Data: 14/04/2023 11:15:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFES