ALINE ZANCHETTI AMENI

**Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos
do extrato fluido de *Casearia sylvestris*,
em ratos Wistar.**

São Paulo
2011

ALINE ZANCHETI AMENI

**Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de
Casearia sylvestris, em ratos *Wistar*.**

São Paulo
2011

ALINE ZANCHETI AMENI

**Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato
fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profª. Drª. Silvana Lima Gorniák

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2453
FMVZ

Ameni, Aline Zancheti

Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos Wistar / Aline Zancheti Amení. -- 2011.
93 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silva Lima Gorniák.

1. *Casearia sylvestris*. 2. Avaliação toxicidade. 3. Toxicidade aguda.
4. Toxicidade doses repetidas. 5. Ratos Wistar. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da toxicidade do extrato fluido de *Casearia sylvestris*", protocolado sob o nº1738/2009, utilizando 200 (duzentos) ratos, sob a responsabilidade da Profa Dra Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/09/09.

We certify that the Research "Evaluation of the toxicity of *Casearia sylvestris* fluid extract", protocol number 1738/2009, utilizing 200 (two hundred) rats, under the Profa Dra Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 01 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AMENI, Aline Zancheti

Título: Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Essa dissertação foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Vida verdadeira é como a água:
Em silêncio se adapta ao nível inferior,
Que os homens desprezam.
Não se opõe a nada,
Serve a tudo.
Não exige nada,
Porque sua origem é da Fonte Imortal.
O homem realizado não tem desejos de dentro,
Nem exigências de fora.
Ele é prestativo em se dar
E sincero em falar,
Suave no conduzir,
Poderoso no agir.
Age com serenidade.
Por isso é incontaminável.

Lao Tsé - TAO TE CHING

Aos meus pais Acir e Angela por toda dedicação e apoio e a Tia Maria por todas as rezas, para tudo quanto é Santo, para tudo dar certo.

Ao meu marido Eduardo por todo amor e carinho. Amo vc!

Aos meus filhotes queridos Matilda (coelha), Charles (gato) e Porpeta (hamster) por toda a alegria que proporcionam.

Ao meu querido Prof Gilson Giombeli, da Humaniversidade, que foi o primeiro a me mostrar a arte de cura através das plantas medicinais. Sua paixão pelas plantas me incentivou a estudar as plantas medicinais e me dedicar à terapia de pessoas e animais de uma forma holística. Muito obrigado por todos os ensinamentos e incentivo!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Silvana Lima Gorniák, por me receber neste programa de pós, por toda atenção dispensada a mim durante todo o mestrado, pela preocupação, pelo auxílio em todos os momentos em que precisei, e principalmente por ser um exemplo de determinação e disciplina.

À Dr^a Luce Maria Brandão Torres, pesquisadora do Instituto de Botânica de São Paulo, que me recebeu em seu laboratório me ensinou tudo que sei hoje sobre Química dos Produtos Naturais e cromatografia, pela excelente colaboração e orientação para a realização das análises cromatográficas, pelo enorme incentivo durante o projeto sempre me aconselhando sobre todos os assuntos e torcendo pelo meu sucesso. Luce, obrigado pelo seu carinho e amizade!!!

A Dr^a. Mitsue Haraguchi e a Dr^a. Daiane Hansen do Instituto Biológico pela colaboração no processo de extração da *Casearia sylvestris*.

A Andréia Oliveira Latorre pela amizade, pelos ótimos conselhos, pelo auxílio imprescindível para realização deste trabalho, pela competência e amor que tem pela ciência e acima de tudo pelo respeito que demonstra ter pelo próximo. Andréia muitíssimo obrigada por tudo!

A Beatriz, minha querida amiga e companheira em todos os momentos, inclusive nos experimentos com muita dedicação. Obrigada ! Adoro te encher o saco!!!!

Ao Fernando, Luciana Lippi que estiveram comigo desde o primeiro dia no departamento, por todas as conversas e conselhos, sessões de terapia, etc.

Aos amigos, Thaisa, Sayuri, Fabiana, Adriana, Camila Lima, Izabel, Luciana Cunha, Esther, e todos os outros do departamento de patologia por todos os momentos que passamos juntos, que com diferentes formas contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Samantha, Maria Helena, Mau, e Dani do laboratório de hematologia do HOVET.

Ao Paulo César e Ester do CEPTOX, por toda amizade, carinho e auxílio para a confecção desta dissertação.

Aos funcionários do biotério do VPT Claudia, Idalina, Luís, Nelson, Luciana, Mauro e Rosiris, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos, por todo auxílio e ótima convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT Magali, Herculano e Vagner, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT pelo auxílio sempre que preciso.

Aos funcionários do laboratório de histologia: Cláudio e Luciano pela confecção das lâminas estudadas.

As funcionárias do laboratórios de patologia: Luciana e Juliana pela análise das lâminas de histologia.

A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

MUITO OBRIGADA a todos os animais usados nestes experimentos.

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

AMENI, A. Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar***. [Evaluation of the possible toxic effects of fluid extract of *Casearia sylvestris* in *Wistar* rats]. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A planta *Casearia sylvestris*, popularmente conhecida como guaçatonga, é comumente utilizada para o tratamento de diversas afecções como queimaduras, ferimentos, herpes labial e genital, distúrbios do trato gastrointestinal, como gastrites, úlceras, gengivites, aftas, halitose; além disto, atribui-se à planta ação cicatrizante, tônica, depurativa, anti-reumática, antiinflamatória, antiofídica, antidiarréica, entre outras. Atualmente, é catalogada como planta medicinal de interesse ao Sistema Único de Saúde no Brasil. Entretanto, até o momento, não haviam estudos relativos à avaliação de sua toxicidade. Assim, o objetivo desta pesquisa foi o de estudar, em ratos, os possíveis efeitos tóxicos da *C. sylvestris*. Para tal, foram realizados os testes de citotoxicidade com o objetivo de analisar o potencial tóxico das diferentes formas de extração da planta, e estudos pré-clínicos de toxicidade oral aguda, e em doses repetidas, por 28 e 90 dias, realizados de acordo com protocolos preconizados pelas agências reguladoras nacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) e internacionais (Organization for Economic Cooperation and Development - OECD) de avaliação de risco para substâncias químicas. No presente estudo, o extrato fluido (EF) de *C. sylvestris* foi administrado, a ratos, por via oral, através de gavagem, em dose única de 2000mg/kg; ou em doses

repetidas, durante 28 ou 90 dias, nas doses 60, 120 e 240mg/kg,. Foram avaliados sinais sistêmicos de toxicidade, ganho de peso e consumo de ração, hemograma completo, avaliação bioquímica (AST, ALT, GGT, ALP, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídes, glicose, albumina, proteínas totais e cloreto), análise macroscópica e histopatológica de órgãos e avaliação do peso relativo dos órgãos linfóides baço e timo e celularidades do baço e medula óssea para averiguar os possíveis efeitos imunotóxicos. Além disso, foi obtido o perfil cromatográfico (*fingerprint*) utilizando a técnica analítica CLAE/UV. Os resultados mostraram que o EF de *C. sylvestris* não causou efeitos tóxicos quando administrado em dose única 2000mg/kg no estudo de toxicidade aguda, assim como também não mostrou efeitos sistêmicos de toxicidade ou efeitos imunotóxicos nos estudos em doses repetidas por 28 e 90 dias. Estes dados aqui encontrados permitem sugerir que o EF da *C.sylvestris* é seguro quando utilizado mesmo prolongadamente. No entanto, outros estudos, como por exemplo, de genotoxicidade e de carcinogenicidade, devem ser realizados para complementar esta etapa de avaliação pré-clínica.

Palavras chave: *Casearia sylvestris*. Avaliação toxicidade. Toxicidade aguda. Toxicidade doses repetidas. Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

AMENI, A. Z. **Evaluation of the possible toxic effects of fluid extract of *Casearia sylvestris* in Wistar rats.** [Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar*]. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Casearia sylvestris Sw commonly known in Brazil as “guaçatonga”, is currently used to treat many diseases such as burns, wounds, labial and genital herpes, gastrointestinal disorders- gastritis, ulcers, gingivitis, aphthae and halitoses. *C.sylvestris* has been also used as cicatrizant in skin diseases, blood purifier and general detoxification, anti-inflammatory, antiofidic, diarrhea, among others. In our country it is considered as medicinal plant and for this reason *C.sylvestris* is catalogued at The Unified Health System (Sistema Único de Saúde - SUS) as a plant of interest for Brazilian population .However, no toxicological studies concerned the safety of extract fluid of this plant have been reported. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible toxic effects of fluid extract (EF) of *C. sylvestris*. For this, it was performed citotoxicity tests in order to analyze the toxic potential of different extracts of the plant. It was also performed preclinical studies, in rats, according the guidelines proposed by National Health Surveillance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) and OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) being performed the following tests: acute oral toxicity and repeated dose 28 and 90-day. The EF of *C. sylvestris* was administered by gavage at a single dose of 2000 mg/kg, or during 28 and 90 days with doses 60, 120 e 240mg/kg. It was evaluated systemic signs

of toxicity, body weights and food consumption, hematology, serum biochemistry (AST, ALT, GGT, ALP, urea: creatinine, uric acid cholesterol, triglycerides, glucose, albumin, total proteins, and chloride) macroscopic and histopathological analysis of different organs and evaluation of relative weight of lymphoid organs, spleen and thymus and the cellularity of spleen and bone marrow to investigate the possible immunotoxic effects. We also obtained the fingerprint chromatogram of *C. sylvestris*, using CLAE/UV. The results showed that there were no toxic effects by the EF when administered as a single dose at 2000mg/kg in acute toxicity study, as well as showed no systemic effects of toxicity or immunotoxic effects in studies with repeated doses of 28 and 90 days. This data suggest that the EF of the plant is safe even used for long period. However, other studies, eg, genotoxicity and carcinogenicity studies should be performed to complement the preclinical evaluation.

Key words: *Casearia sylvestris*. Toxic evaluation. Acute toxicity. Repeated doses toxicity. *Wistar* rats.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A EVOLUÇÃO HISTÓRICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA ATUALIDADE	17
1.2	CARACTERÍSTICAS DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	19
1.3.	FITOTERÁPICOS NO BRASIL	21
1.4.	REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	23
1.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE	24
1.5.1	Sobre avaliação de toxicidade oral aguda	26
1.5.2	Sobre toxicidade oral em doses repetidas	28
1.5.3	Norma da ANVISA para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos	30
1.6	SOBRE A <i>Casearia sylvestris</i>	31
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	ANIMAIS	40
3.2	DROGAS E REAGENTES	40
3.3	<i>C. sylvestris</i> E EXTRATOS	41
3.3.1	Material vegetal	41
3.3.2	Extrato fluido (EF)	41
3.3.3	Extrato etanólico (EE)	42
3.3.4	Tintura (TI)	42
3.3.5	Extrato aquoso (CHÁ)	42
3.4	ANÁLISE DO EF POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR ULTRAVIOLETA (CLAE/UV)- IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO CROMATOGRÁFICO	43
3.5	ADMINISTRAÇÃO DO EF DA <i>C. sylvestris</i>	45
3.6	PROCEDIMENTOS	46
3.6.1	Avaliação de citotoxicidade	46

3.6.2	Avaliação do ganho de peso dos animais e consumo de ração.....	47
3.6.3	Avaliação clínica dos animais.....	47
3.6.4	Coleta de sangue, hemograma e bioquímica.....	48
3.6.5	Avaliação dos pesos relativos de timo e baço e celularidades de baço e medula óssea	48
3.6.6	Avaliação histopatológica	49
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	50
4.1	EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS QUATRO DIFERENTES EXTRATOS DA <i>C. sylvestris</i> : FLUIDO (EF), TINTURA (TI) , AQUOSO (CHA) E ETANÓLICO (EE)	51
4.1.1	Resultados	53
4.2	EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO FLUIDO DE <i>C. sylvestris</i>	55
4.2.1	Resultados	55
4.3	EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO (EF) DA <i>C. sylvestris</i> , ADMINISTRADO POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 28 DIAS, EM RATOS ADULTOS	56
4.3.1	Resultados	57
4.4	EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO (EF) DA <i>C. sylvestris</i> , ADMINISTRADO POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 90 DIAS, EM RATOS ADULTOS	63
4.4.1	Resultados	63
4.5	EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO (EF) DA <i>C. sylvestris</i> , ADMINISTRADO POR VIA ORAL, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS JOVENS.	69
4.5.1	Resultados	69
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A EVOLUÇÃO HISTÓRICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA ATUALIDADE

O conhecimento acerca de propriedades farmacológicas de diversas plantas é, há muito, conhecido pelo homem. De fato, o estudo de pergaminhos sumérios, com datas anteriores a 4.000 a.C., revela que este povo já fazia uso do ópio, obtido da *Papaver somniferum*, para minorar e/ou abolir a dor; também outras civilizações, como a egípcia empregava plantas e seus produtos para diversos fins terapêuticos e bem como conservantes teciduais para os procedimentos de embalsamamento. Além disso, há relatos, descritos em obras como o livro de Pen T'Sao Ching , na China (2700 aC), nos Papiros (1500aC) e ainda na Bíblia, escrita pelos Hebreus, onde encontram-se milhares de citações sobre o emprego de plantas medicinais e preparações à base de ervas.

Vale ressaltar que até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, somente, a partir da revolução industrial, o início do estudo da química orgânica e o desenvolvimento de técnicas para o isolamento de substâncias ativas presentes nas plantas, permitiram a obtenção de substâncias isoladas como a morfina da *Papaver somniferum*, a quinina e a quinidina da *Cinchona spp*, a atropina da *Atropa belladonna*, entre outras. Desde então, estas substâncias passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais, pois apresentavam vantagens relativas à reprodutibilidade dos efeitos dada pela constância de sua composição, maior eficácia, segurança e até mesmo a maior facilidade de estabelecer especificações para uma substância única, em relação à mistura complexa presente nos extratos das plantas.

Por outro lado, com a obtenção das substâncias isoladas das plantas e a produção de substâncias sintéticas para uso como medicamento, houve desinteresse, na década de 1960, da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de origem vegetal, por acreditarem que já haviam sido isoladas as principais substâncias ativas das plantas conhecidas,

bem como já haviam sido realizadas todas as modificações químicas de interesse destas substâncias (TUROLLA, 2004; SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2007). Entretanto, a partir dos anos 1980, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitiram maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas, como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, nas últimas décadas observou-se a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas e o interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver medicamentos fitoterápicos em escala industrial (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Atualmente, tem-se observado aumento significativo do uso de medicamentos ditos “alternativos”, ou seja, substâncias usadas para o tratamento de diversas doenças que não são aqueles medicamentos convencionais, como, por exemplo, remédios à base de ervas. Assim, a Associação Brasileira de Indústrias de Fitoterápicos (ABIFITO) estima que este crescimento esteja ao redor de 15% ao ano. Portanto, evidencia-se que a sociedade vem buscando produtos “orgânicos”, “naturais” ou “sem adição de produtos químicos” para o consumo e, para tal, vem empregando novamente plantas medicinais, sejam elas na forma de chás comercializados em farmácias de manipulação ou na forma de fitoterápicos (MARQUES, 1999). Além disso, pode-se atribuir este crescimento a busca pela população por maior autonomia sobre o corpo e seus processos, bem como o medo e a preocupação de possíveis efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos ou alopáticos. Acrescente-se, ainda, a forte crença de que os fitoterápicos não causam efeitos colaterais indesejáveis, sendo assim mais “seguros ou confiáveis” (OLIVEIRA, 2005).

No entanto sabe-se que muitas plantas medicinais podem causar reações adversas por seus próprios componentes, adulterantes e/ou contaminantes presentes nas formulações fitoterápicas e que somente o vasto tempo do uso tradicional não é suficiente para validar a eficácia e, principalmente, a segurança dos produtos naturais. Assim, essas informações devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de risco e benefício através de ensaios farmacodinâmicos e toxicológicos (LAPA et al., 2007).

1.2 CARACTERÍSTICAS DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Conforme definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “Fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”(ANVISA, 2004a). A principal característica dos fitoterápicos é a presença de diversos princípios ativos presentes e outras substâncias em uma mesma planta. Seus efeitos terapêuticos geralmente estão associados à ação sinérgica destas substâncias ativas e não de substâncias isoladas (YUNES; PEDROSA; CHECHINEL FILHO, 2001).

É também importante definir outras expressões ligadas a este tema:

- Planta medicinal: “planta usada tradicionalmente com finalidade terapêutica”
- Droga vegetal: “planta medicinal ou sua partes, após processos de coleta. Estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada”
- Derivado de droga vegetal: “produtos de extração da matéria-prima vegetal. É caracterizado pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade”.

Em relação às formas de apresentação, estas podem ser como extratos, que são preparações líquidas (extrato fluido), sólidas (extratos secos) ou semi- sólidas (extratos moles), obtidas pela extração de drogas vegetais, frescas ou secas, através de um líquido extrator adequado, seguida de sua evaporação total ou parcial e ajuste do concentrado a um padrão previamente estabelecido. Além dos extratos existe a tintura, que consiste em preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas, resultantes da extração das drogas vegetais ou da diluição dos extratos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Outras formas farmacêuticas de apresentação de fitoterápicos são xaropes, emulsão e loções (preparações líquidas), pomadas, cremes e géis (semi-sólidas) e cápsulas, drágeas ou comprimidos (sólidos) as quais contém a planta seca moída (CARVALHO, 2004).

São características pertinentes aos fitoterápicos apontadas por Calixto (2000):

- a variabilidade no metabolismo secundário vegetal pode produzir diferenças na composição química em diferentes lotes de droga vegetal;
- as substâncias ativas nos medicamentos fitoterápicos estão numa mesma matriz complexa juntamente com outras não ativas;
- os princípios ativos vegetais são freqüentemente desconhecidos;
- dificuldade de padronização, estabilidade e qualidade dos produtos;
- vários fatores podem influenciar na presença das substâncias presentes na planta ou nas preparações fitoterápicas – idade e parte da planta utilizada, condições e período de plantio e de coleta, exposição à luz ou altas temperaturas, métodos de coleta, secagem, armazenamento e transporte da matéria-prima, métodos de extração e contaminação por microorganismos, inseticidas, metais pesados entre outros.

Assim, diante dos diversos fatores que alteram a qualidade dos fitoterápicos é necessária a padronização destes medicamentos para que apresentem o efeito terapêutico desejado.

A determinação dos princípios ativos responsáveis pela atividade farmacológica ou o estabelecimento de marcadores químicos é de fundamental importância para o desenvolvimento, a padronização e o controle de qualidade de fitoterápicos. O conhecimento dos princípios ativos também contribui para o estabelecimento do mecanismo de ação (farmacológico e toxicológico), da relação estrutura-atividade e servem de modelos para a síntese ou semi-síntese de fármacos. Além disso, os estudos farmacológicos com os extratos são desenhados considerando-se a concentração do princípio ativo/marcador (SANTOS, 2008).

O conceito “marcador químico” foi criado para padronização dos medicamentos fitoterápicos quando não são conhecidos os responsáveis pela atividade farmacológica/efeito terapêutico. O marcador é definido como: “componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos” (BRASIL, 2004a).

A forma de garantir a padronização de um fitoterápico é o uso de técnicas analíticas de cromatografia: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a métodos físicos de identificação como espectrometria na região do ultravioleta (CLAE/UV, CLAE/DAD), espectrometria de

massas (CLAE/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) que permitem identificar classes de metabólitos e marcadores químicos presentes no fitoterápico. Estas análises químicas determinam a identidade, a estabilidade e consequentemente a reprodutibilidade dos resultados garantindo a eficácia terapêutica. Os resultados obtidos são cromatogramas ou perfis cromatográficos de referencia ou padrão do material vegetal, coletado de indivíduos da mesma espécie, de diferentes populações e no mesmo estágio fenológico (fase de desenvolvimento) da planta (NETTO et al., 2006; SANTOS, 2008). Desta forma, a análise do perfil cromatográfico está se tornando uma importante ferramenta para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, uma vez que, pode demonstrar tanto as similaridades quanto as diferenças entre as amostras dos medicamentos fitoterápicos considerando os múltiplos componentes presentes (CHITLANGE et. al., 2008).

1.3. FITOTERÁPICOS NO BRASIL

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial (BRASIL, 2006). Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além disso, as plantas são aqui utilizadas há muito tempo, em práticas populares e tradicionais, como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional.

Diante deste conhecimento tradicional e seguindo as diretrizes propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para estimular o desenvolvimento de políticas públicas com o objetivo de inserir a medicinal tradicional no sistema oficial de saúde, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, e que fundamenta as diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento

das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

Em 2008, foi publicada, pelo Ministério da Saúde, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse (RENISUS) ao Sistema Único de Saúde (SUS), a qual é constituída de espécies vegetais com potencial para avançar nas etapas da cadeia produtiva e gerar produtos de interesse e que possam ser empregados pela população assistida pelo SUS. A finalidade da RENISUS é subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva, inclusive nas ações que serão desenvolvidas também pelos outros Ministérios, participantes do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Além disso, o RENISUS tem também a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos (RENISUS, 2009).

A RENISUS é constituída por plantas medicinais que interessam ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, e já terem algumas evidências para indicação de uso na atenção básica de saúde. No entanto, muitos mais estudos com estes vegetais se faz necessário, para confirmar a segurança e a eficácia, a definição da indicação de uso e da forma farmacêutica mais adequada, bem como a possibilidade de cultivo e produção padronizada.

Ainda, em 2008, foi publicada pela ANVISA, a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, na qual foram incluídas as espécies vegetais que já apresentam um corpo de evidências científicas, eficácia e posologia que permitiria seu uso pela população, entretanto, muitas destas plantas contidas nesta lista requer uma avaliação toxicológica mais aprofundada (ANVISA, 2008).

Mais tarde, em 2010, a ANVISA publicou a RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010, que dispõe sobre a produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de substâncias vegetais, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a esses produtos pelos consumidores. Os produtos que estão contidos nesta Resolução destinam-se ao uso episódico, oral ou tópico, para o alívio sintomático das doenças relacionadas, devendo ser disponibilizados exclusivamente na forma de planta seca rasurada ou

triturada, para o preparo de infusões, decocções e macerações, não permitindo o uso de substâncias vegetais na forma de cápsulas, xaropes, tintura, extratos, entre outros. Deve-se ressaltar que estes medicamentos, são produtos de venda livre, isentos de prescrição médica (ANVISA, 2010).

1.4. REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

A regulamentação dos medicamentos fitoterápicos no Brasil é realizada pela ANVISA, órgão federal, responsável pelo registro de todos os medicamentos de uso humano e pela fiscalização das indústrias produtoras destes medicamentos. Sendo assim, esta agência realiza o controle sanitário destes produtos, que abrange a normatização, as atividades educativas e de informação do setor regulado e aos consumidores, registro de produtos, controle do processo produtivo, distribuição, comercialização, publicidade, consumo e descarte, além de análises laboratoriais (CARVALHO et al., 2007).

Os medicamentos fitoterápicos industrializados devem ser registrados antes de sua comercialização para garantir o uso seguro pela população. Esse registro, determinado na Lei nº 6.360/76, que dispõe sobre os produtos submetidos ao controle da Vigilância Sanitária, tem validade de cinco anos, devendo ser renovado por períodos sucessivos. A principal legislação atual é a Resolução RDC nº 48/04 na qual são estabelecidos todos os requisitos necessários que abrangem avaliações da matéria-prima vegetal, dos derivados de droga vegetal e do produto final. Além disso, há a necessidade da comprovação da segurança e da eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Para tanto, podem ser utilizadas informações disponíveis sobre a tradição de uso da planta para as indicações propostas, fundamentadas em levantamento bibliográfico, o qual avalia a indicação de uso episódico ou para curtos períodos de tempo, coerência com relação às indicações terapêuticas, ausência de risco tóxico ao usuário, ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, ou presentes dentro de limites seguros e comprovação do uso por um período igual ou superior a 20 anos. Ainda, de acordo com esta resolução, os medicamentos que não se enquadram como fitoterápicos tradicionais devem apresentar comprovação de segurança de uso, incluindo ensaios

de toxicologia pré-clínica e clínica e de eficácia terapêutica através de ensaios farmacologia estipulados pelo Conselho Nacional de Saúde (CARVALHO et al., 2007).

Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão seguir, como parâmetro mínimo, o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, normatizado pela Resolução RE nº 90/04 (BRASIL, 2004d).

Ainda, fazem parte da regulamentação dos fitoterápicos as seguintes Resoluções:

- RE 88/04: determina a publicação da “Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos” (ANVISA, 2004b);
- RE 89/04: determina a publicação da “Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos” (ANVISA, 2004 c);
- RE 91/04: determina a publicação da “Guia para Realização de Alterações, Inclusões, Notificações e Cancelamentos Pós-Registro de Fitoterápicos” (ANVISA, 2004 e).

Oliveira, et. al. (2007), consideram a legislação brasileira altamente exigente para o registro de medicamentos fitoterápicos e citam também que é necessário o controle da produção e da qualidade dos fitoterápicos e estes devem seguir normas referentes a bulas, embalagens, restrições de venda, publicidade, estabilidade entre outros.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

O estudo de um novo medicamento, seja ele sintético ou fitoterápico, deve seguir fases importantes para assegurar sua utilização, sendo estas classificadas em: avaliação botânica, estudo farmacêutico, ensaios biológicos pré-clínicos, realizados em animais de laboratório e, posteriormente, ensaios clínicos realizados na espécie humana; no entanto, esta última fase somente deve ser realizada somente se existirem indicações seguras de que os benefícios do uso do novo produto superam os riscos avaliados na fase toxicológica (LAPA et al., 2007).

Assim, a fase de avaliação botânica consiste na identificação correta do material de estudo importante para garantir a estabilidade e a uniformidade do

material utilizado em todas as etapas da pesquisa. Para tal, há a necessidade de se conhecer o nome científico da planta e seus sinônimos, as partes utilizadas para cada preparação farmacológica e ainda informações detalhadas sobre as condições de plantio, colheita e armazenamento (WHO, 2000).

A fase de estudo farmacêutico, por sua vez, está relacionada com o modo de preparo para administração da planta, padronização e estabilidade do produto. Para que isso seja possível deve ser realizada a caracterização dos constituintes químicos da planta e a determinação da concentração dos princípios ativos relacionados às atividades farmacológicas. A utilização do perfil cromatográfico de componentes ativos, marcadores químicos ou grupos químicos, com concentração mais abundante, também pode ser empregado como uma alternativa para a padronização quando não for possível identificar uma única substância responsável por seus efeitos. Esta etapa, quando se trata de plantas medicinais, nem sempre é possível, devido ao grande número de componentes e variabilidade dos ecossistemas onde se procedeu a coleta. Portanto, para a validação é necessário proceder às análises com material obtido de uma só coleta. Além disso, é necessário ficar atento a possíveis interferentes de adjuvantes farmacêuticos empregados ou a alterações que possam ser causadas pelos processos de produção do extrato (LAPA et al., 2007).

A etapa posterior ao processo de validação de um novo medicamento são os estudos pré-clínicos de farmacodinâmica e farmacocinética. Os testes farmacodinâmicos têm por objetivo comprovar os efeitos colaterais, a relação dose-resposta e os possíveis mecanismos de ação em várias espécies de laboratório, podendo também comparar a diferença dos efeitos destes fármacos entre elas. Já os estudos farmacocinéticos avaliam o destino do fármaco após sua administração verificando a velocidade e intensidade de absorção, a distribuição no organismo, a afinidade por sítios de ligação e, por fim, as formas de metabolização e de excreção.

Portanto, a avaliação da toxicidade tem como objetivo conhecer os efeitos nocivos decorrentes das interações das substâncias químicas com o organismo para o estabelecimento de formas seguras para sua utilização, sendo a identificação destes efeitos proveniente de estudos pré-clínicos, clínicos ou, ainda, epidemiológicos (CORRÊA; ZAMBRONE, 2009).

A fim de harmonizar a condução de estudos de toxicidade, a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), a *United States Environmental*

Protection Agency (USEPA) e outras agências e/ou instituições internacionais possuem protocolos (*guidelines*) padronizados que correspondem a metodologias de uso comum do governo, das indústrias e de laboratórios independentes para identificar e caracterizar os perigos de substâncias químicas novas ou já existentes. Essa harmonização garante uma ampla aceitabilidade dos dados gerados para fins regulatórios e evita duplicações ou repetições desnecessárias de estudos já efetuados (CORRÊA; BOFF, 2009).

1.5.1 Sobre avaliação de toxicidade oral aguda

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo, após administração única ou múltipla dentro de 24 horas, de elevadas doses da substância avaliada. O início da realização deste teste, segundo Valadares (2006), ocorreu na década de 20 para avaliar substâncias que seriam utilizadas em seres humanos, porém na década de 1970 passou a ser amplamente utilizado para a comparação e classificação da toxicidade de substâncias e após este período, gradativamente, tornou-se pré-requisito para as agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas.

Estes estudos são conduzidos com o propósito de expressar a potência das substâncias em termos da dose letal média (DL50- dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) ou da concentração letal média (CL50 concentração letal 50% - concentração que mata 50% dos animais) valores estes que representam a dose estimada que cause a morte em 50% dos animais expostos ao produto testado. Desta forma, a substância-teste pode ser administrada por muitas vias, dentre elas a dérmica, a oral e a inalatória. Assim, os efeitos observados nos animais são relacionados à quantidade de substância administrada e o principal ponto analisado é a morte do animal, sendo observado também qualquer efeito adverso que possa ser atribuído a esta substância durante o período estudado. Portanto, os resultados deste ensaio possibilitam a caracterização da relação dose-resposta, de tecidos e órgãos alvo por meio de avaliações macro e microscópicas, além de outros

parâmetros como o início, a natureza e a duração da intoxicação associada à morte. Além disso, também é possível identificar os perigos relativos às diferentes vias de exposição e diferenças entre os sexos ou idade dos animais (CORRÊA; BOFF, 2009).

Atualmente, a OECD possui três protocolos para avaliação da toxicidade oral aguda:

➤ **Método doses fixas (protocolo n °420)** – o princípio do teste é verificar o aparecimento de sinais evidentes de toxicidade a partir da exposição de doses fixas (5, 50, 300 e 2000mg/kg peso vivo) do produto de forma seqüencial. Inicia-se o teste com a dose que não causa sinais severos de toxicidade e nem levem o animal à morte. A ocorrência ou não de sinais de toxicidade e mortalidade dos animais já testados definem a continuidade do estudo, e o término se dá quando for possível observar toxicidade evidente ou uma morte for identificada. O animal escolhido para este teste é o rato, preferencialmente fêmeas e são testados cinco animais para cada nível de dose, que devem ser administradas via gavagem. Neste teste nenhum valor de DL50 é estimado, apenas haverá a classificação da substância quanto ao perigo, utilizando os critérios do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (OECD, 2001a).

➤ **Método de Toxicidade Aguda de Classe (protocolo nº 423)** – este método baseia-se na utilização de três animais (ratos) de preferência fêmeas por dose em cada etapa. A ocorrência ou não de morte define o passo seguinte que consiste no tratamento de mais três animais com a mesma dose, maior ou menor e quando o ensaio deve ser finalizado. As doses utilizadas, administradas via gavagem, são: 5, 50, 300 e 2000mg/kg de peso vivo, e a dose inicial deve ser aquela mais provável de produzir a morte de algum animal. Neste teste a substância também é classificada de acordo com GHS e um valor de DL50 de corte pode ser estabelecido de acordo com o número de mortes observadas (OECD, 2001b).

O Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) é um documento publicado em 2002, pelas Nações Unidas, para a avaliação das propriedades das substâncias e estabelece condições para o alto nível global de proteção para a saúde humana e o meio ambiente. No que diz respeito à toxicidade aguda, o GHS determinou cinco categorias com base na DL50 (oral, dérmica), ou na CL50 (inalação), classificando as substâncias quanto ao seu perigo descrito na tabela 1. A categoria 1(um) representa toxicidade severa e

a categoria 5(cinco) é destinada a produtos químicos com toxicidade aguda relativamente baixa, mas que, sob certas circunstâncias, podem representar um risco para populações vulneráveis (ABIQUIM, 2005).

Tabela 1- Critérios para classificação de substâncias na toxicidade oral aguda de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS)

Toxicidade Aguda	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
Oral (mg/kg)	$> 0 \leq 5$	$> 5 \leq 50$	$> 50 \leq 300$	$> 300 \leq 2000$	$> 2000 \leq 5000$

➤ **Teste *Up and down* (protocolo nº 425)** – este teste, diferente daqueles anteriormente descritos, permite estimar valor de DL50 com intervalo de confiança, sendo também possível a classificação de acordo com o GHS. É utilizado um software que estabelece as doses a serem testadas, identifica o momento da finalização do teste, estima a DL50 e o intervalo de confiança. O princípio do teste é a administração de doses únicas progressivas e ordenadas, com intervalo de 48 horas entre as dosagens. A dose inicial proposta é de 175mg/kg (com coeficiente de progressão de 3,2 entre as doses), esse valor pode ser modificado caso haja informações disponíveis a respeito da substância teste. Utiliza-se ratos, fêmeas e a administração da substância é feita através de gavagem, testando os animais um a um. Se o animal sobreviver, o próximo recebe uma dose maior, e no caso de morte diminui a dose. O término do teste segue os seguintes critérios:

- Três animais consecutivos sobrevivem a maior dose;
- Cinco reversões ocorrem entre seis animais tratados consecutivamente;
- Ao menos quatro animais seguem a primeira inversão (OECD, 2008a).

1.5.2 Sobre toxicidade oral em doses repetidas

Os estudos de toxicidade com exposições contínuas as substâncias são utilizados para mimetizar a forma mais comum de exposição humana: as exposições repetidas e constituem a etapa inicial para identificação dos efeitos adversos em potencial (CAMPOS; AMARAL, 2009).

A partir destes testes é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomopatológicas e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do nível de efeito (dose) não observado (NOEL) e nível de efeito (dose) adverso não observado (NOAEL). Geralmente três doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e não-roedores (ANVISA, 2010).

A escolha adequada da espécie que será utilizada é importante. Deve ser fundamentada nos requerimento das agências regulatórias, na sua similaridade aos humanos considerando a farmacocinética e biodisponibilidade da droga, incluindo sua biotransformação, na escolha das espécies mais sensíveis, na resposta a um órgão ou tecido particular para uma toxicidade específica e também na disponibilidade de habitação e criação apropriada para os animais. Segundo Campos e Amaral (2009), o rato é a espécie escolhida para estudos via oral e inalatória, e a OECD ressalta que a utilização de animais menores que rato podem resultar num aumento da variabilidade dos resultados, além de o rato ser a única espécie indicada para avaliar desreguladores endócrinos. Para exposição dérmica o coelho é a espécie preferencial. A utilização de duas espécies, uma roedora e outra não roedora, aumenta a probabilidade de avaliar as respostas da substância-teste com maior similaridade com o homem. Assim os ratos são os roedores de escolha e os cães da raça *Beagle* são os mais comumente utilizados para espécie não-roedora.

Para o teste de toxicidade em doses repetidas, em roedores, a OECD dispõe de dois protocolos descritos a seguir:

- **Toxicidade oral em doses repetidas 28 dias em roedores (protocolo nº 407)** – esse teste utiliza ratos, machos e fêmeas, adultos jovens, com cinco animais por grupo das doses a serem testadas e ainda recomenda-se a utilização de um grupo satélite com mais dez animais (cinco por sexo) no grupo controle e no grupo da maior dose testada, para observação da persistência, reversibilidade ou efeitos posteriores aqueles observados ao término dos 28 dias de tratamento, que permanecerão em observação por mais 14 dias.

Durante o período do teste devem ser observados sinais clínicos gerais, alterações no peso corpóreo dos animais e consumo de água e ração. Ao final, devem ser avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos, análise macroscópicas e histopatológicas dos órgãos e tecidos e os pesos absolutos e relativos dos órgãos. Além disso, é recomendado avaliar alterações nos sistemas imune, endócrino e sistema nervoso central (OECD, 2008b).

- **Toxicidade oral em doses repetidas 90 dias em roedores (protocolo nº 408)** – esse teste permite, além da avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da administração prolongada de uma substância, observar os efeitos decorridos após a maturação dos animais na idade adulta devido ao tempo de ocorrência mais prolongado. O delineamento experimental é igual ao teste de 28dias, porém com dez animais por grupo (OECD, 1998).

1.5.3 Norma da ANVISA para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos

O registro de medicamentos fitoterápicos pela ANVISA, de acordo com a Resolução 90/04, exige que sejam conduzidos os testes de toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas, e genotoxicidade para medicamentos de uso oral e também os testes de sensibilização dérmica, irritação cutânea e ocular para medicamentos de uso tópico, conforme descritos a seguir:

- **Toxicidade aguda**

Utiliza-se uma espécie de mamífero (geralmente rato), machos e fêmeas adultos, com seis animais por grupo, devendo ser utilizada a mesma via de administração proposta para o uso do medicamento. Para esta avaliação podem ser utilizados qualquer um os protocolos validados pela OECD.

- **Toxicidade de doses repetidas (longa duração)**

Exige que o teste seja realizado com pelo menos duas espécie de mamíferos, sendo uma roedora e uma não-roedora. Devem ser utilizados machos e fêmeas; com grupos contendo 10 animais para roedores e três para

espécies não-roedores. A duração do tratamento com a substância-teste depende do tempo de uso proposto: até 30 dias de uso por ano a duração é de 4 semanas; acima de 30 dias de uso por ano o tratamento deve ser realizado por 12 semanas. Da mesma forma que o teste agudo, estes seguem os critérios propostos pela OECD, porém não comentam a recomendação da avaliação de toxicidade no sistema endócrino, imune ou no sistema nervoso central.

➤ **Teses de Genotoxicidade**

O teste deve ser efetuado quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos (não é relatado o tempo mínimo de uso contínuo).

Dentre os testes propostos estão:

- Avaliação in vitro da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de dano a cromossomas de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo.
- Avaliação in vivo do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (teste de micronúcleo).

A respeito dos testes para medicamentos de uso tópico não são descritos como devem ser realizados nesta norma, no entanto podem ser utilizados os protocolos validados pela OECD.

1.6 SOBRE A *Casearia sylvestris*

A *Casearia sylvestris* Sw. é uma planta da família das *Salicaceae* (SOLTIS et al., 2000; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). Segundo Torres e Yamamoto (1986) botanicamente é caracterizada por:

“Subarbusto a árvore com 1,5-10,0(-15,0) m de altura. Ramos com extremidade glabra a pubescente, lenticelas esparsas a numerosas. Folhas geralmente maduras, às vezes jovens na floração; oblongas, elípticas ou ovadooblongas; base atenuada, simétrica a assimétrica;

cerca de (4,0-)5,0-12,0(-14,0)x(1,0-)2,0-3,5(-4,0) cm; membranáceas a papiráceas; totalmente glabras, exceto, às vezes, a nervura central em uma ou ambas as faces; pontuações transparentes, pequenas, numerosas, distribuídas por toda a lâmina; margem levemente glandular-serrulada a serrada; venação nunca subtriplinérvea, imersa, inconspícua a conspicua na face superior, inconspícua a proeminente na face inferior; pecíolo glabro a pubescente, cerca de 0,5-0,6 cm de comprimento; estípulas caducas. Fascículo sésil, cerca de 24-40 flores por inflorescência; bractéolas pequenas, escamiformes, na base dos pedicelos; pedicelo com cerca de 2,0-6,0 mm de comprimento, articulado quase na metade de seu comprimento, glabro a pubescente. Botão floral globóide; sépalas 5, levemente unidas na base, internamente glabras, externamente glabras a pubescentes, oblongas, com cerca de 4,0x2,0 mm. Estames (8-9-)10(-11-14); filetes glabros a seríceos, alternadamente cerca de 0,8 e 1,0 mm de comprimento; conectivo com glândula apical glabra. Lobos do disco seríceos a tomentosos, com cerca de 0,5-1,0 mm de comprimento. Ovário ovóide, glabro a seríceo na porção superior, estilete com (raramente 2-) 3 ramos na extremidade, estigmas (raramente 2-) 3, capitados. Cápsula ovóide, com cerca de 5,0 mm de diâmetro, vermelha, cálice persistente; sementes 1-7, glabras, testa foveolada, arilo amarelo, pegajoso”(Figuras 1 e 2).

Ocorre naturalmente em todo o território brasileiro podendo ser encontrada também em outros países da América do Sul e Central e dependendo da região, recebe nomes populares diferentes como, por exemplo, guaçatonga e herva de bugre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, café-bravo no Ceará e Paraná ou ainda, cusé na Bolívia, sarnilha em Cuba e cafecillo cimarrón e hierba de burro no Paraguai (CARVALHO, 2007).

Figura 1 - *Casearia sylvestris*

Figura 2 - Exemplar de *C. sylvestris* mostrando detalhe das folhas e flores.

A *C. sylvestris* foi incluída na 1ª Farmacopéia do Brasil, identificada como herba de bugre, constando como parte utilizada suas folhas. O emprego oficial citado é do extrato hidroalcoólico (EtOH/H₂O, 1:2, v/v) obtido por percolação (1:1, m/v) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1926).

Santos (2008) menciona que o relato mais antigo de uso popular da planta encontrado na literatura é datado no ano de 1877 e há citações do uso popular da planta em obras clássicas como “Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas” (CORREA, 1975), “Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais”, “O Jardim Botânico de São Paulo” (HOEHNE, 1939; HOEHNE, 1941) e “Notas de Fitoterapia” (COIMBRA, 1958), e também em obras mais recentes, como “Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas” (LORENZI; MATOS, 2002) e “Plantas que curam” (PANIZZA, 1998). Santos (2008), ainda, destaca que as folhas são a parte mais utilizada da planta e as indicações populares mais comuns são antiofídico, antitérmico, cicatrizante e no tratamento de úlceras e gastrites. Outros usos como o tratamento de queimaduras, herpes labial e genital, gengivites, aftas, halitose, diarreia, reumatismo e a utilização desta planta como tônica e depurativa também foi relatado no uso popular por Lorenzi e Matos (2002).

A atividade antiofídica do extrato aquoso das folhas de *C. sylvestris* foi avaliada em ensaios farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo* e mostrou que este extrato inibiu as atividades hemolítica, anticoagulante, miotóxica, a indução de edema de pata, além de diminuir a letalidade, produzidas pelo veneno de cobras dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesia* (BORGES et al., 2000; RASLAN et al., 2002; OSHIMA-FRANCO et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2007).

Sobre atividade antiinflamatória, são descritos efeitos analgésico e antiinflamatório dos extratos aquosos de folhas e cascas da *C. sylvestris*, em camundongos, avaliados pelo número de contorções abdominais e modelos de difusão do azul de Evans na cavidade abdominal e edema de pata (RUPPELT et al., 1990; PEREIRA et al., 1992). O extrato hidroalcoólico de suas folhas também mostrou atividade antiinflamatória em modelo utilizando o método de difusão de azul de Evans em ratos (SILVA et al., 2004). Camargo et al. (1996) observaram a propriedade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico em lesão subcutânea em camundongos, observando redução da fase aguda do processo inflamatório seguida de intensificação e prolongamento da fase regenerativa da lesão.

Quanto ao uso da guaçatonga no tratamento da herpes labial, Cury (2005) avaliou a eficácia de cremes à base de tintura de *Casearia sylvestris* a 10% em lesões herpéticas, em humanos, comparando com creme do antiretroviral, penciclovir a 1%, num estudo duplo-cego, e verificou que o creme oriundo da planta induziu à cicatrização num período de tempo significativamente menor do que o creme de penciclovir. A ação cicatrizante também é descrita por Gomes et al. (2005).

A ação antiulcerogênica, dos extratos etanólico e hidroalcoólico das folhas de *C. sylvestris*, foi avaliada em ratos *Wistar*, por meio de ensaios de lesão gástrica aguda produzida por estresse e por álcool, e de lesão gástrica crônica provocada por ácido acético. Os resultados destes testes, juntamente com os das medidas de parâmetros de secreção gástrica, demonstraram que o extrato protegeu a mucosa do estômago, sem alterar o pH estomacal e a secreção de ácido clorídrico, apresentando a vantagem de não interferir no processo de digestão e absorção de proteínas diferentemente do que ocorreria com medicamentos estudados, cimetidina e misoprostol, os quais são comumente empregados na clínica para o tratamento da úlcera gástrica (BASILE et al., 1990; SERTIÈ; CARVALHO; PANIZZA, 2000).

Outros estudos, como a atividade anti-câncer da guaçatonga, na década de 1980, no Japão, realizado por Itokawa et al. (1988) observou que o extrato etanólico de suas folhas apresentava intensa atividade anti-tumoral contra sarcomas de camundongos. Compostos isolados da planta, denominados casearinas, demonstraram não só atividade anti-tumoral, mas também citotóxica contra várias linhagens de células humanas cancerosas (MORITA et al., 1991). Ainda, Oberlies et al. (2002) identificou novas casearinas nas folhas e caules da *C. sylvestris* com atividade citotóxica em diversas linhagens celulares tumorais e, também, vários fungos patogênicos.

No que se refere aos estudos de avaliação de toxicidade da *C. sylvestris*, Basile et al. (1990) verificaram que o extrato hidroalcoólico obtido das folhas de guaçatonga apresentou baixa toxicidade, sendo sua toxicidade oral aguda, expressa pela dose letal média (DL 50), em ratos *Wistar*, inferior a 1842 mg/kg. Ainda, neste estudo, foi avaliada a toxicidade oral em doses repetidas por 30 dias das doses de 57,5 mg/kg e 143,9 mg/kg do extrato, não sendo observado qualquer sinal de toxicidade avaliado pela observação macroscópica e peso absoluto e relativo dos órgãos fígado, baço e rins.

O potencial genotóxico do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* foi avaliado por Maistro et al. (2004), empregando-se o “teste do cometa”, que avalia a lesão e o reparo do DNA, e os resultados revelaram que este extrato não apresentou efeitos genotóxicos. Da mesma forma, Oliveira et al. (2009) demonstraram, utilizando-se o teste do micronúcleo (MN) e do cometa, que o extrato etanólico da planta também preveniu lesão no DNA induzida pela ciclofosfamida quando utilizado em baixas concentrações (6,25 e 12,5 mg/kg p.v teste MN; 3,13, 6,25, 12,5 e 25 mg/kg p.v no ensaio cometa). Contudo, em altas concentrações (50 e 75 mg/kg p.v) este extrato promoveu dano no DNA.

Atualmente, a *C. sylvestris*, no Brasil, está presente na lista de plantas da RENISUS, no Formulário Nacional Fitoterápico e na Resolução - RDC Nº 10/10, com indicação para uso interno no tratamento de dispepsia, gastrite e halitose e uso tópico para dor e lesões, como anti-séptico e cicatrizante utilizado na forma de infusão ou compressas com advertência somente para o uso em gestantes, com base nos estudos já realizados e nas informações do uso tradicional desta planta, porém poucos há poucos estudos sobre avaliação da toxicidade e, conseqüentemente, segurança do uso desta planta.

Assim o objetivo deste trabalho, foi o de realizar os protocolos para análise de toxicidade oral, preconizados pela OECD e pela própria ANVISA, visando verificar se o extrato fluido de *C. sylvestris*, possui algum efeito tóxico quando utilizado prolongadamente.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar, *in vitro* (avaliação da citotoxicidade) e *in vivo*, em ratos, os possíveis efeitos tóxicos da *C. sylvestris*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da *C. sylvestris*, utilizando-se os seguintes procedimentos:

1. Citotoxicidade *in vitro*: Avaliação de quatro diferentes extratos brutos da *C. sylvestris* - extrato fluido (EF), tintura (TI), extrato aquoso (CHÁ) e extrato etanólico (EE);
2. Toxicidade oral aguda do extrato fluido;
3. Toxicidade oral com doses repetidas 28 dias (ratos jovens e adultos) e 90 dias (ratos adultos);
4. Imunotoxicidade em ratos, tratados com o extrato fluido da planta durante 28 e 90 dias;

Procurou-se também realizar a determinação do perfil ou padrão cromatográfico (*fingerprint*)¹ do extrato fluido por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta (CLAE-UV) para padronização do extrato fluido.

¹ Perfil cromatográfico(*fingerprint*) é definido como : padrão cromatográfico das substâncias quimicamente ativas e/ ou dos constituintes químicos característicos da amostra (CHITLANGE et al. , 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos e fêmeas, adultos(idade 60 dias) e jovens (idade 21dias), provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ–USP). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico fosco, com tampas metálicas, medindo 40x50x20cm. Todas as gaiolas foram mantidas em salas com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h. Durante o experimento os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram aclimatados às condições experimentais, por um período de cinco dias anteriores ao início da administração da planta.

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ-USP e estão protocolados sob o nº 1738/09.

3.2 DROGAS E REAGENTES

Os reagentes e drogas utilizadas durante esse estudo foram: acetonitrila (J.T.Backer grau HPLC), ácido acético (Synth), Metanol (Merck grau HPLC),álcool etílico Santa Cruz[®] 99,3° INPM , azul de Trypan (Gibco[®], *Invitrogen cell culture*), xilazina (Anasedan[®]-Vetbrands), quetamina (Dopalen[®]-Vetbrands), Paraformaldeído (Sigma), RPMI-1640 (Gibco[®], *Invitrogen cell culture*), Penicilina/estreptomicina/ anfotericina (Gibco[®], *Invitrogen cell culture*), soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®], *Invitrogen cell culture*), *Tween 20*[®], kit's comerciais para análise bioquímica: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT); bem como os níveis séricos da uréia, creatinina, glicose, colesterol total, triglicerídes, albumina, proteína total (PT) e ácido úrico(Celm[®]).

3.3 *C. sylvestris* E EXTRATOS

3.3.1 Material vegetal

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas no campus da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, em de fevereiro 2009. Estas foram secas em temperatura ambiente e moídas e armazenadas em embalagem escura até o momento da preparação dos extratos.

Uma exsicata foi identificada e depositada no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo sob número 430190.

3.3.2 Extrato fluido (EF)

O extrato fluido da planta foi produzido de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1926), a qual foi identificada com o nome “herva de bugre”. Assim, para obtenção de tal extrato empregou-se o método de percolação, como descrito a seguir: “100 g da folha seca pulverizada foram umedecidas, com uma solução de álcool etílico 99,3° INPM e água destilada na proporção de 1:2 e macerada por 6 horas. Após este procedimento o pó umedecido foi filtrado com a solução hidroalcóolica (1L), em filtro buchner, para obtenção do extrato fluido que foi posteriormente colocado em rotaevaporador, para evaporação do álcool etílico, à temperatura de 50°C para obtenção do extrato fluido seco. O extrato foi mantido congelado a -20°C, sendo ressuspenso em água destilada em diferentes doses imediatamente antes da administração semanalmente.

3.3.3 Extrato etanólico (EE)

O extrato etanólico da *C.sylvestris* foi obtido conforme processo descrito na patente PI 0306167-1 (FAPESP, 2003). Assim, duzentos gramas de folhas secas pulverizadas da planta foram adicionadas a 600ml de álcool etílico 99,3° INPM, colocadas no aparelho de ultrassom, por 20 minutos, e, a seguir filtrada. Ao resíduo da filtração adicionou-se novamente 600ml de álcool etílico e colocados no aparelho de ultrassom, repetindo-se este mesmo processo com o resíduo desta filtração.

Após este procedimento, os filtrados foram reunidos e depositados no rotaevaporador para obtenção do extrato, o qual foi mantido no congelador, à temperatura de -20°C, até o momento de sua utilização.

3.3.4 Tintura (TI)

A tintura alcoólica da planta foi produzida de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1959) pelo método de maceração, como descrito a seguir:

Vinte gramas de folhas secas de *C. sylvestris*, pulverizadas, foram adicionadas a 100ml de álcool etílico 99,3° INPM, em um frasco de vidro âmbar, sendo este foi mantido em temperatura ambiente, isolado da luz, por oito dias. Após este período a tintura foi filtrada e armazenada em geladeira (4°C) até o momento de uso.

3.3.5 Extrato aquoso (CHÁ)

O extrato aquoso da *C. sylvestris* foi obtido por infusão de 50g da folha seca da planta para 100 ml de água fervente, mantendo-o abafado por um período de tempo de oito minutos e após filtrado em filtro de papel imediatamente antes do uso.

3.4 ANÁLISE DO EF POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR ULTRAVIOLETA (CLAE/UV) - IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO CROMATOGRÁFICO

A identificação do padrão cromatográfico do EF de *C. sylvestris* utilizado para a avaliação de toxicidade oral aguda e em doses repetidas por 28 e 90 dias, foi realizado conforme as instruções do documento: Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos” – ANVISA, de acordo com RE 899/03 (ANVISA, [2003 - ?]).

O extrato fluido (EF) de *C. sylvestris* foi analisado por CLAE-UV² utilizando o equipamento Varian modelo *Pro Star 310*, software *Varian star workstation*, 6.0. A separação cromatográfica ocorreu através da coluna cromatográfica C18 Pursuit® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta de: eluente A- água milliQ (Millipore) com 0,1% ácido acético (CH₃COOH; Merck); eluente B – metanol grau HPLC (MeOH, Merck) utilizado para limpeza da coluna e eluente C - acetonitrila grau HPLC (ACN, J.T.Baker). A vazão da fase móvel foi de 0,6 ml/min..

A amostra do EF foi previamente diluída em água milliQ na concentração 1mg/ml e filtrada com filtro Millipore 0,45mm, antes da injeção no cromatógrafo. O volume da injeção foi de 20 µl.

A eluição foi realizada da seguinte forma: Tempo 0 - 95% de A e 5% de C até 28% de A até 15min. De 16min – a 55min de 28% de A até 68% de C e de 56min-60min até 100% de C, totalizando 60 minutos de tempo total de corrida. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 254 nm.

O padrão cromatográfico obtido na análise por CLAE/UV é mostrado na figura 3. Os picos, mostrados no cromatograma, ao longo do eixo do tempo serve para a identificação qualitativa dos compostos da amostra, enquanto que as áreas sob os picos fornecem informações a respeito das quantidades relativas de cada um dos componentes da mistura, portanto cada pico do cromatograma representa uma

² Esta análise foi realizada no Instituto de Botânica de São Paulo, no Laboratório de Fitoquímica e Ecofisiologia com a orientação e colaboração da pesquisadora Dra. Luce Maria Brandão Torres.

substância detectada e os resultados apresentados na tabela 2 mostra o número de picos e seus respectivos tempos de retenção (T_r) (tempo gasto por um componente desde a sua injeção na coluna até a sua detecção na saída do sistema) em minutos e as concentrações destas substâncias detectadas que são determinadas pela área integral do pico expressas em porcentagem(%) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 3 - Cromatograma do extrato fluido (EF) de *C. sylvestris* obtido pela análise CLAE-UV. Condições cromatográficas: fase móvel composta por 0,1 % de ácido acético em água e acetonitrila, fluxo de 0,6 mL/min, coluna C18 Pursuit® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detector a 254 nm, equipamento Varian modelo Pro Star 310

Tabela 2 – Substâncias detectadas na análise do EF de *C. sylvestris* por CLAE-UV do EF, representada por picos obtidos no cromatograma com os seus respectivos tempo de retenção (*Tr*) e áreas integrais dos picos, as quais correspondem a concentração de cada substância na amostra expressa em %

Picos	Tempo retenção (<i>Tr</i> - min)	Área Integral do pico (%)
1	3.697	8,28
2	4.860	6,09
3	9.772	1,33
4	11.329	24,71
5	15.561	3,65
6	15.826	3,63
7	17.146	2,41
8	17.982	5,80
9	18.720	5,79
10	18.883	34,01
11	19.069	4,24

3.5 ADMINISTRAÇÃO DO EF DA *C. sylvestris*

A administração do extrato fluido da planta aos animais, em todos os experimentos, foi realizada por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, por 28 ou 90 dias. Durante todo o tratamento os ratos foram pesados periodicamente para o ajuste da dose.

3.6 PROCEDIMENTOS

3.6.1 Avaliação de citotoxicidade

A metodologia empregada para a avaliação da viabilidade celular por corante vital, MTS/PMS, foi realizada como recomendado no kit “CellTiter96® AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega Corporation”.

Para tal, as células CHO-k1 utilizadas foram padronizadas. Estas células foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4 para realização dos experimentos.

A viabilidade celular foi determinada pela relação:

$$VC(\%) = \left(\frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \right) \times 100$$

Onde: VC = viabilidade celular (%); DO_{amostra} = densidade óptica da amostra; DO_{controle} = densidade óptica do controle.

O Índice de Citotoxicidade (IC₅₀), concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente pelo programa *Origin* 6.0.

Para os extratos TI e EE da planta foi realizada a determinação da curva de citotoxicidade também para os solventes, álcool etílico 99,3° INPM e *Tween*®20, respectivamente, para excluir o possível efeito citotóxico destes extratos.

Para estimar a dose inicial do experimento de toxicidade aguda foi utilizada a fórmula que indica a dose letal 50% (DL₅₀ - ou seja, a quantidade de ingrediente ativo de uma substância tóxica necessária para matar 50% de animais testados) por meio da

obtenção do valor do índice de citotoxicidade (IC50) proposta pela publicação "*Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*", descrita a seguir: $\log (LD50) = 0.435 \times \log (IC50x) + 0.625$ (ICCVAM, 2006)³.

3.6.2 Avaliação do ganho de peso dos animais e consumo de ração

Os animais foram pesados antes do início da administração do extrato fluido (EF) de *C. sylvestris*, procurando-se, desta maneira, realizar a distribuição estatisticamente homogênea de peso dos animais entre os diferentes grupos.

O consumo de ração, bem como o peso dos ratos tratados, foi medido periodicamente durante os experimentos.

3.6.3 Avaliação clínica dos animais

Os animais foram observados, diariamente, sempre no período entre 9-12h procurando-se verificar qualquer manifestação de sinais de toxicidade, tais como: alteração da locomoção, alteração em pele, pêlos e mucosas, piloereção, sialorréia, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, movimentos estereotipados, tremores, diarreia, letargia e coma.

³ O teste de citotoxicidade foi realizado com a colaboração da Dr^a Andrea Rodas no Laboratório de Biomateriais, no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares São Paulo (IPEN).

3.6.4 Coleta de sangue, hemograma e bioquímica

Para a coleta de sangue, os ratos foram anestesiados com xilazina associada à quetamina (5,0 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente), por via intraperitoneal (ip) e, em seguida, foram submetidos à punção cardíaca, empregando-se para tal seringas descartáveis não heparinizadas. Uma alíquota de sangue com EDTA foi utilizada para realização do hemograma em aparelho automatizado (Vet ABCTM *Animal Blood Counter*, Horiba, ABX *Diagnostics*), e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através da coloração com Rosenfeld (corante panótico). Outra alíquota do sangue foi mantida em temperatura ambiente por pelo menos 45 min para que ocorresse a coagulação. Depois de coagulado, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min, coletando-se o soro, o qual foi mantido a uma temperatura de -20°C, até o momento de processamento para realização da dosagem bioquímica.

As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT); bem como os níveis séricos da uréia, creatinina, glicose, colesterol total, triglicerídes, albumina, proteína total (PT), ácido úrico dos animais experimentais e controle foram dosados por meio de sistema automatizado, utilizando CELM SBA-200 do Laboratório do CEPTOX- Universidade de São Paulo, campus Pirassununga.

3.6.5 Avaliação dos pesos relativos de timo e baço e celularidades de baço e medula óssea

Após a coleta do sangue, os animais foram submetidos à eutanásia, por decaptação, empregando para tal a guilhotina. Imediatamente após este procedimento realizou-se a coleta do timo, do baço e do fêmur (pata direita). A seguir, procedeu-se à pesagem dos órgãos linfóides (baço e timo). Posteriormente, o baço foi macerado e

após a lise das hemácias, os esplenócitos foram mantidos em gelo até realizar-se a contagem dos mesmos.

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral de cada animal, após a lavagem da mesma com 5 mL de solução gelada de RPMI. As células foram acondicionadas em tubos cônicos de 15 mL e dispersas com auxílio de pipeta tipo Pasteur até se obter uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, 10µL desta amostra foram colhidos e diluídos na razão 1:100 em Azul de Trypan (diluídos 6x em PBS). A viabilidade e contagem global das células nucleadas foram realizadas em câmara de Neubauer.

3.6.6 Avaliação histopatológica

Para análise histológica, os fragmentos de tecidos provenientes do timo, baço, fígado, rim, adrenal, pulmão, coração, estômago, e cérebro, foram fixados em formol a 10%; posteriormente, o material foi emblocado, cortado e corado com hematoxilina-eosina (HE), para observação de possíveis alterações à microscopia óptica.

3.7 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. Para dados não paramétricos e não homocedásticos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os dados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão (SD) ou mediana (mínimo - máximo) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS QUATRO DIFERENTES EXTRATOS DA *C. sylvestris*: FLUIDO (EF), TINTURA (TI) , AQUOSO (CHA) E ETANÓLICO (EE)

Os extratos EF, TI, CHA e EE da *C. sylvestris* foram diluídos, em meio RPMI 1640, para obtenção de oito concentrações para análise, na proporção de 1:2. A primeira diluição foi esterilizada com filtro 0,45 µm para seringa com membrana de celulose. As diluições subsequentes foram realizadas em fluxo laminar estéril na proporção 1:2 em meio RPMI 1640 estéril. Quando necessário, foi realizado o mesmo procedimento para o solvente.

Em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50µL da suspensão de células CHO- K1, na concentração de 5000 células por poço, sobre 50µL dos extratos nas concentrações, de acordo com a tabela 3, em sextuplicata. Após este procedimento, a placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO₂ por 48 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µl de solução de MTS/PMS (20:1) e incubado por mais 2 horas. A placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm (Figura 5).

Tabela 3 - Concentrações dos extratos de *C. sylvestris*: extrato fluido (EF), tintura (TI), extrato aquoso (CHA) e extrato etanólico (EE) utilizadas nas placas de cultura das células CHO-k1

Concentrações μg/ml	EF	TI	CHA	EE
C1	19,53	0,005	0,469	0,019
C2	39,06	0,010	0,938	0,038
C3	78,12	0,019	1,875	0,076
C4	156,25	0,040	3,75	0,153
C5	312,5	0,078	7,5	0,305
C6	625	0,156	15	0,61
C7	1250	0,312	30	1,22
C8	2500	0,625	60	2,44

Figura 4 - Desenho esquemático, ilustrando uma das placas analisadas, as quais continham células CHO- K1. Os poços das bordas foram utilizados como "branco", não possuindo nem células nem extrato, as colunas de nº 2 e 11 foram utilizadas como controle (células em meio RPMI), e nas colunas de nº 3 a 10 foram depositadas as diferentes concentrações dos extratos da *C. sylvestris*, a saber: extrato fluido (EF), tintura alcoólica (TI), extrato aquoso, (CHA) e extrato etanólico (EE) do mais diluído ao mais concentrado. A avaliação da viabilidade celular é obtida pela reação da amostra com o corante vital, MTS/PMS, e a leitura realizada por leitor ELISA

4.1.1.Resultados

Verificou-se que extrato EE mostrou maior citotoxicidade, seguindo-se os extratos TI, CHA e EF. Os valores das ICs 50, foram determinadas graficamente. Estes valores foram de 0,084µg/ml, 0,237µg/ml, 1,822µg/ml e 200,81µg/ml, para o EE, TI, CHA e EF, respectivamente (Figura 5).

A DL50 dos extratos EE ,TI, CHA e EF foram obtidas pela fórmula: $\log (LD50) = 0.435 \times \log (IC50x) + 0.625$ resultando nos valores: EE= 0,40g/kg, TI = 0,59 g/kg, CHA= 0,86 g/kg e EF= 1,28g/kg.

Figura 5: Viabilidade das células CHO-K1(%) após tratamento com os diferentes extratos de *C.sylvestris*: extrato fluido (EF), tintura (TI), extrato aquoso (CHA) e extrato etanólico (EE – representado por US no gráfico) e dos veículos dos extratos TI (álcool) e EE (Tween 20®). Os valores das concentrações dos extratos estão expressos em escala logarítmica

4.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EXTRATO FLUIDO DE *C. sylvestris*

Foram utilizadas três ratas *Wistar*, pesando entre 193 e 200g. Estes animais foram submetidos ao jejum alimentar prévio de 12 h à administração. A administração foi feita por via oral, através de gavagem, com a dose única de 2000 mg/kg do EF da planta.

Os animais foram observados, individual e consecutivamente por 30 minutos após receberem o extrato da planta e depois periodicamente, durante as primeiras 24 horas. Decorrido este período, as ratas foram observadas diariamente, durante 14 dias consecutivos.

Foram observadas as possíveis alterações clínicas, como descrito no item 3.6.2. Além disto, os animais foram pesados e aferiu-se o consumo de ração a cada quatro dias. No 15^o dia os três animais foram submetidos à necropsia para avaliação histológica, de acordo com o item 3.6.6, dos órgãos baço, rim, e fígado.

4.2.1 Resultados

Durante os 14 dias de avaliação, não foram observadas mortes ou alterações clínicas em nenhum dos animais; por outro lado, verificou-se diminuição do peso destes entre o 5^o e 9^o dia, período no qual os animais consumiram menos ração. Após o 9^o dia, estes animais voltaram a ganhar peso e pode-se observar maior o consumo de ração, conforme indicado nas tabelas 4 e 5. À necropsia não foram observadas alterações macroscópicas, da mesma maneira, não foi constatada nenhuma alteração, quando da avaliação histopatológica do rim, fígado e baço destes animais.

Tabela 4 - Avaliação da variação de peso de ratos tratados com 2000mg/kg do extrato fluido (EF) da *C. sylvestris*, em dose única, por via oral, no período de observação de 14 dias

Dias da avaliação	Peso (g)		
	Animal 1	Animal 2	Animal 3
1	193	201	195
5	194,5	202,5	207
9	186	195	202
14	195,6	201	208,6

Tabela 5 - Consumo ração de ratos tratados com 2000mg/kg do extrato fluido (EF) da *C. sylvestris*, em dose única, por via oral, no período de observação de 14 dias

Consumo de ração(g)	Animal 1	Animal 2	Animal 3
Dia 1-5	49,80	61,60	68,80
Dia 5-9	31	44,4	49,4
Dia 9-14	67,8	77,4	80,8

4.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO (EF) DA *C. sylvestris*, ADMINISTRADO POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 28 DIAS, EM RATOS ADULTOS.

Foram utilizados 40 ratos adultos, machos, os quais foram separados em quatro grupos iguais, sendo um controle três experimentais. Os animais pertencentes aos grupos experimentais receberam, durante 28 dias, por gavagem, as diferentes doses de guaçatonga: 60 (EF60), 120 (EF120) e 240 mg/kg (EF240). Os ratos pertencentes ao grupo controle (Co) receberam, também por gavagem, apenas água. Diariamente, foi realizada a avaliação clínica dos animais, conforme descrito no item 3.6.2, e a cada quatro dias foram pesados e tiveram o consumo de ração mensurado.

Ao final dos 28 dias de administração da planta, os ratos foram anestesiados, para, em seguida, proceder-se à punção cardíaca para coleta de sangue, para a realização do hemograma e da análise bioquímica, conforme descrito no item 3.6.4. Posteriormente, naqueles animais pertencentes ao grupo que recebeu a maior dose do extrato da planta (EF240), realizaram-se as coletas dos órgãos conforme descrito no item 3.6.6.

Além disso, procedeu-se à avaliação dos pesos relativos de timo e baço e celularidade de baço e medula óssea, seguindo-se procedimento conforme descrito no item 3.6.5.

4.3.1 Resultados

As figuras 6 e 7 ilustram os efeitos do tratamento com EF da guaçatonga, no período de 28 dias. Assim, pode-se observar que o tratamento com a planta não causou nenhuma alteração significativa ($p>0,05$), no que se refere ao peso e consumo de ração.

O hemograma não revelou diferenças significantes entre os dados obtidos dos animais dos diferentes grupos, conforme mostra a tabela 6.

Da mesma maneira, as celularidades de medula óssea e do baço não diferiram significativamente ($p>0,05$), quando compararam-se os dados obtidos entre os animais dos diferentes grupos (Figura 8).

A avaliação estatística dos valores obtidos de peso relativo dos órgãos linfóides (baço e timo) dos ratos dos diferentes grupos, também revelou não haver diferenças entre os mesmos ($p>0,05$) - Tabela 7.

A tabela 8 mostra os dados relativos à avaliação da bioquímica sérica. Assim, verifica-se que o teste estatístico empregado revelou não haver alterações das enzimas ALT, AST, FA e GGT, e dos níveis séricos de glicose, colesterol, uréia, e ácido úrico, quando comparou-se os dados obtidos dos animais do grupo controle, com aqueles dos diferentes grupos experimentais ($p>0,05$). Por outro lado, em relação aos níveis séricos

de proteínas totais, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis desta substância naqueles ratos tratados com as maiores doses do extrato (EF120, EF240). As análises estatísticas empregadas também mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de albumina dos ratos tratados com a dose intermediária (EF120) da *C. sylvestris*.

Em relação aos níveis de triglicérides, da creatinina e do cloreto, a avaliação estatística revelou haver diminuição significativa ($p < 0,05$) destes parâmetros, naqueles animais submetidos ao tratamento com EF120 e EF240 da planta quando comparado aos valores de creatinina e cloreto, obtidos dos animais do grupo controle.

O estudo histopatológico naqueles animais dos diferentes grupos, mostrou não haver nenhuma alteração em todos os órgãos coletados, em nenhum dos animais avaliados.

Figura 6 - Variação do peso dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

Figura 7 - Consumo de ração dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C. sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

Tabela 6 - Hemograma completo de ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

	Co	EF60	EF120	EF240
HCT (%)	41,0 $\pm$ 3,1	40,8 $\pm$ 2,7	40,5 $\pm$ 1,4	41,7 $\pm$ 3,0
HGB(g/dl)	14,4 $\pm$ 0,7	14,5 $\pm$ 0,6	14,3 $\pm$ 0,6	14,9 $\pm$ 0,5
RBC (10⁶/mm³)	8,3 $\pm$ 0,6	8,2 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,5
WBC(10³/mm³)	5,9 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 0,9	5,1 $\pm$ 1,0
PLT (10³/mm³)	648,1 $\pm$ 56,9	649,0 $\pm$ 64,6	637,9 $\pm$ 65,0	612,1 $\pm$ 77,7
MCV (fm³)	48,8 $\pm$ 3,5	50,0 $\pm$ 1,7	48,8 $\pm$ 1,5	48,8 $\pm$ 1,3
MCH (pg)	17,4 $\pm$ 0,8	17,8 $\pm$ 0,8	17,2 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,7
MCHC (g/dl)	34,8 $\pm$ 1,7	35,6 $\pm$ 1,6	35,4 $\pm$ 1,4	35,8 $\pm$ 1,9

HCT = hematócrito, HGB = hemácias, RBC = eritrócitos, WBC = leucócitos, PLT= plaquetas, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração da hemoglobina corpuscular

Figura 8 - Avaliação da celularidade do baço (A) e medula óssea (B) dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Tabela 7 - Peso relativo dos órgãos linfóides baço e timo (g/100g p.v) dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Orgãos	Co	EF60	EF120	EF 240
Baço	0,21 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02
Timo	0,08 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01

Tabela 8 - Avaliação do perfil bioquímico dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Parâmetros bioquímicos	Co	EF60	EF120	EF 240
AST (U/L)	205,0 $\pm$ 34,1	180,5 $\pm$ 22,9	183,3 $\pm$ 20,2	205,4 $\pm$ 40,7
ALT (U/L)	48,92 $\pm$ 5,4	49,92 $\pm$ 7,4	52,01 $\pm$ 9,7	64,22 $\pm$ 35,8
GGT (U/L)	0,06 $\pm$ 0,20	0,25 $\pm$ 0,33	0,19 $\pm$ 0,30	0,38 $\pm$ 0,45
ALP (U/L)	180,1 $\pm$ 36,7	186,4 $\pm$ 25,0	216,9 $\pm$ 66,1	190,3 $\pm$ 46,5
Proteína Total (g/dl)	5,98 $\pm$ 0,5	6,40 $\pm$ 0,4	7,21 $\pm$ 0,6*	6,94 $\pm$ 0,4*
Albumina (g/dl)	4,71 $\pm$ 0,38	4,78 $\pm$ 0,15	5,21 $\pm$ 0,29**	4,78 $\pm$ 0,21
Glicose (mg/dl)	124,8 $\pm$ 12,2	131,1 $\pm$ 12,8	129,8 $\pm$ 9,8	133,2 $\pm$ 11,8
Uréia (mg/dl)	50,70 $\pm$ 3,1	50,30 $\pm$ 5,0	51,10 $\pm$ 5,1	50,20 $\pm$ 5,8
Creatinina (mg/dl)	0,49 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,04**	0,40 $\pm$ 0,03**
Ácido úrico (mg/dl)	1,54 $\pm$ 0,37	1,82 $\pm$ 1,25	1,29 $\pm$ 0,43	1,56 $\pm$ 0,38
Colesterol total (mg/dl)	37,54 $\pm$ 2,7	39,25 $\pm$ 4,4	36,41 $\pm$ 5,5	36,74 $\pm$ 4,8
Triglicérides (mg/dl)	192,8 $\pm$ 62,0	185,7 $\pm$ 38,2	127,3 $\pm$ 45,6 *	124,5 $\pm$ 23,0*
Cloreto (meq/L)	128,2 $\pm$ 8,8	124,2 $\pm$ 7,3	111,0 $\pm$ 9,0*	98,60 $\pm$ 11,2*

ALT- alanina aminotransferase, AST- aspartato aminotransferase), ALP- fosfatase alcalina, GGT- gama glutamil transferase. * p<0.01 pós-teste Dunnett, ** p<0.05 pós-teste Dunn

4.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO (EF) DA *C. sylvestris*, ADMINISTRADO POR VIA ORAL, EM DOSES REPETIDAS DURANTE 90 DIAS, EM RATOS ADULTOS.

Foram utilizados 40 ratos adultos, machos. Estes animais foram separados em quatro grupos iguais, sendo um controle e três experimentais. Os animais pertencentes aos grupos experimentais receberam, durante 90 dias, cinco dias por semana, por via oral, através de gavagem, as diferentes doses do extrato fluido de guaçatonga: 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), enquanto que os ratos pertencentes ao grupo controle (Co) receberam água. Diariamente, foi realizada a avaliação clínica dos animais, conforme descrito no item 3.6.2. A cada oito dias, os animais foram pesados e tiveram o consumo médio de ração avaliado.

Ao final dos 90 dias de administração da planta, os ratos foram anestesiados para, em seguida, proceder-se à punção cardíaca para coleta de sangue, para a realização do hemograma e da análise bioquímica, conforme descrito no item 3.6.4. Posteriormente, naqueles animais pertencentes ao grupo que recebeu a maior dose do extrato da planta (EF240), realizou-se as coletas dos órgãos conforme descrito no item 3.6.6.

Além disso, procedeu-se à avaliação dos pesos relativos de timo e baço e celularidade de baço e medula óssea, seguindo-se procedimento conforme descrito no item 3.6.5. Neste experimento também foram avaliados os pesos relativos de fígado e rim destes animais.

4.4.1 Resultados

Durante a administração das diferentes concentrações do EF da planta repetidamente por 90 dias, não foram detectadas diferenças no ganho de peso ou do

consumo de ração, quando compararam-se os dados obtidos dos ratos do grupo controle com aqueles dos animais tratados com o EF da planta ($p>0,05$) - Figura 9.

Da mesma maneira, a análise estatística não detectou alterações significantes ($p>0,05$) no hemograma, celularidade do baço e da medula óssea, bem como no peso relativo dos órgãos linfóides (baço e timo), fígado e rins, quando se realizou a comparação entre os valores obtidos dos animais do grupo controle e aqueles dos ratos dos diferentes grupos experimentais (Tabela 9 e Figura 10).

Ainda, os testes estatísticos empregados também revelaram não haver diferenças significantes ($p>0,05$), entre os valores obtidos dos animais do grupo controle e experimentais, nos seguintes parâmetros bioquímicos: ALT, AST, FA e GGT, glicose, colesterol total, proteínas totais, albumina, triglicérides, uréia e ácido úrico. No entanto, esta mesma comparação estatística revelou haver diminuição significativa ($p<0,05$) dos níveis séricos de colesterol total naqueles ratos que receberam as maiores doses de EF da planta (EF120, EF240) e nos níveis séricos de creatinina nos animais tratados com EF240. A análise estatística revelou ainda o aumento dos níveis séricos de cloreto naqueles animais tratados com EF120 (Tabela 10).

O estudo histopatológico, dos animais dos diferentes grupos, mostrou não haver nenhuma alteração em todos os órgãos coletados.

Figura 9 - Ganho total de peso (A) e consumo diário médio de ração (B) dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 90 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Tabela 9 - Hemograma completo dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 90 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média±desvio-padrão (n=10)

	Co	EF60	EF120	EF240
HCT (%)	36,7 ± 2,9	36,8 ± 1,6	37,5 ± 3,7	36,4 ± 6,3
HGB(g/dl)	13,9 ± 0,9	14,1 ± 0,5	14,1 ± 1,2	14,0 ± 2,0
RBC (10⁶/mm³)	6,4 ± 0,5	6,4 ± 0,3	6,4 ± 0,7	6,3 ± 1,1
WBC (10³/mm³)	3,8 ± 1,3	4,0 ± 1,2	3,9 ± 0,9	4,0 ± 0,8
PLT10³/mm³)	617,4 ± 87,5	638,8 ± 69,2	600,6 ± 223,5	565,4 ± 167,0
MCV (fm³)	57,6 ± 0,7	57,9 ± 1,1	56,4 ± 1,0	57,8 ± 1,2
MCH (pg)	21,9 ± 0,5	22,1 ± 0,6	21,3 ± 1,2	22,4 ± 1,5
MCHC (g/dl)	38,1 ± 0,9	38,4 ± 0,7	37,8 ± 2,0	38,7 ± 2,3

HCT = hematócrito, HGB = hemácias, RBC = eritrócitos, WBC = leucócitos, PLT= plaquetas, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração da hemoglobina corpuscular

Figura 10 - Avaliação da celularidades do baço (A) e medula óssea (B) e pesos relativos dos órgãos linfóides, baço(C) e timo (D), e fígado (E) e rim (F) (g/100g peso vivo) de ratos dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 90 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Tabela 10 - Bioquímica sérica de dos ratos adultos, tratados por via oral, através de gavage, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 90 dias. Foram utilizados 10 animais por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Parâmetros bioquímicos	Co	EF60	EF120	EF 240
AST (U/L)	115,2 $\pm$ 51,2	121,7 $\pm$ 28,2	108,0 $\pm$ 21,7	116,5 $\pm$ 23,9
ALT (U/L)	55,5 $\pm$ 21,3	45,3 $\pm$ 6,3	42,9 $\pm$ 4,1	49,3 $\pm$ 8,9
GGT (U/L)	0,7 $\pm$ 0,82	0,4 $\pm$ 0,52	0,5 $\pm$ 0,53	0,2 $\pm$ 0,42
ALP (U/L)	87,7 $\pm$ 14,4	83,2 $\pm$ 8,4	99,5 $\pm$ 26,1	89,8 $\pm$ 11,9
Proteína Total (g/dl)	7,97 $\pm$ 0,52	8,06 $\pm$ 0,40	7,91 $\pm$ 0,22	8,04 $\pm$ 0,18
Albumina (g/dl)	5,34 $\pm$ 0,54	5,80 $\pm$ 0,83	5,50 $\pm$ 0,70	5,26 $\pm$ 0,38
Glicose (mg/dl)	242,5 $\pm$ 20,5	224,4 $\pm$ 21,5	229,8 $\pm$ 11,2	241,6 $\pm$ 14,2
Uréia (mg/dl)	77,7 $\pm$ 8,1	76,0 $\pm$ 7,9	79,1 $\pm$ 7,8	77,0 $\pm$ 6,0
Creatinina (mg/dl)	1,29 $\pm$ 0,21	1,21 $\pm$ 0,09	1,19 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,04 **
Ácido úrico (mg/dl)	1,87 $\pm$ 0,63	1,88 $\pm$ 0,54	2,10 $\pm$ 0,98	2,05 $\pm$ 0,53
Colesterol total (mg/dl)	44,63 $\pm$ 4,1	44,14 $\pm$ 4,8	33,75 $\pm$ 3,9*	35,67 $\pm$ 3,0*
Triglicérides (mg/dl)	241,6 $\pm$ 52,3	255,9 $\pm$ 110,4	265,7 $\pm$ 80,2	245,1 $\pm$ 49,9
Cloreto (meq/L)	142,0 $\pm$ 16,0	143,6 $\pm$ 13,2	166,6 $\pm$ 21,1*	154,2 $\pm$ 14,2

ALT- alanina aminotransferase, AST- aspartato aminotransferase), ALP- fosfatase alcalina, GGT- gama glutamil transferase * p<0.01 pós-teste Dunnett; ** p<0.05 pós-teste Dunn

4.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO (EF) DA *C.sylvestris*, ADMINISTRADO POR VIA ORAL, DURANTE 28 DIAS, EM RATOS JOVENS.

Foram utilizados 24 ratos jovens, 12 machos e 12 fêmeas, com 30 dias de idade, separados em 4 grupos iguais contendo três machos e três fêmeas em cada. Os animais pertencentes aos grupos experimentais receberam, durante 28 dias, diariamente, por via oral, através de gavagem, as diferentes doses do extrato fluido de guaçatonga: 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), enquanto que os ratos pertencentes ao grupo controle (Co) receberam água. Diariamente, foi realizada a avaliação clínica dos animais, conforme descrito no item 3.6.2.e a cada oito dias, os animais foram pesados.

Ao final dos 28 dias de administração da planta, os ratos foram anestesiados com xilazina e quetamina para, em seguida, proceder-se à punção cardíaca para coleta de sangue, para a realização do hemograma e da análise bioquímica, conforme descrito no item 3.6.4. Posteriormente, naqueles animais pertencentes ao grupo que recebeu a maior dose do extrato da planta (EF240), realizou-se as coletas dos órgãos conforme descrito no item 3.6.6.

Além disso, procedeu-se à avaliação dos pesos relativos de timo, baço, fígado e rim destes animais.

4.5.1 Resultados

A figura 11 mostra os efeitos do tratamento com o EF da *C. sylvestris*, em ratos jovens, machos e fêmeas, por 28 dias. Assim, verifica-se que a administração da planta não alterou o ganho de peso de ambos os sexos. Da mesma maneira, a análise estatística não detectou diferenças significantes no hemograma e no peso relativo dos órgãos linfóides (baço e timo), fígado e rim, quando se realizou a comparação entre os

valores obtidos dos animais do grupo controle e aqueles dos ratos dos diferentes grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabelas 11 e 12).

Além disso, a comparação dos valores bioquímicos de ALT e ALP, glicose, proteínas totais, albumina, colesterol total, triglicérides, uréia, creatinina e cloreto, obtidos dos animais do grupo controle e aqueles dos ratos dos diferentes grupos experimentais também revelaram não haver diferenças significantes ($p>0,05$). Por outro lado, esta mesma análise estatística empregada revelou diferença significativa ($p< 0,05$) entre o valor de AST obtido dos animais do grupo tratado com a maior dose da planta e aquele de ratos do grupo controle (Tabela 13) .

Figura 11 - Ganho total de peso dos ratos jovens, machos e fêmeas, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

Tabela 11 - Hemograma completo dos ratos jovens, machos e fêmeas, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

	Co	EF60	EF120	EF240
HCT (%)	44,0 $\pm$ 0,9	45,0 $\pm$ 1,7	43,1 $\pm$ 1,7	44,1 $\pm$ 3,3
HGB(g/dl)	14,1 $\pm$ 0,3	14,3 $\pm$ 0,3	14,3 $\pm$ 0,4	14,3 $\pm$ 0,9
RBC (10⁶/mm³)	7,4 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,7
WBC (10³/mm³)	5,8 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 1,1	5,8 $\pm$ 1,7
PLT (10³/mm³)	600,5 $\pm$ 27,0	618,0 $\pm$ 64,8	562,0 $\pm$ 43,7	561,8 $\pm$ 70,9
MCV (fm³)	58,8 $\pm$ 0,6	58,4 $\pm$ 0,9	58,4 $\pm$ 0,7	57,5 $\pm$ 1,3
MCH (pg)	18,8 $\pm$ 0,1	18,6 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,4	18,6 $\pm$ 0,6
MCHC (g/dl)	32,0 $\pm$ 0,3	31,9 $\pm$ 0,7	32,9 $\pm$ 0,5	32,4 $\pm$ 0,8

HCT = hematócrito, HGB = hemácias, RBC = eritrócitos, WBC = leucócitos, PLT= plaquetas, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração da hemoglobina corpuscular

Tabela 12 - Peso relativo dos órgãos baço, timo, fígado e rim (g/100g p.v) dos ratos jovens, machos e fêmeas, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

Orgãos	Co	EF60	EF120	EF 240
Baço	0,26 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,10
Timo	0,25 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,07
Fígado	4,74 $\pm$ 0,50	4,83 $\pm$ 0,32	4,70 $\pm$ 0,41	4,82 $\pm$ 1,6
Rim	0,43 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,16

Tabela 13 - Avaliação do perfil bioquímico dos ratos jovens, machos e fêmeas, tratados por via oral, através de gavagem, com as diferentes doses do extrato fluido (EF) da *C.sylvestris*: 0 (Co), 60mg/kg (EF60), 120mg/kg (EF120) e 240 mg/kg (EF240), diariamente por 28 dias. Foram utilizados 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

Parâmetros bioquímicos	Co	EF60	EF120	EF 240
AST (U/L)	89,7 $\pm$ 15,0	102,8 $\pm$ 11,9	120,0 $\pm$ 37,7	136,2 $\pm$ 25,8*
ALT (U/L)	29,3 $\pm$ 5,2	31,0 $\pm$ 7,3	37,6 $\pm$ 6,8	32,3 $\pm$ 6,4
ALP (U/L)	195,8 $\pm$ 71,7	211,2 $\pm$ 56,8	238,2 $\pm$ 55,7	263,8 $\pm$ 73,1
Proteína Total (g/dl)	9,90 $\pm$ 0,20	5,51 $\pm$ 0,21	5,60 $\pm$ 0,21	5,68 $\pm$ 0,21
Albumina (g/dl)	2,7 $\pm$ 0,25	2,7 $\pm$ 0,12	2,7 $\pm$ 0,12	2,8 $\pm$ 0,20
Glicose (mg/dl)	254,8 $\pm$ 49,4	251,2 $\pm$ 26,6	270,2 $\pm$ 90,7	241,8 $\pm$ 68,4
Uréia (mg/dl)	44,2 $\pm$ 6,6	47,0 $\pm$ 4,3	48,7 $\pm$ 4,5	48,5 $\pm$ 4,3
Creatinina (mg/dl)	0,94 $\pm$ 0,067	0,90 $\pm$ 0,045	0,94 $\pm$ 0,105	0,90 $\pm$ 0,070
Colesterol total (mg/dl)	55,83 $\pm$ 6,08	61,67 $\pm$ 10,01	63,17 $\pm$ 14,13	52,17 $\pm$ 6,24
Triglicérides (mg/dl)	251,8 $\pm$ 110,3	187,8 $\pm$ 86,4	222,2 $\pm$ 151,9	262,2 $\pm$ 82,5
Cloreto (meq/L)	129,5 $\pm$ 10,8	124,3 $\pm$ 4,2	128,3 $\pm$ 9,5	131,2 $\pm$ 9,9

ALT- alanina aminotransferase, AST- aspartato aminotransferase), ALP- fosfatase alcalina, GGT- gama glutamil transferase * $p < 0.05$ pós-teste Dunnett's.

5. *DISCUSSÃO*

5 DISCUSSÃO

Há muito tempo as plantas vem sendo utilizadas pela humanidade para cura de seus males; portanto, a grande maioria da população imagina que as plantas medicinais, de uso tradicional, já foram testadas e homologadas, justamente pelo seu uso prolongado na própria espécie humana. Assim, crê-se que tais vegetais seriam remédios seguros e eficazes, naturalmente balanceados e isentos de efeitos colaterais, comuns aos produtos sintéticos, não necessitando de avaliação de segurança. Porém, essas plantas medicinais podem encerrar substâncias consideradas xenobióticos, isto é, são compostos químicos estranhos ao organismo, podendo ser potencialmente tóxicos (LAPA et al, 2007).

Desta forma, nesta pesquisa, propôs-se verificar se a planta medicinal *C. sylvestris* poderia produzir efeitos tóxicos, quando de sua administração prolongada. Esta planta é popularmente utilizada em nosso país, no tratamento de diversas afecções, como queimaduras, ferimentos, herpes labial e genital, cicatrizante, tônica, depurativa, anti-reumática, antiinflamatória, antiofídica, antidiarréica, sendo ainda empregada no tratamento de males do trato gastrointestinal, como gastrites, úlceras, gengivites, aftas, halitose, entre outras (LORENZI; MATOS, 2002). A *C. sylvestris* é catalogada como planta medicinal de interesse do SUS, portanto, a avaliação de sua possível toxicidade se reveste de importância maior, haja vista que a mesma vem sendo amplamente utilizada pela população. Além disto, esta pesquisa dá início ao estabelecimento de protocolos para avaliação de toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos, neste laboratório.

Segundo Lapa et al. (2007), o estudo de um novo medicamento fitoterápico deve seguir fases importantes para assegurar sua utilização de forma racional, sendo estas classificadas em: etapa botânica, farmacêutica e ensaios biológicos pré-clínicos, realizados em animais de laboratório. Assim, para avaliar a segurança do extrato fluido de *C. sylvestris*, extraído conforme proposto pela Farmacopéia Brasileira, foram realizados os testes para a avaliação da citotoxicidade, com o objetivo de analisar o

potencial tóxico das diferentes formas de extração da planta, e os estudos pré-clínicos de toxicidade oral aguda, e em doses repetidas por 28 e 90 dias, realizados de acordo com as propostas preconizadas para avaliação de risco para substâncias químicas, pela agência reguladora nacional, a ANVISA, e internacionais, seguindo-se aqueles protocolos propostos pela OECD.

A etapa botânica foi realizada com a identificação da espécie de *C. sylvestris*, coletada no campus da Universidade de São Paulo, por especialistas do herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, o que garantiu que a identificação correta do material de estudo.

A etapa farmacêutica, a qual compreende a seleção da forma de preparo da amostra, foi avaliada pelo teste de citotoxicidade. Em relação ao controle de qualidade, de uniformidade e de estabilidade da amostra, ensaios também pertencentes a esta etapa, realizou-se a análise por CLAE/UV que forneceu um padrão ou perfil cromatográfico do EF de *C. sylvestris*.

Segundo Schenkel; Gosmann e Petrovick, (2007) embora a matéria-prima vegetal possa ser mesma, os produtos obtidos possuem qualidades e propriedades diferentes. Como exemplo, estes mesmos autores citam que os produtos farmacêuticos de *Ginkgo biloba*, os quais estão presentes em várias formas diferentes no mercado - cápsulas de gelatina dura contendo pó das folhas, extratos secos obtido com soluções etanólicas e extrato secos concentrados e purificados observou as seguintes diferenças: os extratos secos são passíveis de padronização, já na forma de pó das folhas, a composição é variável dependendo do período e condições de coleta, do clima, da idade das folhas, entre outros; somente para os extratos secos há estudos farmacológicos; a dose efetiva diária para o extrato é menor que para o pó das folhas; o extrato especial purificado, contém no máximo 5ppm de ácidos gincólicos, substâncias responsáveis pelo efeitos alergênicos, enquanto o extrato seco simples e o pó das folhas ultrapassam muito esta concentração, levando ao aumento da toxicidade.

De fato, o estudo aqui realizado mostrou que diferentes formas de extração da planta, representada pelos extratos EE, TI, CHA e EF, por meio do estudo *in vitro*

(citotoxicidade), mostrou que as mudanças no tipo de solvente e do método de extração podem influenciar ativamente no potencial tóxico. Isso ocorre porque as diferentes condições de extração alteram a concentração das substâncias ativas e por consequência, o efeito, a eficácia e a toxicidade de um medicamento fitoterápico (CARVALHO, 2005). Assim, este dado aqui obtido corrobora outros estudos, mostrando que a avaliação toxicológica das diferentes formas farmacêutica e de seus constituintes químicos, quando se trata de produtos fitoterápicos, deve ser realizada individualmente para o estudo de avaliação de risco destes produtos.

A obtenção do padrão cromatográfico do extrato fluido (EF) de *C. sylvestris* pela análise cromatográfica por CLAE-UV, forneceu dados que identificam os constituintes presentes na planta (Tempo de retenção, detecção na região do UV, concentração relativa dos constituintes químicos em %), que podem garantir a qualidade, a uniformidade e estabilidade do extrato. Por meio desta metodologia, este padrão cromatográfico obtido, poderá ser comparado e assim ajudar na identificação de amostras autênticas auxiliando na identificação de possíveis compostos utilizados em uma adulteração do extrato, segundo Liang; Xie e Chan (2004). De fato, a técnica de cromatografia, está cada vez mais sendo utilizada pela comunidade científica, especialmente por demonstrar a característica sistêmica dos componentes da amostra focando na identificação e estabilidade dos constituintes químicos observados. Sendo assim, esta técnica foi introduzida e aceita pela OMS, como estratégia para avaliação de plantas medicinais, sendo exigida para padronização de ervas medicinais chinesas e suas matérias-primas pelo *Drug Administration Bureau of China* (DABC), assim como é recomendada por outras entidades regulatórias como Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e a European Agency for Evaluation of Medicinal Products (EMA) e também pela ANVISA no Brasil (ANVISA, [(2003 - ?)]; ALAERTS et al., 2007).

A avaliação pré-clínica, realizada em ratos *Wistar*, foi realizada primeiramente pelo estudo da toxicidade oral aguda, seguindo-se protocolo 423 proposto pela OECD (2001b), no qual administra-se uma dose única da planta num período de 24 horas e avalia-se a mortalidade e efeitos tóxicos sistêmicos nos animais tratados com a planta

por 14 dias. Nesta avaliação pode-se observar que a administração da planta, em dose única de 2000mg/kg, não provocou nenhuma morte, nem foi verificado sinais de toxicidade sistêmica, bem como não provocou alterações macroscópicas ou histopatológicas nos órgãos rim e fígado. Assim, com os resultados aqui obtidos, pode-se classificar o EF de *C. sylvestris* na categoria 5 do sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS)(ABIQUIM, 2005). Desta maneira, por meio do GHS, substâncias que apresentam dose letal 50% (DL50 - ou seja, a quantidade de ingrediente ativo de uma substância tóxica necessária para matar 50% de animais testados) entre 2000 até, no máximo, 5000mg/kg/ peso vivo, são consideradas com baixa toxicidade aguda e, portanto, ausência de perigo. Esse estudo confirmou a baixa toxicidade da *C. sylvestris*, a qual já havia sido descrita por Basile et al.(1990), os quais verificaram que a amostra da planta avaliada apresentava DL50 > 1840mg/kg.

A avaliação da toxicidade da administração contínua da planta foi realizada por meio dos estudos em doses repetidas, por 28 e 90 dias, preconizados pela OECD. Estes estudos tem por objetivo obter informações sobre a identificação de órgãos alvos, os efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomopatológicas e histopatológicas (CAMPOS; AMARAL, 2009). Assim, nesta pesquisa, administrou-se, por via oral, nos ratos, o EF de *C. sylvestris* nestes dois períodos de tempo. Além disto, propõe-se aqui verificar se o fator idade poderia interferir com a toxicidade da planta, uma vez que já é bem estabelecido que tanto a gravidade do efeito tóxico, bem com muitas vezes o seu aparecimento está vinculado a este fator; de fato, Wang et al.(2011), avaliando a toxicidade da planta ruibarbo (*Rheum tanguticum* var *tanguticum*; *Rheum palmatum* L.), em ratos, verificou que ratos jovens eram menos sensíveis a toxicidade produzida pela administração da planta via oral por 5 semanas, que os animais adultos, sendo observado neste experimento diferenças do ganho ou perda de peso, na bioquímica sérica e lesões hepáticas e renais relacionados ao tratamento mais severas no animais adultos do que nos animais jovens. Neste sentido, Florio (2011), propõe que dentre os diversos fatores que podem alterar o efeito tóxico de uma

substância destaca-se a idade; assim, indivíduos muito jovens e aqueles idosos podem não ter todas as enzimas necessárias para realizar a biotransformação hepática, a qual consiste na transformação de substâncias para favorecer sua eliminação ou sua inativação, resultando no aumento da toxicidade do agente tóxico. Além disso, os animais jovens apresentam maior quantidade de ácidos graxos no sangue, os quais competem pela ligação as proteínas plasmáticas, podendo ocasionar um aumento da toxicidade, pois quando duas substâncias competem com o mesmo sítio de ligação com estas proteínas, uma tende a ser deslocada para a forma livre.

Os resultados da administração prolongada do EF da *C. sylvestris* mostraram que não houve efeitos de toxicidade sistêmica, a saber: redução no consumo de ração, alterações de comportamento, apatia, alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sangüíneas naqueles animais tratados com o EF da planta, nas diferentes doses empregadas, e nos dois períodos de administração propostos (28 e 90 dias). Além disto, verificou-se que a idade dos animais também não foi um fator que interferiu no efeito tóxico da planta. Por outro lado, a avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de proteína e albumina, bem como diminuição de creatinina, triglicérides e colesterol total, hipocloremia ou hiperclorémia, naqueles animais tratados com as maiores doses da planta. Tais resultados permitiria inferir que a planta poderia promover, por exemplo, alterações no metabolismo da proteína e da gordura, bem como alguma disfunção renal.

No entanto, deve-se considerar que as alterações estatísticas, aumento ou diminuição significativa, podem não ter significado biológico. De fato, Campos e Amaral (2009) enfatizam que nestes estudos de toxicidade, conduzidos com animais, quando um grande número de parâmetros biológicos são avaliados, é inevitável que alguns apresentem significância estatística sem possuir relevância biológica, ou seja, tais resultados podem ser “falsos-positivos”; assim deve-se avaliar se esse efeito estatisticamente significativo é real e ainda se constitui ou não a um efeito adverso.

Para o reconhecimento e a diferenciação de efeitos adversos de efeitos não-adversos o *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* (ECETOC) propõe que a interpretação dos estudos sejam estabelecidos tomando-se como base algumas definições preestabelecidas como o *no observed effect level* (dose sem efeito observado - NOAEL) e *lowest-observed-adverse-effect-level* (menor dose com efeito adverso observado - LOAEL). O NOAEL é a maior dose na qual não promove aumento significativo na frequência ou severidade do efeito adverso entre a população exposta a substância-teste e o controle apropriado, e o LOAEL constitui a menor dose na qual houve aumento estatístico ou biologicamente significativo, na frequência ou severidade do efeito adverso, entre a população exposta a substância-teste e o controle apropriado. Ainda, o efeito adverso, definido pelo ECETOC, constitui uma alteração bioquímica, morfológica ou fisiológica (em resposta a um estímulo) que, isoladamente ou em combinação, afeta adversamente o desempenho do organismo ou reduz a capacidade deste em responder a um desafio ambiental adicional e os efeitos não-adversos são efeitos biológicos que não promovem alterações bioquímicas, morfológicas ou fisiológicas, que afetem o bem estar geral, o crescimento, o desenvolvimento ou o tempo de vida do animal. Assim, é considerado efeito biologicamente significativo, somente aqueles nos quais tem efeitos dignos de nota no bem estar do sistema biológico dos animais (ECETOC, 2002; CAMPOS; AMARAL, 2009).

Ainda, seguindo as recomendações do ECETOC, a interpretação dos resultados deve ser realizada de acordo com as seguintes questões: há diferença significativa, nos parâmetros avaliados, dos animais tratados em relação aos do grupo controle?; existe diferença entre as respostas dos animais à substância-teste relacionada ao tratamento?; o efeito observado é considerado adverso?.

Deve-se considerar alguns fatores para diferenciar efeitos incidentais daqueles considerados adversos como: relação dose-resposta, neste sentido, é menos provável que um efeito seja relacionado ao tratamento quando este não apresentar clara relação dose-resposta. É necessário verificar também se a diferença nos parâmetros avaliados

foram observadas somente em um ou alguns animais considerados *outliers*⁴; também, deve-se incluir como efeito incidental quando houver ausência de plausibilidade biológica, por exemplo, inconsistência dos efeitos observados; ainda, um ponto fundamental, se refere ao fato de que se a variação, mesmo que estatisticamente diferente, se dentro dos valores de referência dos parâmetros para aquela espécie animal, não pode ser considerado como efeito do tratamento.

Portanto, para responder se o efeito está relacionado ao tratamento, deve ser avaliado se existe alguma alteração no organismo ou nos órgãos e tecidos afetados, se o efeito não constitui uma resposta adaptativa ou transitória, se o efeito é isolado ou independente, ou seja, se apresenta ou não correlação com outros efeitos, se o efeito é precursor e as alterações causadas progredirão para um efeito adverso ou ainda se as alterações não foram conseqüências do modelo experimental empregado (ECETOC, 2002).

Diante do exposto, os dados aqui obtidos, provenientes do estudo bioquímico permitem propor que, apesar de alguns parâmetros avaliados apresentarem significância estatística, estes não possuem relevância biológica, ou seja, não foram considerados efeitos adversos por não haver dados clínicos que corroborem estes resultados; além disto, não houve relação dose-resposta, e, ainda, a consulta dos parâmetros bioquímicos de referência para ratos *Wistar*, mostraram que os valores aqui obtidos, encontram-se dentro das variações fisiológicas normais para esta espécie (HARKNESS; VAGNER, 1993; SHARP; LA REGINA, 1998; QUESENBERRY; CARPENTER, 2003; SANTOS, M., 2010). Acrescente-se também que não foram observadas alterações histológicas nos órgãos, rins e fígado, os quais estariam relacionados a estas alterações bioquímicas. Finalmente, deve-se considerar que os animais tratados com ⁵as diferentes doses do EF da planta não apresentaram qualquer

⁴ *outliers*: é uma observação que é numericamente distante das demais. Estatísticas geradas a partir de *outliers* podem ser incorretas. A presença de *outliers* pode indicar que alguns dados pertençam a outra população diferente do resto dos dados amostrados (MORETTIN; BUSSAB, 2002).

sinal de toxicidade sistêmica nem tampouco foram afetados no bem estar geral, no crescimento ou no seu desenvolvimento normal.

Dado interessante foi aquele relativo à diminuição dos níveis de triglicérides naqueles animais adultos tratados com a duas maiores doses da planta durante 28 dias. Dado semelhante foi encontrado na pesquisa conduzida por Werle, et al. (2009) os quais mostraram que a administração do extrato hidroalcoólico de *C. sylvestris*, em ratos, na dose 500mg/kg , administrados por via oral, por 28 dias, promoveu diminuição dos níveis de triglicérides sanguíneos, ao redor de 5%, quando comparados aos animais controles; portanto, estes autores sugeriram que esta planta poderia ser utilizada para o controle dos níveis de triglicérides. No entanto, mais estudos deverão ser realizados, empregando-se metodologias específicas e controles positivos para determinação de efeito hipotriglicemiante, para poder-se melhor avaliar tal propriedade da *C. sylvestris*.

A imunotoxicologia é uma ciência recente, surgida nos anos de 1960 com a introdução maciça de medicamentos como os quimioterápicos para o tratamento de cânceres e fármacos de potente ação imunossupressora, empregados em transplantados renais, cujos efeitos adversos observados causaram grande preocupação dos profissionais de saúde, pois tais efeitos resultavam em maior suscetibilidade a processos infecciosos por patógenos oportunistas, maior ocorrência de linfomas e, também aumento acentuado da frequência de neoplasias sólidas induzidas por vírus nestes pacientes (HUEZA ; PALERMO-NETO, 2006).

Desde então, vários estudos nessa área passaram a focalizar a ação de outras substâncias as quais os seres humanos estavam expostos, como aqueles realizados por Selye et al., (1966), os quais observaram a maior suscetibilidade de ratos a endotoxinas de bactérias gram-negativas após uma única injeção de acetato de chumbo, ou após a exposição ao acetato de cádmio (Cook et al., 1974), entre muitos outros realizados com diferentes compostos, como bifenis policlorados, o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), praguicidas, entre outros.

Os resultados obtidos nestes estudos levaram várias agências internacionais de normatização, como: *the U.S. Environmental Protection Agency* (USEPA), *the U.S. Food and Drug Administration* (US-FDA), bem como a OECD a incorporarem em seus estudos de risco toxicológico de xenobióticos de interesse humano, ensaios de imunotoxicidade (Luster et al., 1988, 1992, 2003).

Assim, nestas avaliações de doses repetidas com o extrato fluido da *C. sylvestris*, procurou-se avaliar o sistema imunológico, empregando-se para tal a análise de alteração do peso relativo, da celularidade e da histologia dos órgãos linfóides. Os órgãos freqüentemente utilizados para esta avaliação são o timo, o qual participa do desenvolvimento do sistema imune (maturação dos linfócitos), o baço e os linfonodos, onde ocorre a diferenciação e proliferação celular dos linfócitos e também a resposta frente aos antígenos (LATORRE, 2006). A medula óssea também é avaliada, por ser um importante órgão hematopoiético e fonte de vários precursores dos linfócitos e leucócitos e alterações das populações celulares servem, portanto como bom indicador do potencial imunotóxico (WHO, 2006). Os resultados não indicaram nenhuma alteração nos animais tratados em relação aos do grupo controle, o que permitiu sugerir que o EF da *C. sylvestris* não causa efeitos tóxicos no sistema imune, mesmo em doses maiores que a terapêutica.

Finalizando, com os dados obtidos nestes estudos, permitem sugerir que o EF da *C. sylvestris* é seguro, mesmo quando utilizado prolongadamente. No entanto, outros estudos, como por exemplo, de avaliação da genotoxicidade e de carcinogenicidade, devem ser realizados para complementar esta etapa de avaliação pré-clínica.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A avaliação dos quatro diferentes extratos brutos da *C. sylvestris* - extrato fluido (EF), tintura (TI), extrato aquoso (CHÁ) e extrato etanólico (EE), mostrou que o EF é o extrato com menor potencial citotóxico.
- O tratamento com o EF de *C. sylvestris* não provocou nenhum sinal de toxicidade no estudo de toxicidade oral aguda ou nos estudos com doses repetidas, tanto por 28 quanto por 90 dias. Também, não foram detectadas diferenças na toxicidade da planta, considerando-se a idade dos animais.
- O tratamento com o EF da *C. sylvestris*, com as doses aqui empregadas, não provocou efeitos imunotóxicos.
- O padrão ou perfil cromatográfico do EF de *C. sylvestris*, por CLAE-UV permitiu detectar 11 componentes majoritários ou substâncias diferentes (concentração na amostra acima de 1,33%) nesse extrato. A padronização do EF nestas condições de análise é uma garantia da qualidade e da estabilidade do mesmo para futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- ABIQUIM. Associação Brasileira da Indústria Química. Departamento de Assuntos Técnicos. **O que é o GHS?** Sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos. São Paulo: ABIQUIM/DETEC, 2005. 69p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_manual_ghs.pdf. Acesso em 02 junho 2011.
- ABSY, M. L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, p. 641-676, 1973.
- ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER-HEYDEN, T. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**. v. 1772, n. 1, p. 1-8, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações sobre controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos**. [2003-?]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf. Acesso em: 1 maio 2011.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Notícias da ANVISA: Medicamentos fi**. 2008. Disponível lista de fitoterápicos com registro simplificado. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>. Acesso em: 3 maio de 2011.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004. 2004 a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf. Acesso em: 3 maio de 2011.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 88, de 16 de março de 2004. 2004 b. Determina a publicação da “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”. Disponível em: <http://elegis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 5 mar. 2011.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 89, de 16 de março de 2004. 2004 c. Determina a publicação da “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 5 mar. 2011.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 90, de 16 de março de 2004. 2004 d. Determina a publicação da “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 5 mar. 2011.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 91, de 16 de março de 2004. 2004 e. Determina a publicação da “Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 5 mar. 2011.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 10, DE 9 MARÇO DE 2010. 2010. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao10_09_03_10.pdf. Acesso em: 02 mar.2011.

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; PANNIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127B, p. 21-30, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p (Série B. Textos Básicos de Saúde).

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2000, v. 33, p. 179-189.

CAMARGO, F. G.; PEREIRA, J. A.; BUENO, V. S.; GOMES, E.; ANDO, T. Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo – Parte II – Estudo histológico. **LECTA**, v. 14, n. 1, p. 61-86, 1996.

CAMPOS, S. V.; AMARAL, L. M. S. Toxicidade sobreaguda e subcrônica. In: CORRÊA, C. L.; LEMONICA, I. P.; ZAMBRONE, F. A. D.; CAMARGO, J. L. V. **Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSI-Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, 2009, cap. 4, p.95-130.

CARVALHO, J.T.C. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmmed, 2004.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V, Número 11, 2007.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.

CORRÊA, C. L.; BOFF, M. M. Toxicidade Aguda. In: CORRÊA, C. L.; LEMONICA, I. P.; ZAMBRONE, F. A. D.; CAMARGO, J. L. V. **Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSI- Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, 2009, cap. 3, p.43-91.

CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Introdução. In: CORRÊA, C. L.; LEMONICA, I. P.; ZAMBRONE, F. A. D.; CAMARGO, J. L. V. **Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSI- Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, 2009, cap.1, p. 15-23.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 169-170.

COOK, J.A., MARCONI, E.A., DI LUZIO, N.R. Lead, cadmium, endotoxin interaction: effect on mortality and hepatic function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 28, p. 292-302, 1974.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura: IBDF, 1975. p. 514-516.

CHITLANGE S. S.; BHUJBAL S. S.; KULKARNI.A. A. ; IMRAN M. ; KULKARNI S. P. Chromatographic Fingerprint Analysis for Herbal Medicines : A Quality Control Tool. v.6, n. 2, **Pharmaceutical Reviews**, 2008. Disponível em: <http://www.pharmainfo.net/reviews/chromatographic-fingerprint-analysis-herbal-medicines-quality-control-tool>. Acesso :30 maio 2011.

ECETOC. EUROPEAN CENTRE FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICALS **Recognition of, and differentiation between, adverse and non-adverse effects in toxicology studies**. Technical report 85. Brussels, Belgium, 2002. Disponível em: [http:// www. ecetoc.org/publications](http://www.ecetoc.org/publications). Acesso em : 11 maio 2011.

FAPESP.FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (Brasil). J. A. A. SERTIÉ; R. G. WOISKY; A. J. CAVALHEIRO; V. S. BOLZANI; A. G. SANTOS; A. G. TININIS. **Processo de obtenção de extratos de Casearia sylvestris, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrointestinais, medicamento e princípio ativo**. PI 0306167-1, 18 dez. 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 1.ed.,1926. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/farmacopeia.htm>. Acesso em: 5 maio de 2011.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2.ed.,1959. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/farmacopeia.htm>. Acesso em: 5 maio de 2011.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

GONZÁLEZ, F. H. D., SILVA S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, pp.179-198, 2003.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3.ed, São Paulo: Roca, 1993.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. **O Jardim Botânico de São Paulo**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, 1941.

ICCVAM. INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS **In vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing**. NIH Publication No. 07-4519. 2006.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L. F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H; BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP, UNICAMP: 2006, cap. XI, p. 273- 398,

QUESENBERRY, K. E.; CARPENTER, J. W. **Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery: includes sugar glides and hedgehogs**. 2 ed., St Louis: Saunders, 2004, cap. 28.

LAPA, A, J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. cap. 11, p. 247- 262.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA V. G. M.; GUI MI KO. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

LATORRE, A. O. **Avaliação dos efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum*. Estudo em camundongos**. 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LIANG, Y. Z.; XIEP, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**. v.812, p. 53-70, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 220-221.

LUSTER, M.I., MUNSON, A.E., THOMAS, P.T., HOLSAPPLE, M.P., FENTERS, J.D., WHITE JR., K.L., LAUER, L.D., DEAN, J.H. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National toxicology program's guidelines

for immunotoxicity evaluation in mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 10 p. 2-19, 1988.

LUSTER, M.I., PORTIER, C., PAIT, D.G., WHITE JR., K.L., GENNINGS, C., MUNSON, A.E., ROSENTHAL, G.J. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.18, p. 200-210, 1992.

LUSTER, M.I., DEAN, J.H., GERMOLÉ, D.R. Consensus workshop on methods to evaluate developmental immunotoxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 579-583, 2003.

MARQUES, L. C. O mercado de produtos fitoterápicos. **Fármacos e Medicamentos**, v.04, p. 43-46. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **O que é RENISUS?** 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780. Acesso em: 1 maio 2011.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

NETTO E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C.B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Rev Fitos**. v.1,n.3,p. 9-17, 2006.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J.G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. B. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. *Visão Acadêmica*, v. 7, n. 2 , 2006. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/academica/article/view/9042>. Acesso em: 1maio de 2011.

OLIVEIRA, M . Fitoterapia e biodiversidade no brasil: saúde, cultura e sustentabilidade. **Revista Idea Ambientales**. nº 2, 2005. Disponível em: http://www.manizales.unal.edu.co/modules/unrev_ideasAmb/index.php?mod=revista_s. Acesso em: 1maio de 2011.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**. Paris: OECD, 2001a, Guideline 420.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, 2001b, Guideline 423.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. Paris: OECD, 2008a, Guideline 425.

OECD ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals:** Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. 2008b. Guideline 407. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en;jsessionid=cr1l8e7p7tr9.epsilon. Acesso em: 13 maio de 2011.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals:** Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. 1998. Guideline 408. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en;jsessionid=cr1l8e7p7tr9.epsilon. Acesso em: 13 maio de 2011.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C. M. V.; ANDRÉO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; SILVA, M. G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from Bothrops jararacussu snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venoms Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 465-478, 2005.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**. 3. ed. São Paulo: IBRASA, 1998.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina popular III. Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 4, p. 85-86, 1992.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bolletín Chimie et Pharmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 4 mar 2010.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. I – Atividades analgésica e antiinflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 3, p. 54-56, 1990.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de casearia sylvestris: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 361p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H.; MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, 2010.

SARTI, S. J ; CARVALHO J. C. T. Fitoterapia e fitoterápicos. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. 480p.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. M.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis. UFSC: UFRGS, 2007. cap. 15, p. 371-400.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

SELYE H., TUCHWEBER, B., BERTO?K, L. Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. **Journal of Bacteriology**, v. 91, p. 884-890, 1966.

SHARP, P. E; LA REGINA, M. C. **The laboratory rat**. Boca Raton: CRC Press, 1998.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. G. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; CHASE, M. W.; MORT, M. E.; ALBACH, D. C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W. H.; HOOT, S. B.; FAY, M. F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S. M.; PRINCE, L. M.; KRESS, W. J.; NIXON, K. C.; FARRIS, J. A. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 133, p. 381–461, 2000.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 239-258, 1986.

TUROLLA, M.S.R. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo**. 2004. 145 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TUROLLA, M.S.R; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3,n. 2, p. 93-98, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO,V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

Wang, J.-B.; Kong, W.-J.; Wang, H.-J.; Zhao, H.-P.; Xiao, H.-Y.; Dai, C.-M.; Xiao, X.-H. Toxic effects caused by rhubarb (*Rheum palmatum* L.) are reversed on immature and aged rats. **Journal of Ethnopharmacology**.v. 134, p. 216–220, 2011.

WERLE, A. L. B.; ZANETTI, G. D.; CERON, C. S.; MANFRON, M. P. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, p. 400-402, 2009.

WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General guideline for methodologies on research and evaluation of tradicional medicine**. Geveva: WHO, 2000.

WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals**. 1996.

(Environmental health criteria ; 180),. Disponível em:

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc180.htm>. Acesso em: 3 maio 2011.