

LUANA FARAH ALVARENGA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DA *Hovenia dulcis*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A473a
2012
Alvarenga, Luana Farah, 1979-
Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis* /
Luana Farah Alvarenga. – Viçosa, MG, 2012.
xvi, 168f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 148-164

1. *Hovenia dulcis*. 2. Testes de toxicidade. 3. Plantas
medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 583.86

LUANA FARAH ALVARENGA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DA *Hovenia dulcis*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2012.

Sérgio Luis Pinto da Matta

Marcelo Eustáquio Silva

Carla de Oliveira Barbosa Rosa

Virginia Ramos Pizziolo

Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

“Todavia, entre tantas plantas as quais falsamente se atribuem propriedades maravilhosas, algumas existem que realmente fornecem remédios efficacíssimos. Se existisse no Brasil maior número de homens instruídos, o governo desse país faria obra de grande utilidade, nomeando em cada província uma comissão que se encarregasse de submeter, a exame minucioso, todas as plantas de que se utilizam os colonos para aliviar seus males. Por esse meio, pode-se-ia chegar a construir, para os vegetais, uma matéria médica brasileira, que elucidaria os colonos a respeito de remédios ineficazes ou perigosos e, ao mesmo tempo, daria a conhecer aos nacionais e aos estrangeiros grande número de plantas benéficas. Trabalho de tal envergadura não se poderá fazer, sem dúvida, senão daqui a longos anos”.
(AUGUST SAINT-HILLAIRE, 1820)

*Dedico esta tese ao meu noivo José Luiz,
aos meus pais Márcia e Ariane,
aos meus irmãos Lucas, André e Bruno,
à minha cunhada Percy, ao meu sobrinho Júnior
e à minha cadelinha de estimação Sol.
É o meu amor pelas pessoas e animais que me faz
Forte, persistente e ética!*

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer:

A minha orientadora Tânia Toledo de Oliveira pela oportunidade profissional, carinho e confiança ao longo destes anos de convívio;

Ao meu co-orientador Tanus Jorge Nagem que me deu suporte profissional desde o início da minha graduação;

Aos membros da banca de qualificação; banca de defesa de tese, os professores: Marisa, João Paulo, Virgínia e George; Marcelo, Sérgio, Virgínia e Carla pela ajuda profissional e direcionamento;

Aos vários professores que me disponibilizaram seu tempo e/ou seu laboratório: Claudia Martins (Nupeb/Ufop), José Humberto (Dequi/Ufop), Sérgio da Matta (Biologia/UFV), José Dantas (Veterinária/UFV), Marisa (Bioquímica/UFV), Paulo Stringheta (Alimentos/UFV), Jason (Dequi/Ufop), Rosyane (Univiçosa) dentre outros.

Aos vários funcionários técnicos que me auxiliaram: José Geraldo (Biofármacos/UFV), Sílvio (Univiçosa), Aécio (farmacêutico/UFV), dentre outros;

Aos amigos e colegas de pós-graduação pelo apoio e participação: Luís Eugênio, Anna Paula, Juliana, Helcio, Karina, Fernanda, Rômulo;

A Capes e a Rede Toxifar pelo apoio financeiro;

A minha família, em especial meus pais, e ao meu noivo José Luiz pelo apoio incondicional e afetivo, pela participação direta nos bons e nos maus momentos, vocês são imprescindíveis na minha vida!

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE QUADROS | viii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xi |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1 A pesquisa de novos medicamentos fitoterápicos e seus aspectos regulatórios | 3 |
| 2.2 Normas para a realização de avaliações toxicológicas de fitoterápicos | 16 |
| 2.3 Estudos de toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos | 20 |
| 2.4 Família Rhamnaceae: gênero <i>Hovenia</i> : espécie <i>Hovenia dulcis</i> | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 50 |
| 3.1 Objetivo Geral | 50 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 50 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 51 |
| 4.1 Etapa botânica | 52 |
| 4.2 Etapa fitoquímica | 53 |
| 4.2.1 Determinação da atividade antioxidante | 54 |
| 4.3 Etapa farmacotécnica | 55 |
| 4.3.1 Preparo da fórmula e forma farmacêutica | 55 |
| 4.3.2. Padronização do Extrato hidroalcoólico dos frutos de <i>Hovenia dulcis</i> (EHF) | 56 |
| 4.3.2.1 Teor de umidade do EHF | 56 |
| 4.3.2.2 Identificação e doseamento do flavonóide dihidromiricetina no EHF | 57 |
| 4.4 Etapa de estudos pré-clínicos | 58 |
| 4.4.1. Animais | 58 |
| 4.4.2 Experimento 1: Toxicidade de dose única (aguda) | 59 |
| 4.4.3 Experimento 2: Toxicidade de doses repetidas | 61 |
| 4.4.3.1 Eutanásia dos animais, coleta do sangue e órgãos | 62 |
| 4.4.4 Análises estatísticas | 66 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 5.1 Etapa botânica | 67 |
| 5.2 Etapa fitoquímica | 69 |
| 5.2.1 Determinação da atividade antioxidante | 76 |
| 5.3 Etapa farmacotécnica | 79 |
| 5.3.1 Preparo da fórmula e forma farmacêutica | 79 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.2. Padronização do Extrato hidroalcoólico dos frutos de <i>Hovenia dulcis</i> (EHF) | 81 |
| 5.3.2.1 Teor de umidade do EHF | 82 |
| 5.3.2.2 Identificação e doseamento do flavonóide dihidromiricetina no EHF | 83 |
| 5.4 Etapa de estudos pré-clínicos | 87 |
| 5.4.1 Experimento 1: Toxicidade de dose única (aguda) | 87 |
| 5.4.1.1 Análise comportamental | 87 |
| 5.4.1.2 Análise ponderal e de consumo de ração | 89 |
| 5.4.1.3 Análises histopatológicas | 95 |
| 5.4.2 Experimento 2: Toxicidade de doses repetidas | 97 |
| 5.4.2.1 Análise comportamental e ponderal | 97 |
| 5.4.2.2 Análises hematológicas | 105 |
| 5.4.2.3 Análises bioquímicas | 107 |
| 5.4.2.4 Análises histopatológicas | 122 |
| 5.4.2.4.1 Fígado | 122 |
| 5.4.2.4.2 Rim | 129 |
| 5.4.2.4.3 Pulmão | 132 |
| 5.4.2.4.4 Coração | 135 |
| 5.4.2.4.5 Outros | 138 |
| 6. CONCLUSÃO | 147 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 148 |
| ANEXO I: RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004. | 165 |
| ANEXO II: Protocolo do Comitê de ética na experimentação animal da UFJF: 009/2010 | 168 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|------------|
| FIGURA 1: 1- hovetrichoside A: 1R, 2S; 2- hovetrichoside B: 1S, 2R; ácido hovenico | 33 |
| FIGURA 2: Pedúnculo (a) + fruto (b), conjunto chamado “fruto”; Folha (c); Fruto propriamente dito - cápsula globosa (d); galho com pedúnculo, fruto e semente (e); sementes (f). | 48 |
| FIGURA 3: Árvore de <i>Hovenia dulcis</i> usada para coleta dos pedúnculos frutíferos, frutos e sementes. | 52 |
| FIGURA 4: Perfil cromatográfico do EHF por HPLC | 85 |
| FIGURA 5: Perfil cromatográfico do padrão de DHM por HPLC | 85 |
| FIGURA 6: Absorção no espectro UV; pico A do EHF (a) e da DHM (b) | 85 |
| FIGURA 7: Curva-padrão de dihidromiricetina (x=área; y=concentração) | 86 |
| FIGURA 8: Gráficos comparativos, entre o G1 e G2, da evolução ponderal média (a) e do consumo médio alimentar (b), diários, durante os 14 dias após o tratamento para as fêmeas (a1; b1) e machos (a2; b2). | 94 |
| FIGURA 9: Fotomicrografia do pulmão do rato 5, evidenciando descaracterização tecidual, com presença de exsudato purulento, caracterizado por numerosos neutrófilos, íntegros e desintegrados (coloração HE, barra = 70µm). | 95 |
| FIGURA 10: Fotomicrografia no pulmão e fígado do rato 8; (a) Pulmão evidenciando espessamento de septo interalveolar por infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico. (b) Fígado evidenciado leve vacuolização dos hepatócitos, caracterizando esteatose hepática microvacuolar incipiente (400X; HE). | 96 |
| FIGURA 11: Gráficos comparativos, entre o G1, G2, G3 e G4, da evolução ponderal média, semanal, durante 12 semanas de tratamento para as fêmeas (a) e machos (b). | 102 |
| FIGURA 12: Pesos médios de cada órgão em relação ao peso médio total dos órgãos dos ratos para fêmeas (a) e machos (b). | 104 |
| FIGURA 13: Fotomicrografia do fígado; (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). | 125 |
| FIGURA 14: Fotomicrografia do fígado mostrando achados | 125 |

ocasionais, não significativos; infiltrado lobular perivascular (*); congestão sinusoidal (seta); microvesículas gordurosas (ponta seta) (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm).

FIGURA 15: Fotomicrografia do rim mostrando as camadas cortical (a;c) e medular (c;d) características; (a,b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). **130**

FIGURA 16: Fotomicrografia do pulmão mostrando o parênquima pulmonar característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). **133**

FIGURA 17: Fotomicrografia do coração mostrando miocárdio característico (a- longitudinal; b- transversal) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c- longitudinal; d- transversal) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). **137**

FIGURA 18: Fotomicrografia do esôfago característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). **139**

FIGURA 19: Fotomicrografia do estômago característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. Eosinófilos (seta); (coloração HE, barra = 140µm). **140**

FIGURA 20: Fotomicrografia dos intestinos característicos (a;b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. Eosinófilos (seta); (coloração HE, barra = 140µm). **141**

FIGURA 21: Fotomicrografia do pâncreas característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. Eosinófilos (seta); (coloração HE, barra = 70µm). **143**

FIGURA 22: Fotomicrografia da adrenal mostrando as regiões cortical (a;c) e medular (c;d) características; (a,b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). **144**

FIGURA 23: Fotomicrografia do testículo (a;c) e ovário (b;d) característicos; (a,b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm). **145**

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|-----------|
| QUADRO 1: Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico 70% das cascas, folhas e frutos de <i>Hovenia dulcis</i> | 47 |
| QUADRO 2: Compostos isolados e identificados da <i>Hovenia dulcis</i> | 70 |
| QUADRO 3: Atividades farmacológicas dos extratos de <i>Hovenia dulcis</i> | 74 |
| QUADRO 4: Ficha de sinais e sintomas apresentados pelo rato _____ no experimento de toxicidade aguda | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1: Comparativo das normas para realização de estudos de toxicidade aguda segundo a OMS, a RE no 90 de 2004 para fitoterápicos e a OECD para produtos químicos. | 19 |
| TABELA 2: Comparativo das normas para realização de estudos de toxicidade de doses repetidas segundo a OMS, a RE no 90 de 2004 para fitoterápicos e a OECD para produtos químicos. | 20 |
| TABELA 3: Porcentagem da atividade antioxidante (DPPH) do extrato EHF, do flavonóide padrão dihidromiricetina (DHM) e BHA. | 78 |
| TABELA 4: Determinação do teor de umidade do EHF: Medida do peso de cada amostra nos tempos determinados | 83 |
| TABELA 5: Evolução ponderal média dos ratos (g), dos grupos G1 e G2, de machos e fêmeas, durante 14 dias | 92 |
| TABELA 6: Consumo médio alimentar (g), dos ratos dos grupos G1 e G2, de machos e fêmeas, durante 14 dias | 93 |
| TABELA 7: Evolução ponderal média dos ratos (g), dos grupos G1,G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, durante 12 semanas | 101 |
| TABELA 8: Pesos médios dos órgãos extirpados dos machos e fêmeas de cada grupo, selecionados aleatoriamente. | 103 |
| TABELA 9: Eritrograma e contagem de plaquetas dos grupos G1,G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, após as 12 semanas | 108 |
| TABELA 10: Leucograma dos grupos G1,G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, após as 12 semanas | 109 |
| TABELA 11: Parâmetros bioquímicos plasmáticos dos grupos G1,G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, após as 12 semanas | 124 |
| TABELA 12: Morfometria do fígado dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas. | 126 |
| TABELA 13: Morfometria das microvesículas do fígado dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas. | 127 |

| | |
|---|------------|
| TABELA 14: Morfometria do córtex renal dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas. | 131 |
| TABELA 15: Morfometria da medula renal dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas. | 132 |
| TABELA 16: Morfometria do pulmão dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas. | 134 |
| TABELA 17: Morfometria do coração dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas. | 138 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. AAT: porcentagem da atividade antioxidante
2. Abs: absorvância
3. ADH: enzima álcool desidrogenase
4. ALDH: enzima aldeído desidrogenase
5. ALT ou TGP: alanina-aminotransferase
6. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
7. AOAC: Association of Official Analytical Chemists/ Associação Oficial de Químicos Analíticos
8. AST ou TGO: aspartato-aminotransferase
9. BHA: butilhidroxianisol
10. BPF: Boas Práticas de Fabricação
11. CCl₄: tetracloreto de carbono
12. CFB: Comissão da Farmacopéia Brasileira
13. CONAFIT: Subcomissão Nacional de Assessoramento em Fitoterápicos
14. CPRFB: Comissão Permanente da Farmacopéia Brasileira
15. CTT: Comitês Técnicos Temáticos
16. DgalN/LPS: galactosamina/lipopolissacarídeo
17. DHM: Dihidromiricetina
18. DL50: Dose Letal para 50% da população teste.
19. DMSO: dimetilsulfóxido
20. DPPH: radical 1,1-diphenil-2-picrilhidrazil
21. EHF: extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis*
22. FA: fosfatase alcalina
23. GEPFITO: Grupo de Estudos de Produtos Fitoterápicos
24. GESEF: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia

25. GGT: gama-glutamyltransferase
26. HDL: High-density lipoprotein/ Lipoproteína de alta densidade
27. HE: coloração das lâminas com hematoxilina e eosina
28. HPLC/CLAE: High-performance liquid chromatography/ cromatografia líquida de alta eficiência
29. IC50: concentração da substância que inibe 50% da reação
30. IN: Instrução Normativa
31. LDH: lactato desidrogenase
32. OECD: Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico
33. OMS: Organização Mundial de Saúde
34. PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
35. PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
36. PNPMF: Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
37. RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
38. RE: Resolução Específica
39. RENAME-FITO: Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
40. RENISUS: Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS
41. RMN: ressonância magnética nuclear
42. SNFMM: Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia
43. SNC: Sistema Nervoso Central
44. SUS: Sistema Único de Saúde
45. TG: triglicérides
46. TSH: Thyroid-stimulating hormone/ hormônio estimulante da tiróide

RESUMO

ALVARENGA, Luana Farah, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis***. Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Tanus Jorge Nagem, João Paulo Viana Leite e Aloísio da Silva Pinto.

A *Hovenia dulcis*, uva-do-japão, é uma planta exótica no Brasil originária do leste da Ásia e utilizada principalmente no tratamento de doenças do fígado e como agente detoxificante para intoxicação alcoólica. Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico este trabalho se propôs a elaborar uma revisão integrativa sobre a planta, determinar sua atividade antioxidante (método do DPPH) e avaliar a toxicidade pré-clínica (aguda e crônica) de uma formulação farmacotécnica à base do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis*, previamente padronizado, de acordo com a RE nº 90 de 2004. Para padronização foi determinado o teor de umidade, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ed (perda por dessecação) e o doseamento do flavonóide dihidromiricetina no extrato (CLAE). No estudo toxicológico agudo, ratos Wistar (n=6 por dose e por sexo) foram tratados (v.o.) com a formulação na forma farmacêutica de suspensão na dose única de 6g/kg de peso corpóreo. Durante 14 dias após o tratamento foram observados: sinais tóxicos comportamentais, letalidade, variação ponderal, consumo de ração. Após esse período os animais foram eutanasiados e examinados os órgãos, aqueles que apresentaram alteração anatomopatológica foram coletados para análise histológica. No ensaio crônico os ratos (n=10 por dose e sexo) foram tratados com doses repetidas diariamente de 100, 200 e 300mg/kg de peso corporal durante 12 semanas. Durante o tratamento os sinais tóxicos comportamentais e letalidade foram avaliados diariamente e a variação ponderal semanalmente. Ao final do experimento os ratos foram eutanasiados para avaliação ponderal dos órgãos e análise dos parâmetros sanguíneos e histopatológicos. O extrato e a dihidromiricetina (400ppm) apresentaram atividade antioxidante de até 23,82%±1,60 e 82,53%±0,68, respectivamente, utilizou-se o BHA como padrão (50ppm) com atividade de até 76,97%± 0,96. O teor de umidade do extrato final foi de 21,4%, e o teor de dihidromiricetina foi 470,0±12,14

µg/grama de extrato. No estudo toxicológico agudo nenhum sinal comportamental foi atribuído ao tratamento, não houve morte dos animais e a variação ponderal e consumo de ração foram semelhantes ao grupo controle refletindo um comportamento normal e saudável dos animais de ambos os grupos. Na análise anatomohistopatológica pneumonia foi identificada em dois animais do grupo tratado e controle, não havendo relação com o tratamento. No ensaio crônico sinais de alterações comportamentais foram verificados eventualmente em alguns animais sem progressão e de forma dispersa e semelhante nos grupos, incluindo o controle. Dois animais do grupo tratado com a menor dose foram a óbito durante o experimento e os sintomas apresentados até o óbito caracterizaram falsa via de gavagem ou afecções não relacionadas ao tratamento. Nenhuma alteração hematológica, dos parâmetros bioquímicos do sangue e da histopatologia foram relacionadas à toxicidade. Os resultados da histomorfometria não apresentaram variações, estatisticamente significativas, comparando o grupo tratado com a maior dose ao controle. O fitopreparado desenvolvido a base do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* não apresentou evidências de toxicidade aguda ou crônica em níveis comportamentais, ponderais, hematológicos, bioquímicos sorológicos e histológicos. Adicionalmente apresentou evidências, que corroboram a literatura, de efeitos benéficos em nível sanguíneo e histológico dos parâmetros hepáticos e renais.

ABSTRACT

ALVARENGA, Luana Farah, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Evaluation of pre-clinical toxicity of *Hovenia dulcis***. Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Tanus Jorge Nagem, João Paulo Viana Leite and Aloísio da Silva Pinto.

The *Hovenia dulcis*, oriental Raisin tree, is an exotic plant in Brazil originating from eastern Asia and is mainly used in the treatment of liver diseases and as a detoxication agent for alcohol intoxication. In order to further develop other a herbal drugs from this species this work presents an integrative review of the plant and their antioxidant activity (DPPH method). Herein a toxicity assessment in rats with the hydroalcoholic extract (formulation) from fruits of *Hovenia dulcis* according to Brazilian law (ANVISA-RE 90/2004) is presented. The extract was standardized by water determination (Brazilian Pharmacopoeia methods – Determination of loss on drying) and by dihydromyricetin (flavonoid) level determination (HPLC). In the acute toxicity test Wistar rats (n=6 per gender and dose) were treated (p.o.) with a pharmaceutical formulation in the form of extract suspension in a single dose of 6g/kg body weight. Each group was observed, for 14 days post treatment, in which certain indicators such as toxicity signs, lethality, body weight gain and food consumption were avaluated. After this period the animals were euthanized and the organs examined, those with visual changes were collected for histological analysis. In the chronic toxicity test rats were separated in to out on three experimental groups (100, 200 and 300mg/kg body weight). Each group (n=10 per gender and dose) was dosed daily by gavage for a period of 13 weeks. At the end of treatment the rats were euthanized for evaluation of organs weight and for biochemical, hematological and histopathologic analysis. The extract and dihydromyricetin (400ppm) showed antioxidant activity of up to 23.82%±1.60 and 82.53±0.68%, respectively. The standard BHA (50 ppm) showed antioxidant activity of up to 76.97%±0.96. The water determination of the extract was 21.4%, and the level of dihydromyricetin was 470.0±12.14 mg/g extract. The formulation developed with hydroalcoholic extract from fruits of *Hovenia dulcis* did not show evidence of acute or chronic toxicity, in which certain

indicators such as toxicity signs, lethality, body weight gain, food consumption, organs weight biochemical, hematological and histopathologic analysis. Furthermore beneficial effects were found as determined by the blood levels and the histological parameters of liver and kidney.

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos medicinais a base de plantas é prática comum na terapêutica, desde os tempos mais remotos. Plantas medicinais são aquelas que possuem tradição de uso em uma população ou comunidade e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Ao serem processadas para a obtenção de um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico (CARVALHO *et al.*, 2007).

O mercado de fitoterápicos decaiu com o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos no pós-guerra, porém, vem apresentando um crescimento marcante nas últimas décadas, como tratamento alternativo aos medicamentos da medicina convencional. Para o registro de plantas medicinais na forma de fitoterápicos e sua disponibilização à população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) avalia diversos critérios de qualidade, segurança e eficácia, exigindo requisitos similares aos requeridos para os medicamentos convencionais. Este controle tem o objetivo de desvincular os fitoterápicos da idéia de serem produtos de qualidade inferior e da ausência de potencial de risco tóxico (CARVALHO *et al.*, 2007).

De acordo com a Portaria nº 971 do Ministério da Saúde (2006), que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem estimulado os países a incluírem em seus sistemas de saúde a fitoterapia. (BRASIL, 2006a). O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento dessa terapêutica. No país o interesse popular e

institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a fitoterapia no SUS. A partir da década de 80, diversos documentos foram elaborados enfatizando a introdução de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos na atenção básica do sistema público de saúde. Atualmente, existem programas estaduais e municipais de fitoterapia, desde aqueles com regulamentação específica para o serviço, implantados há mais de 10 anos, até aqueles com início recente ou com pretensão de implantação.

Considerando-se a diversidade de efeitos farmacológicos encontrados em plantas medicinais cujos estudos são frequentemente interrompidos sem alcançar um produto final fitoterápico e considerando a relevância dos estudos que avaliam a segurança, eficácia e toxicidade de acordo com a Resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos, a RDC nº 14, de 05 de abril de 2010, foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis*, adotando-se como protocolo o "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS", da RE nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004 (ANEXO I), visando à possibilidade de registro de um fitoterápico que possua este extrato como princípio ativo. Sobre a *Hovenia dulcis* existem muitos estudos de atividades farmacológicas comprovadas e em andamento (BRASIL, 2004d; 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A pesquisa de novos medicamentos fitoterápicos e seus aspectos regulatórios para registro

A pesquisa de novos medicamentos fitoterápicos envolve etapas, tais como, botânica, fitoquímica, farmacotécnica, e de estudos pré-clínicos e clínicos. A etapa botânica envolve a seleção do material, dados referentes à coleta da planta, identificação macro e microscópica, armazenamento, a fim de garantir a estabilidade e uniformidade do material. A etapa química, ou fitoquímica, envolve os estudos de identificação e isolamento de substâncias componentes da planta, podendo ser estas ativas ou não. A farmacotécnica é a etapa de preparo da forma e fórmula farmacêutica a ser testada nos estudos pré-clínicos e clínicos. Estes últimos envolvem estudos farmacológicos e toxicológicos a fim de garantir segurança e eficácia para possibilidade de produção do fitoterápico (OLIVEIRA, 2007). Os estudos de controle da qualidade da matéria-prima vegetal e da forma farmacêutica final são importantes para garantia da qualidade na fase de produção do fitoterápico e são, em geral, regulamentadas pelas farmacopéias e outros compêndios oficiais.

Entretanto a realização destes estudos com fitoterápicos enfrentam problemas referentes tanto à padronização dos fitopreparados para testes quanto aos aspectos normativos que envolvem os fitoterápicos, que são extremamente variáveis de país para país, o que dificulta a construção do

conhecimento dos dados de segurança e eficácia dos fitoterápicos novos e dos já existentes.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) revisou e escreveu novas monografias de plantas medicinais na tentativa de unificar os critérios para avaliação dos fitoterápicos e publicou o “*WHO Monographs on Selected Medicinal Plant* / Monografias de plantas Medicinai selecionadas pela OMS” volumes I e II, e o “General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine/ Diretrizes Gerais para as metodologias de pesquisa e avaliação da medicina tradicional”, contendo a descrição botânica, constituintes químicos, dados para controle de qualidade, uso medicinal baseado em dados clínicos, dados farmacopeicos e tradicionais, uso popular, resultados de experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos, contra-indicações, advertências, interações medicamentosas, dentre outros (OMS 1999; 2002).

Um dos problemas relativos a essas divergências nas legislações entre os países foi que a norma brasileira vigente para alimentos a partir de 1969, o Decreto-lei nº 986, permitiu a entrada no país, sem registro, de alimentos importados a base de plantas medicinais em suas embalagens originais (BRASIL, 1969). Essa posição conduziu à entrada no Brasil dos suplementos alimentares, que se originados no país seriam registrados como medicamentos, mas eles não obedecem às normas brasileiras dessa classe de produtos. Atualmente as resoluções RDC nº 22 e nº 23 de 2000 referentes ao registro e dispensa de registro de produtos alimentícios importados e nacionais exigem o registro no Ministério da Saúde do Brasil,

porém não limitam a entrada destes produtos no país (MARQUES, 2000; BRASIL, 2000a, 2000b).

Segundo CARVALHO *et al.* (2007), a OMS informou que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais. No Brasil, não se sabe com exatidão o número de pessoas que utilizam plantas para fins farmacológicos, mas, seguramente, segue-se a tendência mundial. Entende-se por consumo de plantas medicinais a utilização, desde fitoterápicos industrializados, passando por fitoterápicos manipulados, produtos registrados como alimentos ou cosméticos, além dos produtos artesanais até a planta medicinal *in natura*, utilizados amplamente na medicina popular.

No Brasil, a legislação referente aos fitoterápicos veio sendo modificada ao longo de sua história. Seguindo a tendência mundial de revisão e compilação dos compêndios oficiais a ANVISA, através da RDC nº 49, de 23 de novembro de 2010, aprovou a Farmacopéia Brasileira 5ª edição elaborada juntamente com a Comissão da Farmacopéia Brasileira (CFB) e Comitês Técnicos Temáticos (CTT) formados com a participação de Instituições de Ensino e Pesquisa e tomou providências importantes como (BRASIL, 2010b):

- Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais na quinta edição da Farmacopéia Brasileira, para o controle de insumos e produtos farmacêuticos admitir-se-á a adoção de monografia oficial, em sua

última edição, de códigos farmacêuticos estrangeiros, na forma disposta em normas específicas (BRASIL, 2010c).

- Ficam revogadas todas as monografias e métodos gerais das edições anteriores da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010c).

No entanto, as monografias farmacopeicas não expressam os aspectos de segurança (toxicidade) de uso e não referenciam eficácia. A preocupação com a segurança e eficácia dos fitoterápicos teve início em 1967 com a portaria nº 22 que instituiu o Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (SNFMF) e estabeleceu normas para o emprego de preparações fitoterápicas (BRASIL, 1967). A portaria continha a definição de produto fitoterápico, exigia a apresentação por parte do fabricante de dados técnicos sobre a droga, a preparação fitoterápica, a fórmula, indicações terapêuticas, rótulo e bula e explicitava a necessidade de submissão à análise dos pedidos de licenciamento para fitoterápicos, mesmo constando na farmacopéia, embora mantivesse mecanismos facilitadores para estes. Através desta portaria, para a produção do fitoterápico, tornaram-se necessários ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos (toxicidade aguda e crônica, farmacologia animal, experimentação clínica e testes de teratogenicidade). A portaria, ainda, estimulava a diminuição da combinação de drogas vegetais para novos licenciamentos, revalidações e modificações de fórmula (MARQUES, 2000).

Nas décadas de 1980 e 1990 ocorreu um aumento do consumo de plantas medicinais em virtude de uma corrente naturalista emergente no país o que acarretou no surgimento de várias regulamentações setoriais complementares (MARQUES, 2000; TUROLLA, 2004).

Quando em 1992 as portarias nº 19 do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e de nº 19 da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, respectivamente, proibiram o uso do confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações de uso interno e suspenderam por tempo indeterminado a comercialização do cambará (*Lantana camara* L), *in natura* e nas formas farmacêuticas, por motivos de toxicidade encontradas em avaliações técnicas específicas, demonstrou-se uma visão mais consciente em relação aos medicamentos de origem vegetal, confrontando a falsa idéia da ausência de toxicidade dos fitoterápicos (BRASIL, 1992a; 1992b; MARQUES, 2000).

Depois disso foram formadas, sucessivamente, várias comissões técnicas pelo Ministério da Saúde, como o Grupo Consultor Técnico Científico, criado para estabelecer a normatização e o controle dos serviços, da produção, da armazenagem e da utilização de substâncias e produtos naturais, pela Portaria Ministerial nº 546 de 21/05/1993 (BRASIL, 1993); a subcomissão da Comissão Permanente da Farmacopéia Brasileira (CPRFB) para elaborar monografias de plantas medicinais, pela Portaria nº 40 de 10/01/1994 (BRASIL, 1994a); a subcomissão da CPRFB para elaborar normas sobre fitoterápicos, pela Portaria nº 42 de 10/01/94 (BRASIL, 1994b); a Comissão Técnica de Integração Terapêutica posteriormente nomeada Grupo de Estudos de Produtos Fitoterápicos (GEPFITO), ligado à Comissão Técnica de Assessoramento em Assuntos de Medicamentos e Correlatos, posteriormente substituído pela Subcomissão Nacional de Assessoramento em Fitoterápicos, o CONAFIT (BRASIL, 1994c; 1994d; 1998a).

O GEPFITO, em 1994, por meio de uma proposta aberta à consulta pública, sugeriu a normatização do registro de produtos fitoterápicos a partir da qual, com a avaliação realizada por diversos setores da sociedade, definiu-se a portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária nº 123. Neste contexto, os principais pontos desta portaria envolveram (BRASIL, 1994e):

- O conceito de fitoterápico: medicamento preparado exclusivamente por matérias ativas oriundas de plantas medicinais e obedecendo integralmente aos requisitos técnicos para a preparação farmacêutica e uso terapêutico;
- A padronização dos conceitos e termos técnicos da área;
- Orientações da produção e controle de fitoterápicos, com estabelecimento de normas de qualidade para matéria-prima e produto final na aquisição do registro pela empresa produtora;
- E principalmente, o estabelecimento padronizado do atendimento aos critérios de segurança e eficácia com estudos de toxicologia aguda e crônica, farmacologia pré-clínica e clínica.

Em 1999 a Lei nº 9.782, do Ministério da Saúde do Brasil, define a política e o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como uma autarquia sob regime especial, vinculada ao Ministério da Saúde, com prazo de duração indeterminado e atuação em todo o território nacional, caracterizada pela independência administrativa, estabilidade de seus dirigentes e autonomia financeira e com a finalidade institucional de promover a proteção à saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária,

inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, e de portos, aeroportos e fronteiras (BRASIL, 1999a).

Atualmente todos os fitoterápicos industrializados devem ser aprovados e registrados na ANVISA antes de serem comercializados, a fim de garantir acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade comprovada. O registro tem validade de cinco anos, devendo ser renovado por períodos sucessivos, conforme determinado na Lei nº 6.360 de 1976, que dispõe sobre os produtos submetidos ao controle da Vigilância Sanitária e ainda vigora com alterações. Para a obtenção do registro e sua renovação, o fabricante deve peticionar junto à ANVISA um dossiê técnico-administrativo com informações sobre o produto, de acordo com os regulamentos específicos. Durante a análise de um processo de registro, verificam-se os principais aspectos referentes ao processo produtivo, controle de qualidade, ensaios de segurança e eficácia, dados legais da empresa, rotulagem e bula (BRASIL, 1976; CARVALHO *et al.*, 2007).

A portaria nº 6, que instituiu e normatizou o registro de fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária, de 1995, estabeleceu prazo de cinco anos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos já comercializados. Tendo em vista a necessidade de normatização dos estudos toxicológicos e de eficácia de produtos fitoterápicos, que até então eram baseados em protocolos não padronizados para fitoterápicos e/ou protocolos estrangeiros, com a participação da Academia Brasileira de Ciência foi publicada a portaria nº 116 de 08/08/1996 a respeito das normas para realização de estudos de toxicidade de produtos fitoterápicos (BRASIL, 1995a; 1996a).

A portaria nº 1.029 publicada em 1998 submeteu à consulta pública os procedimentos de registro simplificado para produtos fitoterápicos tradicionais que constavam em lista aprovada pelo Sistema de Vigilância Sanitária. Nela também foram esclarecidos critérios de registro por similaridade, exigindo comprovação de equivalência terapêutica (BRASIL, 1998b; MARQUES, 2000).

No que se referia a medicamentos isentos de registro, a portaria nº 6 de 1995 adequou-se ao prescrito na lei 6.360 mantendo a possibilidade de isenção de registros para drogas vegetais e produtos farmacopeicos, porém restringindo esse expediente apenas às informações efetivamente constantes das monografias oficiais. Dados de toxicidade, eficácia e controle de qualidade das formas farmacêuticas, não constantes nas monografias oficiais, deveriam ter os dados comprovados pela empresa interessada na isenção de registro. Como a isenção envolve várias classes de medicamentos, além dos fitoterápicos, foi publicada norma própria com a edição da Portaria nº 81 de 13/09/1995 que esclareceu o assunto e definiu um cadastramento numerado para os produtos isentos (BRASIL, 1995b; MARQUES, 2000).

Para auxiliar no cumprimento às legislações vigentes pelas empresas ou programas públicos e filantrópicos não dotados de infraestrutura adequada para as pesquisas necessárias ocorreu à reestruturação do GEPFITO com a elaboração de monografias para a composição de Formulário Nacional de Fitoterápicos, através da edição da Portaria nº 125 de 1995. A aprovação do formulário Nacional de Fitoterápicos, como parte integrante da Farmacopéia Brasileira 5ª ed., aconteceu em 2011 através da

RDC nº 60 trazendo 83 monografias de produtos fitoterápicos acabados, como infusões, xaropes e pomadas, incluindo-se avaliações toxicológicas e de eficácia terapêutica com indicações precisas, com doses recomendadas, restrições de uso, efeitos colaterais e contra-indicações. Os requisitos de qualidade estão definidos de forma específica para a farmácia de manipulação e farmácias vivas. (BRASIL, 1995c; 2011).

A Portaria nº 178 de 1998, que submeteu à consulta pública, a qual revogou a portaria nº 81 de 1995 sobre as normas de isenção, possuía conteúdo semelhante à última, porém definia os produtos que podem sofrer a isenção, destacando-se os medicamentos cujas fórmulas integrais constem da Farmacopéia Brasileira em vigor, visando disciplinar o procedimento de isenção, e mantendo o prazo de validade da concessão de isenção de registro e a necessidade de sua renovação periódica (BRASIL, 1998c).

No ano de 2000 entrou em vigor a RDC nº 17 normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária que foi revogada pela RDC nº 48 de 2004. Esta última previa diferentes formas de se comprovar a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos, havendo a possibilidade de se utilizar as informações disponíveis sobre a tradição de uso da planta para as indicações propostas, apresentando-se um levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações técnico-científicas ou publicações), conforme recomendado pela OMS em 1991 (OMS, 1991; BRASIL, 2000c; 2004a). Quatro resoluções derivaram da RDC nº 48 de 2004 e apresentaram critérios específicos para medicamentos fitoterápicos,

sendo elas as Resoluções Específicas: RE nº 88 de 2004 - Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia; RE nº 89 de 2004 - Lista de registro simplificado para registro de fitoterápicos; a RE nº 90 de 2004 - Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica; e a RE nº 91 de 2004 - Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro (MARQUES, 2000; BRASIL, 2004b; 2004c; 2004d; 2004e; TUROLLA, 2004)

A RDC nº 48 de 2004 foi substituída, em 2010, pela RDC nº-14 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. De acordo com esta resolução não é objeto de registro a planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. As plantas medicinais, de acordo com a legislação brasileira, podem ser comercializadas em farmácias e ervanárias, de acordo com a Lei nº 5.991 de 1973 e precisam ser notificadas como drogas vegetais de acordo com a RDC nº 10 de 2010. Já os produtos obtidos das mesmas podem ser cadastrados ou registrados junto à ANVISA como alimentos, cosméticos e medicamentos fitoterápicos. A comercialização de plantas na forma rasurada para a preparação de chás pode ser enquadrada como alimento. O cadastro de plantas destinadas à infusão extemporânea, para o preparo de chás, é feito junto à Gerência de Alimentos da ANVISA, através das resoluções RDC nº 267 de 2005, RDC nº 277 de 2005, RDC nº 278 de 2005 e RDC nº 219 de 2006. As plantas que podem ser cadastradas nesta categoria estão definidas nas resoluções e devem ter um histórico de uso alimentício, não apresentando toxicidade nas doses usuais àquelas utilizadas em preparação alimentícia e não

apresentem uso característico como medicinal independente de sua apresentação como alimento. Para facilitar o registro a RDC nº 219 de 2006 apresenta uma lista positiva de espécies para as quais já se admite a aplicação desses requisitos e podem ser objeto de solicitação de registro imediata (BRASIL, 1973; 2005a; 2005b; 2005c; 2006b; 2010a; 2010c; CARVALHO *et al.*, 2008).

Apenas os produtos registrados como medicamentos, dentre eles os fitoterápicos, podem apresentar alegações terapêuticas em suas bulas, embalagens e publicidade. A RDC nº 47 de 2009 estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos e possui na seção IV as normas para bulas dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2009; CARVALHO *et al.*, 2007).

A IN nº 5 de 2008, em substituição e atualização à RE nº 89 de 2004, determinou a publicação de nova "lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" com a inclusão de novas espécies. A IN nº 5 de 2010 atualizou a "lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos" em substituição à RE nº 88 de 2004 (BRASIL, 2008a; 2010d).

A RE nº 90 de 2004 apresenta a guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica específica para medicamentos fitoterápicos, que além dos ensaios de toxicidade aguda e de doses repetidas, também sugere estudos de genotoxicidade, quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos e a avaliação toxicológica de fitoterápicos de uso tópico, porém não detalha os métodos para a realização destes testes (BRASIL, 2004d).

A ANVISA divulgou, em 2010, a primeira versão da “Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos”. A elaboração da guia foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos e de instituições de interesse na área objetivando maior harmonização com a regulamentação internacional e cientificamente válida e racionalização dos estudos não clínicos. Evitam-se, assim, as duplicidades e utilização desnecessária de animais, sem comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da droga a ser testada para fornecer dados confiáveis para futuras pesquisas clínicas. Porém fica estabelecido que se o pesquisador/instituição conseguir comprovar a segurança desses fármacos por outros estudos científica e tecnicamente mais viáveis, os dados apresentados poderão ser avaliados pela ANVISA (ANVISA, 2010). Este guia não possui valor de resolução e não é específico para medicamentos fitoterápicos permanecendo vigente, no Brasil, para os fitoterápicos, a RE nº 90 de 2004.

Para os ensaios clínicos com medicamentos fitoterápicos vale a mesma resolução que regulamenta os ensaios clínicos gerais, a RE nº-39 de 2008 (BRASIL, 2008b).

Em 2006, duas portarias foram publicadas para o setor de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. A primeira foi a Portaria Ministerial nº 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS e a segunda foi o Decreto nº 5.813 que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. Ambas as políticas

apresentaram em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos e estimularam a adoção da fitoterapia nos programas de saúde pública (BRASIL, 2006a; 2006c).

Em 2008 a portaria nº 1.274 instituiu o grupo executivo para apoiar o Ministério da Saúde na coordenação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, relacionado à regulamentação, cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Ao grupo ficou determinado orientar estudos e pesquisas que pudessem subsidiar a elaboração da RENAME-FITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos) para o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos. Paralelamente a Portaria Interministerial nº 2.960, de 2008 aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos cuja função foi elaborar a RENAME-FITO, uma lista de espécies vegetais medicinais prioritárias para investimento, e a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) publicada em 2009 com 71 espécies vegetais com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS com o objetivo de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de fitoterápicos disponíveis para uso da população. (BRASIL, 2008c; 2008d; TORRES, 2009).

A distribuição e ampliação de fitoterápicos no SUS e o progressivo amadurecimento da legislação brasileira em relação aos estudos de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos anunciam um aumento no número de medicamentos fitoterápicos a serem registrados (CARVALHO *et*

al., 2008). Desde então, práticas relacionadas à distribuição de fitoterápicos e a implantação das “Farmácias Vivas” vêm se tornando uma realidade no país. Sendo assim, a necessidade de estudos toxicológicos e a implantação de políticas de fitofarmacovigilância devem ser tomadas como prioridade para a saúde pública (LANINI *et al.*, 2009).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) devem ser implantadas em toda a cadeia produtiva de fitoterápicos, desde o cultivo da planta medicinal até a distribuição do produto acabado, devendo ser incluídas em programas mais abrangentes de garantia da qualidade. Diversos países têm procurado regulamentar a aplicação das BPF para produtos fitoterápicos, que basicamente seguem as orientações da OMS e tem como objetivo a garantia da qualidade, eficácia e segurança (GIL, 2010). No Brasil, o estabelecimento das BPF para fitoterápicos segue a RDC nº 17 de 2010 (BACCARIN, 2010, BRASIL, 2010e).

2.2 Normas para a realização de avaliações toxicológicas de fitoterápicos

Tendo em vista a necessidade de normatização dos estudos toxicológicos e de eficácia dos fitoterápicos, propostas de regulamentação foram surgindo ao longo da evolução da legislação para fitoterápicos.

A principal fonte de guias para a regulamentação em âmbito internacional é a OMS. Embora suas diretivas não tenham força de lei em nenhum país, elas influenciam fortemente a elaboração das legislações nacionais. Sendo assim, na década de 90 a OMS elaborou o “*Guidelines for*

the assessment of herbal medicine/ Normas para avaliação dos medicamentos a base de plantas”, o “*Research Guidelines for Evaluation the Safety and Efficacy of herbal medicines/ Normas de pesquisa para avaliação da Segurança e Eficácia dos medicamentos a base de plantas*” e o “*Guidelines for clinical research on Acupuncture/ Normas de pesquisa clínica em acupuntura*. Segundo as normas citadas, principalmente quanto à avaliação de segurança de um fitoterápico, se faz necessária a consideração do tempo de uso do medicamento para os fins terapêuticos a que se propõem. As normas consideram o uso tradicional como base de avaliação de risco, desde que não haja evidências de problemas quanto a sua segurança, sendo necessária uma extensa revisão da literatura a fim de se verificar se as informações de segurança estão bem esclarecidas. Caso contrário, torna-se necessário a realização de estudos pré-clínicos e clínicos, que devem ser realizados sempre que não houver documentação que comprove sua tradicionalidade ou quando houver quaisquer dúvidas quanto a sua segurança (OMS, 2000; TUROLLA, 2004).

No referente aos ensaios toxicológicos pré-clínicos, critérios para realização destes testes estão bem especificados nas normas da *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) / Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico* no “*OECD Guidelines for testing of chemicals/ OECD Normas para teste de substâncias químicas*”. No entanto, tais normas não são específicas para medicamentos de origem vegetal e sim para substâncias químicas de forma geral, evidenciando a necessidade de avaliações mais apropriadas àquela classe de medicamentos (TUROLLA, 2004; OECD, 2011).

No Brasil a primeira norma que estabeleceu um roteiro técnico, com critérios específicos para fitoterápicos, visando à elaboração de estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos foi a portaria nº116 de 1996. Esta portaria, dentre outras exigências, permitiu a realização concomitante de estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos, com a finalidade de agilizá-los, uma vez que, em sua maioria, as espécies estudadas já vinham sendo comercializadas e consumidas pela população. Ela também uniformizou a prestação de serviços na área de fitoterápicos e orientou sobre as metodologias a serem utilizadas nos estudos. Embora a portaria não definisse o protocolo experimental a ser utilizado nos estudos orientou na sua elaboração exigindo que demonstrasse a ausência ou a eventual toxicidade do produto fitoterápico e detalhou um roteiro com os parâmetros mínimos para os estudos necessários. Além dos aspectos toxicológicos a portaria propôs normas para estudo da eficácia de produtos fitoterápicos. Ela ainda sugeriu que, além destas normas, pudesse ser consultado o Roteiro de ensaios pré-clínicos e clínicos da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento Científico da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde e mais duas referências: o já citado, “*Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*”, da OMS e o “*WHO Guidelines for Good Clinical Practice (GCP) for Trials on Pharmaceutical Products/ OMS Normas para Boas Práticas Clínicas para triagem de produtos farmacêuticos*” (BRASIL, 1996a; OMS, 1992; 2000). Em decorrência desta portaria, houve um estímulo à elaboração destes estudos nas instituições devido à demanda e disponibilização de normas claras para sua execução (MARQUES, 2000).

No Brasil, atualmente, o regulamento que apresenta critérios específicos para estudos toxicológicos pré-clínicos dos medicamentos fitoterápicos é a RE nº 90 de 2004 - Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos. As TABELAS 1 e 2 evidenciam as principais diferenças entre as normas da OMS, da RE nº 90 para fitoterápicos e da OECD para produtos químicos (OECD, 1995; 2001; OMS, 2000; BRASIL, 2004d).

TABELA 1: Comparativo das normas para realização de estudos de toxicidade aguda segundo a OMS, a RE nº 90 de 2004 para fitoterápicos e a OECD para produtos químicos.

| Parâmetros | Toxicidade aguda para fitoterápicos segundo a OMS | Toxicidade aguda para fitoterápicos segundo RE n.º 90, de 16 de março de 2004. | Toxicidade aguda para substâncias químicas segundo OECD. |
|-----------------------------|--|--|---|
| Espécies de animais | Mínimo 2 espécies, sendo uma roedora e uma não-roedora | Uma espécie de mamífero, evitando-se animais com características genéticas especiais. | Preferencialmente roedores (ratos) podendo ser utilizadas espécies não roedoras. |
| Sexo e número de animais | Machos e fêmeas em pelo menos uma das espécies. Mínimo 5 animais por sexo. Roedores: mínimo dois animais por sexo por grupo | No mínimo 6 machos e 6 fêmeas em idade adulta. | Mínimo 5 roedores para cada dose do mesmo sexo. Fêmeas devem ser nulíparas e não prenhas. Ao final, repetir o teste com um grupo de no mínimo 5 animais do sexo oposto. |
| Via de administração | Via oral. Caso a preparação seja administrada ao homem por via parenteral, somente esta via será suficiente. | A mesma via proposta para o uso do produto. | Oral |
| Dosagens | Roedores: concentrações que permitam determinar a dose letal aproximada. Não roedores: doses que permitam a observação de efeitos tóxicos. | Suficiente para observação de possíveis efeitos adversos e estimativa da DL ₅₀ . Se não forem observados efeitos adversos, utilizar a máxima dose possível. | No mínimo 3 dosagens, em número e intervalo de tempo suficiente para produzir uma curva dose-resposta que permita a determinação da DL ₅₀ . |
| Frequência da administração | Uma ou mais doses durante o período de 24 horas. | Uma ou mais doses durante o período de 24 horas. | Uma ou mais doses não excedendo 24 horas. |
| Período de observação | Devem ser observados por no mínimo 07 dias e no máximo 14 dias. | Durante as primeiras 24h nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após a administração | Mínimo de 14 dias. O período deve ser determinado de acordo com o aparecimento dos efeitos tóxicos e ser prolongado até que necessário. |

Fontes: OMS, 2000; BRASIL, 2004d; OECD, 1995; 2001)

TABELA 2: Comparativo das normas para realização de estudos de toxicidade de doses repetidas segundo a OMS, a RE nº 90 de 2004 para fitoterápicos e a OECD para produtos químicos.

| Parâmetros | Toxicidade de doses repetidas para fitoterápicos segundo a OMS | Toxicidade de doses repetidas para fitoterápicos segundo RE n. 90, de 16 de março de 2004. | Toxicidade de doses repetidas para substâncias químicas por 28 dias, segundo OECD. |
|-----------------------------|---|---|---|
| Espécies de animais | Mínimo 2 espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não-roedora | Pelo menos 2 espécies de mamíferos (uma roedora e uma não-roedora). | Preferencialmente espécies roedoras (ratos). |
| Sexo e número de animais | Roedores: mínimo 10 machos e 10 fêmeas por dose; não roedores: mínimo 3 machos e 3 fêmeas por dose. Para cada estudo incluir um grupo controle com o veículo da formulação e um grupo sem tratamento. | Roedores: 10 machos e 10 fêmeas por dose; não-roedores: no mínimo 3 machos e 3 fêmeas por dose. Para cada estudo incluir um grupo controle com o veículo da formulação. | Mínimo 10 animais para cada dose (5 machos e 5 fêmeas). Fêmeas devem ser nulíparas e não prenhas. |
| Via de administração | A mesma via de administração do medicamento. | A mesma via de administração do medicamento. | Via oral. |
| Dosagens | Mínimo 3 concentrações por grupo: uma dose de nenhum efeito observado, uma dose que produza efeitos tóxicos, uma ou mais doses intermediárias. | Mínimo 3 doses: dose de efeito terapêutico (menor dose), maior dose que produza efeito detectável limitada pelo volume da dose e uma dose intermediária, como exemplo, a média geométrica entre a dose maior e a menor. | Caso a dose de 1000 mg/kg/dia não cause efeitos tóxicos deve ser realizado com no mínimo 3 grupos e um grupo controle. Um estudo de achado de dose pode ser realizado se não houver dados disponíveis. A dose máxima escolhida deve induzir efeitos tóxicos, mas não deve induzir morte ou sofrimento severo. |
| Frequência da administração | O tempo de administração segue o período da utilização terapêutica, mínimo de 2-4 semanas até 9-12 meses. | Segue o período da utilização terapêutica: até 30 dias de uso/ano = 4 semanas; mais de 30 dias de uso/ano = 12 semanas. | Os animais devem ser testados 7 dias por semana durante 28 dias. |
| Período de observação | Observação diária. | Não consta. | Observação por 28 dias. Grupo controle deve ser observado por mais 14 dias. |

Fontes: OMS, 2000; BRASIL, 2004d; OECD, 1995; 2001)

2.3 Estudos de toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos

Toxicidade é definida como a capacidade de certas substâncias causarem danos aos seres vivos. É importante salientar que toxicidade e dano não têm o mesmo significado; medidas de toxicidade são estimadas para avaliar o potencial de dano. Dano não é apenas uma função da toxicidade inerente, mas está relacionado à biodisponibilidade da substância. Esta distinção e a importância de informações sobre a biodisponibilidade do material devem ser mantidas em mente no que se refere à segurança de

produtos que entram em contato com o organismo humano (PINTO *et al.*, 2000).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES; FORBES, 1994 apud LIMA *et al.*, 2009) Tais ensaios podem ser realizados para analisar toxicidade aguda, subcrônica (subaguda para alguns autores) e crônica. A maior diferença entre estudos agudos, subcrônicos e crônicos, além da duração experimental, é o grau com que os animais experimentais são avaliados, em nível físico, bioquímico, hematológico e histológico, quanto aos efeitos tóxicos produzidos pela substância teste (PINTO *et al.*, 2000).

O grau de segurança no uso de drogas só pode ser avaliado quando se analisa uma série de fatores, relacionados não somente com as propriedades físicas, químicas e farmacodinâmicas das drogas, mas também com as características biológicas dos indivíduos. Apesar da análise de todos estes fatores é ainda impossível o estabelecimento completo do grau de segurança das drogas. Durante os testes de toxicidade, os animais ou humanos usados nos estudos devem ser observados quanto às alterações físicas e comportamentais, e analisados quantos aos parâmetros bioquímicos e hematológicos periodicamente. A interpretação dos resultados é específica para cada constituinte em particular, mas existem princípios básicos e associações que devem ser seguidas (KERR, 2003).

Os parâmetros de bioquímica subclínica e clínica funcionam como indicadores dos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, protéico e mineral, além de oferecer indicativos na interpretação

do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo e muscular, e associado aos parâmetros hematológicos, histológicos ou histopatológicos fornecem o grau de segurança da utilização endógena de uma determinada substância (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Respostas bioquímicas, que geram respostas patológicas, podem ocorrer quando um tóxico entra no organismo, como uma aclimatação do organismo ou uma situação de toxicidade podendo afetar a sobrevivência dos animais. O estresse é um mecanismo fisiológico compensatório que o organismo adota em resposta a fatores físicos ou químicos, os agentes estressores, que podem afetar parâmetros bioquímicos em nível sanguíneo e/ou em nível de órgãos. O consumo de oxigênio, o metabolismo de lipídios, conteúdo de lactato e glicogênio tecidual e níveis plasmáticos de glicose podem ser alterados depois da exposição a um xenobiótico. Assim, estes parâmetros bioquímicos são sensíveis a concentrações subletais de agentes tóxicos (DE SMET; BLUST, 2001 apud PRETTO, 2008). O fígado e os rins são, geralmente, os órgãos ativos na metabolização e eliminação de xenobióticos, portanto, a análise de parâmetros bioquímicos e histológicos pode ajudar a identificar os órgãos alvo de toxicidade e o estado geral de saúde do animal (ALMEIDA *et al.*, 2001 apud PRETTO, 2008).

CUNHA *et al* (2009) avaliaram a toxicidade pré-clínica do látex e do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum*, por via oral, em ratas Wistar. Esta planta tem o látex usado empiricamente como antitumoral e antiinflamatório e existem espécies tóxicas nesta família. O estudo seguiu diretrizes do *Guideline 423* (toxicidade aguda) e *Guideline 407* (toxicidade subaguda) da OECD (OECD, 1995; 2001). Na avaliação de toxicidade aguda

(14 dias) parâmetros comportamentais e sinais de toxicidade foram avaliados. Foram realizadas análises macroscópica e histopatológica dos órgãos dos animais. No estudo de toxicidade subaguda os animais foram divididos em cinco grupos com 8 fêmeas cada, totalizando 40 animais. Três doses diferentes do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* foram administradas por grupo, por 30 dias. Um grupo, denominado satélite, foi tratado com a dose máxima do extrato por 30 dias, permanecendo sem tratamento por mais 30 dias. Foram observados e registrados, diariamente, peso, consumo de água, consumo de ração, produção de fezes e produção de urina e alterações comportamentais anormais durante todo o estudo. Parâmetros hematológicos e bioquímicos, macroscópicos e histopatológicos dos órgãos foram analisados. Na toxicidade aguda não observaram alterações fisiológicas e comportamentais, e nem a morte dos animais. No entanto, o látex ocasionou congestão e infiltrado leucocitário nos rins, fígado e pulmões, efeitos não observados com o extrato da mesma. Na toxicidade subaguda, os tratamentos com o extrato não produziram alterações dose-dependentes significativas nos parâmetros laboratoriais e nem alterações fisiológicas, macroscópicas e histopatológicas dos órgãos. Os autores concluíram que o extrato da *S. umbellatum* é praticamente atóxico em exposição aguda, já o látex pode ocasionar alterações histopatológicas no fígado e pulmões e que o uso crônico da planta merece mais estudos.

A evolução histórica mostra o emprego de espécies animais buscando avaliar o risco no ser humano, em diferentes situações, de forma bem sucedida. Em contraste, o trágico episódio da Talidomida, nos anos 60 apontou deficiência crítica no emprego dos roedores em prever riscos de

toxicidade em humanos, evidenciando a variabilidade de respostas dos fármacos. Muitos estudos permitiram aprendizado quanto às duas dificuldades básicas na utilização de animais: o problema em extrapolar resultados obtidos de estudos em animais a humanos, e a dificuldade em extrapolar observações obtidas com dosagens elevadas nos animais, para os níveis de dosagens inferiores considerados para o homem. No que se refere ao modelo animal empregado, apesar das diferenças existentes entre qualquer das espécies e o homem, no que diz respeito à absorção, distribuição, biotransformação e eliminação, e da variabilidade de resposta, é sempre preferível à resposta de um modelo vivo do que de qualquer outro (PINTO *et al.*, 2000).

O ensaio de toxicidade aguda é uma etapa inicial para a avaliação do perfil toxicológico de uma substância, podendo sugerir o mecanismo de toxicidade envolvido na absorção da mesma por diferentes vias de administração. Este ensaio pode ser necessário para o estabelecimento de doses a serem utilizadas em estudos crônicos e subagudos. Além disso, fornece informações sobre o risco à saúde humana capaz de advir da administração aguda dessa substância (BIGUETHI *et al.*, 2004).

CRAVEIRO *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina*, espécie vegetal muito usada na medicina popular principalmente como tranquilizante. O protocolo experimental utilizado seguiu o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos da RE nº 90 de 2004. O extrato aquoso de *Erythrina velutina*, foi dissolvido em água destilada e administrado, por via oral, a um grupo de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas),

em dose única. Após a administração foram observados aparecimento de sinais tóxicos de caráter geral, com exceção da quantidade de bolos fecais, os demais parâmetros foram avaliados através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 pontos (cianose, piloereção, contorções, ptose palpebral, tremores, convulsões, ataxia, hipnose e urina vermelha), ou bipolares variando de 0 a 8 pontos, sendo 4 o valor representante da normalidade (atividade motora, respiração, reflexos corneal, de endireitamento e de retirada, tônus corporal). A variação do peso foi observada diariamente. O número de mortes foi verificado para cálculo da DL50 e após eutanásia as características macroscópicas dos pulmões, rins, intestinos, fígado, gônadas e coração foram analisados. De acordo com os resultados dos autores nenhum animal veio a óbito e nenhum sinal de toxicidade foi detectado nas observações comportamentais ou nas autópsias, indicando uma razoável atoxicidade do extrato.

A Dose Letal 50% (DL50) é a dose única que causa a morte em 50% dos animais, sendo expressa em peso da substância teste por unidade de peso do animal experimental (mg/kg). O valor da DL50 é usado como um índice para a classificação toxicológica, fornecendo subsídios para estudos de avaliação de risco da exposição humana. Deste modo, este padrão visa à detecção e avaliação do potencial tóxico, para o homem, de qualquer substância ou produto químico acabado, ao qual possa estar exposto. Por meio da observação e quantificação do número de mortes após a administração única de uma substância ou produto químico por diferentes vias de administração, em ratos ou camundongos, o valor da DL50 é calculado (BIGUETHI *et al.*, 2004). Os testes de toxicidade subaguda e

crônica são geralmente avaliados por meio de exposições prolongadas (doses repetidas) do organismo a concentrações subletais (ALBINATI *et al.*, 2009). Geralmente os protocolos exigem o teste em duas espécies animais, podendo apenas uma delas ser espécie roedora.

MELLO *et al.* (2008) avaliaram a segurança de um fitoterápico, constituído de extrato fluído de *Gossypium herbaceum* (algodoeiro) e tintura de Algodoeiro Cangeri®, através de estudos de toxicidade, tendo como base a resolução nº 90 de 2004. Para o teste de toxicidade em doses repetidas com duração de 30 dias de tratamento, utilizaram dez ratos machos e dez fêmeas, tratados com a dose terapêutica indicada pelo fabricante para seres humanos adultos, 5 vezes e 10 vezes a dose terapêutica, além de um grupo controle, onde administraram o veículo do fitoterápico. Foi avaliada a massa corporal diária, consumo diário de ração, consumo diário de água, análise macroscópica dos órgãos, peso relativo das vísceras no dia da eutanásia e exames complementares como análise histopatológica dos órgãos, hemograma completo e análise bioquímica sanguínea. Os resultados revelaram que os animais tratados com a dose terapêutica não mostraram alterações sistêmicas que indique toxicidade. As alterações observadas nas variáveis de ganho de massa corporal, dados hematológicos e de bioquímica sanguínea nos grupos tratados com as doses 5 e 10 vezes a dose terapêutica revelaram a ocorrência de toxicidade sistêmica dose dependente.

Existem vários protocolos sugeridos para desenvolvimento dos estudos de toxicidade de fármacos e atualmente, no Brasil, existe protocolo específico para fitoterápicos. Cabe ao pesquisador selecionar um protocolo

que seja aceito pelo órgão fiscalizador do seu país. Um estudo da Universidade King Saud, da Arábia Saudita, por exemplo, que usou protocolo nacional, utilizou quatro grupos de oito ratos e testou duas plantas isoladamente. Em um dos grupos testou a associação das plantas, o quarto grupo foi o controle, que recebeu apenas ração. Metade dos animais de cada grupo foi eutanasiado, aleatoriamente, com três semanas de tratamento e a outra metade com seis semanas de tratamento. No sangue dos animais foi realizada hematologia completa e alguns parâmetros bioquímicos (FA, AST, ALT, proteínas totais, albumina, globulina, bilirrubina, uréia, cálcio e magnésio). Todos os animais de todos os grupos tiveram o intestino, fígado, rim, coração e baço analisados histologicamente (YAHYA *et al.*, 2000). Diminuição do ganho de peso e eficiência alimentar, enteropatias e diarreias foram atribuídas aos tratamentos com *C. colocynthis* e *N. oleander* administrados isoladamente. Lesões de órgãos foram acompanhadas por leucopenia, anemia e alterações no soro dos níveis de AST, ALT, FA, proteína total, albumina, uréia, bilirrubina e outros constituintes de soro. O grupo tratado com a associação das duas plantas apresentou efeitos mais acentuados e morte.

ATTAWISH *et al.* (2004) utilizaram o protocolo da OMS (2000) e testaram toxicidade crônica de um extrato de *Gynostemma pentaphyllum* usada tradicionalmente para tratamento de hiperlipidemia. De acordo com o protocolo, 90 ratos Wistar machos e 90 fêmeas, foram divididos ao acaso em seis grupos de 15 animais por sexo, sendo um grupo controle que recebeu água, quatro grupos tratados com quatro doses crescentes do extrato aquoso da planta e o sexto grupo tratado com a maior dose. Os animais

foram tratados por 24 semanas. O peso, a ingestão alimentar e o comportamento foram avaliados semanalmente, durante os seis meses de tratamento. O sexto grupo, para restabelecimento, teve o tratamento suspenso 14 dias antes do fim dos seis meses para verificar se o grupo tratado na maior dose teria os casuais efeitos tóxicos reversíveis ou permanentes. Ao final dos seis meses foram avaliados os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os órgãos dos animais foram avaliados macro e microscopicamente. Os resultados mostraram que o extrato não causou toxicidade significativa em ratos durante seis meses de tratamento.

O produto fitoterápico utilizado como digestivo e denominado Ierombina® passou por testes pré-clínicos, onde foi avaliada a toxicidade em ratos e cães, de acordo com a portaria nº 116 de 1996, vigente na época. Concluíram neste estudo, onde foram utilizadas três doses, semelhante à usada em seres humanos, cinco vezes e 25 vezes, que o produto é de baixa toxicidade não tendo causado morte nem alterações significativas nos animais, viabilizando assim, os ensaios clínicos. Em seguida, foram realizados ensaios clínicos toxicológicos referentes à fase I em seres humanos para o registro na ANVISA de acordo com a RDC nº 48 de 2004, vigente na época. De acordo com as Resoluções nº 196 de 1996 (BRASIL, 1996b) e nº 251 de 1997 (BRASIL, 1997) do Conselho Nacional de Saúde, o ensaio clínico toxicológico fase I do tipo randomizado foi realizado com a participação voluntária de indivíduos, após assinarem o Termo de Consentimento livre. Foram utilizados 28 seres humanos, 14 homens e 14 mulheres entre 20 e 40 anos de idade, previamente selecionados, devidamente sadios, tendo sido feita uma avaliação clínica e laboratorial

completa. Os voluntários tomaram uma dose do produto fitoterápico por via oral, três vezes ao dia durante oito semanas. A partir do 1º dia de ingestão até o 7º dia avaliou-se a toxicidade aguda e depois até a 8ª semana, avaliou-se a toxicidade crônica. No 3º e 7º dia, na 3ª e 6ª semana e 24 horas após a 8ª semana de ingestão do produto, os indivíduos (homens e mulheres) foram submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial do seu estado geral no hospital onde foi realizado o estudo. Durante todo o curso da pesquisa, os voluntários foram instruídos a comunicarem aos pesquisadores, qualquer sinal ou sintoma que porventura apresentassem de reação adversa e também receberam um questionário para preencher no caso de reação adversa. Os resultados obtidos demonstraram que os pacientes não apresentaram alterações clínicas, laboratoriais e reações adversas significativas, apenas os níveis de AST e FA no grupo feminino, apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) embora os valores tenham permanecido dentro dos valores de normalidade para indivíduos adultos (PAULO *et al.*, 2009).

2.4 Família Rhamnaceae: gênero *Hovenia*: espécie *Hovenia dulcis*

Rhamnaceae é uma família botânica de plantas angiospérmicas. Embora sua distribuição seja cosmopolita, elas são comumente encontradas em zonas tropicais e subtropicais. Possui 58 gêneros e aproximadamente 900 espécies (LIMA, 2006). Muitas dessas espécies são utilizadas como plantas medicinais de uso popular. Gêneros como *Ampelozizyphus*, *Berchemia*, *Ceanothus*, *Discaria*, *Hovenia*, *Rhamnus*, *Zizyphus*, têm sido

alvo de pesquisas, em busca de comprovar e descobrir novas atividades farmacológicas (ABDEL-ZAHER *et al.* 2005; BHUIYAN *et al.*, 2009; CHIN *et al.*, 2006, DIALLO *et al.*, 2003; ECEVIT *et al.*, 2007; GIACOMELLI *et al.* 2001; 2004; MOREL, *et al.* 1995; ROSAS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2005; VOLPATO *et al.*, 2002)

BAO-JUN *et al.* (2004), em artigo de revisão das bioatividades de *Hovenia dulcis*, consideram que o gênero *Hovenia*, da família Rhamnaceae Coreana, possui três espécies, sendo *Hovenia dulcis*, *Hovenia acerba* e *Hovenia trichocarpa*, e duas variedades para a espécie *Hovenia dulcis*: *Hovenia dulcis* var. *tomentella* Makino e *Hovenia dulcis* var. *koreana* Nakai.

Porém de acordo com o BANCO DE DADOS TRÓPICOS (2010), o gênero *Hovenia* da família Rhamnaceae possui, até o presente, nove espécies diferentes catalogadas. A espécie *Hovenia dulcis* fica assim dividida:

- ***H. dulcis* Thunberg** e seus sinônimos:
 - *H. dulcis* var. *glabra* Makino;
 - *H. dulcis* var. *latifolia* Nakai.
- ***H. dulcis* var. *tomentella* Makino**

Sendo as outras oito espécies:

- *H. acerba* Lindl.
- *H. inaequalis* (sinônimos: *H. acerba* var. *acerba*, *H. dulcis* var. *acerba*, *H. parviflora*, *Ziziphus esquitoli*);
- *H. trichocarpa*

- *H. fulvotomentosa* (sinônimos: *H. trichocarpa* var. *fulvotomentosa*, *H. trichocarpa* var. *trichocarpa*)
- *H. tomentosa*
- *H. robusta* (sinônimos: *H. trichocarpa* var. *robusta*);
- *H. merrilliana*;
- *H. kiukiangensis* (sinônimos: *H. acerba* var. *kiukiangensis*).

Originária do leste da Ásia, com distribuição principalmente na China, Japão, Coréia e áreas do Himalaia, a *Hovenia dulcis* Thunberg foi introduzida no Brasil possivelmente em 1987, quando o Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (CNPFlorestas/EMBRAPA) recebeu, da Academia Chinesa de Florestas, sementes de *Hovenia dulcis* de duas localidades da República Popular da China para fins ornamentais e de reflorestamento (CARVALHO, 1994). São comuns, atualmente, pequenos plantios de uva-do-japão em propriedades agrícolas no sul do país e nas outras regiões ocorre em terrenos baldios e nas proximidades das habitações, de forma isolada ou em pequenos agrupamentos, devido à dispersão de origem zoocórica de suas sementes (CARVALHO, 1994; RIGATTO *et al.*, 2001).

A *Hovenia dulcis* é conhecida popularmente no Brasil, principalmente, por uva-do-japão. Seu nome em inglês é Oriental Raisin tree, no Japão é conhecida por kenponashi e na China por chih-chü, kenan, Zhi Bei Zi (CARVALHO, 1994). Esta espécie é utilizada na medicina tradicional chinesa e coreana no tratamento de doenças do fígado e como agente detoxificante para intoxicação alcoólica e está listada na “Tang Materia Medica”,

compêndio pioneiro da medicina tradicional chinesa que remonta a 659 dC (SHEN et al., 2012). Suas sementes, frutos, raízes, cascas e folhas têm sido usadas no tratamento de vários sintomas patológicos. Popularmente, suas partes vêm sendo utilizadas como diurético, antipirético e para doenças do fígado, asma, bronquite e diarreia. (CASTRO et al., 2002). Seus frutos e pedúnculos frutíferos são considerados antieméticos, antipiréticos, laxativos, diuréticos e calmantes estomacais (SUTTISRI et al., 1995; LI et al., 2005; REN-BO et al., 2007; YOSHIKAWA et al., 1997; HSUN-LANG et al., 2007). A casca da árvore é utilizada para tratar doenças do reto, constipação, convulsão infantil, antispasmodico, febrífugo. (KOLLER et al., 1997).

As outras espécies de *Hovenia* não são encontradas espontaneamente no Brasil e suas bibliografias são bastante escassas. *Hovenia trichocarpa*, encontrada no Japão, tem suas cascas e as folhas utilizadas popularmente para combater sintomas do excesso alcoólico. A casca é usada para preparar desodorantes. Da casca de *H. trichocarpa* foram isolados e elucidados estruturalmente, através de métodos químicos e espectroscópicos, oito glicosídeos fenólicos denominados hovetrichosídeos A-H, um novo triterpeno lupano, ácido hovenico e um glicosídeo abeolupano, dentre outros compostos fenólicos (FIGURA 1) (YOSHIKAWA et al., 1998a; 1998b; 1998c).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos têm revelado promissor potencial bioativo para a espécie *Hovenia dulcis* Thunberg.

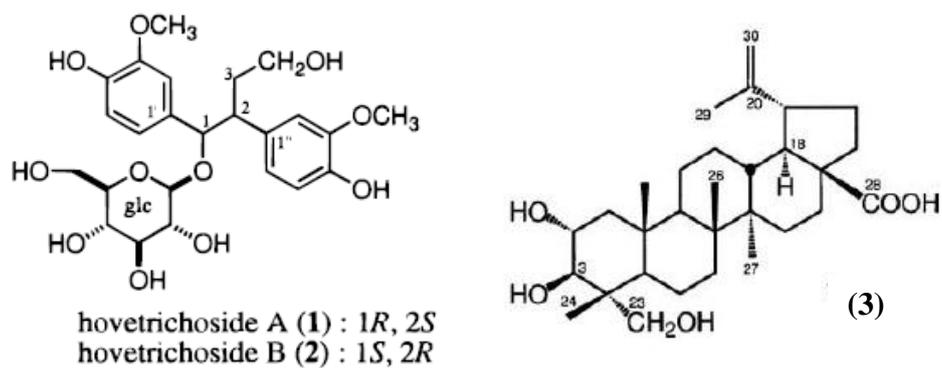


FIGURA 1: 1- hovetrichoside A: 1R, 2S; 2- hovetrichoside B: 1S, 2R; ácido hovenico

Pesquisadores chineses concluíram, em experimento com ratos diabéticos aloxano induzidos, que o tratamento, por sete dias, com extrato de *Hovenia dulcis* reduziu, significativamente, os níveis de glicose e aumentou a formação de glicogênio hepático, quando comparados ao grupo controle diabético (JI *et al.*, 2002).

HIROTAKA *et al.* (2003) registraram a patente de um suplemento alimentar que possui atividade hipoglicemiante. O composto possui, dentre outros, o extrato das sementes de *Hovenia dulcis*. NA *et al.* (2004) registraram a patente de um alimento funcional para prevenção e tratamento da diabetes que contém a fração insolúvel do extrato alcoólico, preferencialmente metanólico, de *Hovenia dulcis* ou polissacarídeos isolados da mesma, como um ingrediente ativo.

Outro estudo comprovou atividade de *H. dulcis* na diabetes. Camundongos hiperglicêmicos, induzidos com estreptozocina e tratados, por seis semanas, com 10mg/kg e 40mg/kg do extrato de *H. dulcis*, apresentaram redução glicêmica e maior tolerância à glicose. A análise histopatológica do pâncreas mostrou que as Ilhotas de Langerhans foram

parcialmente regeneradas quando comparadas ao grupo doente não tratado. Foi observado aumento na quantidade de fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF I e II). Os resultados sugerem que o tratamento auxilia na recuperação de danos causados ao pâncreas pela estreptozocina (JEONG-SANG *et al.*, 2005).

O extrato metanólico dos frutos de *Hovenia dulcis* var. *koreana* Nakai, e suas partições apresentaram atividade antioxidante considerável, em estudo que utilizou a metodologia da atividade sequestrante de radicais livres DPPH (radical 1,1-diphenil-2-picrilhidrazil) e ânion superóxido. A fração acetato de etila obtida do extrato, por ter apresentado maior atividade antioxidante, foi utilizada, no mesmo trabalho, para tratar ratos diabéticos induzidos por estreptozocina. Os níveis de glicose plasmática, triacilgliceróis, colesterol total e peróxido lipídico foram diminuídos nos ratos tratados nas duas doses, 20 e 50mg/kg, durante 24 dias, enquanto que o HDL/colesterol (lipoproteína de alta densidade) e a glutatona foram aumentados, comprovando que o tratamento diminuiu o desequilíbrio entre radicais livres e a atividade antioxidante, causado pela indução com estreptozocina e pelas complicações da diabetes (LEE *et al.*, 2005).

Vários estudos comprovam atividade de *Hovenia dulcis* na redução da intoxicação alcoólica. OKUMA *et al.* (1995) trabalharam com frações do extrato de *H. dulcis* e encontraram que uma das frações na dose de 0,5 g/kg, quando administrada cinco minutos antes da ingestão alcoólica em ratos, promoveu decréscimo de 40 e 37% nos níveis plasmáticos de álcool e acetaldeído, respectivamente. O extrato seco etanólico, na dose de 0,125g/kg de peso corporal, administrado em homens adultos vinte minutos

antes da ingestão alcoólica, diminuiu a concentração alcoólica e acetaldeídica presente na saliva e a concentração alcoólica expiratória foi reduzida em cinco dos oito homens do estudo.

Quatro flavonóides foram isolados das folhas de *H. dulcis* por DING *et al.* (1997) e através de análise espectroscópica e com base em suas propriedades físico-químicas, suas estruturas foram identificadas como dihidrocamferol (isolado no gênero pela primeira vez), quercetina, (+)-3,3',5',5,7-pentahidroflavanona (um novo flavonóide) e (+)-dihidromiricetina (isolada pela primeira vez no gênero)

YOSHIKAWA *et al.* (1997) encontraram atividade inibitória do efeito relaxante muscular induzido por álcool e atividade protetora de lesões hepáticas induzidas por galactosamina/lipopolissacarídeo (DgalN/LPS) ou tetracloreto de carbono (CCl₄), em ratos, na fração metanólica de *Hoveniae Semen Seu Fructus*, produto comercial chinês e japonês à base de frutos com sementes e folhas de *Hovenia dulcis*. Do produto também isolaram e determinaram a estrutura de três novos flavonóides, denominados hovenitinas I, II e III e quatro já conhecidos (+)-ampelopsina (dihidromiricetina), laricetrina, miricetina e (+)-galocatequina. Hovenitina I e (+)-ampelopsina, principais componentes, demonstraram atividade inibitória do efeito relaxante muscular induzido por álcool. Somente hovenitina I demonstrou atividade protetora de lesões hepáticas induzidas.

Um flavonóide ativo, denominado hovenodulinol, extraído da fração butanólica do extrato hidroalcoólico dos frutos de *H. dulcis*, foi patenteado. O processo de obtenção desse composto, sua utilização no alívio dos sintomas do excesso alcoólico e como agente detoxificante alcoólico também foram

registrados pela comprovação da atividade através de experimentos com ratos e humanos (LEE *et al.*, 2002).

CHEN *et al.* (2006) encontraram redução significativa da concentração alcoólica plasmática nas primeiras três horas após tratamento com o extrato aquoso de *H. dulcis* em camundongos, resultado que corrobora os de OKUMA *et al.* (1995) e JI *et al.* (2001). Além disso, acrescentam que o tratamento aumentou a atividade da enzima álcool desidrogenase no fígado, concluindo que o tratamento inibe a absorção e estimula o metabolismo alcoólico. JI *et al.* (2001), que utilizaram os frutos de *H. dulcis*, também detectaram encurtamento no tempo de sono dos ratos em experimento.

NA (2003) patenteou uma composição farmacêutica e/ou alimento funcional contendo a fração insolúvel do extrato alcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* ou um polissacarídeo isolado da fração como um potente hepatoprotetor e ativo contra os sintomas do excesso alcoólico. KIM (2005) patenteou uma composição contendo extrato de *Hovenia dulcis*, extrato de *Lindera obtusiloba* ou contendo o extrato de mistura das duas plantas como ingredientes ativos contra hepatotoxicidade e para melhoramento da função hepática e renal.

Embora a *H. dulcis* seja muito utilizada na medicina popular chinesa e tenha vários estudos comprovando sua ação como detoxificante alcoólico, os constituintes ativos, as frações ativas dos extratos e os mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos. XU *et al.* (2003) compararam a atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH) de frações dos extratos de várias partes da *H. dulcis* utilizando um

analisador conhecido por Microplate. Os resultados indicaram que a fração butanólica dos frutos, acetato de etila do caule e o extrato aquoso das folhas obtidos do extrato hidroalcoólico de cada parte apresentaram elevação na atividade de ADH, enquanto o extrato butanólico e aquoso dos frutos, aquoso do caule e butanólico e aquoso das folhas elevaram a atividade de ALDH.

FANG *et al.* (2007) comprovaram a atividade protetora contra hepatite crônica, induzida por CCl₄, do extrato alcoólico dos frutos de *H. dulcis*, administrado em camundongos oralmente, na doses de 0,5 e 1mg/kg. O extrato promoveu redução de AST e ALT, atenuou a formação de metaloproteinases da matriz celular-I (MMP-I) e a expressão do RNAm de MMP-III, inibiu a peroxidação lipídica, e diminuiu os níveis de malondialdeído, nos rins e no fígado, e hidroxiprolina, no fígado, em 80% e 73%, para a dose de 0,5g/kg e 78% e 74%, para a dose de 1g/kg, respectivamente. Foram encontradas, no mesmo estudo, altas taxas de compostos fenólicos pelo método que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu e leitura em espectrofotômetro a 700nm. Verificaram também elevada atividade antioxidante utilizando o método do DPPH e a relacionaram aos compostos fenólicos presentes no extrato, principalmente aos flavonóides.

Em outro estudo de isolamento e identificação de compostos, HOGIHARA *et al.* (1976) apud INOUE *et al.* (1978) isolaram, por cromatografia de contracorrente, saponinas do extrato metanólico das cascas de *Hovenia dulcis*, que foram denominadas hovenosídeos C, D, G, G' e H. O mesmo grupo de pesquisadores definiu posteriormente a sequência de carboidratos das sapogeninas, denominadas jujubogeninas,

correspondentes às saponinas D, G e I, tendo sido esta última isolada neste estudo (INOUE *et al.*, 1978). O grupo continuou na linha de pesquisa e, em 1981, isolou dez saponinas do extrato metanólico das folhas e identificou as estruturas de três novas, denominadas saponinas C2, D e G (KIMURA *et al.*, 1981). KOBAYASHI *et al.* (1982) elucidaram estruturalmente glicosídeos triterpenóides de saponinas do tipo dammarano e uma lactona monoidratada, classificada como hovenolactona, da *Hovenia dulcis*. HOGIHARA *et al.* (1987) isolaram sapogeninas e jujubogeninas obtidas da saponina D das folhas de *H. dulcis*, por clivagem alcalina da banda glicosídica. Todos estes estudos utilizaram metodologias de reações químicas e evidências espectroscópicas.

Dez glicosídeos, de saponinas hovenolactona e jujubogenina, do tipo dammaranos foram isolados e estruturalmente determinados do extrato etanólico das folhas frescas de *Hovenia dulcis* (Thunb. de I-V e var. *Tomentella* de VI-X), denominados hodulosídeos I - X. Um mM de cada solução contendo um dos glicosídeos I ou VII - IX suprimiram completamente a sensação do sabor doce induzido por 0.2M de sacarose. Os demais apresentaram propriedade inibitória da sensação doce somente em maiores concentrações (YOSHIKAWA *et al.*, 1992, 1993).

SUTTISRI *et al.* (1995) isolaram mais de 40 compostos triterpenóides de estruturas semelhantes das folhas de *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae), *Ziziphus jujuba* (Rhamnaceae) e *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). A estes compostos, ácidos gimnêmicos, jujubosaponinas, hodulosídeos, hovenolactonas, glicosídeos do tipo dammaranos, dentre

outros, foram atribuídas atividades modificadoras de sabor, principalmente inibitórias de sabor doce.

Quatro glicosídeos triterpênicos do tipo dammaranos, denominados hovenidulciosídeos A1, A2, B1, and B2 foram isolados e estruturalmente determinados de *Hoveniae Semen Seu Fructus*, folhas e frutos de *Hovenia dulcis*. A aglicona comum, nos hovenidulciosídeos A1 e A2, também foi determinada, a hovenidulcigenina A. Também se identificou hodulosídeo III e (+)-galocatequina, já conhecidos. Atividade anti-histamínica foi atribuída a todos estes compostos, analisada em células do exsudato peritoneal de ratos induzidos por alergênicos (48/80 e cálcio ionóforo A-23187) (YOSHIKAWA *et al.*, 1995, 1996).

A fração metanólica do extrato aquoso a quente de *H. dulcis* mostrou atividade antioxidante e antimicrobiana. Após sucessivos solventes e colunas cromatográficas de purificação, foram isolados da fração metanólica ativa e identificados, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o ácido vanílico e o ácido ferúlico, que exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e leveduras. O ácido ferúlico exerceu maior atividade sequestrante de radicais livres que o ácido vanílico pelo método do DPPH (CHO *et al.*, 2000).

A fração acetato de etila do extrato metanólico das cascas do tronco de *H. dulcis* exibiu atividade neuroprotetora ($71.3 \pm 8.1\%$) contra neurotoxicidade induzida por glutamato ($5 \mu\text{g/mL}$), em células do hipocampo de camundongos (HT22). Também exibiram atividade antioxidante contra DPPH, ácido 2,2-Azinobis-3-etilbenzotiozolina-6-sulfônico e radical superóxido com IC₅₀ (concentração da substância que inibe 50% da reação)

nos valores de 18.3, 4.9, e 4.0 µg/mL, respectivamente. Oito compostos fenólicos foram isolados nesta fração e identificados por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN): o ácido vanílico, o ácido ferúlico, 3,5-dihidroxiestilbeno, (+)-aromadendrina, metilvanilato, (-)-catequina, ácido 2,3,4-trihidrobencóico e (+)-afzelequina. A (-)-catequina e a (+)-afzelequina, testadas isoladamente, também exibiram atividade neuroprotetora (78.0±6.0% e 73.0±7.8%, respectivamente). Ambas exerceram atividade antioxidante e sequestrante de radicais livres, sendo tal atividade sugerida como mecanismo de ação neuroprotetora. (+)-afzelequina. A (-)-catequina e a (+)-afzelequina foram isolados e identificados pela primeira vez no gênero. (LI *et al.* 2005).

Em estudo de atividade antineoplásica, desenvolvido por CASTRO *et al.* (2002), extratos metanólicos das folhas de *H. dulcis*, germinadas *in vivo* e propagadas *in vitro*, inibiram o crescimento de todas as linhagens neoplásicas testadas, sendo elas: SP2/0 (mieloma de camundongo), Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo), J774 (macrófago de camundongo), P3653 (plasmocitoma de camundongo), BW (timo de camundongo), Erlich (sarcoma induzido por metil colantreno) e MK2 (células epiteliais de rim de macaco). No mesmo estudo foi testada também atividade tripanocida, constatando que o extrato aquoso do fruto e o metanólico das folhas da plantas germinadas *in vivo* foram ativos frente ao parasita *Trypanossoma cruzi* da cepa Y, com percentual de inibição de 95 e 100%, respectivamente.

GADELHA *et al.* (2005) avaliaram o efeito do extrato metanólico e de três frações obtidas das folhas de *H. dulcis* e os resultados demonstraram que a fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *H. dulcis*

reduziu em até 93% o crescimento do parasita *Giardia lamblia* (formas trofozoítas, cepas P1) após tratamento com diferentes concentrações. Evidenciaram também que a fração metanólica, nas doses 1, 10, 50 e 100g/ml, não apresentou citotoxicidade detectável em células mamárias (IEC-6) após 48 horas de tratamento.

Dentre os vários flavonóides encontrados na *Hovenia dulcis*, o PROVITAL GROUP (2006) publicou artigo com ensaios *in vitro* e *in vivo* que comprovam a eficácia da dihidromiricetina como agente redutor de celulite dérmica. Os ensaios *in vitro* detectaram ação na adipogênese, lipólise e lipogênese. Esta ação se deve à inibição seletiva da atividade da tirosina quinase por ligação à subunidade β dos receptores de membrana nos adipócitos. Esta união desencadeia uma série de reações bioquímicas, que aumentam o transporte da glicose através da membrana e ativam ou inativam enzimas, podendo causar mudanças nos níveis de expressão de vários genes.

Resultados do ensaio que utilizou técnica de análise de proteínas *Western blot*, que determinou a expressão do transportador de glicose GLUT 4, sugerem que dihidromiricetina inibe em 40% a indução de GLUT-4 e a capacidade da célula adiposa de promover adipogênese. A atividade de tirosina quinase nas subunidades β dos receptores de membrana é fundamental para o bloqueio da lipólise nos adipócitos. Ocorre a fosforilação de diversas proteínas plasmáticas, que culminam numa cascata de reações que finalmente inibem a lipólise. Resultados do ensaio que também utilizou a técnica de *western blot* demonstram que a molécula de dihidromiricetina bloqueia seletivamente a atividade de tirosina quinase na subunidade β dos

receptores de membrana e de outras proteínas da cascata de reações, causando conseqüente ativação da lipólise, aumentando a degradação de triacilgliceróis em 11.7 vezes, formando ácidos graxos e glicerol. A inibição da proteína quinase e de GLUT 4 provoca diminuição da captação de glicose pelos adipócitos, inibindo a lipogênese. (PROVITAL GROUP, 2006).

O PROVITAL GROUP (2006) sugere, através de ensaios *in vitro*, que a dihidromiricetina atua no metabolismo dos adipócitos diretamente, por catabolismo, estimulando a degradação de lipídeos. Em longo prazo, ela age por bloqueio dos processos anabólicos: bloqueio da lipogênese e inibição da adipogênese. A empresa também realizou estudos *in vivo* de avaliação da densidade dérmica, por aferição dos infiltrados no tecido adiposo da derme de voluntários. Concluíram que, após 28 dias de tratamento, o produto dermatológico testado, à base de dihidromiricetina, causava uma variação da densidade da derme de 11,4% com relação ao grupo placebo. Estudos do perfil toxicológico foram realizados por técnicas de citotoxicidade, irritação dérmica, sensibilização dérmica, irritação ocular e mutagenicidade, sendo que os resultados não foram estatisticamente significativos.

ZANG *et al.* (2003) demonstraram que a dihidromiricetina possui elevada atividade sequestrante do DPPH e inibitória da peroxidação lipídica. Eles propõem que o mecanismo de ação antioxidante seja quelante de Fe²⁺, atuando no sistema de peroxidação lipídica dependente de Fe²⁺. HE *et al.* (2003) corroborou estes resultados testando a inibição da peroxidação lipídica, pela dihidromiricetina, no coração, fígado, homogenato de tecido do cérebro e em mitocôndrias. O flavonóide inibiu peroxidação lipídica no homogenato e nas mitocôndrias de maneira dose dependente. YOO *et al.*

(2005) desenvolveram um novo método de pré-purificação de alta pureza e rendimento para a produção industrial de dihidromiricetina extraída do extrato aquoso dos frutos de *H. dulcis*. Muitos estudos atribuem à dihidromiricetina e aos outros flavonóides, encontrados também na *H. dulcis*, as mesmas atividades encontradas para os extratos da planta. HASE *et al.* (1997) encontraram atividade hepatoprotetora dos frutos de *H. dulcis*, sendo que o extrato metanólico mostrou significativa atividade hepatoprotetora contra toxicidade induzida por CCl₄ em ratos, chamada indução química, e por D-GalN/LPS em camundongos, chamada indução imunológica. Os animais foram tratados com 100mg/kg do extrato, duas vezes na semana, por uma semana antes da indução de toxicidade hepática. (+)-ampelopsina (dihidromiricetina) e miricetina foram isolados do extrato metanólico por metodologia de fracionamento por condução da atividade e análises químicas. Os dois flavonóides foram testados quanto à atividade hepatoprotetora sendo que a atividade foi atribuída à dihidromiricetina uma vez que a miricetina não apresentou atividade hepatoprotetora no experimento.

REN-BO *et al.* (2007) descreveram o isolamento e elucidação de componentes presentes nas frações, a partir do extrato etanólico, de *Hoveniae lignum* (coração do caule de *Hovenia dulcis*) e verificaram o efeito citoprotetor contra toxicidade induzida por tacrina em células derivadas de fígado humano (Hep G2) e contra toxicidade induzida por *ter*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em hepatócitos primários de ratos. Isolaram os compostos fenólicos: floretina, 5-(4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona, (-)-epiafzelechina e maesopsina. A floretina foi hepatoprotetora contra toxicidade

induzida por tacrina em células derivadas de fígado humano (Hep G2) com EC50 de $37,55 \pm 0,42 \mu\text{M}$. O mesmo composto também reduziu a citotoxicidade induzida por *t*-BHP em hepatócitos primários de ratos, diminuindo os níveis de lactato desidrogenase (LDH) e AST.

SHEN *et al.* (2012) encontraram efeitos antialcoólicos para dihidromiricetina, isolada de *Hovenia dulcis*, em modelos animais e determinaram um importante alvo molecular e mecanismo celular contra intoxicação e dependência alcoólica. Demonstraram propriedades farmacológicas de dihidromiricetina consistente com os tratamentos médicos tradicionais. O estudo mostra que a administração oral de 1mg/kg de dihidromiricetina com álcool ou até 30 minutos antes da ingestão de álcool reduziu significativamente o efeito do álcool nos ratos. A dihidromiricetina bloqueou a ligação de neurotransmissores nos receptores GABA, mas não agiu na diminuição dos níveis de álcool no organismo e os pesquisadores acreditam que outros compostos da *Hovenia dulcis* possam ser responsáveis por esses efeitos. Em outra parte do estudo um grupo de ratos recebeu “*ad libitum*”, álcool + dihidromiricetina e água separadamente não mostrando sinais de dependência do álcool ao fim do experimento. O grupo que tinha como escolha somente álcool ou água iniciaram uma dependência alcoólica aumentando o consumo de álcool após 3-4 semanas. Ao introduzir a mistura álcool + DHM no lugar do álcool a quantidade de consumida foi diminuída após uma semana. Os pesquisadores acreditam que a dihidromiricetina é um candidato a medicamento contra o alcoolismo através da prevenção e diminuição da dependência do álcool.

ALVARENGA (2008) realizou a prospecção fitoquímica de acordo com o roteiro sequencial de MATOS (1997), onde foram utilizadas 30 g das cascas, folhas e frutos secos para extração com etanol 70%. As partes foram analisadas separadamente. Os testes determinaram presença de compostos por meio de reações com aparecimento de cor e/ou precipitado. Cascas, folhas e frutos indicaram a presença de taninos, catequinas e saponinas. Bases quaternárias foram positivas ao teste de Drangedorff. As três amostras analisadas não indicaram a presença de antocianinas, antocianidinas e cumarinas. No teste utilizando magnésio em fita e HCl concentrado, foi observado aparecimento, nos frutos e folhas, e intensificação, nas cascas, de cor vermelha, o que indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, na forma livre ou de seus heterosídeos (MATOS, 1997). Os frutos e folhas indicaram a presença de heterosídeos cardiotônicos pelo teste de Kedde; os frutos e cascas indicaram a presença de quinonas, pelo teste de Bornträger. Nas cascas foram detectadas presença de chalconas e auronas por hidrólise alcalina, e alcalóides quando utilizado o reagente de Dragendorff, porém, esse teste foi negativo quando utilizado os reagentes de Hager e Mayer. Casca, folhas e frutos apresentaram reação positiva a esteróides livres; casca e folhas foram positivas também para triterpenóides pentacíclicos livres. Devido às intensas colorações verdes próprias dos extratos das folhas, dificultando a visualização da formação de cor, alguns testes (quinonas, chalconas e auronas, antocianinas e antocianidinas) foram considerados negativos para as folhas (ALVARENGA, 2008). Os resultados dos testes fitoquímicos realizados estão resumidos no QUADRO 1.

BAMPI *et al.* (2010) pesquisaram a composição centesimal do fruto da uva-do-japão que foi feita com base na matéria seca, sendo os resultados convertidos para matéria úmida. Os açúcares redutores e não redutores foram determinados pelo método de Lane-Eynon, utilizando solução de Fehling (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). Dos açúcares totais encontrados, 19,46g em 100g, o teor de açúcares redutores (glicose e frutose) foi 12,57g em 100g, superior ao teor de açúcares não redutores (sacarose) 6,89g em 100g.

No mesmo trabalho BAMPI *et al.* (2010) avaliaram o teor de umidade do fruto desidratado em estufa a 60°C até peso constante que foi 54,08g em 100g, tendo sido determinado pelo método da secagem em estufa (105°C±5°C), de acordo com metodologia da AOAC (2007). As cinzas foram obtidas a partir do princípio da incineração em mufla a 550°C, até a obtenção de peso constante (AOAC, 2007) tendo o teor de cinzas de 2,16g em 100g, valor elevado indicando grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg nos frutos. A determinação de proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl, tendo sido o resultado 3,74g em 100g (AOAC, 2007). O extrato etéreo ou lipídios totais foram determinados pelo método de extração de Soxhlet, segundo a AOAC (2007) e apresentaram baixo teor de lipídios (1,42g em 100g). O teor de fibra alimentar total, 12,56g em 100g, foi determinado pelo método enzimático gravimétrico, segundo AOAC (2007). O valor calórico (kcal/100g) foi determinado aplicando os valores de conversão de ATWATER que considera 4kcal/g para proteínas e açúcares totais e 9kcal/g para lipídios (ANDERSON, 1988). Uma vez que o fruto apresentou um teor de fibra alimentar superior a 3g em 100g, pode ser classificado

como “fonte de fibras”, de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1998d). O alto conteúdo de fibra alimentar da amostra estudada também contribuiu para diminuição do valor calórico calculado (105,56g em 100g). O trabalho auxilia no controle de qualidade para produção de alimento dos pedúnculos (“frutos”) de *Hovenia dulcis*, com exclusão das cápsulas e sementes, porém é esperada uma diferença nos resultados de outras amostras uma vez que as amostras são de diferentes estádios de maturação, variedade, época do ano ou mesmo procedência.

QUADRO 1: Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico 70% das cascas, folhas e frutos de *Hovenia dulcis*

| Prospecção | Cascas | Folhas | Frutos |
|----------------------------|--------|--------|--------|
| Alcalóides | S | O | o |
| Antocianidina/antocianina | O | S | o |
| Antranóis | O | O | o |
| Auronas | ++ | S | o |
| Bases quaternárias | ++ | S | s |
| Catequinas | ++ | + | ++ |
| Chalconas | ++ | S | o |
| Cumarinas | O | O | o |
| Esteróides | ++ | ++ | ++ |
| Fenóis simples | +++ | +++ | +++ |
| Flavonóides | ++ | ++ | ++ |
| Heterosídeos cardiotônicos | O | ++ | ++ |
| Quinonas | ++ | S | ++ |
| Saponinas | +++ | +++ | +++ |
| Taninos | +++ | +++ | +++ |
| Triterpenóides | ++ | ++ | o |
| Xantonas | ++ | ++ | ++ |

Forte +++; Médio ++; Fraco +; Ausente o; suspeito s.

Fonte: adaptado de Alvarenga, 2007.

O fruto da árvore *Hovenia dulcis* é uma cápsula globosa seca, formada por três loculares, contendo as sementes. O pedúnculo respectivo é carnoso e tem coloração castanha escura, sendo geralmente chamado “fruto” (FIGURA 2). É bem consumido pela fauna silvestre e utilizado para complementar a alimentação de suínos e aves (CARVALHO, 1994; BAMPI, *et al.* 2010).



FIGURA 2: Pedúnculo (a) + fruto (b), conjunto chamado “fruto”; Folha (c); Fruto propriamente dito - cápsula globosa (d); galho com pedúnculo, fruto e semente (e); sementes (f).

Fontes: <http://www.waterwereld.nu/hoveniaeng.php>;

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hovenia_dulcis_herceg_novi.jpg

KEYLER *et al.* (2002) determinaram o potencial de toxicidade e segurança de um fitopreparado, denominado NPI-028, contendo plantas da medicina tradicional chinesa, historicamente utilizadas no tratamento da intoxicação alcoólica. O fitopreparado é composto principalmente por *Pueraria lobata* e *Citrus reticulata*, e suplementado com outras cinco plantas, *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Hovenia dulcis*, *Silybum marianum*, e *Stevia rebaudiana*. As doses de 0.0, 0.5, 1.0 e 2.0, incorporadas à ração dos animais, foram administradas diariamente em ratos durante treze semanas e

os efeitos adversos foram analisados. Anormalidades físicas e comportamentais foram analisadas durante todo o experimento e ao final dos três meses os animais foram eutanasiados para análise sanguínea química (sódio, potássio, cloreto, cálcio, fósforo, dióxido de carbono, ânion gap, glicose, colesterol, triglicerídeos, ferro, tiroxina, hormônio estimulante da tiróide (TSH), uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulina, bilirrubina total, direta e indireta, AST, ALT e fosfatase alcalina) e hematológica e análise histológica dos órgãos (cérebro, coração, pulmão, fígado, rim, baço, gordura retroperitoneal e a musculatura do quadríceps).

Nenhuma anormalidade física ou comportamental foi observada nos ratos durante o experimento. Os parâmetros hematológicos não apresentaram qualquer alteração. Na análise histológica os órgãos não apresentaram alteração com relação ao grupo controle. Lesões no pulmão e rins foram mais comuns, porém encontradas tanto nos grupos tratados quanto no grupo controle, demonstrando que tais lesões são comuns em ratos de laboratório. Na análise química dos parâmetros TSH, TG, FA, uréia, creatinina, proteínas totais e globulina pequenas variações foram encontradas, porém foram distribuídos entre os grupos, tratados e não tratado, não refletindo correlação com o tratamento. Os autores relataram em dado não demonstrado que nenhuma toxicidade aguda (administração de dose única oral de 20,0g/kg) em ratos foi observada. O fitopreparado foi considerado seguro no tratamento dos ratos no período de três meses (KEYLER *et al.*, 2002).

Revisando a literatura, não foi encontrado nenhum relato acerca de estudos toxicológicos da *Hovenia dulcis*, separadamente. No entanto,

ALVARENGA (2008) encontrou resposta inflamatória, ao nível hematológico, com células brancas aumentadas em coelhos diabéticos tratados com extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* e em coelhos com ferida de pele induzida tratados com gel a base de extrato hidroalcoólico da casca da mesma planta, sugerindo que os animais possam ter apresentado resposta imunológica alérgica ou inflamatória sistêmica. Tal resultado poderia ser atribuído às várias saponinas e derivados triterpenóides encontrados principalmente nas cascas, porém estudos mais aprofundados são necessários para qualquer conclusão neste sentido.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* (EHF), adotando como protocolo o "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS", da RE nº 90, de 16 de março de 2004 (ANEXO I), utilizando dose única e doses repetidas em ratos.

3.2 Específicos

- a) Elaborar uma revisão bibliográfica integrativa nos bancos de dados sobre a *Hovenia dulcis* e quadros que resumem os principais

compostos metabólicos isolados e as principais atividades farmacológicas da planta;

- b) Preparar o extrato hidroalcoólico seco dos frutos de *Hovenia dulcis*;
- c) Determinar o teor de umidade do extrato preparado (padronização);
- d) Determinar o teor do flavonóide ativo dihidromiricetina no extrato preparado (padronização);
- e) Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico seco, padronizado, dos frutos de *Hovenia dulcis*;
- f) Preparar as formulações farmacêuticas, na forma de suspensão oral simples, adequada ao tratamento de ratos, em doses pré-determinadas;
- g) Determinar a segurança, para a formulação fitoterápica, através do teste de toxicidade aguda (de dose única) de acordo com a RE nº 90 de 2004 da ANVISA;
- h) Determinar a segurança, para a formulação fitoterápica, através do teste de toxicidade crônica (de doses repetidas) de acordo com a RE nº 90 de 2004 da ANVISA;
- i) Avaliar os parâmetros comportamentais, bioquímicos e hematológicos dos animais nos experimentos toxicológicos, de acordo com a RE nº 90 de 2004 da ANVISA.
- j) Avaliar anátomo-histologicamente (macro e microscopicamente) os órgãos sugeridos na RE nº 90 de 2004 da ANVISA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapa Botânica

Os pedúnculos contendo os frutos e sementes da *Hovenia dulcis* (40Kg), sendo este conjunto denominado “frutos” também neste trabalho, foram coletados maduros de árvore adulta (FIGURA 3) localizada no município de Perdões, em Minas Gerais, sob as coordenadas 21°05′38.51″S e 45°05′24.75″O, em abril de 2010.



FIGURA 3: Árvores de *Hovenia dulcis* usadas para coleta dos pedúnculos frutíferos, frutos e sementes.

O material coletado foi lavado, seco à sombra e submetido à desidratação em estufa de ventilação forçada, sob temperatura de 40°C, até estabilização do peso, sendo triturado em liquidificador industrial. O material com granulometria reduzida foi depositado em erlenmeyers e adicionados de extrator hidroalcoólico (1:1) em quantidade suficiente para cobrir os frutos. A cada sete dias o líquido extrator foi filtrado e novo líquido extrator foi adicionado, processo este realizado até exaustão do material, conforme metodologia descrita por SIMÕES, 2004. O extrato filtrado dos frutos teve seu volume reduzido em evaporador rotatório à temperatura controlada até 40°C. O extrato hidroalcoólico, após remoção do etanol em rota-evaporador, foi liofilizado por aproximadamente 72 horas, dando origem a cristais melados altamente higroscópicos, denominado extrato hidroalcoólico seco dos frutos de *Hovenia dulcis* (EHF). O extrato foi imediatamente pesado e armazenado em frasco plástico opaco com agente dessecante (sílica gel) na tampa.

4.2 Etapa Fitoquímica

Realizou-se uma revisão integrativa na literatura científica sobre a *Hovenia dulcis*, que foi resumida de em dois quadros (QUADROS 2 e 3) contendo a classificação, o nome, a estrutura, a citação bibliográfica dos componentes encontrados e isolados da planta, a atividade farmacológica atribuída à planta, a parte da planta e extrato. Os QUADROS 2 e 3 estão apresentados nos resultados.

Para o levantamento dos artigos na literatura, de 2006 a 2012, realizou-se uma busca nas bibliotecas digitais pelo portal dos periódicos CAPES, Google acadêmico (Scholar); nas bases de dados Lilacs, Medline, SciELO, Elsevier e Springer. Foram utilizados, para busca dos artigos diversos descritores e suas combinações nas línguas portuguesa e inglesa: “família Ramnaceae”, “Hovenia”, “descriptor.pdf”, “Hovenia+componente químico”, “Hovenia+toxicidade” dentre outros. A busca em base de dados foi ampla e diversificada, contemplando a procura em bases eletrônicas, busca manual em periódicos, as referências descritas nos estudos selecionados, o contato com pesquisadores e a utilização de material não publicado. Foram incluídos todos os estudos encontrados e tanto a análise quanto a síntese dos dados extraídos dos artigos foram realizadas de forma descritiva (SOUZA, 2010).

4.2.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A Determinação da atividade antioxidante do EHF, pelo método do DPPH, radical 1,1-diphenil-2-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich®), foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de SINGH, *et al.* (2002).

Foi determinada, no mesmo ensaio, a atividade antioxidante do flavonóide dihidromiricetina* (DHM), sabidamente ativo nos extratos de *Hovenia dulcis*.

Duas concentrações de amostra do EHF (200 e 400 ppm), e duas concentrações da amostra da DHM (200 e 400 ppm), foram solubilizadas em

metanol PA (Merck®) e misturadas a 5,0 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM. O BHA (Vetec®), butilhidroxianisol conhecido e potente antioxidante, foi utilizado para comparação das atividades. Para isso, o BHA nas concentrações de 25 e 50 ppm foram misturados a 5,0 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM. Os tubos foram agitados e a leitura foi realizada nos tempo 0 e 30 minutos. O controle negativo foi preparado utilizando-se apenas a solução metanólica de DPPH 0,1 mM. O metanol foi utilizado como branco. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Femto®) no comprimento de onda de 517 nm, em triplicata.

A porcentagem da atividade antioxidante (% AAT) foi calculada pela fórmula: % AAT = [(Abs controle – Abs amostra) / Abs controle] x 100 (SINGH, *et al.*, 2002).

* (Myriceline SPE 90®: lote 501435; código do laudo 7531000G; 92,2% de pureza; extraída e concentrada de *Myrica cerifera* L.).

4.3 Etapa Farmacotécnica

4.3.1 Preparo da fórmula e forma farmacêutica

Modo de preparo:

O Nipagin e o Nipasol foram solubilizados em água destilada. A solução foi aquecida e incorporada à carboximetilcelulose sob agitação; o EHF foi levigado em graal com o propilenoglicol e um pouco de água destilada; o gel de carboximetilcelulose foi vertido no graal até fluidificação;

mistura foi transferida para um cálice e o volume completado com água destilada; após homogeneização, a suspensão foi embalada e rotulada.

Fórmula da suspensão:

| | |
|--------------------------------|--------------|
| EHF | q.s. (doses) |
| Propilenoglicol | 20% |
| Nipagin | 0.1% |
| Nipasol | 0.05% |
| Gel de carboximetilcelulose 1% | 30% |
| Água destilada q.s.p | 100% |

4.3.2. Padronização do Extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* (EHF)

4.3.2.1 Teor de umidade do EHF

O teor de umidade do EHF foi estabelecido conforme normas oficiais da Farmacopeia Brasileira 4ed., pelo método gravimétrico de determinação da perda de umidade por dessecação. Foram pesadas em balança analítica (modelo AdventurerTM; OHAUS®) cápsulas de vidro contendo 3 amostras do extrato e colocadas em estufa de ventilação forçada à temperatura controlada de 105 °C. As amostras foram pesadas após duas horas e de

quatro em quatro horas até estabilização do peso (diferença menor que 0,5mg/g) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

4.3.2.2 Identificação e doseamento do flavonóide dihidromiricetina (DHM) no EHF

Identificação e doseamento da DHM no EHF foi baseada na metodologia adaptada de SEUNG *et al.* (2005).

O procedimento foi realizado, em ambiente com temperatura controlada a 30°C, através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/CLAE), utilizando cromatógrafo líquido Waters Alliance 2695, com detector Waters UV/vis 2996, coluna C18 Waters Symmetry (150mmx4,6mmx5µm) e pré-coluna C18 Waters Symmetry (10 x 3,9-4 µm). Foi utilizada eluição por gradiente água:acetonitrila (Merck®) de 90:10 v/v a 30:70 v/v, com vazão de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 50 µL, e o efluente foi monitorado pelo detector arranjo de diodos - PDA (190-600 nm). A eluição foi controlada por software Waters. Todos os solventes utilizados foram de alta pureza (padrão HPLC) e filtrados os solventes orgânicos em membrana de politetrafluoretileno (22 µm de poro, 13 mm de diâmetro PTFE) e a água em membrana de éster de celulose (0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro, Millipore) e desaerados em banho de ultra-som (Quimis®).

Para a identificação do flavonóide no EHF, o EHF e o padrão do flavonóide dihidromiricetina (Myriceline SPE 90®) foram solubilizados em água:metanol (7:3) gerando amostras em concentrações de 50,0 e 1,0

mg/mL, respectivamente. As amostras foram filtradas com filtros RC 0,45 µm (Sartorius®), diretamente nos *vials* do aparelho.

Para obtenção da curva-padrão de dihidromiricetina preparou-se solução estoque de dihidromiricetina em água: metanol (7:3) na concentração 50 µg/mL, a partir da qual, por diluições sucessivas, foram obtidas as concentrações de 25,0, 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 µg/mL, todas em triplicata e filtradas com filtros RC 0,45 µm. A curva analítica foi obtida por regressão linear (área do pico *versus* concentração do padrão), utilizando-se os seis pontos da solução padrão.

Para o doseamento, preparou-se solução do EHF em água: metanol (7:3) na concentração 50,0 mg/mL, em triplicada e procedeu-se a análise cromatográfica, nas mesmas condições já descritas. As áreas obtidas foram substituídas na equação da curva analítica, gerando as concentrações do flavonóide presentes nas três amostras de extrato. Resultado expresso em média e desvio padrão.

4.4 Etapa de Estudos pré-clínicos

A metodologia foi realizada de acordo com a RE nº90 de 2004 da ANVISA (ANEXO I), adotando-se como protocolo o "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS".

4.4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, de ambos os sexos, pesando em média 200 gramas, todos provenientes do Biotério da Universidade Federal de Viçosa e mantidos no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV, alojados em caixas individuais climatizadas, com ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade 45-65%.

Os ratos foram tratados com água e ração comercial balanceada (Purina[®]) *ad libitum*, e permaneceram por 7 dias devidamente alojados para adaptação ao ambiente antes do início dos experimentos.

Os seguintes experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na experimentação animal (CEEA), da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, editados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob protocolo nº 009/2010 (ANEXO 2).

4.4.2 Experimento 1: Toxicidade de dose única (aguda)

Foi avaliada a toxicidade em ratos após exposição a uma dose única administrada no primeiro dia do experimento, após os 7 dias de adaptação dos animais. Ratos adultos, com peso médio inicial de 150g as fêmeas e 200g os machos.

Foram utilizados 6 ratos machos e 6 ratas fêmeas por grupo. E foram 2 grupos (G1 e G2):

- G1 (grupo tratado): Tratados com a suspensão manipulada com o EHF na dose de 6 g/kg de peso corporal;

- G2 (grupo controle): Tratados com o veículo da suspensão farmacêutica.

A forma farmacêutica (suspensão) foi determinada para administração oral (gavagem orogástrica) e a dose do G1, que foi 20x a maior dose do experimento de toxicidade crônica, sendo a maior dose possível de ser administrada em dose única.

Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, intensidade, progressão e reversibilidade destes sintomas foram observados e registrados. Foram adotados os seguintes parâmetros: aparência geral, alteração da locomoção, frequência respiratória, roncos e chiados, cianose, ptose, frêmito vocal, irritabilidade, autolimpeza, piloereção, diarreia, sialorréia, lacrimação, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, ataxia, excitabilidade do sistema nervoso central, tremores, contorções abdominais, micção, defecação, morte. Os parâmetros foram avaliados através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 pontos, ou bipolares variando de 0 a 8 pontos, sendo 4 o valor representante da normalidade (CRAVEIRO *et al.*, 2008).

Os animais foram observados e tiveram as alterações registradas durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas. Depois do primeiro dia, no qual ocorreu o tratamento, foram observados diariamente durante 14 dias após administração, em período diurno e no mesmo horário. A variação de peso e o consumo de ração foram aferidos diariamente.

Ao fim do período de observação todos os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos nos quais foram observadas alterações nas necrópsias foram coletados para análise histopatológica.

Os procedimentos para eutanásia e tratamento dos órgãos coletados foram idênticos aos explicados no experimento 2.

4.4.3 Experimento 2: Toxicidade de doses repetidas

Foram utilizados 10 machos e 10 fêmeas de ratos em idade jovem adulta para cada uma das 3 doses, e mais 10 machos e 10 fêmeas para o grupo controle (tratado com veículo inerte da formulação), tratados por via oral (gavagem orogástrica) durante 12 semanas, totalizando 80 ratos.

Foram 4 grupos (G):

- G1: Tratados com a suspensão manipulada com o EHF na dose de 100mg/kg de peso corporal;
- G2: Tratados com a suspensão manipulada com o EHF na dose de 200mg/kg de peso corporal;
- G3: Tratados com a suspensão manipulada com o EHF na dose de 300mg/kg de peso corporal;
- G4: Tratados com o veículo da suspensão manipulada (controle).

Durante o experimento foram observados e registrados:

1. Alterações comportamentais (diariamente);
2. Variação do peso corpóreo (semanalmente).

Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados e foi realizado em todos os animais:

1. Hemograma completo;
2. Análises bioquímicas do sangue (sódio, potássio, gama-glutamiltanspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, glicose, proteínas totais e bilirrubina);
3. Exames anatomopatológicos (macroscópicos dos órgãos);
4. Coleta dos seguintes órgãos: fígado, rim, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestino, testículo ou ovário, pâncreas e adrenal.

Os exames histopatológicos foram realizados nos animais tratados com a maior dose. O material retirado dos animais, de todos os grupos, permanecerá em estado de conservação, imersos em etanol 70%, por no mínimo cinco anos.

4.4.3.1 Eutanásia dos animais, coleta do sangue e órgãos

Todo o procedimento foi acompanhado pelo médico veterinário Luis Eugênio Franklin Augusto (CRMV:11169).

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, após jejum de 12 horas. O sangue de cada animal foi recolhido por punção cardíaca, após eutanásia, com auxílio de uma seringa de 5 mL. A amostra de sangue de cada animal foi dividida em três tubos de ensaio separados:

- Tubo 1: para análise da glicose plasmática, contendo fluoreto de sódio, que é um estabilizador enzimático (inibidor da glicólise) e EDTA (anticoagulante).
- Tubo 2: para hemograma completo, com anticoagulante EDTA.
- Tubo 3: para análise dos parâmetros bioquímicos, com ativador de coágulo (soro).

Os tubos 1 e 3 foram centrifugados a 7100 x g durante 15 minutos para obtenção do plasma e soro. O hemograma completo e as dosagens de Na e K, por fotômetro de chamas (B462 – Micronal®), foram realizadas no laboratório de análises clínicas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As amostras sanguíneas, após homogeneização manual, foram analisadas em contador hematológico automático (Human®) para a mensuração dos seguintes parâmetros: leucócitos/ μL , hemácias/ μL , hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (%), índice de anisocitose eritrocitária (RDW), plaquetas/ μL , plaquetócrito (%), volume plaquetário médio (fL), índice de anisocitose plaquetária (PDW). A dosagem de hemoglobina foi realizada em espectrofotômetro modelo E-225D (Celm®). Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer, e o hematócrito determinado pela técnica do microhematócrito de SCHALM *et al*, 1986 (Centrimicro Mod.211; Fanem®) e a mensuração das proteínas plasmáticas por meio de refratometria (Clinical refratometers no 140, Fuji®) (OLIVEIRA, 2009).

Os demais parâmetros bioquímicos foram dosados em autoanalisador multiparamétrico de Bioquímica denominado Alizé, da marca Lisabio [série

B652]. Métodos de análise: enzimático colorimétrico ou cinético. Kits paramétricos: Bioclin®.

Três machos e três fêmeas de cada grupo foram selecionados, ao acaso, para terem seus órgãos removidos inteiros e aferidos os pesos em balança (modelo Adventurer™; OHAUS®).

Pequenos fragmentos dos órgãos descritos acima foram coletados de todos os animais, após coleta do sangue, e pesagem dos órgãos quando selecionado. Os fragmentos dos órgãos foram acondicionados em cassetes, devidamente identificados e mergulhados em solução preparada de formol (Vetec®) a 10%, tamponado, tendo permanecido nesta solução por 48 horas.

As lâminas foram confeccionadas no laboratório de histopatologia da União de Ensino Superior de Viçosa (UNIVIÇOSA - MG), onde as peças foram cortadas em tamanho adequado e em seguida procedeu-se as concentrações de álcool sequenciais (Vetec®) para desidratação, diafanização com xilol (Merck®) e impregnação e inclusão em parafina (OMA®) para confecção dos blocos. Os blocos foram seccionados em micrótomo (modelo CUT 4062; Slee Mainz®), em espessuras de 4 µm, e as lâminas (OMA®) foram confeccionadas e coradas com HE/hematoxilina e eosina (SP Labor®), segundo os métodos habituais.

A análise histopatológica das lâminas de fígado, rim, coração e pulmão foram qualitativas e quantitativas (histomorfometria) e os demais órgãos foram analisados qualitativamente, com auxílio de histologista e histopatologista treinados. A principal finalidade da análise histopatológica foi avaliar a integridade tecidual dos órgãos extirpados. Dentre os principais

parâmetros investigados estão lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, hiperemia, congestão, hemorragia, edema e fibrose (CUNHA *et al*, 2009).

Para análise morfométrica do fígado, rim, pulmão e coração, a fotodocumentação foi realizada em software de captura de imagem (Leica DM5000®), usando ocular de 10x e objetiva de 40x (0,5mm diâmetro do campo explorado pela objetiva) associado ao software de análise de imagens Image Pro-plus 4.5 (Media Cybernetcs®), devidamente calibrado (área da fotomicrografia: $11,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$). Foram capturadas 10 imagens aleatórias de cada fragmento de órgão, das quais foram selecionadas seis, para morfometria. Os parâmetros morfométricos do fígado, rim, pulmão e coração foram expressos em densidade de volume (Vv) por contagem do pontos sobre intersecções e aplicação na fórmula (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003): V_v (média e desvio padrão) = PP (estrutura contada) / PT (total de intersecções).

Os demais órgãos, analisados qualitativamente, tiveram as imagens capturadas no mesmo equipamento com ocular de 10x e objetiva de 40x, com exceção do estômago e intestino dos quais foram capturadas as imagens com objetiva de 20x.

Para análise do fígado foram contadas intersecções da grade sobre núcleo e citoplasma dos hepatócitos, capilares sinusóides e células intersticiais (100 intersecções). Cinquenta células aleatórias, coincidentes com cinquenta intersecções pré-definidas nas imagens (para cada rato), foram selecionadas para contagem de gotículas de gordura (CRUZ-ORIVE, 1990; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Para análise do rim, na região cortical foram contadas intersecções da grade sobre glomérulo, túbulo, interstício e vaso; na região medular foram contadas intersecções da grade sobre interstício, parede de túbulo e luz de túbulo (72 intersecções). Foi contado o número total de glomérulos nas imagens (nº de glomérulo/área) (CRUZ-ORIVE, 1990; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Para análise do pulmão foram contadas intersecções da grade sobre septo e espaço aoveolar (300 intersecções). Foi medida a área da superfície do epitélio (24 arcos), contando as intersecções dos arcos sobre superfície do epitélio. O resultado foi calculado através da fórmula (CRUZ-ORIVE, 1990; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; NOVAES et al, 2012):

$$S_v = 2 \times I / L_t$$

Onde:

S_v = densidade da superfície alveolar (mm^2/mm^3)

I = número de intersecções sobre superfície alveolar

L_t = comprimento do arco ($44,9 \mu\text{m}$)

Para análise do coração foram contadas intersecções da grade sobre cardiomiócitos, interstício (célula intersticial e interstício) e vasos (72 intersecções). Foram contados os núcleos (em imagem negativa) para celularidade (células totais/área) e medida a área média da secção horizontal dos cardiomiócitos (20 células por animal) (CRUZ-ORIVE, 1990; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

4.4.4 Análises estatísticas

Para os resultados de peso dos animais, consumo de ração, hematologia e bioquímica sanguínea as variáveis foram testadas quanto a sua normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e quanto a sua homogeneidade pelo teste de *Levene*, onde todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade. Foram aplicados os testes paramétricos teste *T de Student* para comparar médias de dois grupos independentes; Análise de Variância (ANOVA), seguida do *Post Hoc de Dunnet* e *Post Hoc de Tukey*, para comparar médias dos grupos tratados com o controle. Para a análise da variação do peso durante as semanas, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas. Considerou-se nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). O software estatístico utilizado foi o SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0. Para as análises quantitativas do fígado, rim, pulmão e coração foram realizados teste *U de Mann-Whitney* para não paramétricos e comparação de dois grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa Botânica

A identificação e exsicata do material botânico estão depositadas no herbário José Badini, da Universidade Federal de Ouro Preto, sob registro OUPR 21003.

O processo de secagem do EHF forneceu um material cristalizado muito higroscópico, que durante sua retirada do liofilizador já foi

incorporando água do ambiente, adquirindo aspecto de melão. O material foi pesado imediatamente, para cálculo da dosagem do produto final.

Os 40 quilos de frutos coletados tiveram um rendimento de 50% na desidratação a 40 °C. O rendimento do EHF em relação ao total de fruto desidratado foi aproximadamente 24%.

BAMPI *et al.* (2010) avaliaram o teor de umidade do fruto desidratado em estufa a 60°C até peso constante que foi 54,08g em 100g, tendo sido determinado pelo método da secagem em estufa (105°C±5°C), de acordo com metodologia da AOAC (2007).

Os extratos secos são preparações farmacêuticas que tem por objetivos concentrar as substâncias, reduzir as posologias e aumentar o prazo de validade e conservação de algumas drogas ou estão voltadas para a separação dos ativos efetivamente envolvidos nos efeitos terapêuticos, fracionando-se os extratos, retirando-se ou minimizando-se a presença de compostos indesejáveis (MARQUES, 2005). São obtidos pela eliminação total da fase líquida ou pela incorporação de solução extrativa em matriz sólida, com posterior secagem (SONAGLIO *et al.*; 2007).

Entre as técnicas comumente empregadas para obtenção de extratos secos vegetais a partir de soluções extrativas ou extratos moles, há as que empregam baixa temperatura, como a liofilização e outras que envolvem o uso do calor, como a secagem em estufas, leiteo fluidizado e aspensão (spray-drying) (LIST; SCHIMIDT, 1989).

Os vários tipos de secagem podem ser comparados sob os pontos de vista tecnológico, industrial e econômico, mas certamente a temperatura de secagem, o tempo, o custo de operação e as características do produto final

são os parâmetros determinantes na escolha do método. Não há um método ideal que combine menor tempo e baixa temperatura, porém, a secagem por aspersão consome menos tempo, e apesar de utilizar altas temperaturas, ainda mostra-se viável para a secagem de produtos termolábeis, pela rápida exposição ao calor (LIST; SCHIMIDT, 1989), porém o rendimento é mais baixo. A técnica de spray-drying tem sido amplamente utilizada na pesquisa e desenvolvimento de formas farmacêuticas, uma vez que os sólidos obtidos podem ser incorporados diretamente em formulações de comprimidos, granulados, cápsulas, preparações semissólidas ou ainda como forma farmacêutica final. Para obter extratos com maior concentração de constituintes químicos e melhores características tecnológicas, esta técnica vem se destacando na produção de extratos secos vegetais visando à aplicação na indústria de fitoterápicos (AULTON, 2005). Não foi utilizada, pois a finalidade não era forma sólida de medicamento e necessitava-se de maiores rendimentos para experimentação em animal.

5.2 Etapa Fitoquímica

O conhecimento prévio das principais classes de componentes químicos encontrados nos vegetais é importante, pois pode fornecer uma relação dos seus principais metabólitos e direcionar a pesquisa em busca de atividades farmacológicas e toxicológicas. A abordagem fitoquímica, além de facilitar a escolha do material a ser posteriormente estudado, permite ao pesquisador a possibilidade de adaptar as técnicas de fracionamento de

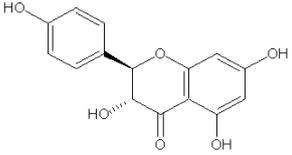
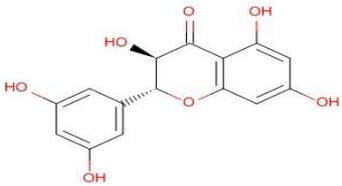
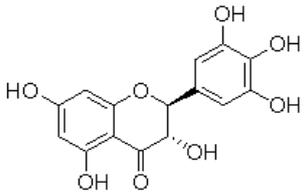
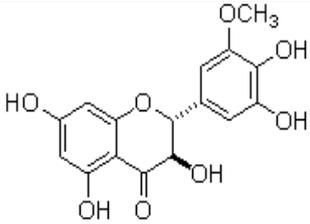
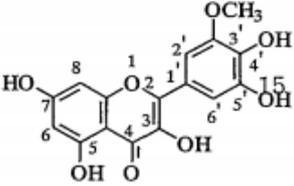
extratos e isolamento e caracterização de substâncias puras, de acordo com a natureza dos constituintes previamente detectados (MATOS,1997).

A revisão integrativa é um método que proporciona a síntese de conhecimento e a incorporação da aplicabilidade de resultados de estudos significativos na prática. É a mais ampla abordagem metodológica referente às revisões, permitindo a inclusão de estudos experimentais e não-experimentais para uma compreensão completa do fenômeno analisado. Combina também dados da literatura teórica e empírica, além de incorporar um vasto leque de propósitos: definição de conceitos, revisão de teorias e evidências, e análise de problemas metodológicos de um tópico particular. Diante da necessidade de assegurar pesquisas embasadas em evidências científicas, a revisão integrativa tem sido apontada como uma ferramenta ímpar no campo da saúde, pois sintetiza as pesquisas disponíveis sobre determinada temática e direciona a prática e as pesquisas futuras fundamentando-se em conhecimento científico (Souza *et al.*, 2010).

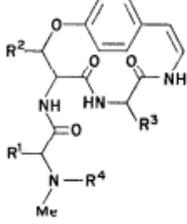
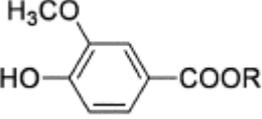
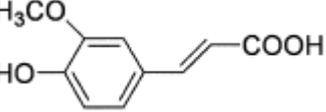
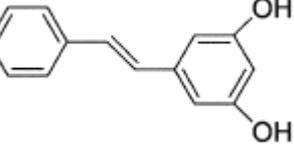
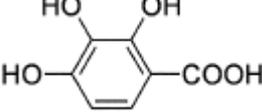
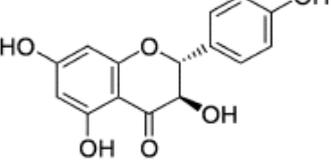
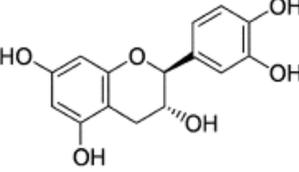
A revisão integrativa realizada sobre a *Hovenia dulcis* está apresentada no item 2.4 e ao longo da discussão desta tese. Os QUADROS 2 e 3 resumem a revisão.

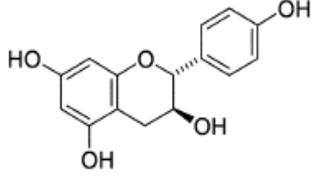
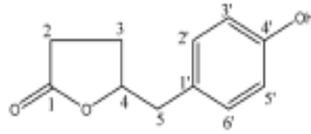
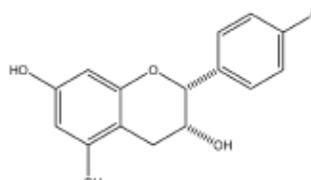
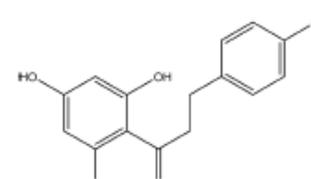
QUADRO 2: Compostos isolados e identificados da *Hovenia dulcis*

| Referência | Parte da planta | Classe composto | Nome composto | Estrutura química |
|------------|-----------------|-----------------|---------------|-------------------|
|------------|-----------------|-----------------|---------------|-------------------|

| | | | | |
|----------------------|---|------------|--|---|
| DING et al., 1997 | sementes | flavonoïde | Dihidrocanferol |  |
| | | | Quercetina |  |
| | | | (+)-3,3',5',5,7-penta-hidroflavanona (novo composto) |  |
| | | | (+)-dihromiricetina ou (+)-ampelopsina |  |
| | | | Hovenitina I, II, III (novo composto) |  |
| Laricetrina |  | | | |

| | | | | |
|--|--|--|--|-----------------------|
| YOSHIKAWA et al., 1997 | frutos e sementes | flavonóide | Miricetina | |
| | | | (+)-galocatequina | |
| | | | (+)-dihidromiricetina ou (+)-ampelopsina | Idem DING et al. 1997 |
| SHEN et al., 2012 | X | flavonóide | (+)-dihidromiricetina ou (+)-ampelopsina | Idem DING et al. 1997 |
| LEE et al., 2002 | frutos | flavonóide | Hovenodulinol | |
| INOUE et al., 1978 KIMURA et al., 1981 KOBAYASHI et al., 1982 HOGIHARA et al., 1987 YOSHIKAWA et al., 1992; 1993; 1995; 1996 SUTTISRI et al., 1995. | folhas, casca do caule e casca da raíz | várias saponinas e derivados de triterpenóides | Ex: Saponina E e H | |

| | | | | |
|---|-----------------------|----------------------------|---|--|
| <p>KAWAI et al., 1977 TAKAI, et al., 1973</p> | <p>casca da raíz</p> | <p>alcalóide peptídico</p> | <p>Frangulanina (I), Hovenina-A (II) and Hovenina-B</p> |  <p>(I) R⁴ = Me (II) R⁴ = H</p> |
| <p>CHO et al., 2000</p> | <p>X</p> | <p>composto fenólico</p> | <p>Ácido ferúlico</p> | <p>Ídem LI et al. 2005</p> |
| | | | <p>Ácido vanílico</p> | <p>Ídem LI et al. 2005</p> |
| <p>LI et al., 2005</p> | <p>casca do caule</p> | <p>composto fenólico</p> | <p>Ácido vanílico (R=H) e metil vanilato (R=CH₃)</p> |  |
| | | | <p>Ácido ferúlico</p> |  |
| | | | <p>3,5-dihidroxi-estilbeno</p> |  |
| | | | <p>2,3,4-ácido trihidrobenzóico</p> |  |
| | | | <p>(+)-aromadendrina</p> |  |
| | | | <p>(-)-catequina</p> |  |

| | | | | |
|------------------------|---------------------|----------------------|--|--|
| | | | (+)-afzelequina |  |
| REN-BO et al., 2007 | coração do caule | composto fenólico | 5-(4'- hidroxifenil)- γ - valerolactona |  |
| | | | (-)-epiafzelequina |  |
| | | | Floretina |  |

QUADRO 3: Atividades farmacológicas dos extratos de *Hovenia dulcis*

| Atividade farmacológica | Extrato e/ou fração do extrato | Referência |
|-------------------------|--------------------------------|------------|
|-------------------------|--------------------------------|------------|

| | | |
|---|--|--|
| Hipoglicêmica e antidiabética | extrato (não especificado) | JI et al., 2002 DON et al., 2005 JEONG-SANG et al., 2005 |
| | extrato das sementes | HIROTAKA et al., 2003 |
| | fração insolúvel do extrato alcoólico dos frutos | SOO et al., 2004 |
| | fração acetate de etila do extrato metanólico dos frutos | LEE et al., 2005 |
| Desintoxicante alcoólica e/ou hepatoprotetora | fração do extrato (não especificado) e extrato etanólico seco (triagem clínica em humanos) | OKUMA et al., 1995 |
| | extrato dos frutos (não especificado) | CHEN et al., 2006 JI et al., 2001 |
| | fração insolúvel do extrato alcoólico dos frutos | NA et al., 2002 |
| | extrato (não especificado) | KIM, 2007 |
| | frações de extratos de várias partes | XU et al., 2003 |
| | extrato alcoólico dos frutos | FANG et al., 2007 |
| | fração metanólica das sementes e frutos | YOSHIKAWA et al., 1997 |
| | extrato metanólico dos frutos | HASE et al., 1997 |
| Hepatoprotetora contra citotoxicidade <i>in vitro</i> | extrato etanólico do coração do caule | REN-BO et al., 2007 |
| Antioxidante | extrato metanólico dos frutos e sua fração acetato de etila | LEE et al., 2005 |
| | extrato alcólico dos frutos | FANG et al., 2007 |
| | fração metanólica do extrato aquoso à quente | CHO et al., 2000 |
| | fração acetate de etila do extrato metanólico da casca do caule | LI et al., 2005 |
| Inibidora do sabor doce ou modificadora de sabor | extrato etanólico da casca do caule e das folhas frescas e extrato aquoso das folhas | YOSHIKAWA et al., 1992; 1993. SUTTISRI et al., 1995. HUSSAIN et al., 1990 KENNEDY et al., 1988. |
| Anti-histamínica | glicosídeos triterpênicos isolados das sementes e frutos | YOSHIKAWA et al., 1995; 1996 |
| Antimicrobiana | fração metanólica do extrato aquoso à quente | CHO et al., 2000 |
| Neuroprotetora | fração acetate de etila do extrato metanólico da casca do caule | LI et al., 2005 |
| Anti-tumoral <i>in vitro</i> | extrato metanólico das folhas jovens | CASTRO et al., 2002 |
| Tripanocida <i>in vitro</i> | extrato aquoso dos frutos e metanólico das folhas | CASTRO et al., 2002 |
| Antiparasitária contra giardíase <i>in vitro</i> | extrato metanólico das folhas e suas frações hexânica, diclometânica e acetate de etila | GADELHA et al., 2005) |

5.2.1 Determinação da atividade antioxidante

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar (amostra ou padrão), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. A porcentagem de atividade antioxidante (%AAT) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (amostra ou padrão) que pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco. Os radicais livres de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorbância (SOUSA, *et al*, 2007; BORGES, *et al*. 2011).

O método do DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como os compostos fenólicos. O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um

modo estequiométrico. A baixa absorvência indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS *et al*, 2007).

As porcentagens encontradas de atividade antioxidante, pelo método do DPPH, para o EHF, DHM e BHA estão apresentadas na TABELA 3.

O percentual de atividade antioxidante da dihidromiricetina 400 ppm encontrado foi de $82,53\% \pm 0,68$, atividade elevada embora menor que o valor encontrado no estudo de ZHANG *et al.* (2003), que foi de 91,5% para a mesma concentração de dihidromiricetina (0,04% ou 400ppm). Porém deve-se observar que a atividade do BHA não foi 100% no presente trabalho. A dihidromiricetina apresentou elevado potencial antioxidante comparado ao BHA, porém a dose necessária é mais alta que a dose do BHA.

ZHANG *et al.* (2003) demonstraram, ainda, que a dihidromiricetina possui elevada atividade inibitória da peroxidação lipídica. Eles propõem que o mecanismo de ação antioxidante seja quelante de Fe^{2+} , atuando no sistema de peroxidação lipídica dependente de Fe^{2+} .

O EHF apresentou atividade antioxidante, ou sequestrante de radicais livres, de $23,82\% \pm 1,60$ na dose de 400ppm. FANG *et al.* (2007) determinaram a atividade antioxidante do extrato alcoólico seco dos frutos de *Hovenia dulcis*, de acordo com metodologia que determina a quantidade de antioxidante (amostra e padrão) necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, usando 0,1 mM de metanol (como controle) ou solução de teste. O extrato etanólico dos frutos de *H. dulcis* apresentou concentração de 0,94 mg/ml. A catequina (padrão) apresentou a mesma atividade na concentração de 5,42 $\mu\text{g} / \text{ml}$. LEE *et al.* (2005) e FANG *et al.* (2007) consideraram a atividade antioxidante do extrato do fruto de

Hovenia dulcis relevante e atribuíram esta atividade à capacidade elevada de peroxidação lipídica do extrato e ao teor elevado de compostos fenólicos encontrados no mesmo (27.2 µg/mg).

TABELA 3: Porcentagem da atividade antioxidante (DPPH) do EHF, do flavonóide padrão dihidromiricetina (DHM) e BHA.

| AMOSTRAS (ppm) | MÉDIA ± DESVIO PADRÃO |
|-----------------------|------------------------------|
| EHF (200) | 16,65% ± 1,94 |
| EHF (400) | 23,82% ± 1,60 |
| DHM (200) | 51,31% ± 0,72 |
| DHM (400) | 82,53% ± 0,68 |
| BHA (25) | 40,27% ± 1,59 |
| BHA (50) | 76,97% ± 0,96 |

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Eles atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: impedem a formação dos radicais livres, inibindo as reações em cadeia com o ferro e o cobre; são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a ligação dupla dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e os carotenóides, são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres (BIANCHI; ANTUNES,1999).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons, que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. A concentração,

principalmente de radicais superóxidos e hidroxila, pode elevar-se devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres, é chamado estresse oxidativo e desempenha papel importante nos mais variados processos patológicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade, dentre outras, de sequestrar os radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

5.3 Etapa Farmacotécnica

5.3.1 Preparo da fórmula e forma farmacêutica

Para o tratamento dos animais nos experimentos da etapa pré-clínica foi escolhida a forma farmacêutica de suspensão, para administração oral, devido ao EHF não ter sido pulverizado, não podendo, portanto, ser encapsulado, e também por ser mais facilmente administrado por gavagem. O EHF foi parcialmente insolúvel em água, descartando-se, portanto, a possibilidade de manipulação de soluções.

O EHF foi administrado no experimento de toxicidade de doses repetidas em 3 doses (100, 200 e 300 mg/kg de peso corporal) e no experimento de dose única na dose de 6 g/kg, que foi 20x a maior dose do

experimento de toxicidade crônica e a maior dose possível. Porém não causou morte dos animais para cálculo da DL₅₀.

A Dose Letal 50% (DL₅₀) é a dose única que causa a morte em 50% dos animais, sendo expressa em peso da substância teste por unidade de peso do animal experimental (g/kg). O valor da DL50 é usado como um índice para a classificação toxicológica, fornecendo subsídios para estudos de avaliação de risco da exposição humana. Deste modo, este padrão visa a detecção e avaliação do potencial tóxico, para o homem, de qualquer substância ou produto químico acabado, ao qual possa estar exposto. Por meio da observação e quantificação do número de mortes, o valor da DL50 é calculado após a administração única de uma substância ou produto químico por diferentes vias de administração em ratos ou camundongos (BIGUETHI *et al.*, 2004).

As formulações foram manipuladas considerando-se o peso médio inicial dos ratos (150 g) e a menor quantidade possível de suspensão a ser administrada por tratamento (inicialmente 0,5 ml). Com o ganho de peso dos animais as doses foram calculadas e ajustadas na seringa de tratamento.

As doses do experimento de toxicidade em doses repetidas foram selecionadas levando-se em consideração que JI *et al.* (2002) utilizaram três doses em seu experimento para atividade hipoglicemiante, 50, 100 e 200 mg/kg de peso corporal em camundongos, sendo este o trabalho comparado aos outros encontrados na literatura o que utilizou as maiores doses do extrato, sua maior dose foi considerada a dose média para os ensaios pré-clínicos no presente trabalho.

Nas formulações das suspensões, propilenoglicol foi utilizado para auxiliar na levigação e solubilização do EHF. Nipagin e nipasol foram utilizados, em mínimas concentrações, como conservantes, somente no experimento de doses repetidas cuja duração foi de 3 meses e a carboximetilcelulose foi o agente suspensor.

5.3.2. Padronização do Extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* (EHF)

Uma maneira de conferir ao medicamento fitoterápico qualidade, eficácia e confiabilidade é a utilização de extratos padronizados. Extratos padronizados são aqueles em que o teor de um ou mais constituintes é ajustado a valores previamente definidos. O ajuste do teor pode ser obtido por diluição do extrato com o solvente utilizado na extração, pela adição de adjuvantes tecnológicos ou por concentração de extratos diluídos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

A utilização de extratos secos padronizados, em que os componentes químicos do vegetal são ajustados em níveis concentrados e conhecidos, apresenta-se como solução para a manutenção do esquema posológico. Os extratos devem ser produzidos utilizando condições definidas de extração, e a padronização serve para assegurar lote a lote as especificações do teor de ativos, em relação aos quais os ensaios pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia foram estabelecidos e documentados (FERREIRA; LEITE, 2009).

Além disso, as plantas estão sujeitas às variações de sua composição química como alteração do teor de princípios ativos ou surgimento de novas

substâncias devido a diversas variáveis que estão expostas durante seu crescimento, sua coleta, secagem, armazenamento e processo de extração, o que justifica a padronização do extrato para posterior produção do medicamento fitoterápico (HOSTETTMANN, *et al.* 2003).

5.3.2.1 Teor de umidade do EHF

O teor de umidade foi determinado para padronização do extrato e para contribuir com o estabelecimento de rotinas que facilitem o controle de qualidade do extrato finalizado. O material obtido no processo de extração foi um mel bastante espesso e foi considerado finalizado (“seco”) uma vez que não houve possibilidade de retirar mais água do extrato sem alterar suas características utilizando altas temperaturas.

Cada uma das 3 amostras perdeu 0,4g ($X=1,47\pm 0,12$) de umidade até estabilização do peso (as amostras sofreram 4 pesagens), significando que a perda de umidade por dessecação do extrato foi de 21,4%, de acordo com os resultados apresentados na TABELA 4 e nos cálculos demonstrados.

De acordo com a farmacopeia são considerados extratos moles aqueles que apresentam entre 15 e 20% de umidade. Abaixo deste valor o extrato pode ser firme se apresentar entre 10 e 15% de umidade e seco se apresentar entre 5 e 10% de umidade, sendo que acima de 20% o extrato é considerado líquido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000).

Porém, para as finalidades do EHF, este foi considerado seco uma vez que foi exaurido no referente à perda de água, para cálculo de dosagens para os estudos farmacológicos e toxicológicos, sem perda de atividade.

Uma vez que não há monografias oficiais para padronização do extrato de *Hovenia dulcis*, foi considerado no presente trabalho o teor de umidade do EHF padronizado em até 21,4%.

TABELA 4: Determinação do teor de umidade do EHF: Medida do peso de cada amostra nos tempos determinados

| Amostra (g) | 0h | 2h | 6h | 10h | 14h | 18h |
|-------------|------|------|------|------|------|------|
| a | 1,80 | 1,54 | 1,53 | 1,44 | 1,41 | 1,41 |
| b | 2,00 | 1,76 | 1,71 | 1,62 | 1,59 | 1,59 |
| c | 1,80 | 1,52 | 1,45 | 1,41 | 1,40 | 1,40 |

t= 0h: peso da amostra inicial; t=tempo em horas; g = gramas

Média de peso inicial das amostras = 1,87

Média de da perda da umidade = 1,87 – 1,47 = 0,4g

Umidade g%= $\frac{\text{peso da umidade(g)} \times 100}{\text{peso da amostra inicial}} = 21,4\%$

5.3.2.2 Identificação e doseamento do flavonóide dihidromiricetina no EHF

Os perfis do extrato hidroalcoólico seco dos frutos, e da dihidromiricetina estão caracterizados nos cromatogramas das FIGURAS 4 e 5, respectivamente. De acordo com a FIGURA 4 foi possível visualizar no perfil cromatográfico do EHF o maior pico, no tempo de retenção ente 6-8 min. O pico da DHM (FIGURA 5), também apresentou tempo de retenção

semelhante. O cromatograma da DHM demonstrou acentuada pureza formando pico único no tempo de retenção próximo de 8 min.

O pico A, maior pico do perfil cromatográfico do EHF, apresentou absorção em 292,2 nm, no seu espectro UV (FIGURA 6a). Absorção idêntica ocorreu para o pico da DHM (FIGURA 6b). Resultado que confirma a presença da DHM no EHF da formulação testada nos experimentos pré-clínicos.

Estes resultados corroboram os apresentados por DING *et al.* e por YOSHIKAWA *et al.*(1997), que encontraram o flavonóide DHM, dentre outros, nos frutos e folhas de *Hovenia dulcis*. ALVARENGA (2008) demonstrou a presença da DHM na fração acetato de etila da casca do tronco de *H. dulcis*.

Para o doseamento da DHM no EHF, a curva-padrão de dihidromiricetina gerou a equação da reta de regressão linear $y = 4E+08x - 117007$, $R^2 = 0,9996$ e sua representação gráfica está na FIGURA 7.

Do cálculo da média das áreas dos picos de 3 amostras do EHF na equação da reta (y) juntamente com a média das concentrações das amostras (x) foi obtido o teor médio de dihidromiricetina de $470,0 \pm 12,14$ µg/grama de EHF. O teor pode parecer baixo porque não reflete o teor de flavonóides totais do extrato e sim de um único flavonóide escolhido.

VEIGA (2008) isolou dois flavonóides do extrato etanólico bruto de *Jatropha gossypifolia* L., o pião-roxo, que foram denominados Jg1 e Jg2. Na quantificação destes flavonóides, por HPLC, as concentrações encontradas foram 340 e 406µg/ml do extrato, respectivamente.

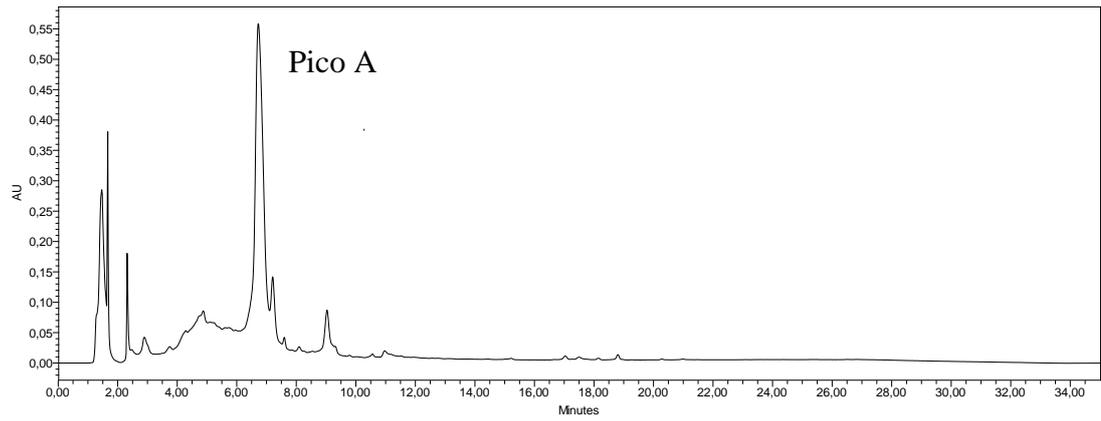


FIGURA 4: Perfil cromatográfico do EHF em HPLC

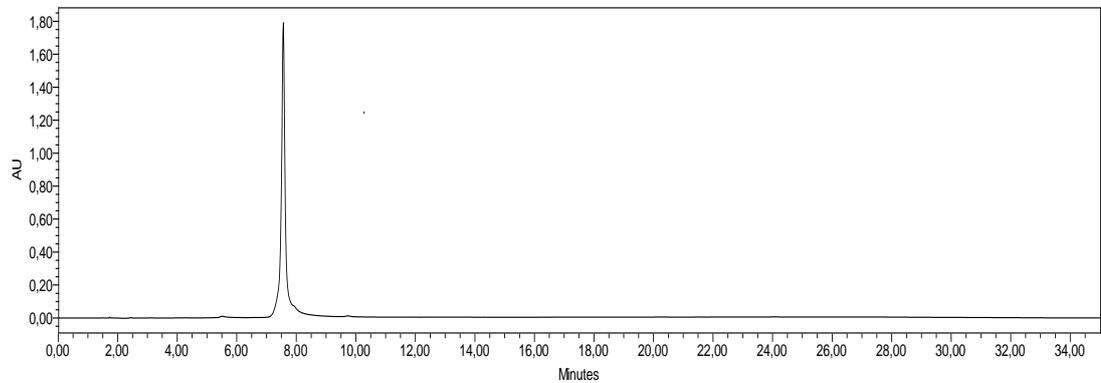


FIGURA 5: Perfil cromatográfico do padrão de DHM em HPLC

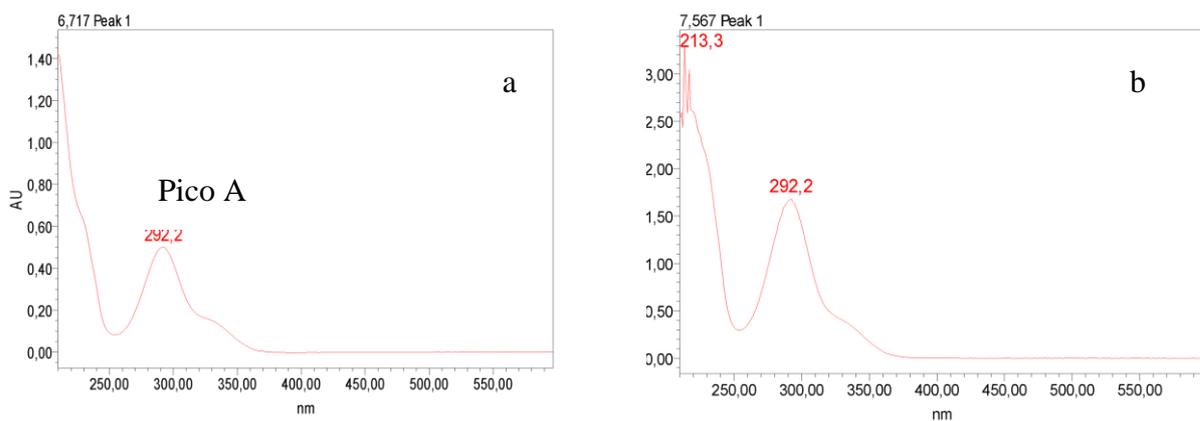


FIGURA 6: Absorção no espectro UV do pico A do EHF (a) e da DHM (b)

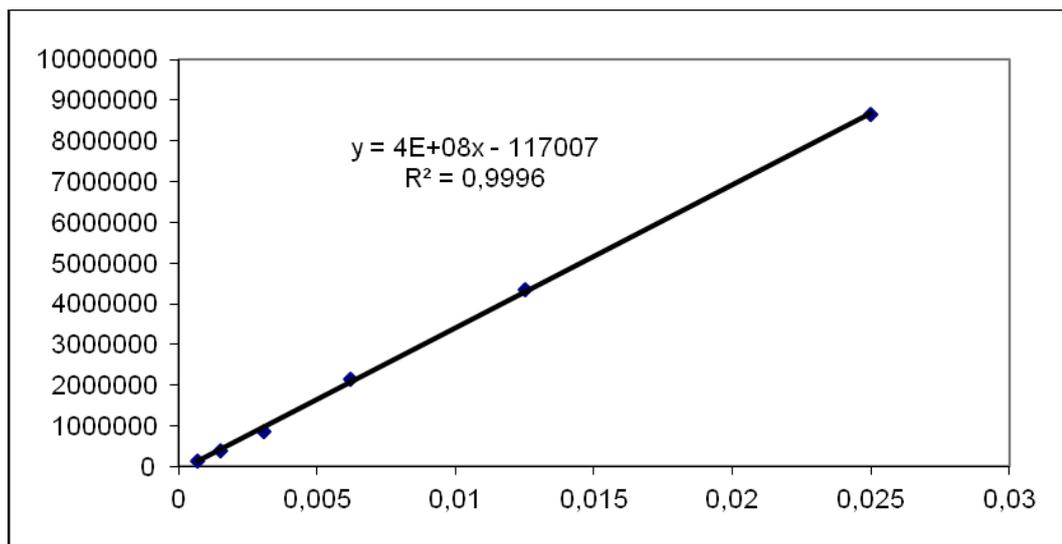


FIGURA 7: Curva-padrão de dihidromiricetina (x=área; y=concentração)

Não foi encontrado na literatura resultado de quantificação de um flavonóide específico em extratos concentrados de *Hovenia dulcis*. A metodologia espectrofotométrica de referência usada aqui foi desenvolvida por SEUNG *et al* (2005) para isolamento e pré-purificação da dihidromiricetina dos frutos de *Hovenia dulcis*. Os pesquisadores obtiveram, no melhor resultado 1,345 mg de DHM, partindo de 16g de biomassa (fruto, *in natura*, liofilizado e moído) com 50% de pureza e 71,8% de rendimento.

Muitas das atividades farmacológicas encontradas para a *Hovenia dulcis* também foram verificadas para o flavonóide DHM isolado, como efeito anticarcinogênico, anti-inflamatório, hepatoprotetor, contra intoxicação alcoólica, antioxidante, antimicrobiano, antihipertensivo, (LI-PING *et al.*, 2005; SHEN *et al.* 2012).

YU *et al.* (2011) desenvolveram uma metodologia que otimizou um processo ultrassônico utilizado para extração dos flavonóides totais do extrato alcoólico concentrado das sementes de *Hovenia dulcis* que resultou em rendimento de $0.819 \pm 0.003\%$ de flavonóides totais.

A análise do teor dos principais componentes biologicamente ativos em matérias primas de origem vegetal e de fitoterápicos é uma etapa essencial para a segurança e eficácia de sua utilização na elaboração de produtos farmacêuticos. A quantificação de substâncias ativas em fitoterápicos ainda é realizada de forma incipiente devido à presença de um fitocomplexo ativo nas plantas e seus extratos (WILLIAMSON, 2001). O uso de extratos padronizados centrados em grupos específicos de princípios ativos visa garantir a homogeneidade química do produto lote a lote, para melhoria da qualidade (CAPASSO *et al.*, 2000). Os princípios ativos selecionados para esse processo de ajuste de qualidade devem ser aqueles que são importantes para as ações biológicas e farmacológicas do produto, se conhecidos (CALIXTO, 2000).

A quantificação da dihidromiricetina, nesse contexto, foi necessária para padronizar o EHF, utilizado em formulação farmacêutica para os experimentos exigidos para registro do fitoterápico. No entanto, de acordo com a regulamentação vigente para registro de fitoterápicos, a RDC nº 14 de 2010, ainda será necessária a validação da metodologia por espectrofotometria capaz de quantificar a dihidromiricetina presente no EHF e no produto acabado, para que possa ser usada rotineiramente nos laboratórios de controle de qualidade. No Brasil a RE nº 899, de 2003, traz a “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003; 2010a).

5.4 Etapa de Estudos pré-clínicos

5.4.1 Experimento 1: Toxicidade de dose única (aguda)

5.4.1.1 Análise comportamental

Os ratos foram numerados de 1 a 24, sendo de 1-6 fêmeas do G1 (tratado), de 7-12 fêmeas do G2 (controle), de 13-18 machos do G1 e de 19-24 machos do G2. Uma ficha, contendo o QUADRO 4, de sinais e sintomas clínicos, foi preenchida para cada animal, contendo também o número de identificação do rato e um espaço para observações gerais e outros sinais e sintomas que não constavam no quadro. Toda a avaliação foi realizada pelo mesmo observador.

Até 15 minutos após a administração da dose do fitopreparado, todos os animais, dos dois grupos apresentaram aumento na atividade de autolimpeza (anotações entre 5-7). A partir dos 30 minutos até 1 hora após o tratamento todos apresentaram ligeira diminuição da excitabilidade normal (entre 2 e 3). Estes sinais não foram atribuídos ao tratamento uma vez que os animais do grupo controle (G2) também os apresentaram, sendo, portanto atribuídos à manipulação dos animais.

Uma hora depois do tratamento o rato 18 (macho e tratado – G1) apresentou aumento na defecação (anotação 6), que não persistiu e sendo somente um animal não foi considerado relevante. Oito horas após o tratamento o rato 9 (fêmea e controle – G2) apresentou secreção nasal transparente que persistiu até 24 horas após o tratamento, sinal anotado nas observações.

Nos dois primeiros dias todas as anotações foram normais. No terceiro dia os ratos 4 (fêmea; G1) e 13 (macho; G1) apresentaram diarreia (anotação 2). O rato 4 apresentou diarreia até o quarto dia (anotação 3) e os ratos 20 e 24 (machos; G2) também apresentaram diarreia no quarto dia, não persistente (anotação 2).

No quinto dia após o tratamento o rato 15 (macho G1) apresentou diarreia não persistente (anotação 3) e o rato 13 (macho; G1) apresentou diminuição na autolimpeza (anotação 2), voltando ao normal no sexto dia. No sexto dia o rato 21 (macho; G2) apresentou diarreia não persistente (anotação 2) e até o décimo segundo dia todas as anotações foram normais. No décimo terceiro dia os ratos 22 e 23 (machos; G2) apresentaram diarreia (anotação 2) que não persistiu até o último dia. O único sinal que foi recorrente foi diarreia, analisada pela apresentação de sujidades na região perianal ou na gaiola. Mas não foi atribuída ao tratamento uma vez que se apresentou nos dois grupos em proporções semelhantes.

Não houve morte durante os 14 dias de experimento.

5.4.1.2 Análise ponderal e de consumo de ração

A evolução ponderal diária média dos ratos dos grupos G1 e G2 estão apresentadas na TABELA 5, dividida em machos e fêmeas de cada grupo. Não houve diferença significativa comparando-se o ganho de peso dos animais machos e fêmeas entre os grupos G1 e G2.

A FIGURA 8 (a1 e a2) mostra a linearidade da evolução ponderal dos machos e fêmeas, muito semelhantes entre os grupos G1 e G2. O ganho de peso das fêmeas, nos dois grupos, durante 14 dias após o tratamento foi de

180 à 215g, aproximadamente, e dos machos de 185 à 255g, aproximadamente.

O consumo de ração diário médio dos ratos dos grupos G1 e G2 estão apresentados na TABELA 6, dividida em machos e fêmeas de cada grupo. Apenas no 9º dia após o tratamento, o consumo dos machos do G2 foi significativamente maior que o consumo dos machos do grupo G1. Esse dado não foi considerado relevante.

A FIGURA 8 (b1 e b2) mostra o consumo médio de ração dos machos e fêmeas, muito semelhantes entre os grupos G1 e G2. Os gráficos do consumo de ração de machos e fêmeas apresentaram desenho semelhante variando apenas a quantidade média de ração diária sendo superior para os machos.

O ganho de peso semelhante em ambos os grupos e sexos e o consumo de ração homogêneo reflete um comportamento normal e saudável dos animais tratados e controles.

QUADRO 4: Ficha de sinais e sintomas apresentados pelo rato _____ no experimento de toxicidade aguda

| Sinais e sintomas | normal | 0 | 1/4h | 1/2h | 1h | 4h | 8h | 12h | 16h | 20h | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d | 8d | 9d | 10d | 11d | 12d | 13d | 14d |
|----------------------------|--------|---|------|------|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Aparência geral | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Frequência respiratória | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Roncos e chiados | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Frênilo vocal | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Irritabilidade | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Autolimpeza | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Excitabilidade do SNC | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alteração da locomoção | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alteração do tônus muscul. | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ataxia | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Piloereção | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Diarréia | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sialorréia | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lacrimação | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hipnose | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tremores | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cianose | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ptose | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Convulsão | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Contorções abdominais | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Micção | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Defecação | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Morte | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia da escala de 1 a 4; Testes com anotação normal “4” a intensidade do efeito pode variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle, e de 5 a 8 quando ocorrer aumento. h= hora; d= dia; muscul. Muscular

TABELA 5: Evolução ponderal média dos ratos (g), dos grupos G1 e G2, de machos e fêmeas, durante 14 dias

| | Fêmeas | | | Machos | | |
|----|-----------------------|-----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| | G1 | G2 | Valor de p | G1 | G2 | Valor de p |
| | Média ± desvio padrão | Média ± desvio padrão | | Média ± desvio padrão | Média ± desvio padrão | |
| 0 | 185,266 ± 5,020 | 182,883 ± 10,653 | 0,631 | 187,250 ± 13,712 | 186,633 ± 16,206 | 0,945 |
| 1 | 187,166 ± 5,587 | 185,550 ± 11,657 | 0,766 | 191,300 ± 13,932 | 189,866 ± 16,589 | 0,874 |
| 2 | 189,666 ± 6,656 | 187,300 ± 09,916 | 0,638 | 195,283 ± 12,878 | 193,500 ± 16,340 | 0,838 |
| 3 | 191,816 ± 7,485 | 190,133 ± 10,972 | 0,763 | 200,166 ± 15,917 | 198,616 ± 15,718 | 0,869 |
| 4 | 193,716 ± 6,861 | 192,383 ± 11,059 | 0,807 | 207,066 ± 14,615 | 206,133 ± 16,122 | 0,918 |
| 5 | 194,416 ± 5,556 | 196,166 ± 11,932 | 0,751 | 211,183 ± 14,615 | 210,083 ± 15,565 | 0,901 |
| 6 | 196,766 ± 8,093 | 198,250 ± 11,201 | 0,798 | 218,883 ± 15,791 | 214,916 ± 15,329 | 0,668 |
| 7 | 198,900 ± 7,054 | 199,883 ± 10,854 | 0,856 | 221,266 ± 16,169 | 220,200 ± 14,230 | 0,906 |
| 8 | 202,083 ± 8,273 | 203,166 ± 12,131 | 0,860 | 226,683 ± 17,562 | 227,133 ± 13,445 | 0,961 |
| 9 | 202,183 ± 7,753 | 204,683 ± 12,123 | 0,679 | 229,866 ± 16,085 | 231,700 ± 12,180 | 0,828 |
| 10 | 204,791 ± 8,781 | 206,766 ± 12,065 | 0,752 | 236,016 ± 17,260 | 237,008 ± 11,149 | 0,911 |
| 11 | 207,400 ± 9,965 | 208,850 ± 12,171 | 0,826 | 242,166 ± 18,558 | 242,316 ± 10,539 | 0,987 |
| 12 | 209,283 ± 9,328 | 209,716 ± 10,685 | 0,942 | 242,366 ± 17,810 | 244,333 ± 10,001 | 0,818 |
| 13 | 211,850 ± 8,657 | 214,333 ± 13,025 | 0,705 | 249,383 ± 18,378 | 250,400 ± 8,513 | 0,905 |
| 14 | 213,883 ± 8,633 | 214,600 ± 13,388 | 0,914 | 252,133 ± 18,151 | 254,000 ± 8,269 | 0,823 |

G1 (ratos tratados com a suspensão do EHF); G2 (ratos tratados com veículo – grupo controle)

*p < 0,05 (não houve diferença significativa comparando-se G1 e G2 no mesmo dia)

TABELA 6: Consumo médio alimentar (g), dos ratos dos grupos G1 e G2, de machos e fêmeas, durante 14 dias

| Dias | Fêmeas | | | Machos | | |
|------|-----------------------|-----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| | G1 | G2 | Valor de p | G1 | G2 | Valor de p |
| | Média ± desvio padrão | Média ± desvio padrão | | Média ± desvio padrão | Média ± desvio padrão | |
| 1 | 19,900 ± 1,994 | 19,083 ± 1,880 | 0,482 | 23,550 ± 2,911 | 21,650 ± 4,879 | 0,432 |
| 2 | 16,216 ± 2,349 | 15,666 ± 2,084 | 0,677 | 18,433 ± 2,313 | 16,900 ± 2,200 | 0,267 |
| 3 | 17,400 ± 2,226 | 15,433 ± 1,890 | 0,130 | 20,316 ± 2,659 | 19,000 ± 2,636 | 0,409 |
| 4 | 17,866 ± 1,767 | 17,550 ± 1,143 | 0,720 | 23,066 ± 2,199 | 21,966 ± 1,583 | 0,344 |
| 5 | 15,000 ± 1,069 | 16,566 ± 1,818 | 0,099 | 18,950 ± 2,258 | 19,116 ± 1,598 | 0,886 |
| 6 | 17,183 ± 1,828 | 16,816 ± 1,900 | 0,740 | 22,416 ± 2,132 | 21,633 ± 1,139 | 0,446 |
| 7 | 15,850 ± 1,177 | 17,066 ± 1,900 | 0,212 | 20,550 ± 2,519 | 22,183 ± 0,865 | 0,164 |
| 8 | 16,066 ± 2,876 | 16,000 ± 2,415 | 0,966 | 20,350 ± 1,770 | 20,433 ± 1,598 | 0,933 |
| 9 | 15,466 ± 2,547 | 17,083 ± 1,943 | 0,245 | 20,166 ± 1,367 | 22,533 ± 1,658 | 0,022* |
| 10 | 17,933 ± 3,377 | 17,983 ± 0,832 | 0,973 | 22,691 ± 2,478 | 23,425 ± 1,809 | 0,571 |
| 11 | 17,933 ± 3,377 | 17,983 ± 0,832 | 0,973 | 22,691 ± 2,478 | 23,425 ± 1,809 | 0,571 |
| 12 | 14,600 ± 2,204 | 14,200 ± 0,857 | 0,687 | 17,716 ± 1,103 | 18,300 ± 2,057 | 0,554 |
| 13 | 17,066 ± 1,250 | 18,383 ± 2,207 | 0,232 | 21,316 ± 1,655 | 21,650 ± 2,335 | 0,781 |
| 14 | 19,700 ± 1,534 | 19,266 ± 2,054 | 0,688 | 24,416 ± 2,752 | 25,116 ± 1,963 | 0,623 |

G1 (ratos tratados com a suspensão do EHF); G2 (ratos tratados com veículo – grupo controle)

*p < 0,05 (apenas no 9º dia após o tratamento, o consumo dos machos do G2 foi significativamente maior que o consumo dos machos do grupo G1)

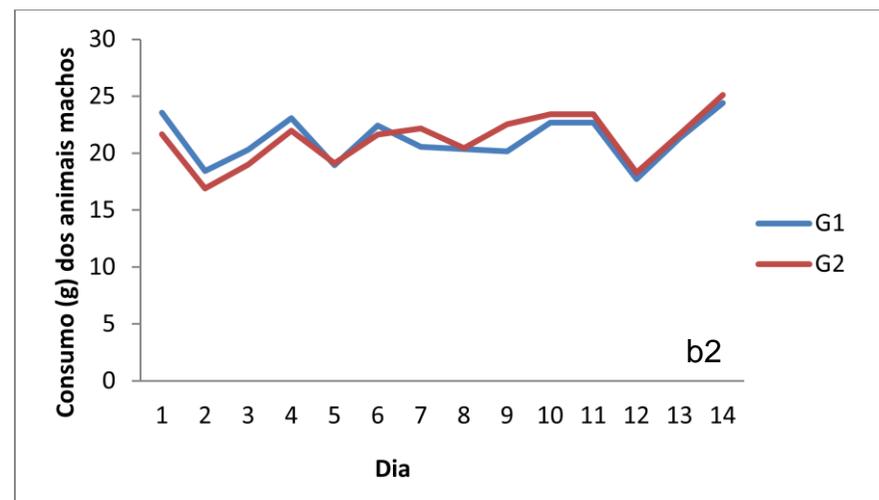
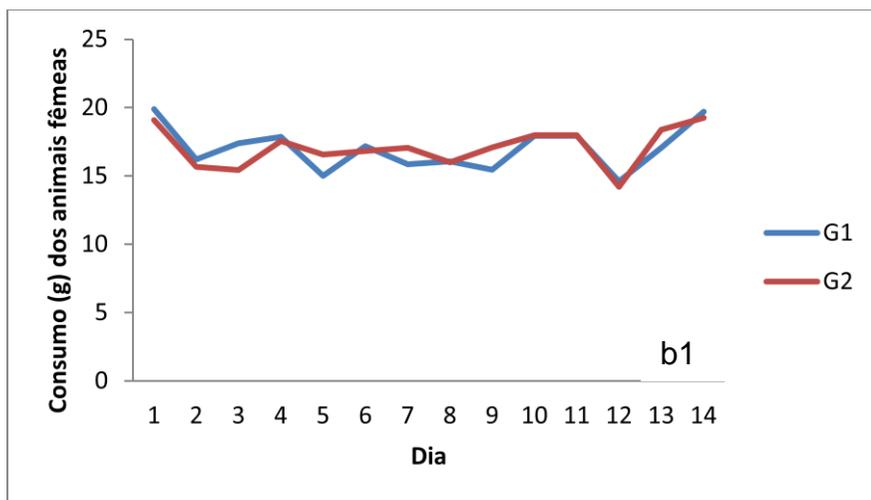
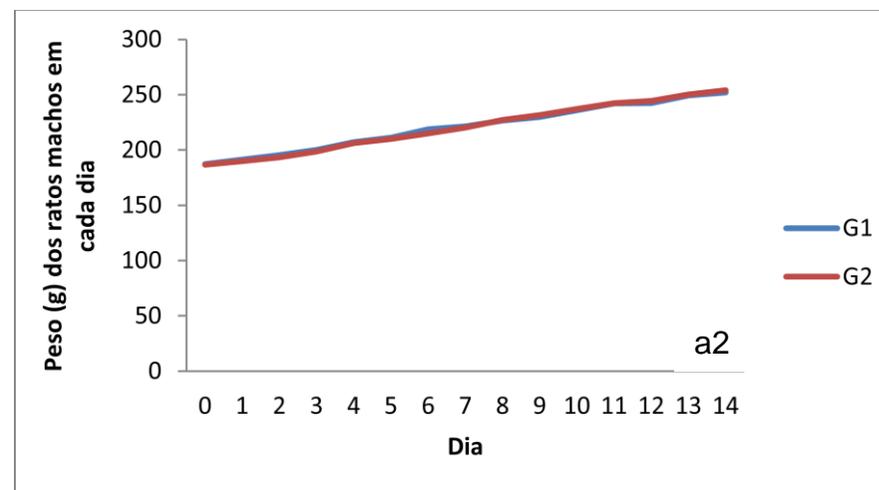
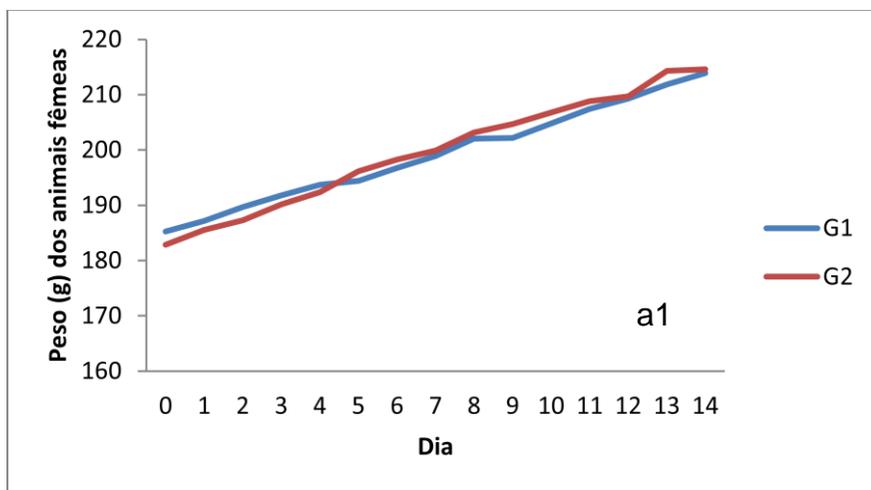


FIGURA 8: Gráficos comparativos, entre o G1 e G2, da evolução ponderal média (a) e do consumo médio alimentar (b), diários, durante os 14 dias após o tratamento para as fêmeas (a1; b1) e machos (a2; b2).

5.4.1.3 Análises histopatológicas

Na necropsia apresentaram alterações macroscópicas:

- Rato 4 (fêmea; G1 – tratado); Rim esquerdo: macroscopicamente apresentou pequena mancha na cortical; Na análise da lâmina histológica estava normal.
- Rato 5 (fêmea; G1 - tratado); Pulmão esquerdo: macroscopicamente apresentou supuração. Na análise histopatológica apresentou broncopneumonia supurativa, difusa grave (FIGURA 9).

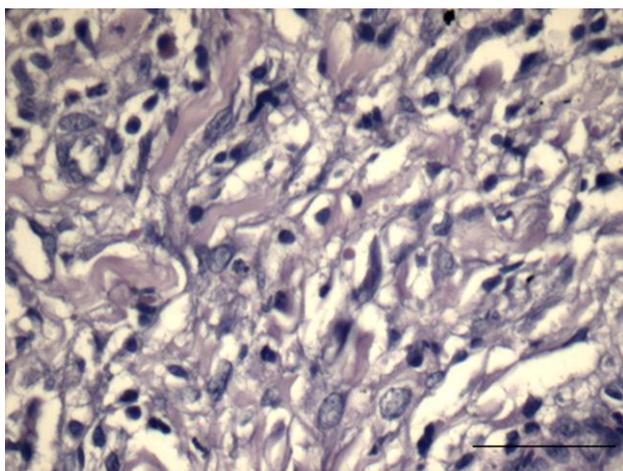


FIGURA 9: Fotomicrografia do pulmão do rato 5, evidenciando descaracterização tecidual, com presença de exsudato purulento, caracterizado por numerosos neutrófilos, íntegros e desintegrados (coloração HE, barra = 70µm).

- Rato 8 (fêmea; G2 – controle): Macroscopicamente o pulmão esquerdo e direito apresentaram supurações; Na análise histopatológica apresentou pneumonia intersticial linfocítica,

com discretos neutrófilos, focal, de grau leve a moderado (FIGURA 10a).

- Rato 8 (fêmea; G2 – controle): Macroscopicamente o fígado apresentou áreas congestionadas; Na análise histopatológica apresentou leve degeneração gordurosa (esteatose) multifocal a coalescente com leve dissociação de hepatócitos (FIGURA 10b).

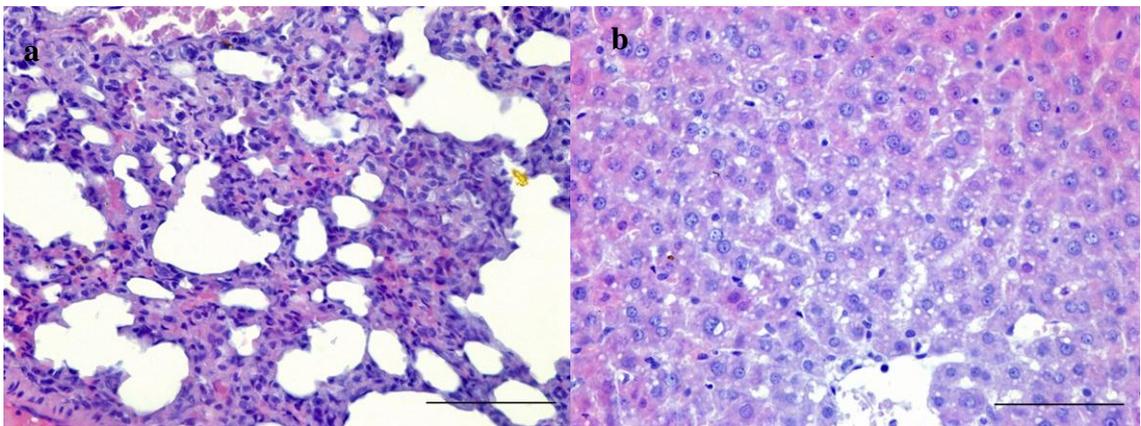


FIGURA 10: Fotomicrografia do pulmão e fígado do rato 8; (a) Pulmão evidenciando espessamento de septo interalveolar por infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico. (b) Fígado evidenciado leve vacuolização dos hepatócitos, caracterizando esteatose hepática microvacuolar incipiente (coloração HE, barra = 70µm).

- Rato 9 (fêmea; G2 – controle); Fígado: macroscopicamente apresentou áreas congestionadas; Na análise histopatológica apresentou ausência de lesões significativas.
- Rato 22 (macho; G2 – controle); Fígado: macroscopicamente apresentou áreas congestionadas; Na análise histopatológica apresentou ausência de lesões significativas.

As complicações pulmonares acometeram duas fêmeas, dos 24 ratos, sendo uma do grupo tratado (G1) e uma do grupo controle (G2); portanto não foi atribuído aos efeitos do extrato. Em casos como estes, pneumonias podem estar relacionadas à falsa via de gavagem ou afecções comumente encontradas em animais de laboratório. A maioria dos animais de laboratório possui um ou mais sistemas de órgão que são acometidos com maior frequência e no caso dos ratos são o sistema respiratório e urinário (LINDSEY *et al.* 1971).

O fígado que apresentou pequenas degenerações microscópicas pertencia ao rato 8 do grupo controle (G2) não sendo a degeneração atribuída ao tratamento (FIGURA 10b).

5.4.2 Experimento 2: Toxicidade de doses repetidas

Os ratos (10 machos e 10 fêmeas por grupo; 3 grupos tratados e 1 grupo controle) foram numerados de 1 a 80 na ordem a seguir e sendo os primeiros 10 os machos e as últimas 10 as fêmeas em cada grupo:

- de 1 a 20 = G1 (tratados com 100mg/kg)
- de 21 a 40 = G2 (tratados com 200mg/kg)
- de 41 a 60 = G3 (tratados com 300mg/kg)
- de 61 a 80 = G4 (controle; tratado com veículo da suspensão)

5.4.2.1 Análise comportamental e ponderal

As alterações comportamentais foram observadas diariamente durante o tratamento dos animais, por 12 semanas. A variação do peso corpóreo foi aferida semanalmente e os órgãos dos ratos selecionados aleatoriamente ao final do experimento foram pesados, após eutanásia.

Os mesmo sinais e sintomas do experimento de toxicidade aguda foram os parâmetros observados neste experimento: aparência geral, alteração da locomoção, frequência respiratória, roncos e chiados, cianose, ptose, frênilo vocal, irritabilidade, autolimpeza, piloereção, diarreia, sialorréia, lacrimação, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, ataxia, excitabilidade do sistema nervoso central, tremores, contorções abdominais, micção, defecação e morte. Foram considerados apenas o aparecimento do sintoma e progressão sem anotação semi-quantitativa por ter sido este um experimento com maior número de animais (80 ratos), com maior duração (12 semanas) e com administração de doses menores (100, 200 e 300 mg/kg).

Os dados foram anotados em ficha individual. Apatia, emagrecimento, queda de pêlo, secreção nasal, sangue no nariz, leve sibilo, diarreia, foram verificados eventualmente em alguns animais sem progressão e de forma dispersa e semelhante nos vários grupos, inclusive o controle (G4).

No segundo dia de tratamento da sexta semana o rato 8 (macho; G1 tratado com menor dose), que perdeu bastante peso da quarta para a quinta semana, apresentou sangue coagulado nas narinas e nas patas pelo contato, indicativo de sangramento nasal forte, estava com respiração acelerada e sibilante, apático, tendo sido isolado para observação e veio a óbito no mesmo dia. O diagnóstico provável realizado pelo veterinário foi de

gavagem por falsa via, devido à morte súbita. Não foi feita a necropsia porque o rato já estava em *rigor mortis*.

O rato 2 (macho; G1 tratado com menor dose) veio apresentando perda de peso, apatia e sibilo desde a quarta semana de tratamento, que evoluiu para dificuldade respiratória e óbito no segundo dia da décima semana de tratamento. Não foi feita a necropsia porque o rato já estava em “*rigor mortis*”.

A morte de dois machos do G1 não foi relacionada ao tratamento devido terem ocorrido somente no grupo tratado com a menor dose e por ser um número pequeno em 10 machos de um grupo de 20 ratos (G1). Os sintomas apresentados até o óbito caracterizam falsa via de gavagem ou afecções não relacionadas ao tratamento.

A evolução ponderal semanal média dos ratos dos grupos G1, G2, G3 e G4 (controle) estão apresentadas na TABELA 7, dividida em machos e fêmeas de cada grupo. Comparando-se o ganho de peso dos animais machos e fêmeas entre os grupos tratados e o controle na mesma semana, somente apresentou diferença significativa, o G2 comparado ao G4 (fêmeas), na primeira semana, e o G1 e G3 comparados ao G4 (fêmeas), na décima primeira semana. Estas diferenças não foram consideradas relevantes uma vez que não tiveram relação dose dependente e apareceram ocasionalmente. O peso das fêmeas evoluiu de aproximadamente 100g a 235g e dos machos de aproximadamente 100g a 340g.

A FIGURA 11 (a e b) demonstra os gráficos da evolução ponderal dos machos e fêmeas, muito semelhantes entre os grupos G1, G2, G3 e G4. O gráfico das fêmeas aparece mais inclinado, mostrando que ao fim do

experimento a variação do peso foi menor, comparando-se com a variação de peso dos machos, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os machos do G3 apresentaram evolução ponderal menor que os outros grupos, porém essa diferença também não foi estatisticamente significativa.

Os pesos médios dos órgãos dos 3 machos e 3 fêmeas selecionadas aleatoriamente, de cada grupo, e aferidos durante a coleta de material para a análise histopatológica na eutanásia dos animais estão apresentados na TABELA 8. Não houve variações relevantes no peso médio dos órgãos entre os grupos e do G1, G2 e G3 comparados ao G4 (controle). Apenas o peso médio dos intestinos das fêmeas do G2 e o peso médio dos testículos do G2 apresentaram diferença estatística quando comparada ao G4. Essas diferenças não foram consideradas relevantes uma vez que somente se apresentaram no grupo G2, tratado com a dose média, não tendo, portanto relação dose dependente.

A FIGURA 12 demonstra os pesos médios de cada órgão em relação ao peso médio total dos órgãos dos ratos para fêmeas (a) e machos (b). O peso médio total dos órgãos das fêmeas foi de 28,0g (G1), 23,5g (G2), 28,5g (G3), 29,5g(G4) e dos machos foi de 36,5g (G1), 36,6g (G2), 33,1g (G3), 35,6g (G4). A relação do peso médio dos órgãos com o peso médio dos ratos em cada grupo ao final do experimento, quando foram extirpados os órgãos foi de 12% (G1), 10% (G2), 12% (G3), 12% (G4) para as fêmeas e 11% (G1-G4) para os machos.

TABELA 7: Evolução ponderal média dos ratos (g), dos grupos G1, G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, durante 12 semanas

| Peso (g) | Fêmea | | | | Machos | | | |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G1 | G2 | G3 | G4 |
| Semana 1 | 98,000±7,133 | 99,100±7,218* | 94,6±6,785 | 85,400±8,871* | 107,600±6,077 | 102,100±12,404 | 106,500±5,873 | 109,300±5,638 |
| Semana 2 | 128,250±7,275 | 124,240±11,266 | 127,040±8,708 | 121,580±8,795 | 144,630±6,734 | 135,410±15,368 | 138,490±11,373 | 142,650±14,405 |
| Semana 3 | 148,430±10,043 | 146,990±14,027 | 145,470±11,480 | 142,470±10,033 | 174,720±13,998 | 163,460±16,951 | 168,630±14,481 | 171,270±19,893 |
| Semana 4 | 166,180±13,199 | 165,670±17,271 | 158,690±21,137 | 153,640±19,882 | 208,440±16,796 | 193,600±19,464 | 199,590±18,845 | 207,450±25,938 |
| Semana 5 | 175,270±13,967 | 173,400±17,086 | 172,280±11,619 | 173,320±11,610 | 217,060±22,624 | 205,660±20,952 | 209,120±18,384 | 220,020±26,621 |
| Semana 6 | 184,040±12,278 | 181,510±18,898 | 183,920±14,896 | 181,730±13,932 | 220,600±33,712 | 221,050±22,408 | 221,670±17,914 | 229,620±23,027 |
| Semana 7 | 201,260±9,939 | 197,830±18,713 | 201,830±13,965 | 199,790±13,739 | 241,200±37,712 | 248,400±20,604 | 242,370±14,949 | 253,020±27,135 |
| Semana 8 | 204,310±10,741 | 203,380±16,803 | 208,420±15,993 | 203,410±15,353 | 249,400±40,014 | 258,080±20,380 | 250,150±14,630 | 262,350±24,703 |
| Semana 9 | 216,540±9,404 | 215,470±19,434 | 215,840±16,118 | 217,280±15,132 | 285,587±18,679 | 282,660±22,631 | 262,710±17,001 | 289,010±27,978 |
| Semana 10 | 222,120±11,647 | 220,720±17,020 | 220,110±13,948 | 220,010±12,168 | 302,625±21,331 | 295,620±23,162 | 276,230±15,939 | 304,270±31,174 |
| Semana 11 | 230,490±12,99* | 229,530±15,966 | 230,600±15,91* | 220,680±28,93* | 327,250±16,473 | 319,410±28,576 | 294,270±18,698 | 324,040±32,062 |
| Semana 12 | 233,850±12,433 | 235,580±16,346 | 235,820±15,854 | 238,020±23,535 | 334,037±18,195 | 329,050±29,022 | 306,310±18,956 | 334,410±33,405 |

G1, G2 e G3 (ratos tratados com doses crescentes do EHF); G4 (ratos tratados com veículo – grupo controle);

Valores expressos em média ± desvio padrão

*p < 0,05: Semana 1, fêmeas G2 e G4: 0,016; Semana 11, fêmeas G1 e G4: 0,006; G3 e G4: 0,029

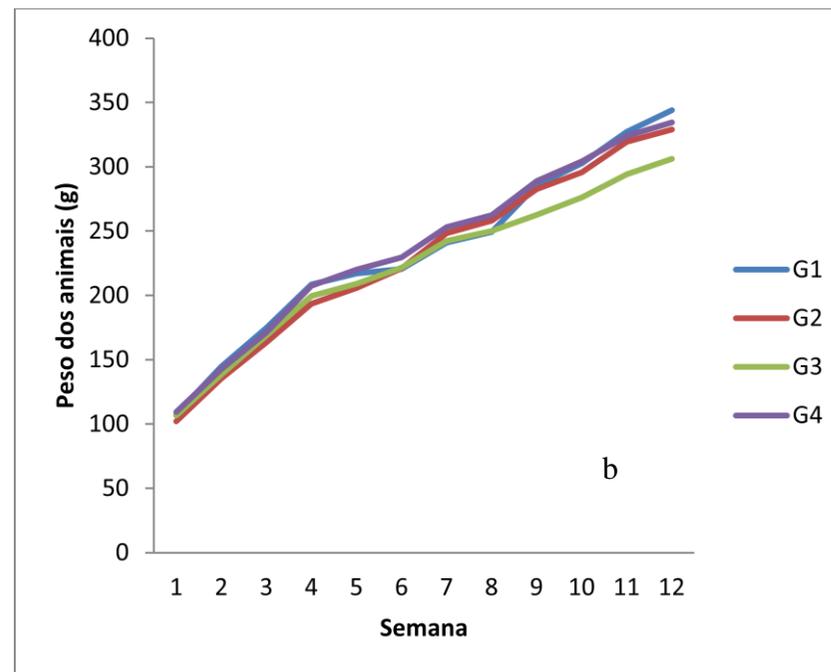
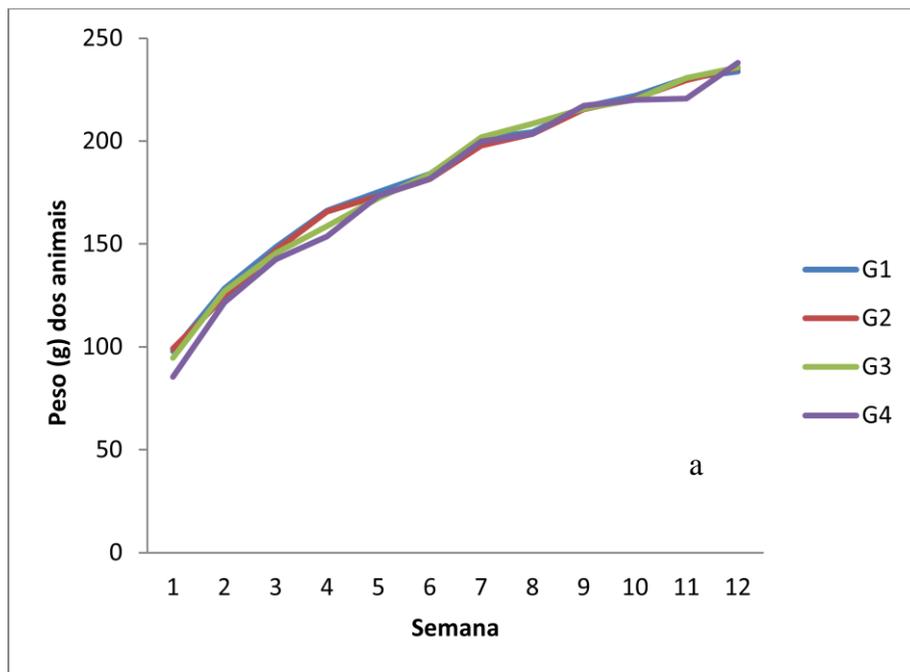


FIGURA 11: Gráficos comparativos, entre o G1, G2, G3 e G4, da evolução ponderal média, semanal, durante 12 semanas de tratamento para as fêmeas (a) e machos (b).

TABELA 8: Pesos médios dos órgãos extirpados dos machos e fêmeas de cada grupo, selecionados aleatoriamente.

| Órgãos | Peso (g) | | | | | | | |
|------------------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Fêmeas | | | | Machos | | | |
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G1 | G2 | G3 | G4 |
| Fígado | 7,833±0,814 | 6,200±0,360 | 7,500±0,282 | 7,866±0,351 | 9,233±0,450 | 10,300±0,360 | 9,566±0,901 | 9,866±0,723 |
| Rins | 1,733±1,600 | 1,600±0,264 | 2,000±0,282 | 1,600±0,346 | 2,266±0,305 | 2,400±0,173 | 2,333±0,152 | 2,266±0,057 |
| Pulmão | 1,600±0,173 | 1,433±0,057 | 1,850±0,070 | 1,433±0,057 | 1,833±0,152 | 2,000±0,100 | 2,066±0,305 | 2,266±0,057 |
| Coração | 0,833±0,321 | 0,767±0,057 | 0,850±0,070 | 0,733±0,115 | 1,100±0,200 | 1,066±0,115 | 0,933±0,057 | 2,033±0,057 |
| Estômago | 1,466±0,115 | 1,566±0,305 | 1,450±0,070 | 1,766±0,152 | 1,566±0,152 | 1,700±0,200 | 1,800±0,200 | 1,500±0,360 |
| Intestino | 12,966±1,955 | 10,433±1,123* | 12,950±0,353 | 14,3±1,352* | 14,600±1,014 | 13,266±0,642 | 11,866±0,321 | 13,100±2,121 |
| Ovário/testículo | 0,305±0,065 | 0,334±0,109 | 0,333±0,152 | 0,277±0,050 | 4,466±0,305 | 4,700±1,135* | 3,433±0,057 | 3,400±0,264* |
| Pâncreas | 1,083±0,154 | 1,002±0,180 | 1,355±0,077 | 1,334±0,121 | 1,243±0,028 | 1,001±0,209 | 0,906±0,117 | 1,046±0,202 |
| Adrenal | 0,181±0,038 | 0,126±0,026 | 0,193±0,024 | 0,168±0,097 | 0,165±0,027 | 0,165±0,053 | 0,187±0,036 | 0,155±0,106 |

G1, G2 e G3 (ratos tratados com doses crescentes do EHF); G4 (ratos tratados com veículo – grupo controle);

Valores expressos em média ± desvio padrão

*p < 0,05; Intestino, fêmeas G2 e G4: 0,030; Testículo, machos G2 e G4: 0,043.

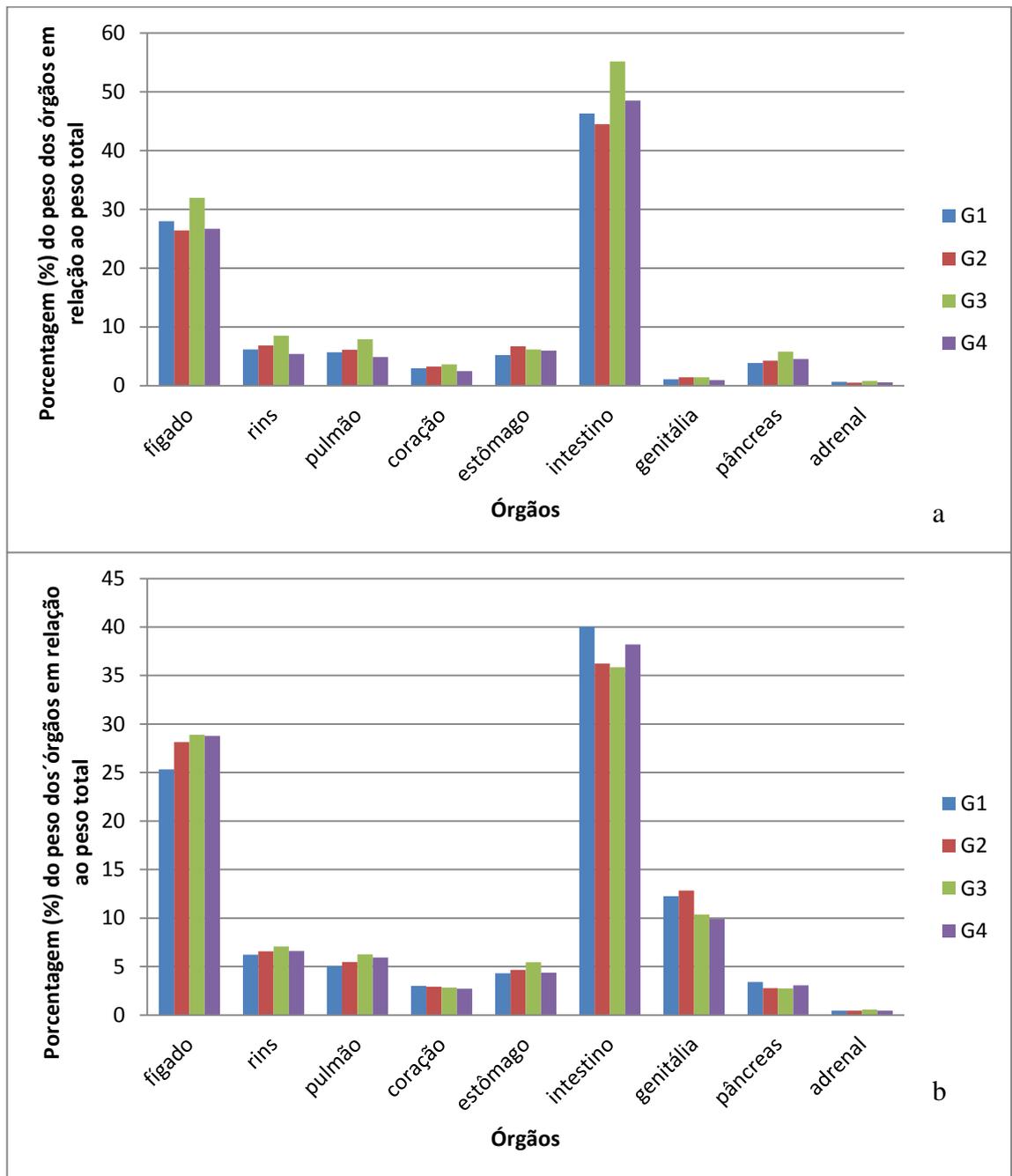


FIGURA 12: Pesos médios de cada órgão em relação ao peso médio total dos órgãos dos ratos para fêmeas (a) e machos (b).

5.4.2.2 Análises hematológicas

O hemograma é um importante aliado dos estudos de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível às atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes e que podem limitar a utilização de fármacos e medicamentos; alterações hematológicas podem refletir, também, na atividade imunológica (LIMA *et al.*, 2002).

O hemograma, um exame complementar de diagnóstico, se divide em 3 séries: série vermelha (eritrograma), série branca (leucograma) e série plaquetária. De maneira geral a série vermelha avalia a presença de doenças dos glóbulos vermelhos, como a anemia, a série branca avalia processos alérgicos e infecciosos, agudos ou crônicos e a série plaquetária avalia o sistema de coagulação primário (THEML *et al.* 2001).

O eritrograma e a contagem de plaquetas estão demonstrados na TABELA 9 e o leucograma na TABELA 10.

O eritrograma pode ser analisado sob três parâmetros quantitativos: o hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem de hemácias. Três índices adicionais permitem descrever características qualitativas médias e incluem: Volume Globular Médio (VGM), a Hemoglobina Globular Média (HGM) e a Concentração Média da Hemoglobina Globular (CHGM). De acordo com a TABELA 9 estes parâmetros não apresentaram diferença estatística quando comparados os grupos tratados com o controle, para machos e fêmeas. As anemias podem ser detectadas na observação de

valores inferiores aos normais do número de hemácias do sangue circulante e/ou do seu conteúdo de hemoglobina. A contagem de plaquetas não apresentou diferença estatística quando comparados os grupos tratados com o controle, para machos e fêmeas. Observa-se aumento das plaquetas (plaquetose) nas respostas às infecções, inflamação e hemorragia (FAUCI *et al.* 1998).

No leucograma diferenças estatísticas significativas foram observadas somente para os machos, na contagem de leucócitos e porcentagem de monócitos onde G1 apresentou maior número comparado ao G4 e o G2 apresentou maior porcentagem de segmentados comparado ao G4, não havendo relação com a dose do tratamento essas diferenças foram consideradas eventuais e irrelevantes.

O estudo dos leucócitos baseia-se nos seguintes parâmetros: contagem, características morfológicas, proporções relativas, maturação e modificações na inflamação. O aumento do número de leucócitos designa-se por leucocitose e resulta, na maioria dos casos, do aumento do número de neutrófilos (neutrofilia), o que não ocorreu no presente experimento. As principais causas de leucocitose são: infecção/inflamação, traumatismo e leucemia/linfoma. Há algumas situações que são acompanhadas pelo aumento de um tipo específico de leucócito, pelo que a realização de um hemograma pode ter particular interesse no seu diagnóstico. Por exemplo, as infecções bacterianas acompanham-se frequentemente de neutrofilia, as infecções viróticas de linfocitose e as infecções parasitárias e doenças alérgicas de eosinofilia, o que não ocorreu no presente experimento. No caso do presente experimento, o aumento dos leucócitos no G1 foi

acompanhado de aumento de monócitos, que pode ocorrer em diversas situações como quimioterapia, infecções bacterianas crônicas ou por protozoários, mas foi considerado um caso isolado, uma vez que não ocorreu aos outros grupos e, portanto, irrelevante (FAUCI *et al.* 1998).

O aumento de neutrófilos segmentados no G2 não refletiu em aumento significativo dos leucócitos totais, portanto, não caracteriza infecção bacteriana, e, uma vez que não ocorreu aos outros grupos, foi considerado irrelevante.

5.4.2.3 Análises bioquímicas

A maior diferença entre estudos agudos, subcrônicos e crônicos, nos ensaios de toxicidade, além da duração experimental, é o grau com que os animais experimentais são avaliados, em nível físico, bioquímico, hematológico e histológico, quanto aos efeitos tóxicos produzidos pela substância teste (PINTO *et al.*, 2000). Os parâmetros bioquímicos funcionam como indicadores dos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, protéico e mineral, além de oferecer indicativos na interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo e muscular (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

TABELA 9: Eritrograma e contagem de plaquetas dos grupos G1, G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, após as 12 semanas

| Exames | Fêmea | | | | Machos | | | |
|---------------------------------|--|--|--|--|--|---|---|---|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G1 | G2 | G3 | G4 |
| Hemácias (mm ³) | 8,9x10 ⁶ ± 0,5x10 ⁶ | 8,8x10 ⁶ ± 0,4x10 ⁶ | 9,3x10 ⁶ ± 0,9x10 ⁶ | 8,4x10 ⁶ ± 0,9x10 ⁶ | 9,1x10 ⁶ ± 1,0x10 ⁶ | 10,1x10 ⁶ ± 0,6x10 ⁶ | 10,4x10 ⁶ ± 0,5x10 ⁶ | 97x10 ⁶ ± 1,8x10 ⁶ |
| Hemoglobina (g/dl) | 16,2±0,7 | 16,4 ± 0,6 | 16,5 ± 0,7 | 16,3 ± 1,2 | 16,9±0,6 | 17,3 ± 0,4 | 16,9 ± 0,6 | 16,6± 1,0 |
| Hematócrito (%) | 47,1 ± 2,2 | 45,2 ± 1,9 | 47,1 ± 3,6 | 44,5 ± 4,0 | 49,3 ± 3,8 | 51,9 ± 3,1 | 52,2 ± 2,2 | 48,9 ± 4,8 |
| Proteína total (g/dl) | 8,2±0,2 | 8,3± 0,3 | 8,2± 0,3 | 8,5± 0,6 | 8,2±0,4 | 7,9±0,3 | 7,9 ± 0,3 | 8,3 ± 0,5 |
| VGM (fl) | 52,9± 2,5 | 51,5±1,7 | 47,6±11,0 | 52,8±1,6 | 54,4 ± 2,6 | 51,5±0,8 | 50,1±1,2 | 50,4±2,4 |
| HMG (pg) | 18,2±1,3 | 18,7±0,1 | 19,5±4,8 | 19,4± 1,0 | 18,5±1,3 | 17,1±0,8 | 16,3± 0,7 | 17,3±1,3 |
| CHGM (%) | 34,4±1,4 | 36,3±0,9 | 33,4±6,0 | 36,6 ± 1,3 | 33,8±1,8 | 33,3±1,5 | 32,5 ± 1,1 | 31,5 ± 8,5 |
| Plaquetas (mm ³) | 729333,3 ± 270876,8 | 778900, ± 66226,0 | 803400,0± 108075,3 | 675800,0 ± 277251,5 | 634876,0 ± 78375,4 | 712125,0 ± 99814,7 | 742200,0 ± 60092,2 | 815300,0± 89630, |

G1, G2 e G3 (ratos tratados com doses crescentes do EHF); G4 (ratos tratados com veículo – grupo controle);

*p < 0,05 ; valores expresso em média ± desvio padrão

TABELA 10: Leucograma dos grupos G1, G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, após as 12 semanas

| Exames | Fêmea | | | | Machos | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|----------------|---------------|--------------|--------------|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G1 | G2 | G3 | G4 |
| Leucócitos (mm ³) | 4422,2±657,2 | 4370,0±975,3 | 3350,0±1152,1 | 3350,0±1660,8 | 5875,0±1027,8* | 4712,5±1208,8 | 3600,0±836,7 | 4040,0±779,2 |
| Eosinófilos (p/mm ³) | 62,4±59,2 | 96,3±105,5 | 47,0±43,6 | 46,7±55,0 | 121,9±50,6 | 82,9±109,2 | 52,2±71,1 | 63,9±67,4 |
| Eosinófilos (%) | 1,4±1,4 | 2,2±2,2 | 1,4±1,4 | 1,9±2,3 | 2,1±1,0 | 1,8±2,0 | 1,5±1,8 | 1,6±1,6 |
| Segmentados (p/mm ³) | 1181,1±396,4 | 929,3±301,5 | 730,2±246,2 | 767,2±353,7 | 1292,8±422,6 | 1464,3±592,7 | 924,0±210,8 | 830,4±294,4 |
| Segmentados (%) | 27,3±9,6 | 21,5±5,6 | 22,2±6,3 | 24,4±11,6 | 22,4±8,0 | 31,1±8,4* | 26,4±6,3 | 21,1±6,9 |
| Linfócitos (p/mm ³) | 3014,8±762,1 | 3216,1±855,0 | 2501,1±1034,8 | 2461,8±1415,5 | 4230,0±1103,3 | 2976,6±732,2 | 2504,3±822,7 | 3081,0±823,5 |
| Linfócitos (%) | 67,4±9,7 | 73,3±7,7 | 74,0±7,5 | 71,6±12,5 | 71,5±9,9 | 63,5±5,9 | 68,6±6,9 | 75,7±8,2 |
| Monócitos (p/mm ³) | 152,1±102,0 | 119,2±100,5 | 58,1±42,8 | 74,3±80,3 | 224,0±113,3 | 152,9±177,7 | 104,0±69,6 | 64,4±41,0 |
| Monócitos (%) | 3,6±2,8 | 2,8±2,3 | 1,9±1,7 | 2,1±1,7 | 3,9±2,2* | 3,0±3,2 | 3,0±2,2 | 1,6±1,0 |

G1, G2 e G3 (ratos tratados com doses crescentes do EHF); G4 (ratos tratados com veículo – grupo controle); valores expresso em média ± desvio padrão

*p < 0,05: Leucócitos, macho G1 e G4: 0,014; Segmentados, macho G2 e G4: 0,009; Monócitos, macho G1 e G4: 0,018

O fígado e os rins são, geralmente, os órgãos ativos na metabolização e eliminação de xenobióticos. Portanto, a análise de parâmetros bioquímicos pode ajudar a identificar os órgãos alvo de toxicidade e o estado geral de saúde do animal (ALMEIDA *et al.*, 2001 apud PRETTO, 2008).

As médias dos parâmetros bioquímicos dosados no soro dos ratos dos grupos G1, G2, G3 e G4 estão apresentados na TABELA 11.

Foi observado que os níveis de uréia e creatinina foram reduzidos em todos os grupos tratados (G1, G2, G3) com relação ao controle (G4) tanto para os machos como para as fêmeas, sendo as reduções estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os níveis de ácido úrico também apresentaram considerável redução nos grupos tratados com relação aos controles, embora apenas a redução do G1 e do G2 das fêmeas tenha sido estatisticamente significativa.

Proveniente do catabolismo protéico, a uréia é um produto metabólico nitrogenado sintetizado no fígado, como produto final da quebra de aminoácidos, transportada pelo plasma e eliminada pelos rins, na urina, compreendendo de 80% a 90% do nitrogênio urinário total excretado nos mamíferos (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

A insuficiência renal leva a uma falha na excreção de uréia, creatinina e ácido úrico e conseqüentemente ocorre elevação da concentração sorológica destes parâmetros (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

A creatinina é um produto metabólico formado pela descarboxilação da creatina-fosfato no músculo e, portanto, com relação direta com a massa muscular e metabolismo energético. O catabolismo da creatina é lento e constante, numa taxa que é proporcional à massa muscular individual,

ocorrendo um influxo constante de creatinina para o plasma que não é afetado por mudança na atividade ou lesão muscular. Portanto, alterações na concentração plasmática da creatinina são derivadas de alterações na excreção dela, na função renal (KERR, 2003; MOTTA, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das bases purínicas (adenina e guanina) sendo formado, principalmente no fígado, a partir da xantina, pela ação da enzima xantina oxidase. Quase todo o ácido úrico no plasma está na forma de urato monossódico. O teor de urato encontrado no plasma representa o equilíbrio entre a produção e a excreção pela urina e fezes. Quase todo o ácido úrico excretado pelos glomérulos é reabsorvido pelos túbulos proximais; pequenas quantidades são secretadas pelos túbulos distais e excretadas na urina. No caso das intoxicações os altos níveis de ácido úrico plasmático podem evidenciar diminuição da velocidade de excreção por alteração da atividade renal, acidoses, interações medicamentosas (MOTTA, 2003).

KIM (2005) patenteou uma composição contendo extrato de *Hovenia dulcis*, extrato de *Lindera obtusiloba* ou contendo o extrato de mistura das duas plantas como ingredientes ativos contra hepatotoxicidade e para melhoramento da função hepática e renal. Ratos tratados com as formulações das plantas tiveram níveis reduzidos de AST, ALT, FA, bilirrubina total e uréia.

ALVARENGA (2008) mostrou redução na uréia plasmática de coelhos diabéticos, aloxano induzidos, de 4% aos 14 dias de tratamento e 23% aos 28 dias de tratamento com o extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia*

dulcis na dose de 200mg/kg, comparando-se o grupo tratado com o grupo doente não tratado. O tratamento reduziu creatinina plasmática em 10%, aos 28 dias. O extrato na dose e tempo testados não foi capaz de reduzir os níveis de ácido úrico, porém o flavonóide dihidrimiricetina na dose de 100mg/kg apresentou significativas reduções deste parâmetro (até 38% de redução).

Notadamente nas complicações diabéticas, quando ocorrem desordens renais ou hepáticas, os níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, dentre outros costumam aumentar (CZERWIŃSKA *et al.*, 2006).

Sódio e potássio são eletrólitos comumente avaliados, sendo íons livremente difundidos por todo o fluido extracelular. Concentrações normais de eletrólitos no plasma são necessárias para o funcionamento normal das funções elétricas das membranas e para a manutenção dos compartimentos hídricos nos volumes adequados. O excesso de eletrólitos é excretado pelos rins e intestino. Problemas hidroeletrolíticos estão associados com perdas anormais de líquidos e é a quantidade e a composição do líquido que está sendo perdido que determinará a anormalidade eletrolítica. Concentrações plasmáticas eletrolíticas elevadas resultam de perdas excessivas de água livre de eletrólitos. Concentrações plasmáticas eletrolíticas baixas resultam de perda excessiva de líquido com alta concentração de eletrólitos (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

De acordo com a TABELA 11 apresentaram aumento dos níveis sorológicos de sódio, estatisticamente significativo, os machos do G1 e do G2 comparados ao G4. Essa diferença não aconteceu no G3 e em nenhum grupo das fêmeas, não sendo, portanto atribuída ao tratamento.

O sódio é um cátion presente em grande quantidade no líquido extracelular. Suas variações, seja por redução (hiponatremia) ou por aumento (hipernatremia), provocam também alterações na osmolalidade sérica e conseqüentemente nos volumes dos compartimentos hídricos corporais. Níveis baixos de sódio no plasma, por perda de líquido rico em sódio, como acontece na insuficiência renal, resultam em alterações neurológicas que vão desde fraqueza muscular a alterações de comportamento, distúrbios de equilíbrio e coma (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

Os níveis sorológicos de potássio, de acordo com a TABELA 11, não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados comparados ao controle para machos e fêmeas, com exceção do G2 das fêmeas que apresentou diminuição significativa comparada ao G4.

O potássio, presente em grandes concentrações no espaço intracelular, tem grande importância na manutenção do equilíbrio eletrolítico transmembrana celular. Suas concentrações são muito baixas nos fluidos extracelulares, estando menos relacionado ao balanço hídrico do que sódio e a maioria dos distúrbios tende a ocorrer diretamente em função de perdas excessivas ou ausência de excreção do potássio nos rins. As variações em suas concentrações prejudicam a capacidade de contração muscular, tanto da musculatura lisa quanto da estriada. Níveis muito baixos são associados a sintomas neuromusculares. Alterações eletrocardiográficas e sintomas neuromusculares também são encontrados na hipercalemia que quase sempre está relacionada com a incapacidade dos rins em excretar potássio (ex: na nefrotoxicidade). A presença de hemólise na amostra sanguínea

coletada aumenta sensivelmente o nível de potássio, podendo mascarar o resultado. Inúmeras drogas interferem sobre o potássio, aumentando ou diminuindo os seus níveis (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

O plasma contém uma mistura de proteínas contendo albumina, globulinas, enzimas, proteínas específicas de transporte, hormônios protéicos e fatores de coagulação. Sua dosagem fornece um bom parâmetro para a avaliação do estado nutricional e para a presença de doenças sistêmicas severas. O aumento na concentração de proteínas totais pode significar deficiência relativa de água, doença inflamatória crônica e doença imunomediada, por aumento na fração de globulinas (Ex: cirrose do fígado, doenças bacterianas subagudas ou crônicas e doença auto-imune) ou mais raramente paraproteinemia. (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

De acordo com a TABELA 11 todos os grupos tratados (G1, G2 e G3) apresentaram diminuição dos níveis sorológicos de proteínas totais, estatisticamente significativos, comparados ao G4, para machos e fêmeas.

A diminuição da concentração de proteínas totais e/ou de albumina pode ser encontrada em condições de superidratação, embora incomum; por perda excessiva de proteína (principalmente hipoalbuminemia) que pode ser por perda renal (nefropatias), intestinal (enteropatias), hemorragias, queimaduras e por diminuição da síntese de proteínas (principalmente, no caso de animais experimentais, por insuficiência hepática) (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007). No presente trabalho, a diminuição das proteínas plasmáticas não foi associada à diminuição patológica da síntese protéica pelo fígado uma vez que a histologia do fígado apresentou-se normal, porém a redução numérica das principais enzimas do fígado (dado

discutido posteriormente) pode, na sua soma, ter contribuído para a redução significativa das proteínas totais. A redução das proteínas plasmáticas não foi associada à perda protéica uma vez que os animais não apresentaram sinais e sintomas relativos à doença renal, que estaria em grau avançado para causar proteinúria, como anemia, desnutrição, desidratação e principalmente edema. Além disso, a histologia renal apresentou-se normal.

Os fármacos são distribuídos aos vários locais e seus metabólitos eliminados do organismo através da corrente sangüínea. No início a substância ativa é transportada rapidamente para os tecidos de alto fluxo sangüíneo (cérebro, fígado e rins) e posteriormente redistribuída para tecidos de baixo fluxo sangüíneo, mas de alta afinidade pelo fármaco (músculos e gordura). Estas substâncias ativas se ligam particularmente à albumina, aos tecidos, às proteínas plasmáticas e aos receptores. Essa ligação constitui fator muito importante na determinação da intensidade e da duração do efeito do medicamento, bem como um local freqüente de interação (MOTA, 2003). A fração do fármaco ligada à proteína pode ser alta o suficiente para causar diminuição da concentração de proteínas plasmáticas livres, que são detectadas no doseamento plasmático ou sorológico, por aumento do volume de distribuição. A mensuração das proteínas plasmáticas por meio de refratometria apresentada junto ao eritrograma (TABELA 9) não apresentou diferença estatística dos animais tratados em relação aos controles.

A concentração plasmática de glicose adequadamente alta é essencial para o funcionamento normal do cérebro. O organismo utiliza vias diferentes elaboradas para garantir a manutenção da glicemia e,

dependendo do estado atual do metabolismo dos carboidratos, a glicose pode ser originada de uma ou mais fontes. Normalmente o glucagon e o hormônio de crescimento (GH) são os responsáveis pela manutenção dos níveis adequados de glicose, enquanto em estados anormais, como jejum ou estresse, os glicocorticóides e a epinefrina são particularmente importantes. O principal agente diminuidor da concentração de glicose é a insulina. Interessante é que a hiperglicemia, que em curto prazo é menos perigosa para o animal, é muito mais comum e tem várias causas, enquanto a hipoglicemia (que é potencialmente ameaçadora à vida de forma imediata) é incomum (GUYTON; HALL, 2002; KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007). Carboidratos são os maiores constituintes no metabolismo dos animais e agentes tóxicos podem provocar mudanças no metabolismo destas moléculas como estimulação da síntese ou da quebra (CATTANI *et al.*, 1996).

De acordo com a TABELA 11 apresentaram aumento dos níveis sorológicos de glicose, estatisticamente significativo, os machos e as fêmeas do G1 comparados ao G4. Essa diferença não aconteceu no G2 e G3, não sendo esse aumento dose dependente e, portanto não foi atribuído ao tratamento. Os dados colhidos através dos níveis de glicose apresentaram alterações discretas sem significância clínica, não indicando comprometimento sistêmico. Apesar da ingestão do EHF com elevado teor de açúcares, a glicemia dos animais tratados foi mantida normal ao final das 12 semanas de tratamento. Deve-se considerar que a planta *Hovenia dulcis* parece exercer ação hipoglicemiante, dose-dependente, em modelos animais hiperglicêmicos (JI *et al.*, 2002; HIROTAKA *et al.*, 2003; SOO *et al.*,

2004; DON *et al.* 2005; JEONG-SANG *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005). Estudos dos açúcares presentes na planta apontam para presença maior de açúcares redutores e não absorvíveis com propriedades adoçantes dietéticas (HUSSAIN *et al.* 1990; YOSHIKAWA *et al.*, 1992, 1993; SUTTISRI *et al.*, 1995; KENNEDY *et al.*, 1988; BAMPI *et al.* 2010).

O estudo e a dosagem dos lipídios plasmáticos possuem elevado interesse clínico, devido às doenças relacionadas, como a doença arterial aterosclerótica. Alterações no perfil lipídico podem ser diagnosticadas por uma simples interpretação dos níveis de colesterol total e de triacilgliceróis, associados à avaliação do aspecto do plasma após refrigeração, o que permite evidenciar lipemia por opalescência suspensa causada pela presença de triacilgliceróis ou opalescência no topo por presença de quilomícrons. A hipercolesterolemia, nos animais, pode indicar doença hepática ou biliar, síndrome nefrótica, *diabetes mellitus*, enquanto a hipocolesterolemia pode estar associada, algumas vezes, à disfunção hepática grave. A elevação dos triacilgliceróis, concomitante com níveis de colesterol elevados, é considerada fator de risco para doença arterial aterosclerótica e pode ser indicativo de doença renal. Valores altos também são detectados no *diabetes mellitus*, na síndrome nefrótica, na pancreatite, em doenças coronarianas e na arteriosclerose. Os triacilgliceróis também podem elevar-se em consequência do uso de certos medicamentos, como a prednisona (LIMA, 2002; MOTTA, 2003; KERR, 2003; MATOS; MARTINS 2005; THRALL, 2007).

Opalescencia foi encontrada nas amostras plasmáticas de 2 machos e 1 fêmea do G1. De acordo com a TABELA 11 os níveis de colesterol não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados (G1, G2 e G3) comparados aos controles (G4) dos machos e fêmeas. Os níveis de triacilgliceróis apresentaram aumento, estatisticamente significativos, para o G1 de macho e de fêmeas comparados ao G4. Este resultado pode estar relacionado com as amostras opalescentes encontradas, que não foram excluídas e apareceu isoladamente, sem relação dose dependente, sem aumento concomitante do colesterol, não sendo atribuído ao tratamento.

KIM (2001) investigou o efeito hepatoprotetor da *Hovenia dulcis* em ratos intoxicados com CCl₄ e seis dias após o tratamento com a fração clorofórmica do extrato de *Hovenia dulcis* observou redução significativa da atividade das aminotransferases e dos níveis de triacilgliceróis, colesterol e peroxidação lipídica hepática comparado ao grupo doente não tratado. Adicionalmente encontrou aumento do conteúdo de glutatona e atividade de glutatona S-transferase, considerada uma das principais enzimas detoxicantes, desempenha papel fisiológico na iniciação da detoxicação de potenciais agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos.

As aminotransferases (AST e ALT), a gama-glutamil transpeptidase (GGT), a bilirrubina (direta, indireta e total) e a fosfatase alcalina (FA) representam o hepatograma simples, para pacientes sem histórico de doenças hepáticas. São exames de rastreio para se identificar alguma doença oculta do fígado e/ou das vias biliares e no caso dos ensaios de toxicidade são utilizados para acompanhar as funções hepáticas a fim de se detectar alterações hepatológicas que podem significar hepatotoxicidade.

AST e ALT são enzimas presentes, principalmente nos hepatócitos, sendo responsáveis pela metabolização das proteínas, tanto na síntese como na degradação de aminoácidos (NELSON; COX, 2006).

A AST está presente nos hepatócitos e também nas células dos músculos e do coração, enquanto que a ALT é encontrada quase que somente dentro das células do fígado. A ALT é, portanto, muito mais específica para o fígado que a AST. Doenças do fígado, que causem lesão dos hepatócitos, cursam com níveis sanguíneos elevados de AST e ALT. Casos onde apenas a AST se eleva, permanecendo a ALT em níveis normais, podem indicar lesão no coração ou outro músculo (LIMA, 1985; GUYTON; HALL, 2002; NELSON; COX, 2006; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

As principais doenças humanas que causam elevação das transaminases são: hepatites virais, cirrose, esteatose hepática, abuso de bebidas alcoólicas, lesão hepática por drogas e medicamentos (denominada hepatite medicamentosa), insuficiência cardíaca, isquemia do fígado (hepatite isquêmica) e câncer do fígado. As intoxicações medicamentosas e as hepatites isquêmicas geralmente elevam acentuadamente os níveis das transaminases (LIMA, 2002; MOTTA, 2003; MATOS; MARTINS 2005).

A fosfatase alcalina e a Gama GT são enzimas que se elevam quando há lesão das vias biliares. O fígado produz a bile, que é drenada pelas vias biliares. Porém, a GGT e a FA não são tão específicas para as vias biliares quanto a AST e, principalmente, a ALT são para o fígado. Doenças do fígado que causem lesão das vias biliares intra-hepáticas podem implicar na elevação da AST, ALT e também de GGT e FA. Do mesmo modo,

obstruções das vias biliares que causem lesão do fígado também podem implicar em elevação das quatro enzimas (THRALL, 2007).

De acordo com a TABELA 11 os grupos G1 e G3, das fêmeas apresentaram diferença estatística dos níveis de AST com relação ao G4, porém estes níveis apresentaram diminuição, não estando, portanto, relacionadas com lesões. Os níveis de AST, ALT e FA apresentaram diminuição, embora não significativa, em todos os grupos de fêmeas tratados e em grupos isolados dos machos tratados. A GGT permaneceu dentro dos limites normais para todos os grupos, não apresentando diferenças estatísticas significativas. Outros autores apontam para a influência da planta *Hovenia dulcis*, que parece exercer atividade hepatoprotetora, detoxificante alcoólica, demonstrados em experimentos através da redução destes parâmetros e da análise histopatológica do fígado (OKUMA *et al.*, 1995; HASE *et al.*, 1997; YOSHIKAWA *et al.*, 1997; JI *et al.*, 2001; NA, *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006; KIM, 2007; FANG *et al.*, 2007).

HASE *et al.* (1997) induziram lesão hepática em ratos com CCl₄ e D-GALN/LPS após o tratamento com extratos da planta por sete dias. Os níveis de AST e ALT, dosados no soro dos ratos, no grupo doente não tratado, induzido por CCl₄, foram 933 e 730 U/I, 24 horas após indução, respectivamente. No grupo tratado com o extrato metanólico dos frutos de *Hovenia dulcis* os níveis foram de 311 e 175 U/I, para AST e ALT respectivamente. Os níveis de ALT dosados no soro dos ratos, no grupo doente não tratado, induzido por D-GALN/LPS foi 2535 U/I, já no grupo tratado com o extrato metanólico dos frutos de *Hovenia dulcis* foi 661U/I, oito

horas após a indução. Houve também redução da mortalidade no grupo tratado, que foi de 27,2% comparada com o grupo controle, que foi de 63,6%. Esses resultados demonstram efeito protetor significativo da planta contra lesão hepática.

FANG *et al.* (2007) examinaram o efeito do extrato etanólico dos frutos de *Hovenia dulcis* em hepatite crônica induzida por CCl₄ em camundongos. Neste trabalho os animais receberam o tratamento durante o mesmo período de indução, por 9 semanas. A atividade de AST e ALT plasmática foi significativamente reduzida nos camundongos tratados com o extrato, comparados ao grupo não tratado.

As bilirrubinas são subproduto da quebra da molécula heme da hemoglobina. Cerca de 70% a 80% da bilirrubina são provenientes da destruição dos eritrócitos velhos, 15% de fontes hepáticas, e o restante é proveniente da destruição de hemácias defeituosas na medula óssea. A bilirrubina, por ser insolúvel, circula no plasma sob a forma não-conjugada ligada à albumina, chegando aos sinusóides hepáticos, via sistema mononuclear fagocitário e após conjugação com ácido glicurônico, se transforma em bilirrubina conjugada. A fração conjugada é hidrossolúvel e desta forma pode ser eliminada pelo rim. A bilirrubina conjugada é denominada bilirrubina “direta”. A bilirrubina não-conjugada é chamada “indireta” e é calculada por subtração da bilirrubina direta na total. Quando o valor sanguíneo da bilirrubina total está elevado o paciente pode apresentar icterícia, a manifestação clínica da deposição de bilirrubina na pele. Nos quadros de hiperbilirrubinemia, a investigação diagnóstica deve abordar o hemograma para doença hemolítica e outros testes de função hepática para

suspeitas de quadros hepatobiliares (GUYTON; HALL, 2002; KERR, 2003; MOTTA, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

De acordo com a TABELA 11 os níveis de bilirrubina total e direta não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos grupos tratados (G1, G2 e G3) com relação aos grupos controles (G4), tanto para o macho quanto para as fêmeas.

O grau de segurança no uso de drogas só pode ser avaliado quando se analisa uma série de fatores, relacionados não somente com as propriedades físicas, químicas e farmacodinâmicas das drogas, mas também com as características biológicas dos indivíduos. Apesar da análise de todos estes fatores é ainda impossível o estabelecimento completo do grau de segurança das drogas. Todos os processos biológicos se fundamentam em reações químicas. Se um sistema enzimático é alterado por uma droga tóxica sua função pode ser bloqueada, acelerada ou retardada. Durante os testes de toxicidade os animais ou humanos usados nos estudos devem ser observados quanto às alterações físicas e comportamentais, e analisados quanto aos parâmetros bioquímicos e hematológicos periodicamente. A interpretação dos resultados é específica para cada constituinte em particular, mas existem princípios básicos e associações que devem ser seguidas (KERR, 2003).

5.4.2.4 Análises histopatológicas

Qualitativamente, fígado, rim, coração, pulmão, esôfago, estômago, intestino, pâncreas, adrenal e testículo ou ovário foram analisados quanto à

presença de lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose), infiltração de leucócitos (focos inflamatórios), hiperemia, congestão, extravasamento de sangue (focos hemorrágicos), edema e fibrose.

5.4.2.4.1 Fígado

Hepatotoxicidade pode ser classificada em aguda ou crônica. Podem ser encontrados variados graus de necrose, principalmente no centro do lóbulo hepático. Os hepatócitos podem apresentar vacuolizações, com o núcleo ligeiramente deslocado do centro ou completamente periférico, caracterizando degeneração hidrópica e/ou gordurosa (esteatose) (BARROS, 2011).

Hemorragias também podem ser encontradas. Em lesões hepatotóxicas crônicas, outros padrões de lesões podem estar presentes, como hepatite, graus variados de necrose, esteatose, fibrose, proliferação de ductos biliares, colangite, colangiofibrose, megalocitose, e em alguns casos, processos neoplásicos (BARROS, 2011).

Quanto ao fígado, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 13a) quanto o G4 (controle; FIGURA 13b) apresentaram hepatócitos bem delimitados, núcleo com cromatina visível, ductulos biliares e veias centro lobulares características, ausência de infiltrados inflamatórios, ausência de fibrose e ausência de vacuolização citoplasmática por esteatose.

TABELA 11: Parâmetros bioquímicos plasmáticos dos grupos G1, G2, G3 e G4, de machos e fêmeas, após as 12 semanas

| Parâmetros bioquímicos | Fêmeas | | | | Machos | | | |
|------------------------|--------------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G1 | G2 | G3 | G4 |
| Uréia (mg/dl) | 65,2±15,4* | 75,2±14,6* | 73,9±12,0* | 95,5± 17,0 | 66,0 ± 7,6 | 59,3±5,2* | 60,7 ± 6,3* | 80,0 ±8,3 |
| Creatinina (mg/dl) | 0,6±0,1* | 0,6 ± 0,1* | 0,6 ± 0,1* | 0,7 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1* | 0,5 ± 0,0* | 0,5 ± 0,6* | 0,7± 0,1 |
| Ácido úrico (mg/dl) | 2,1 ± 0,4* | 2,4 ± 0,7* | 2,9 ± 0,7 | 3,6 ±1,0 | 2,1 ±1,1 | 2,2 ± 0,5 | 2,4 ±0,4 | 3,1 ± 7,6 |
| Colesterol (mg/dl) | 80,4 ± 8,6 | 88,7±12,2 | 90,8±34,4 | 101,5±28,0 | 81,0± 18,0 | 88,2±17,6 | 99,8 ± 39,5 | 100,2±16,7 |
| Triglicérides(mg/dl) | 105,6±43,7* | 54,6±20,9 | 49,6±13,9 | 62,6 ± 14,9 | 124,1±23,5* | 89,3±25,6 | 47,8 ± 15,0 | 70,5 ± 21,2 |
| Glicose (mg/dl) | 127,7±17,1* | 107,6±20,9 | 84,1±12,8 | 95,7 ± 18,8 | 169,8±16,6* | 140,9±25,7 | 106,4 ± 22,4 | 134,0±32,8 |
| Proteína (g/l) | 89,0±10,8* | 90,7 ± 7,3* | 97,0± 6,2* | 111,2± 8,7 | 83,2 ± 5,1* | 80,4±3,5* | 85,7 ± 2,8* | 101,6±7,6 |
| FA (U/L) | 43,5 ± 12,6 | 49,8 ± 18,6 | 42,5±17,2 | 71,5 ± 17,3 | 103,0±35,6 | 84,8 ± 22,8 | 113,9 ± 17,2 | 86,9±29,5 |
| AST(U/l) | 83,6 ± 13,8* | 96,6 ±23,5 | 93,4±14,7* | 125,8±24,7 | 81,0 ± 13,7 | 95,7 ± 41,1 | 110,8±13,8 | 102,8±18,2 |
| ALT(UI) | 34,4 ± 6,9 | 31,1 ± 8,7 | 34,4±17,1 | 44,6 ± 25,6 | 37,1 ± 5,1 | 34,7 ± 5,1 | 39,8 ± 7,0 | 36,4±4,4 |
| GGT(UI) | 4,1 ± 1,8 | 2,4 ± 0,9 | 1,9 ± 1,7 | 2,9 ± 5,0 | 4,1 ±1,0 | 3,0 ±1,8 | 3,0 ± 2,1 | 1,6±1,5 |
| Bilirrub T(mcg/dl) | 47,4 ± 7,5 | 45,7 ± 10,5 | 50,8 ± 6,8 | 55,6 ± 15,7 | 44,4 ± 7,0 | 42,2 ± 5,7 | 49,3 ± 7,2 | 52,0±7,8 |
| Bilirrub. D(mcg/dl) | 11,1 ± 5,4 | 12,1 ± 6,4 | 14,3 ± 5,8 | 10,1 ± 3,8 | 9,9 ± 6,0 | 10,1 ± 5,3 | 14,8 ± 5,5 | 9,1±2,5 |
| NA(mEq/L) | 149,3 ± 4,2 | 149,1 ± 6,1 | 143,4±2,8 | 148,1± 4,7 | 154,9 ± 3,2* | 156,0±6,9* | 146,4 ±1,7 | 144,9±1,7 |
| K(mEq/L) | 5,9 ± 1,2 | 5,6 ± 1,1* | 7,0 ± 2,0 | 7,9 ±1,7 | 7,5 ±1,0 | 6,4 ± 0,7 | 7,5 ±1,3 | 7,0±1,4 |

G1, G2 e G3 (ratos tratados com doses crescentes do EHF); G4 (ratos tratados com veículo – grupo controle);

valores expresso em média ± desvio padrão

*p < 0,05: Uréia: machos G2 e G4: 0,04; G3 e G4: 0,01 /fêmeas G1 e G4: 0,000; G2 e G4: 0,005; G3 e G4: 0,002. Creatinina: machos G1 e G4: 0,011; G2 e G4: 0,000; G3 e G4:0,000 /fêmeas G1 e G4: 0,004; G2 e G4: 0,025; G3 e G4: 0,025. Ácido úrico: fêmeas G1 e G4: 0,001; G2 e G4: 0,008. Proteínas: machos G1 e G4: 0,000; G2 e G4: 0,000; G3 e G4: 0,000 /fêmeas G1 e G4: 0,000; G2 e G4: 0,000; G3 e G4:0,001. Triglicerídeos: machos G1 e G4: 0,000 /fêmeas G1 e G4: 0,004. Glicose: machos G1 e G4: 0,000;/ fêmeas G1 e G4: 0,043. AST: fêmeas G1 e G4: 0,002; G3 e G4: 0,034. Na: machos G1 e G4: 0,000; G2 e G4: 0,000. K: fêmeas G2 e G4: 0,012.

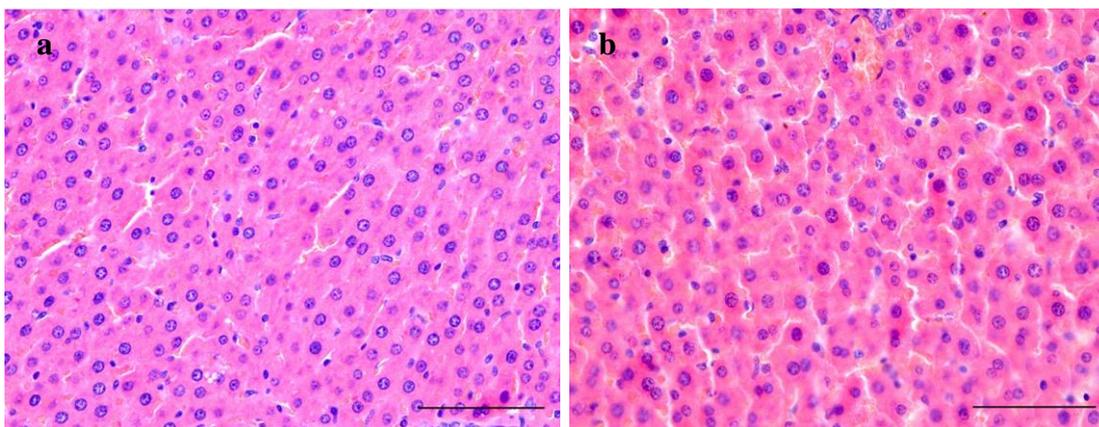


FIGURA 13: Fotomicrografia do fígado; (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm).

Apareceram, ocasionalmente e distribuídas nos dois grupos (tratados e controles) nos machos e nas fêmeas, pequenos infiltrados lobulares perivascularares, congestão sinusoidal leve próximo a veia centro lobular e microvesículas gordurosas citoplasmáticas difusas. Estes achados não foram considerados significativos (FIGURA 14a; b)

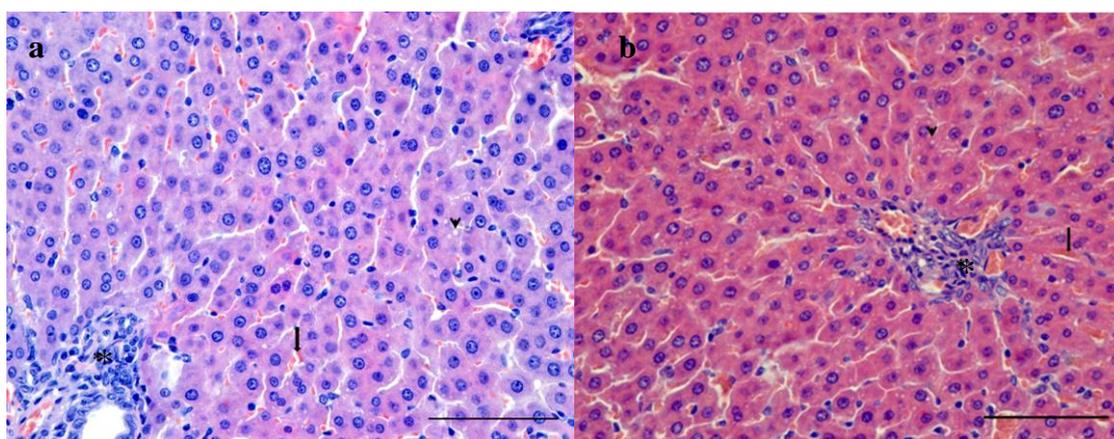


FIGURA 14: Fotomicrografia do fígado mostrando achados ocasionais, não significativos; infiltrado lobular perivascular (*); congestão sinusoidal (seta); microvesículas gordurosas (ponta seta) (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm).

Os resultados da morfometria do fígado dos ratos dos grupos G3 e G4, tratados com a maior dose e o controle, respectivamente, estão

apresentados na TABELA 12. De acordo com os resultados pequenas variações, estatisticamente significativas, foram encontradas O percentual de hepatócitos do G3 (tratado com a maior dose) foi menor que do G4 (controle) dos machos e maior que do G4 (controle) das fêmeas. Esta diferença foi da contagem de núcleos de hepatócitos dos machos do G3 ligeiramente maior que do G4 e da contagem de citoplasma das fêmeas, ligeiramente menor que do G4. Além disso, essa diferença não repercutiu na contagem de hepatócitos do G3 considerando machos e fêmeas juntos com relação ao G4. Na contagem do interstício o G3 dos machos apresentou resultado estatisticamente maior que o G4 e na contagem de capilares sinusóides as fêmeas do G3 apresentaram resultado menor que do G4. As diferenças numéricas foram pequenas e não foram semelhantes entre os machos e as fêmeas, pode ser atribuídas à diferenças entre os sexos e não ao tratamento.

TABELA 12: Morfometria do fígado dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas.

| Total | | | | | | |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| | Vv[nuc] % | Vv[ci] % | Vv[hep] % | Vv[int] % | Vv[cap] % | Vv[ci] % |
| G3 | 12,79±3,40 | 43,10±3,74 | 55,88±4,73 | 23,06±5,04 | 16,54±3,90 | 4,52±2,19 |
| G4 | 13,75±3,03* | 42,57±3,58 | 56,39±4,48 | 20,90±3,8* | 17,75±4,10* | 4,94±2,34 |
| Machos | | | | | | |
| G3 | 11,76±3,29 | 42,11±3,24 | 53,78±3,82 | 25,57±5,00 | 16,65±3,98 | 4,00±1,83 |
| G4 | 14,00±3,33* | 43,02±3,82 | 57,02±4,85* | 21,15±3,90* | 17,09±3,84 | 4,85±2,41 |
| Fêmeas | | | | | | |
| G3 | 13,71±3,25 | 44,05±3,88 | 57,77±4,72 | 20,80±3,90 | 16,45±3,86 | 4,98±2,39 |
| G4 | 13,65±3,05 | 42,25±3,35* | 55,82±4,27* | 20,77±3,75 | 18,45±4,14* | 5,02±2,30 |

* $p < 0,05$; Vv= densidade de volume ; nuc= núcleo de hepatócito; ci=citoplasma de hepatócito; hep=total de hepatócitos; int=interstício; cap=capilares sinusóides; ci=células intersticiais

G3: grupo tratado com a maior dose; G4: grupo controle.

O acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos é um mecanismo natural utilizado para estocar energia, sendo que o fígado mantém duas formas de estoque de energia, o glicogênio e a gordura (GUYTON e HALL, 2002; GOODMAN, 2006).

Apesar das microvesículas de gordura encontradas nos animais do experimento estar em acordo com os níveis normalmente encontrados (TABELA 13), a contagem média, por grupo, de microvesículas de gordura em 50 células, escolhidas aleatoriamente, no fígado de cada animal, mostrou uma redução bastante significativa do G3 (grupo tratado com a maior dose), tanto dos machos quanto das fêmeas, comparados ao G4 (controle). Estes resultados demonstram que o tratamento com EHF pode beneficiar o metabolismo lipídico no fígado e no organismo.

TABELA 13: Morfometria das microvesículas do fígado dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas.

| Microvesículas lipídicas U/500cel | Machos | Fêmeas | Total |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| G3 | 9,96 ± 17,07 | 9,53 ± 18,35 | 9,74 ± 17,60 |
| G4 | 34,30 ± 37,58* | 63,70 ± 61,39* | 48,91 ± 53,10* |

U= unidades; cel=células
*p<0,05

YOSHIKAWA *et al.* (1997) encontraram atividade inibitória do efeito relaxante muscular induzido por álcool e atividade protetora de lesões hepáticas induzidas por DgalN/LPS ou CCl₄, em ratos, na fração metanólica de *Hoveniae Semen Seu Fructus*, produto comercial chinês e japonês à base de frutos com sementes e folhas de *Hovenia dulcis*. FANG *et al.* (2007)

comprovaram a atividade protetora contra hepatite crônica, induzida por CCl₄, do extrato alcoólico dos frutos de *H. dulcis*, administrado em camundongos oralmente, na doses de 0,5 e 1mg/kg. O fígado de camundongos tratados apenas com CCl₄ mostrou necrose, infiltração de linfócitos ampla em torno da veia central e fibrose. Já o fígado dos camundongos tratados com o extrato mostrou um padrão normal lobular com um leve grau de necrose e infiltração de linfócitos.

HASE *et al.* (1997) encontraram atividade hepatoprotetora dos frutos de *H. dulcis*, sendo que o extrato metanólico mostrou significativa atividade hepatoprotetora contra toxicidade induzida por CCl₄ em ratos e por D-GalN/LPS em camundongos. Os animais foram tratados com 100mg/kg do extrato, duas vezes na semana, por uma semana antes da indução de toxicidade hepática. O flavonóide dihidromiricetina, sabidamente encontrado na *Hovenia dulcis*, também apresentou atividade hepatoprotetora no experimento de HASE *et al.* (1997). REN-BO *et al.* (2007) verificaram o efeito citoprotetor contra toxicidade induzida por tacrina em células derivadas de fígado humano (Hep G2) e contra toxicidade induzida por *ter*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em hepatócitos primários de ratos para o extrato etanólico de *Hoveniae lignum* (coração do caule de *Hovenia dulcis*). A Floretina, um composto fenólico isolado da *Hovenia dulcis*, foi hepatoprotetora contra toxicidade induzida por tacrina em células derivadas de fígado humano (Hep G2) com EC₅₀ de 37,55±0,42 µM. O mesmo composto também reduziu a citotoxicidade induzida por *t*-BHP em hepatócitos primários de ratos.

Hepatotoxicidade é frequentemente atribuída aos produtos a base de plantas medicinais. BOSIO (2005) estudou os efeitos hepatotóxicos de doses elevadas, de *Angelica archangelica*, planta medicinal utilizada como antiflatulento, diurético, diaforético, emenagogo, comercializada como fitoterápico no Brasil. Os ratos foram tratados por 10 dias e o tecido do fígado foi analisado histologicamente tendo sido verificado que o fitoterápico provocou lesões hepáticas celulares, com focos de células degeneradas e focos de inflamação crônica, além da desorganização, fibrosamento e proliferação de ductos biliares no espaço porta. Os resultados indicaram ação hepatotóxica em doses elevadas.

5.4.2.4.2 Rim

A nefrotoxicidade é efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro como imunossupressores, antiinflamatórios, antibióticos, anti-hipertensivos e pode causar decréscimo da função renal e lesões glomerulares, tubulares, intersticiais e vasculares. Em geral as lesões renais estão relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (GOODMAN, 2006).

Quanto aos rins dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 15a,b) quanto o G4 (controle; FIGURA 15c,d) apresentaram na camada cortical (FIGURA 15a; 15c) corpúsculos renais (glomérulos e cápsula de Bowman) bem delimitados, túbulos e vasos característicos e na camada medular (FIGURA 15b; 15d) túbulos, ductos coletores e vasos característicos. Não foram

observadas alterações significativas nos rins dos ratos dos grupos G3 comparados ao G4.

As principais alterações túbulo-intersticiais procuradas foram edema e infiltrado inflamatório do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação tubular e necrose; nos glomérulos foram procuradas principalmente hiperplasia de células mesangiais, congestão de capilares glomerulares e involução glomerular (redução no volume dos tufo capilares e alargamento do espaço de Bowman).

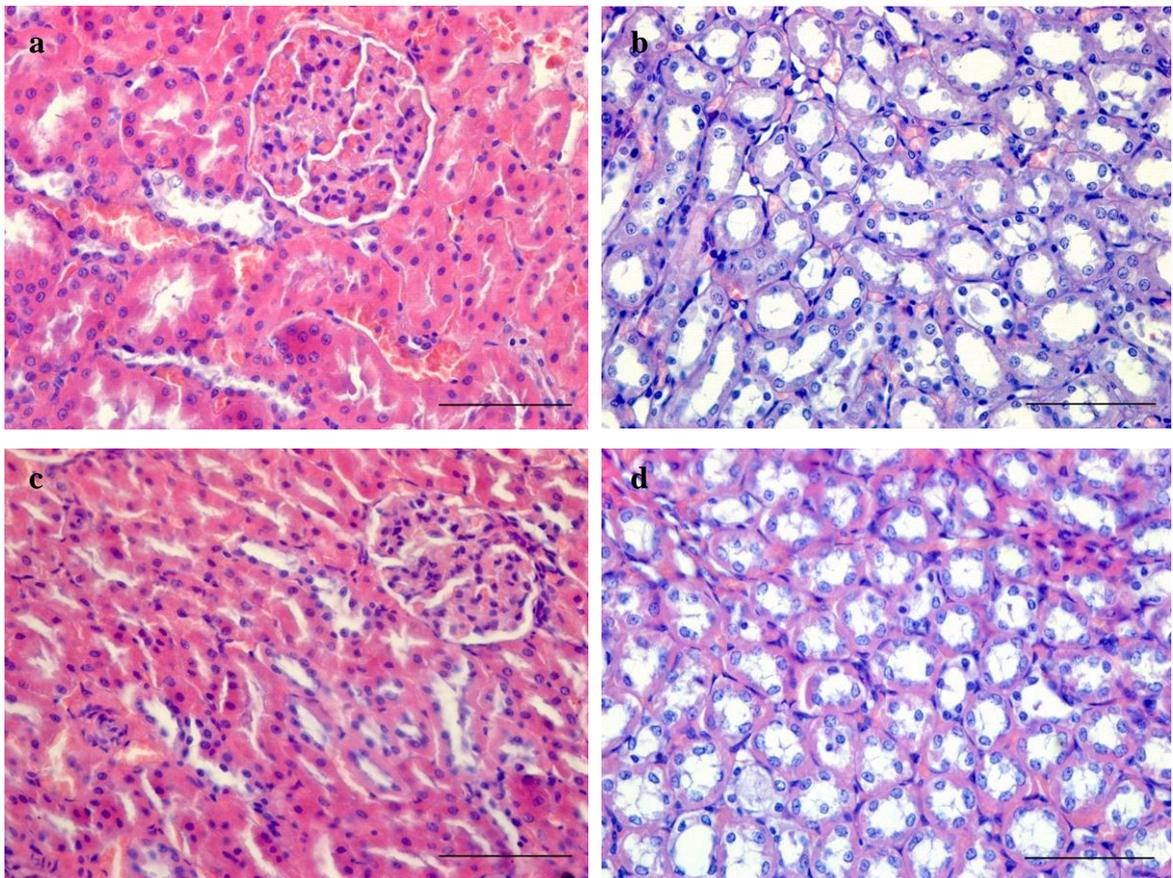


FIGURA 15: Fotomicrografia do rim mostrando as camadas cortical (a;c) e medular (c;d) características; (a,b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70µm).

Os resultados da morfometria da cortical e medular do rim dos ratos dos grupos G3 e G4, tratados com a maior dose e o controle, respectivamente, estão apresentados na TABELA 14 e 15. Não foram encontradas variações, estatisticamente significativas, comparando o G3 (tratado com a maior dose) ao G4 (controle).

TABELA 14: Morfometria do córtex renal dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas.

| | Total | | | | |
|--------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------------------------|
| | Vv[CR]% | Vv[túbulo]% | Vv[int]% | Vv[vaso]% | Glomérulo (N/mm ²) |
| G3 | 18,21 ± 4,73 | 71,25 ± 13,98 | 10,54 ± 1,93 | 4,31 ± 1,40 | 0,014 ± 0,006 |
| G4 | 18,75 ± 5,53 | 70,95 ± 15,62 | 10,48 ± 2,17 | 4,94 ± 1,76 | 0,015 ± 0,006 |
| Machos | | | | | |
| G3 | 18,09 ± 4,10 | 71,30 ± 15,37 | 10,61 ± 2,13 | 4,92 ± 1,34 | 0,012 ± 0,004 |
| G4 | 18,15 ± 4,31 | 70,77 ± 18,82 | 10,98 ± 2,53 | 5,25 ± 1,53 | 0,013 ± 0,005 |
| Fêmeas | | | | | |
| G3 | 19,67 ± 6,15 | 70,11 ± 18,13 | 10,22 ± 1,58 | 3,93 ± 1,46 | 0,015 ± 0,008 |
| G4 | 18,42 ± 7,11 | 70,95 ± 18,47 | 10,63 ± 1,75 | 4,63 ± 1,19 | 0,017 ± 0,007 |

* p< 0,05; Vv= densidade de volume ; CR= corpúsculo renal; túbulo=célula e luz; int=interstício; N= número; G3: grupo tratado com a maior dose; G4: grupo controle. 100%=túbulo+int+CR.

KIM (2005) patenteou uma composição contendo extrato de *Hovenia dulcis*, extrato de *Lindera obtusiloba* e contendo o extrato de mistura das duas plantas como ingredientes ativos contra hepatotoxicidade e para melhoramento da função hepática e renal. No experimento a hepatotoxicidade em ratos foi induzida por CCl₄ e a formação de radicais livres também danificou os rins. Os animais tratados tiveram diminuídos os níveis de malondialdeído, produto da peroxidação lipídica em tecidos, que

tem sido utilizado como indicativo de danos celulares em homogeneizados de amostras dos tecidos renais.

TABELA 15: Morfometria da medula renal dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas.

| | Total | | |
|----|---------------|--------------|-------------|
| | Vv[túbulo]% | Vv[luz]% | Vv[int]% |
| G3 | 75,37 ± 14,20 | 20,19 ± 3,11 | 4,44 ± 1,34 |
| G4 | 74,83 ± 15,35 | 21,11 ± 4,52 | 4,06 ± 1,50 |

| | Machos | | |
|----|---------------|---------------|--------------|
| | G3 | 76,04 ± 15,18 | 19,17 ± 4,33 |
| G4 | 75,08 ± 15,59 | 20,05 ± 4,40 | 4,87 ± 1,61 |

| | Fêmeas | | |
|----|---------------|---------------|--------------|
| | G3 | 76,50 ± 15,11 | 19,42 ± 3,65 |
| G4 | 76,02 ± 15,35 | 19,51 ± 4,69 | 4,47 ± 1,11 |

* $p < 0,05$; Vv=densidade de volume ; int=interstício e vaso;
G3: grupo tratado com a maior dose; G4: grupo controle.

5.4.2.4.3 Pulmão

Algumas doenças respiratórias resultam de ventilação inadequada, enquanto outras são causadas por anormalidades da difusão, através da membrana pulmonar, ou do transporte de gases, no sangue, dos pulmões para os tecidos. São mais comumente relacionadas à limitação do fluxo aéreo associada à inalação de gases e partículas nocivas, alergênicos, e aos problemas associados à função cardiovascular. Fármacos que alteram a função renal ou cardiovascular possuem maior propensão de afetar o sistema respiratório. Casos de pneumointoxicação por medicamentos em

geral aparecem de forma aguda causando insuficiências respiratórias e associado a alterações hemodinâmicas (GUYTON e HALL, 2002; GOODMAN, 2006).

Foram procurados no tecido pulmonar sinais de edema, infiltrado inflamatório no epitélio bronquiolar, distensão alveolar, alvéolos confluentes (destruição das paredes alveolares com conseqüente diminuição capilar), tecido fibrótico, hemorragias e infecções (macrófagos, abscessos). Não foram observadas alterações significativas nos pulmões dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 16a) comparados ao G4 (controle; FIGURA 16b).

Os resultados da morfometria do pulmão dos ratos dos grupos G3 e G4, tratados com a maior dose e o controle, respectivamente, estão apresentados na TABELA 16. De acordo com os resultados não foram encontradas variações, estatisticamente significativas, comparando o G3 ao G4.

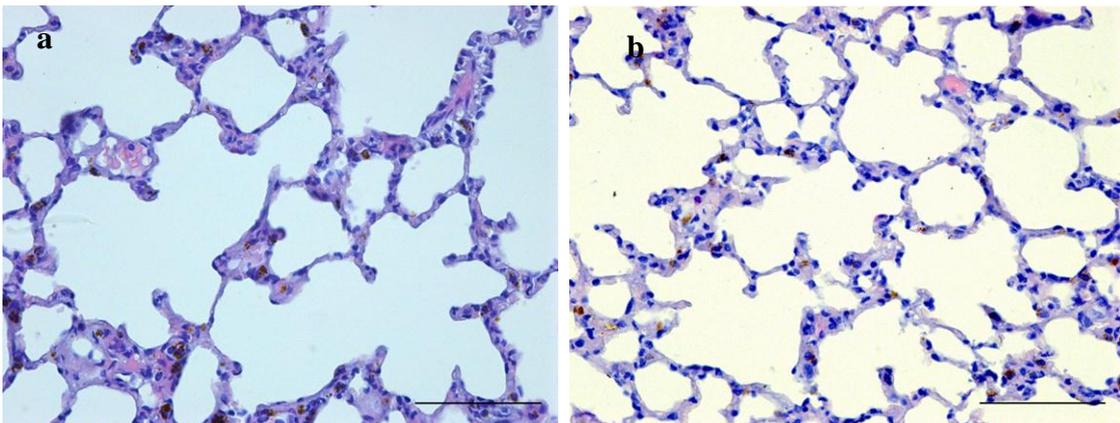


FIGURA 16: Fotomicrografia do pulmão mostrando o parênquima pulmonar característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70 μ m).

TABELA 16: Morfometria do parênquima pulmonar dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas.

| Total | | | |
|--------|---------------|--------------|---|
| | Vv[septo]% | Vv[esp alv]% | Sup alv (mm ² /mm ³) |
| G3 | 91,99 ± 11,30 | 8,01 ± 11,30 | 2,30 ± 0,20 |
| G4 | 92,06 ± 11,43 | 7,94 ± 11,43 | 2,27 ± 0,20 |
| Machos | | | |
| G3 | 91,77 ± 11,40 | 8,23 ± 11,40 | 2,38 ± 0,20 |
| G4 | 92,06 ± 11,41 | 7,94 ± 11,41 | 2,34 ± 0,16 |
| Fêmeas | | | |
| G3 | 92,21 ± 11,20 | 7,79 ± 11,20 | 2,22 ± 0,17 |
| G4 | 92,06 ± 11,44 | 7,94 ± 11,44 | 2,20 ± 0,22 |

* $p < 0,05$; Vv=densidade de volume ; esp. alv.= espaço alveolar; sup. alv.= superfície alveolar; G3: grupo tratado com a maior dose; G4: grupo controle.

Estudos que encontrem pneumotoxicidade causada por plantas medicinais e por fitoterápicos não são comuns. O extrato de *Elephantorrhiza elephantina* é utilizado tradicionalmente por comunidades na África para várias enfermidades em humanos e nas criações para tratar disenterias e helmintíases. Estudo de segurança de uso foi realizado com ensaios de toxicidade aguda (1 dia), sub-aguda (14 dias) e crônica (35 dias) em ratos tratados com o extrato da planta via oral. Durante os experimentos nenhuma morte foi registrada e os ratos mantiveram o comportamento e consumo de ração normal. As variações significativas no peso, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos indicaram relativa toxicidade nas doses mais altas. A toxicidade também foi demonstrada na histologia do fígado, rim, pulmão e baço demonstrando comprometimento desses órgãos. No ensaio de toxicidade sub-aguda a deposição de cristais de oxalato renais e

pielonefrite ascendente secundária apareceu em animais que receberam 800 mg/kg do extrato. As alterações pulmonares, incluindo granulomas pulmonares, foram observadas em animais que receberam 400 mg/kg. Hepatite aguda também foi observada em animais que receberam doses de 800 mg/kg. No ensaio de toxicidade crônica, granulomas pulmonares, depósitos de cristais refringentes e pielonefrite ascendente foram encontrados em grau moderado. Baseados nos achados da pesquisa, MAPHOSA *et al.* (2010) inferiram que a planta apresenta relativa toxicidade em altas doses e seu uso deve ser reavaliado cuidadosamente.

5.4.2.4.4 Coração

As disfunções cardíacas podem estar relacionadas às lesões musculares cardíacas e/ou em virtude do ritmo cardíaco anormal, envolvendo principalmente o sistema circulatório, os pulmões e os rins (GUYTON e HALL, 2002). Muitas substâncias e medicamentos são relacionados aos efeitos cardiotoxícos, particularmente quando de uso crônico ou em longo prazo como, por exemplo, os antineoplásicos (GOODMAN, 2006).

O alcalóide pirrolizidínico, monocrotalina, classe encontrada numa grande variedade de plantas, tem sido utilizado para induzir hipertensão pulmonar, seguida de sobrecarga de pressão no ventrículo direito, hipertrofia ventricular direita podendo levar à insuficiência cardíaca congestiva. A monocrotalina é biossintetizada no fígado formando a dihidromonocrotalina,

que, por sua vez, é capaz de induzir hepatotoxicidade, pneumotoxicidade e nefrotoxicidade (HÜBSCHER, 2005).

Os heterosídeos cardiotônicos, comumente sintetizados por plantas, incluindo as medicinais, podem causar a síndrome cardiotóxica com a propriedade de potencializar a força e a velocidade das contrações miocárdicas através da inibição da bomba sódio/potássio-ATPase na membrana plasmática do tecido muscular, o sarcolema, levando ao surgimento de manifestações clínicas cardíacas severas, podendo persistir por 3 a 6 dias. As disritmias geradas podem levar ao óbito (PARDAL; ITHO, 2010). Na triagem fitoquímica desenvolvida por ALVARENGA (2008) os testes foram positivos indicando presença de heterosídeos cardiotônicos nas folhas e frutos de *Hovenia dulcis*.

Quanto ao coração dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 17a- corte longitudinal; 17b- corte transversal) quanto o G4 (controle; FIGURA 17c- corte longitudinal; 17d- corte transversal) apresentaram no miocárdio fibras cilíndricas curtas ramificadas (cardiomiócitos) com núcleos ovais centrais ou pouco excêntricos característicos. Não foram observadas alterações significativas no coração dos ratos dos grupos G3 comparados ao G4. As principais alterações procuradas foram aumento da cariólise, hemorragia, presença de fibras necróticas, presença de infiltrado inflamatório entre as fibras, fibrose, hipertrofia nuclear miocárdica.

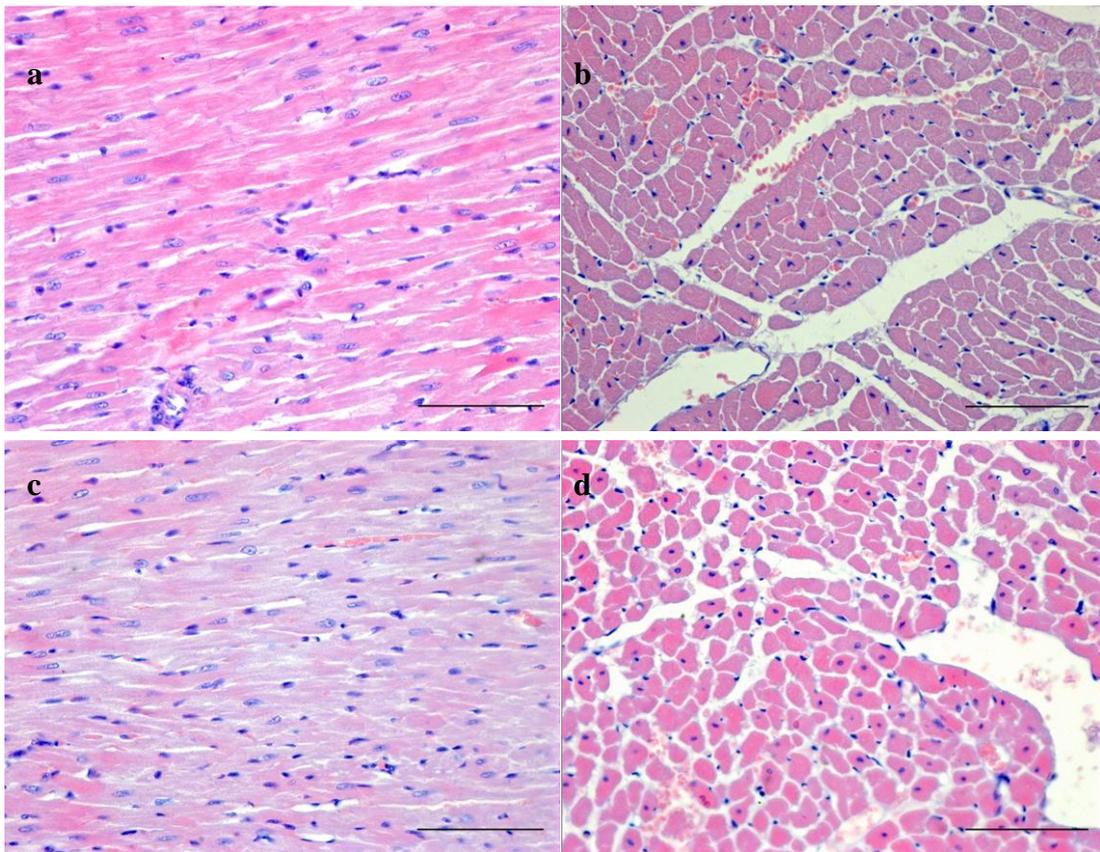


FIGURA 17: Fotomicrografia do coração mostrando miocárdio característico (a- longitudinal; b- transversal) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c- longitudinal; d- transversal) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70 μ m).

Os resultados da morfometria do coração dos ratos dos grupos G3 e G4, tratados com a maior dose e o controle, respectivamente, estão apresentados na TABELA 17. De acordo com os resultados não foram encontradas variações, estatisticamente significativas, comparando o G3 ao G4.

TABELA 17: Morfometria do coração dos ratos dos grupos G3 (tratado com a maior dose) e G4 (controle), total e separado para machos e fêmeas.

| | | Total | | | Área sec.trans cmi (μm^2) |
|----|--------------|-------------|-------------|---|---|
| | Vv[cmi] % | Vv[int] % | Vv[vasos]% | Celularidade (N/X,Xmm ²) | |
| G3 | 93,75 ± 8,56 | 6,25 ± 1,19 | 3,88 ± 5,65 | 241,65 ± 20,54 | 31,03 ± 3,32 |
| G4 | 94,30 ± 8,39 | 5,70 ± 1,23 | 3,79 ± 5,53 | 240,30 ± 19,52 | 31,15 ± 2,71 |
| | | Machos | | | |
| | Vv[cmi] % | Vv[int] % | Vv[vasos]% | Celularidade (N/X,Xmm ²) | |
| G3 | 93,68 ± 8,60 | 6,32 ± 1,15 | 3,91 ± 5,69 | 242,05 ± 23,23 | 30,96 ± 3,71 |
| G4 | 94,00 ± 8,54 | 6,00 ± 1,23 | 3,70 ± 5,67 | 241,50 ± 21,92 | 31,19 ± 2,75 |
| | | Fêmeas | | | |
| | Vv[cmi] % | Vv[int] % | Vv[vasos]% | Celularidade (N/X,Xmm ²) | |
| G3 | 93,90 ± 8,52 | 6,10 ± 1,23 | 3,87 ± 5,62 | 241,25 ± 18,05 | 31,10 ± 2,96 |
| G4 | 94,98 ± 8,24 | 5,02 ± 1,24 | 3,66 ± 5,38 | 239,10 ± 17,28 | 31,10 ± 2,73 |

* p< 0,05; Vv= densidade de volume ; cmi= cardiomiócitos; int=interstício; N=área média da secção transversal do cardiomiócito; X=área da foto; área sec.trans= área média da secção transversal/grupo; G3: grupo tratado com a maior dose; G4: grupo controle. 100%= cmi+int.

5.4.2.4.5 Outros

Os órgãos cavitários, estômago, esôfago e intestino, foram avaliados quanto ao aparecimento de erosões (acometendo apenas o epitélio) e úlceras (atingindo a lâmina própria, podendo chegar à submucosa), presença de necroses focais, multifocais ou difusas, hiperemias, congestões, trombose, hiperqueratose. Foi avaliada também presença de infiltrado inflamatório, principalmente nas camadas mucosa e submucosa.

Quanto ao esôfago dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 18a) quanto o G4 (controle; FIGURA 18b) apresentaram epitélio de revestimento estratificado

pavimentoso e lâmina própria da camada mucosa, submucosa e muscular características. Na coleta dos fragmentos dos órgãos, os esôfagos, estômagos e intestinos foram lavados com soro fisiológico e por isso os epitélios do esôfago parecem estar queratinizados, mas este foi um artefato, devido à lavagem. Apareceram eosinófilos aleatórios na lâmina própria do esôfago, estômago e intestinos, tanto no G3 quanto no G4. Estes granulócitos se infiltram nos tecidos contra parasitas, infecções ou associados a processos alérgicos alimentares. Neste caso é possível que os animais tenham apresentado resposta alérgica local à serragem que forrou as gaiolas, uma vez que a presença de eosinófilos foi verificada em igual frequência e intensidade nos dois grupos (G3 e G4). Os componentes do veículo da fórmula farmacêutica são comprovadamente inertes e de uso em medicamentos formulados para humanos.

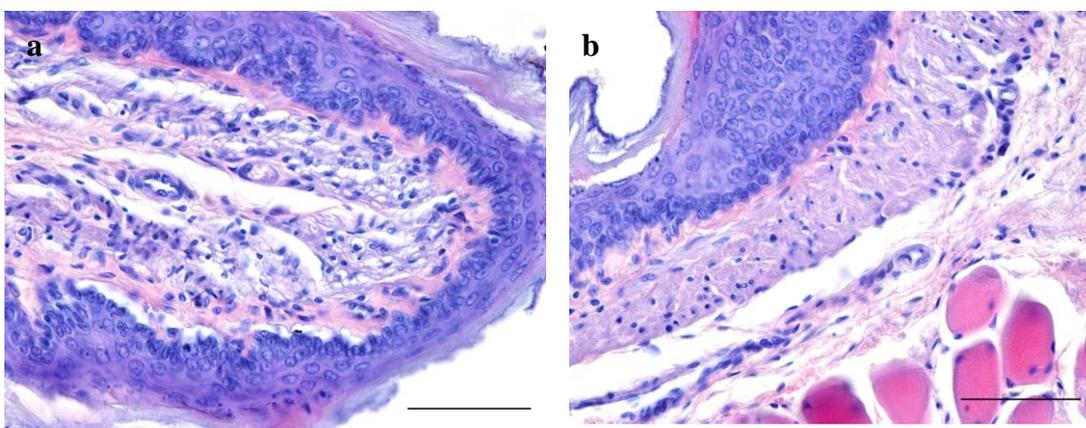


FIGURA 18: Fotomicrografia do esôfago característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70 μ m).

Quanto ao estômago dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 19a) quanto o G4 (controle; FIGURA 19b) apresentaram epitélio de revestimento simples

prismático mucíparo característico, fossetas gástricas normais e lâmina própria característica, muscular da mucosa e glândulas da mucosa características, camadas submucosa (gânglios submucosos- Meissner), muscular (gânglios mioentéricos- Auerbach) e serosa características. No lúmen, dos dois grupos, foram encontrados resíduos de material vegetal. Uma vez que a alimentação foi apenas com ração, é provável que os resíduos sejam oriundos da serragem e que ela tenha causado ligeira reação alérgica atraindo os eosinófilos.

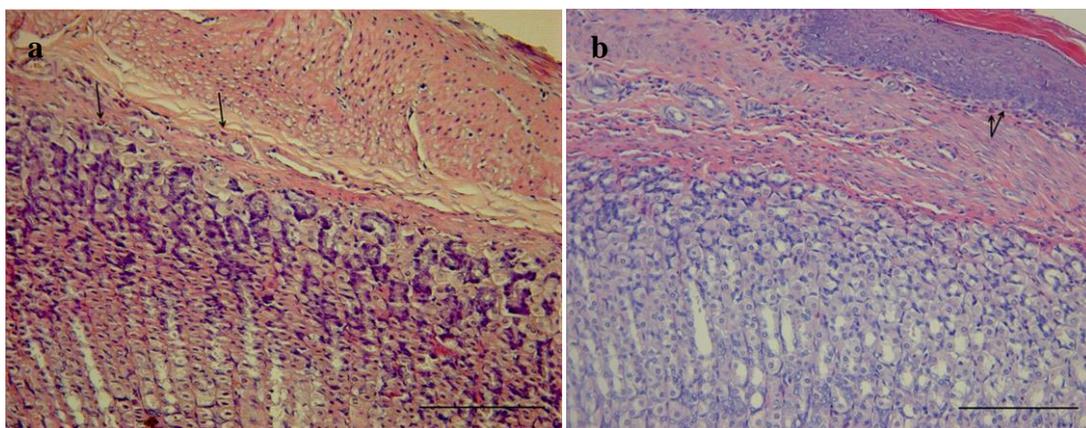


FIGURA 19: Fotomicrografia do estômago característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. Eosinófilos (seta); (coloração HE, barra = 140 μ m).

Quanto aos intestinos dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 20a;b) quanto o G4 (controle; FIGURA 20c;d) apresentaram epitélio de revestimento simples prismático com células caliciformes e lâmina própria característicos, glândulas intestinais (criptas de Lieberkühn) características, camadas submucosa (gânglios submucosos- Meissner), muscular (gânglios mioentéricos- Auerbach) e serosa características. Na coleta os esôfagos,

estômagos e intestinos foram lavados com soro fisiológico e por isso os epitélios dos intestinos apresentaram acentuada lise celular, sobretudo no ápice das vilosidades intestinais no intestino delgado. No lúmen, dos dois grupos, também foram encontrados resíduos de material vegetal.

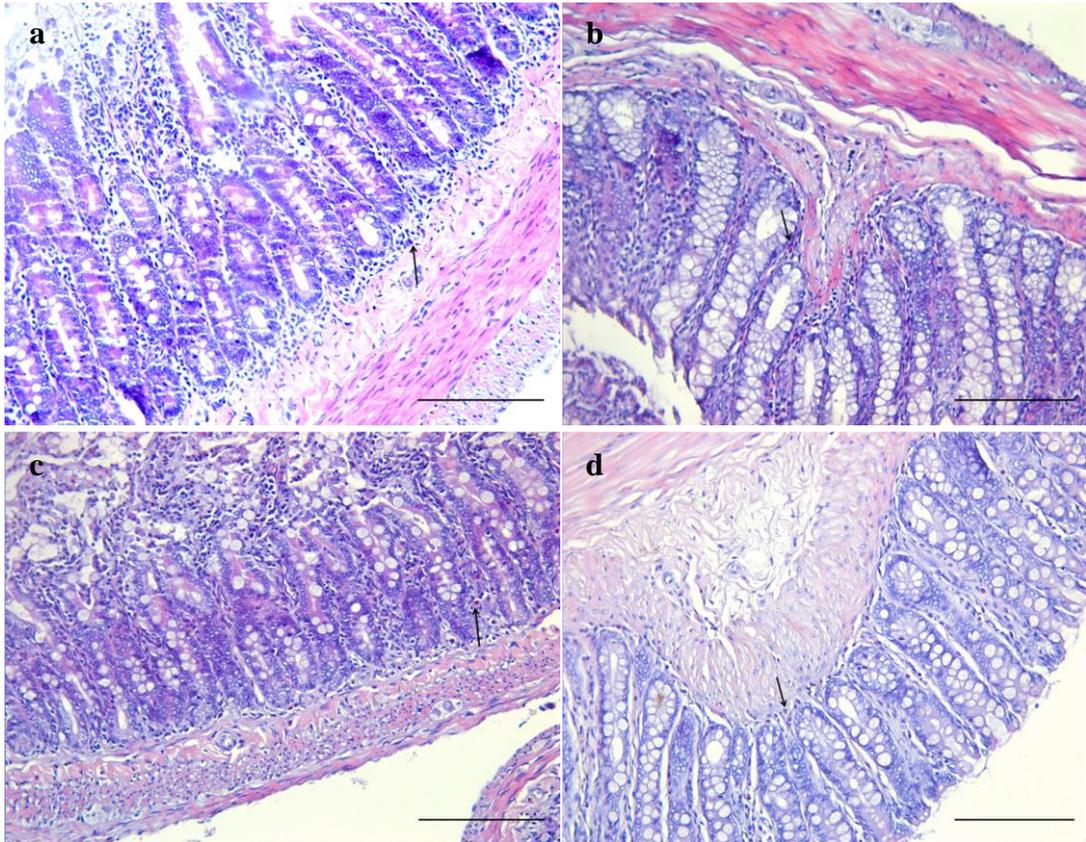


FIGURA 20: Fotomicrografia dos intestinos grosso característicos (a;b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. Eosinófilos (seta); (coloração HE, barra = 140 μ m).

No pâncreas e na adrenal foi procurada a presença de processos degenerativos reversíveis e irreversíveis (necróticos), distúrbios circulatórios, como hiperemia ou congestão, presença de infiltrado inflamatório, fibrose e proliferação de ductos no caso do pâncreas exócrino. O pâncreas é uma glândula mista, cuja parte exócrina secreta o suco pancreático e sua parte

endócrina, as ilhotas de Langerhans, secreta insulina, glucagon somatostatina e polipeptídeo pancreático (GUYTON e HALL, 2002).

Quanto ao pâncreas dos animais do experimento, apesar das preparações terem apresentado muito artefato, devido, provavelmente à pequena espessura do corte no micrótomo, prejudicando principalmente a parte exócrina (adenômeros acinosos serosos), de maneira geral, o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 21a) não apresentou diferenças significativas comparadas o G4 (controle; FIGURA 21b). Foram observadas ilhotas pancreáticas com rede de capilares características, ducto principal, ductos inter e intralobulares, arteríolas e vênulas características, ácinos pancreáticos serosos com núcleos arredondados e o interior com coloração mais clara característica (grânulos de zimogênio e células centroacinares).

De acordo com JEONG-SANG *et al.* (2005) camundongos hiperglicêmicos, induzidos com estreptozocina e tratados, por seis semanas, com 10mg/kg e 40mg/kg do extrato de *H. dulcis*, apresentaram redução glicêmica e maior tolerância à glicose. A análise histopatológica do pâncreas mostrou que as Ilhotas de Langerhans foram parcialmente regeneradas quando comparadas ao grupo doente não tratado. Foi observado aumento na quantidade de fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF I e II). Os resultados sugerem que o tratamento auxilia na recuperação de danos causados ao pâncreas pela estreptozocina.

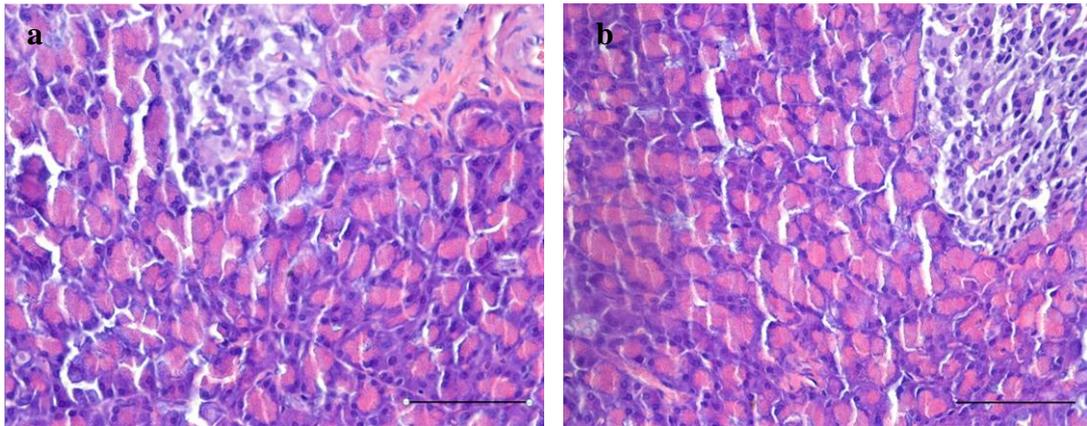


FIGURA 21: Fotomicrografia do pâncreas característico (a) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (b) representando o G4, grupo controle. Eosinófilos (seta); (coloração HE, barra = 70 μ m).

A adrenal ou suprarrenal é uma glândula endócrina que secreta mineralocorticoide (aldosterona), na zona glomerulosa do córtex; androgênios e glicocorticóides (cortisol), na zona fasciculada e reticulada do córtex; adrenalina e noradrenalina na região medular. Os múltiplos sistemas hormonais do organismo desempenham papel-chave na regulação de quase todas as funções, incluindo o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento, o equilíbrio hidroeletrolítico, a reprodução e o comportamento (GUYTON e HALL, 2002).

Quanto à adrenal dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 22a;b) quanto o G4 (controle; FIGURA 22c;d) não apresentaram alterações significativas, com cordões celulares da região cortical e medular características e presença de gotículas lipídicas na cortical características.

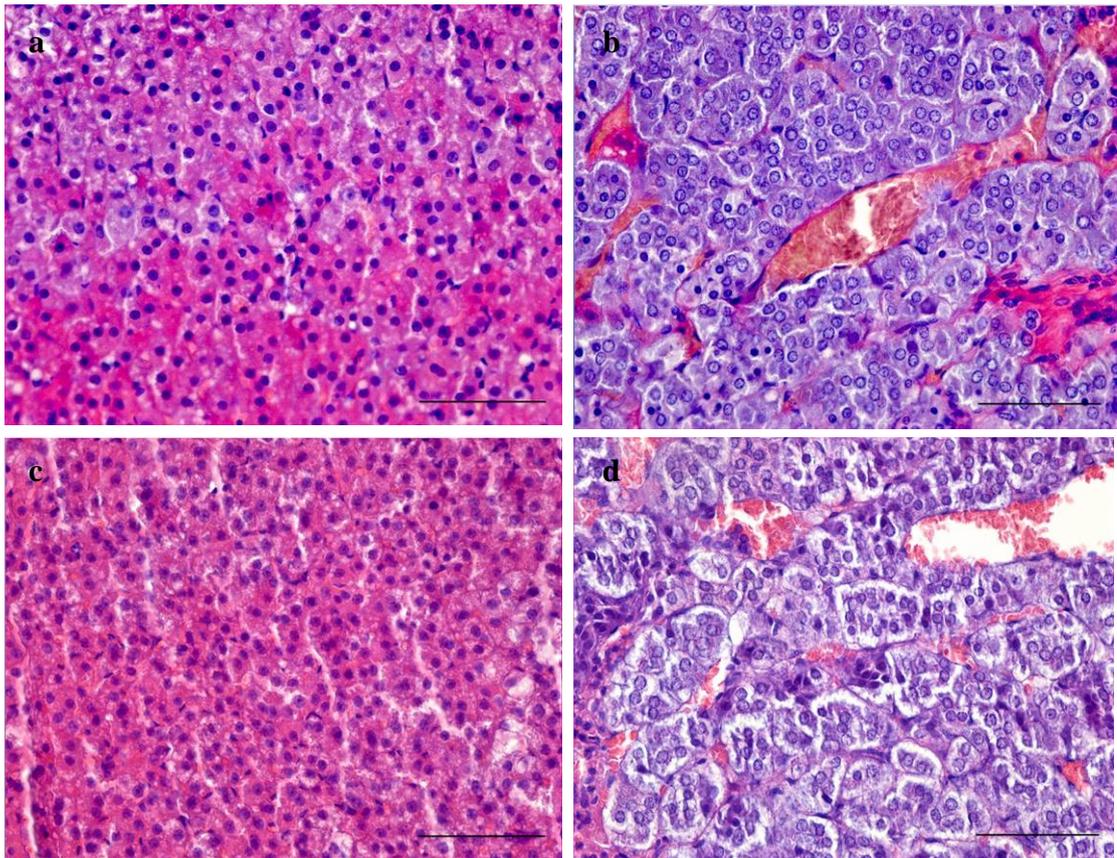


FIGURA 22: Fotomicrografia da adrenal mostrando as regiões cortical (a;c) e medular (b;d) características; (a,b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70 μ m).

Quanto aos testículos e ovários dos animais do experimento, de maneira geral, tanto o grupo G3 (tratado com a maior dose; FIGURA 23a;b) quanto o G4 (controle; FIGURA 23c;d) apresentaram ausência de alterações significativas.

Nos testículos foi avaliada a integridade dos túbulos seminíferos, que possuem as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes, espermatozóides), as células intersticiais ou de Leydig no tecido conjuntivo frouxo, secretoras de testosterona, presença e integridade dos vasos sanguíneos.

Nos ovários, que secretam principalmente estrogênio e progesteronas, foi avaliada a preservação dos folículos ovarianos, em suas diferentes fases de crescimento (primordial, primário, vesicular e maduro), corpo lúteo e corpo albicans, camadas da granulosa e camadas de teca interna e teca externa. Tanto os testículos quanto os ovários foram observados quanto às alterações circulatórias, como hiperemia, congestão, presença de infiltrado inflamatório e proliferação de tecido conjuntivo fibroso (fibrose).

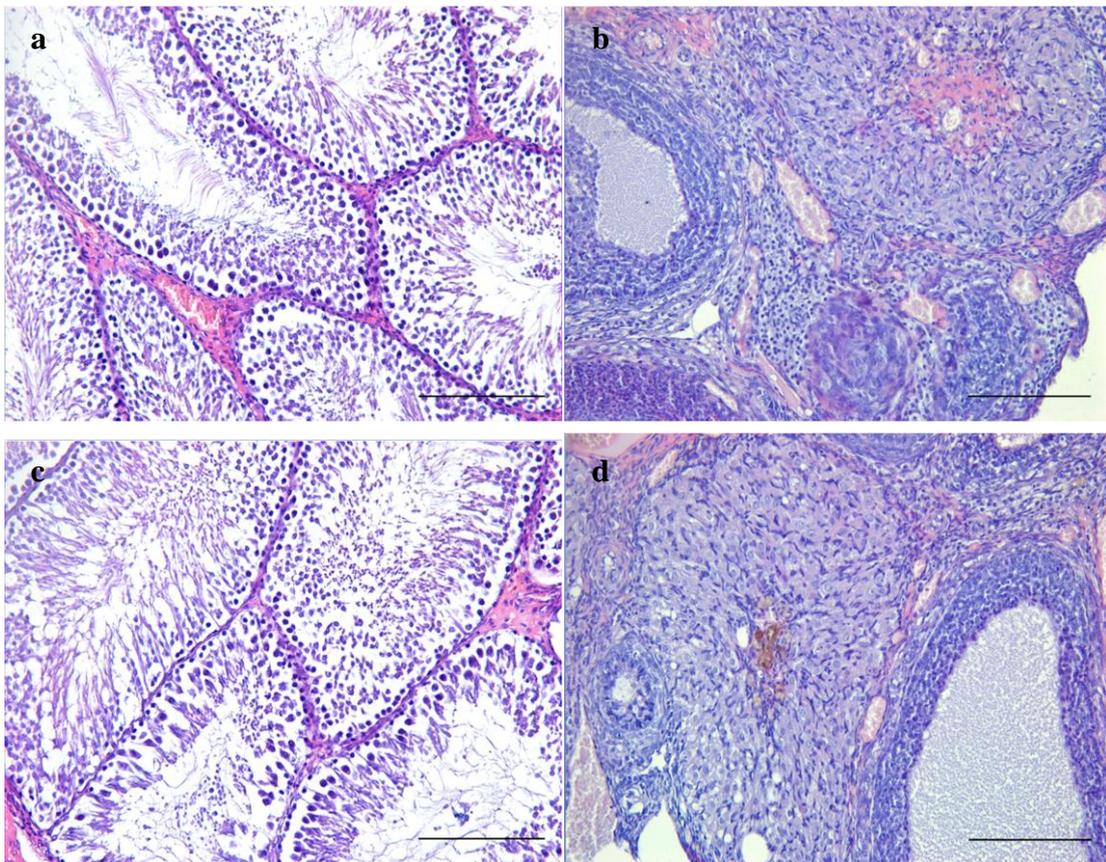


FIGURA 23: Fotomicrografia do testículo (a;c) e ovário (b;d) característicos; (a,b) representando o G3, grupo tratado com a maior dose, sem alterações significativas; (c;d) representando o G4, grupo controle. (coloração HE, barra = 70 μ m).

O princípio de que o benefício advindo da utilização de um produto com finalidade medicamentosa deve superar seu risco potencial deve ser aplicado também aos produtos da medicina tradicional e popular (SIMÕES, *et al.* 1998).

Uma das grandes vantagens da utilização das plantas medicinais no tratamento ou prevenção das várias enfermidades é que elas normalmente apresentam toxicidade baixa nas concentrações de uso e possuem uma margem terapêutica bastante segura, devido a menores concentrações de vários ativos que quase sempre agem em sinergismo. Os estudos de um novo fitoterápico envolvem a etapa botânica, relacionada à identificação do material de estudo; a etapa farmacêutica relacionada ao preparo da forma farmacêutica, visando garantia de qualidade, uniformidade e estabilidade para os ensaios posteriores; a etapa de ensaios biológicos pré-clínicos, relacionada aos ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório para garantir o grau de segurança para os testes em humanos (o primeiro objetivo é mostrar eficácia do material, para justificar continuidade dos estudos e depois segurança); e a etapa clínica, realizada na espécie humana, dividida em quatro fases sequenciais, de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde, sendo a primeira delas em voluntários sadios, para farmacodinâmica, farmacocinética e toxicologia, a segunda fase em poucos voluntários doentes, sem retirada do tratamento referência. A terceira e quarta fases envolvem estudos multicêntricos utilizando grupos diferenciados, placebo, tratamento teste e tratamento referência, sendo a última após a comercialização sob farmacovigilância (LAPA *et al.*, 2000).

6. CONCLUSÃO

A etapa botânica e farmacêutica foi bem desenvolvida gerando a correta identificação da planta e dos “frutos” da *Hovenia dulcis* e preparo tecnicamente adequado do extrato utilizado na formulação farmacotécnica. O extrato apresentou atividade antioxidante, pelo método do DPPH corroborando a literatura sobre a planta e foi devidamente padronizado, utilizando, para tanto, o teor de umidade e o doseamento do flavonóide dihidromiricetina no extrato final.

O fitopreparado desenvolvido a base do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Hovenia dulcis* não apresentou evidências de toxicidade aguda (experimento de dose única) ou crônica (experimento de doses repetidas) de acordo com os parâmetros propostos na RE nº 90 de 2004 em níveis comportamentais, ponderais, hematológicos, bioquímicos sorológicos e histológicos. Adicionalmente apresentou evidências, que corroboram a literatura, de efeitos benéficos em nível sanguíneo dos parâmetros hepáticos e renais.

Para continuidade do presente trabalho são necessários, ensaios pré-clínicos em outra espécie mamífera não roedora, ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade para finalmente partir para os ensaios clínicos, visando o registro do fitopreparado proposto como um medicamento fitoterápico de acordo com a resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos, a RDC nº 14, de 05 de abril de 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-ZAHER, A. O. *et al.* Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. J Ethnopharmacol, v. 101, p. 129-138, 2005.
- ALBINATI, A.C.L. *et al.* Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Arq Bras Med Vet Zootec., v.61, n.3, p.621-627, 2009.
- ALMEIDA, J. A. *et al.* The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environ Int, v. 27, p. 673-679, 2002. Apud: PRETTO, A. Parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cádmio. Dissertação de mestrado em Bioquímica toxicológica. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- ALVARENGA, L. F. Estudo da *Hovenia dulcis* na diabetes e na cicatrização de feridas em coelho. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.
- ANDERSON, L.A. *et al.* Nutrição. Rio de Janeiro: Guanabara, Cap.10, p.179-187, 1988.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 18.ed. Washington: AOAC, P. 3000, 2007.
- ATTAWISH, A. *et al.* Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*. Fitoterapia, v. 75, p. 539– 551, 2004.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Editora Artmed. Porto Alegre, p. 677, 2005.
- BACCARIN, T. Desenvolvimento e padronização de extrato seco de *rapanea ferruginea* mez. (mirsinaceae) obtido por spray drying e avaliação *in vivo* da atividade antinociceptiva. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2010.
- BAMPI, M. *et al.* Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. Cienc Rural, v. 40, n. 11, p. 2361-2367, 2010.
- BAO-JUN X.; YU-QIU D.; CHANG-KEUN. S. Advances in Studies on Bioactivity of *Hovenia dulcis*. S. Agric. Chem. Biotechnol., v.47(1), p. 1-5, 2004.

BARROS, C.S.L. Fígado, Vias Biliares e Pâncreas Exócrino. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. Patologia Veterinária. Editora Roca, São Paulo, p. 183-290, 2011.

BHUIYAN, M.A.R.; HOQUE, M.Z.; HOSSAIN, S.J. Free Radical Scavenging Activities of *Zizyphus mauritiana*. WJAS, v.5 (3), p.318-322, 2009.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev. Nutr., v. 12(2), p. 123-130, 1999.

BIGUETTI, A.E. *et al.* Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. Lecta, v. 22, n. 1/2, p. 53-58, 2004.

BORGES, L.L. *et al.* Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. v.7, n.12, 2011.

BOX, J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.*, v. 17, n. 5, p. 511-525, 1983.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 5.991 de 17/12/1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. D.O.U. Brasília, 1973.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 6.360 de 23/09/76. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. D.O.U. Brasília, 1976.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 9.782 de 26/01/1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. D.O.U., Brasília, 1999.

BRASIL. Estado do Paraná. Secretaria Estadual de Saúde. Resolução nº 19 de 10/03/1992. Resolve suspender, por tempo indeterminado, a comercialização da planta medicinal cambará (*Lantana* sp), tanto *in natura* como sob todas as formas farmacêuticas. Diário Oficial do Estado do Paraná, 1992b.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Ministério da Marinha de Guerra, do exército e da aeronáutica militar. Decreto-lei no 986 de 21/10/1969. Regulamenta o registro, controle, rotulagem, aditivos, padrões de identidade e qualidade, fiscalização, dentre outras providencias relativas aos alimentos. D.O.U. Brasília, 1969.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 22 de 15/03/2000. Dispõe sobre os Procedimentos Básicos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. D.O.U. Brasília, 2000a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 23 de 15/03/2000. Dispõe sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro para produtos pertinentes à área de alimentos. D.O.U., Brasília, 2000b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 24/02/2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 2000c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 88 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 89 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2004c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2004d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 91 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2004e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 267 de 22/09/2005. Aprova o Regulamento Técnico de Espécies vegetais para o preparo de chás. D.O.U. Brasília, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 277 de 22/09/2005. Aprova o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. D.O.U. Brasília, 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 278, de 22/09/2005. Aprova as categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro. D.O.U. Brasília, 2005c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 219 de 22/12/2006. Aprova a inclusão do uso das espécies vegetais e parte(s) de espécies vegetais para o preparo de chás constante da Tabela I do Anexo desta Resolução em complementação as espécies aprovadas pela Resolução ANVISA RDC nº267 de 2005. D.O.U. Brasília, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971 de 03/05/2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Brasília, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 13/01/1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. D.O.U. Brasília, 1998d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. D.O.U. Brasília, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. D.O.U. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 10, DE 09/03/2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. D.O.U., Brasília, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Interministerial nº 2.960, DE 09/12/2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 2008d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. Aprova as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. 1996b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 251 de 07 de agosto. Aprovam as Normas para a Área de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 40 de 10/01/1994. Institui a subcomissão da Comissão Permanente da Farmacopéia Brasileira para elaborar monografias de plantas medicinais. D.O.U. Brasília, 1994a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 42 de 10/01/1994. Institui a subcomissão da Comissão Permanente da Farmacopéia Brasileira para elaborar normas sobre fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 1994b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 43 de 10/01/1994. Institui a Comissão Técnica de Integração Terapêutica. D.O.U. Brasília, 1994c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 546 de 21/05/1993. Institui o Grupo Consultor Técnico-científico incumbido de estabelecer a normatização e o controle dos serviços, da produção, da armazenagem e da utilização de substâncias e produtos naturais. D.O.U. Brasília, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.274, DE 25/06/2008. Institui Grupo Executivo para o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 2008c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 31 de 06/04/1994. Cria o Grupo de Estudos de Produtos Fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 1994d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 665 de 25/08/1998. Institui a Subcomissão Nacional de Assessoramento em Fitoterapia (CONAFIT) da CONATEM, vinculada à SVS. DOU 26/08/1998a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.029 de 21/12/1998. Submete à consulta pública proposta de regulamento técnico sanitário visando disciplinar o procedimento de registro de produto fitoterápico. D.O.U. Brasília, 1998b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 178 de 10/03/1998. Submete à consulta pública o regulamento técnico sanitário visando disciplinar o procedimento de isenção de registro de produtos. D.O.U. Brasília, 1998c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116 de 08/08/1996. Norma para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 1996a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6 de 31/01/1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. D.O.U. Brasília, 1995a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 81 de 13/09/1995. Aprova a regulamentação para isentos de registro. D.O.U. Brasília, 1995b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 19 de 30/01/1992. Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno. 1992a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC nº 60, de 10/11/2011. Aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências. D.O.U., Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC nº 47, de 08/09/2009. Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. D.O.U., Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. IN nº 5 de 11/12/2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado". D.O.U., Brasília, 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. IN nº 05 de 05/03/2010. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos". D.O.U., Brasília, 2010d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC nº 39/06/2008. Aprova o regulamento para a realização de pesquisa clínica e dá outras providências. D.O.U., Brasília, 2008b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 123 de 19/10/1994. Estabelece as normas para o registro de produtos fitoterápicos, determinando 30 dias para questionamentos fundamentados visando o seu aperfeiçoamento. DOU 20/10/1994e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia. Portaria nº 22 de 30/10/1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. D.O.U. Brasília, 1967.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5813 de 22/06/2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Brasília, 2006c.

BUSH, B.M. Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais. Rio de Janeiro:Roca, Caps 5,6 e 7, 2004

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines(Phytotherapeutic agents). Braz J Med Biol Res. v. 33, p.179-189, 2000.

CAPASSO, R. *et al.* Phytotherapy and quality of herbal medicines. Fitoterapia, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARVALHO, A.C.B. *et al.* Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia, ano V, n. 11, p. 26-32, 2007.

CARVALHO, A.C.B. *et al.* Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Rev Bras Farmacogn., v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, P. E. R. Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg). Colombo: EMBRAPA-CNPFLorestas. Circular Técnica, no. 23, Série: CDD 634.97, 1994.

CASTRO, T.C. *et al.* Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada *in vivo* e *in vitro*. Rev Bras Farmacogn., v.12, p. 96-99, 2002.

CATTANI, O. *et al.* Correlation Between Metallothionein and Energy Metabolism in Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*, Exposed to Cadmium. Comp Biochem Physiol C, v. 113, p. 193-199, 1996.

CHEN S.H. *et al.* Influence of *Hovenia dulcis* on alcohol concentration in blood and activity of alcohol dehydrogenase (ADH) of animals after drinking. China J Chin Mat Med., v.31(13), p. 1094-1096, 2006.

CHIN, Y.W. *et al.* Prenylated flavonoids from the root bark of *Berchemia discolor*, a Tanzanian medicinal plant. J. Nat. Prod., v. 69 (11), p.1649 - 1652, 2006.

CHO, J.Y.; MOON, J.H; PARK, K.H. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. KoSFoST, v. 32(6), p. 1403-1408, 2000.

CRAVEIRO A.C.S. *et al.* Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. Rev Bras Farmacogn., v. 18 (Supl.), p. 739-743, 2008.

CRUZ-ORIVE, L.M.; WEIBEL, E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. Am J Physiol., v. 25, p. 8148-8156, 1990.

CUNHA L.C. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. Rev Bras Farmacogn., v. 19(2A), p. 403-411, 2009.

CZERWIŃSKA, M. *et al.* Mechanistic aspects of alloxan diabetogenic activity: a key role of keto-enol inversion of dialuric acid on ionization. J. Phys. Chem. A., v. 110(22), p.7272-7278, 2006.

DE SMET, H.; BLUST, R. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. Ecotoxicol Environ Safety, v. 48, p. 255-262, 2001. Apud: PRETTO, A. Parâmetros

toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cádmio. Dissertação de mestrado em Bioquímica toxicológica. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

DIALLO A. D. *et al.* Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. C R Chimie, v. 7, p.1073–1080, 2004.

DING, L.S.; LIANG Q.L.; TENG Y.F. Study on flavonoids in seeds of *Hovenia dulcis*. Acta Pharm Sinica, v. 32(8), p. 600-602, 1997.

ECEVİT, F.M. *et al.* Selection of Superior Ber (*Ziziphus jujuba* L.) Genotypes in Çivril Region. J Agr Sc., v.14 (1), p. 51-56, 2008.

FAUCI, A.S., *et.al.* Harrison's Principles of Internal Medicine. New York: McGraw-Hill, 1998.

FANG, H.L. *et al.* Treatment of Chronic Liver Injuries in Mice by Oral Administration of Ethanolic Extract of the Fruit of *Hovenia dulcis*. Am J Chinese Med, v. 35 (4), p. 693–703, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., Ed.; Atheneu, São Paulo, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., Ed.; Atheneu, São Paulo, 2000.

FERREIRA, A. A. *et al.* Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.2, p.14-18, 2006.

FERREIRA, J.B. Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritides* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2005.

FERREIRA, L. A.; LEITE, J. P. V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J. P. V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. Atheneu: São Paulo. p. 205-251. 2009.

FONTES, M.E. Toxicologia. Lisboa: Seção de Farmacologia e Toxicologia, p.11, 2001 apud GONÇALVES, A.R. *et al.* Citotoxicidade de plantas com indicativo etnográfico para a desinfecção de água. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.3, p.305-309, 2009.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. Ecotoxicology in theory and practice. Chapman and Hall, Londres, p.247, 1994, apud LIMA, J.M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Planta Daninha, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

GADELHA, A.P.R. *et al.* Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. Parasitology Research, Springer-Verlag, 2005.

- GIACOMELLI, S.R. *et al.* Ciclopeptídeos isolados de *Discaria febrifuga* Mart. In: 23ª Reunião anual da SBQ, livro de resumo, 2001.
- GIACOMELLI, S.R. *et al.* Cyclic peptide alkaloids from the bark of *Discaria Americana*. *Phytochem*, v. 65(7), 2004.
- GIL, E. S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 3 ed. Pharmabooks: São Paulo. P. 511, 2010.
- GONÇALVES, A.R. *et al.* Citotoxicidade de plantas com indicativo etnográfico para a desinfecção de água. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.11, n.3, p.305-309, 2009.
- GONZÁLEZ, F.H.D; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2.ed. Porto Alegre:UFRGS, p. 313-355, 2006. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquímica>. Acesso em: 30/06/2010.
- GOODMAN A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw-Hill, 11ª ed. 2006.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- HASE, K. *et al.* Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. On Experimental Liver Injuries Induced by Carbon Tetrachlorid ou D-Galactosamine/Lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 20(4), p. 381-385, 1997.
- HE, G.X. *et al.* Studies on the effect of dihydromyricetin on antilipid-peroxidation. *China J Chin Mat Med.*, v. 28(12):1188-1190, 2003.
- HIROTAKA, O. *et al.* Diabetic and food. JP 20010323710 20011022, 2003.
- HOGIHARA, Y. *et al.* Droplet counter-current chromatography for the separation of plant products. *Journal Chromatog.*, v. 128(1), p. 218-23, 1976. apud: INOUE, O.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y. Carbohydrate Structures of Three New Saponins from the Root Bark of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). *J.C.S. Perkin I.*, 1978.
- HOGIHARA, Y.; CHEN, Y.; KOBAYASHI, Y. A new prosapogenin from *Hovenia* Saponin D by Mild Alkaline Degradation. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 35 (6), p. 2574-75, 1987.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: Edufscar, 2003.
- HÜBSCHER, G.H. Modulação da hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina através da administração de suco de uva e do vinho tinto.

Tese do doutorado (Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HUSSAIN, R.A. *et al.* Plant-derived sweetening agents:saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. J Ethnopharm, v.28, p. 103-115, 1990.

INOUE, O.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y. Carbohydrate Structures of Three New Saponins from the Root Bark of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). J.C.S. Perkin I., 1978.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3.ed. v. 1, São Paulo, 2005.

JEONG-SANG, K.; CHANG-SOO, N.; JONG-BANG, E. Effect de *Hovenia dulcis* Thunberg extract on the hyperglycemic mice induced with streptozocin. J. Korean Soc. Food Sci Nutr. v.34, p.632-637, 2005.

JI, Y. *et al.* Effects of *Hovenia dulcis* Thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice. J Chin med mat., v. 25(3), p. 190-191, 2002.

JI, Y.,; LI, J.; YANG, P. Effects of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb on acute alcohol toxicity in mice. J Chin med mat., v.24(2), p.126-8, 2001.

KAWAI, K. *et al.* A new sapogenin in the saponins of *Zizyphus jujube*, *Hovenia dulcis* and *Bacopa monniera*. Phytochesm, v. 13, p. 2829-2832, 1974.

KENNED, L.M. *et al.* Hodulcin: selective sweetness-reducing principle from *Hovenia dulcis* leaves. Chem Senses, v. 13, p. 529-543, 1988.

KERR, M.G. Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia. 2. ed. São Paulo: Roca, parte II, p. 81-163, 2003.

KEYLER, D.E. *et al.* Toxicity Study of an Antidipsotropic Chinese Herbal Mixture in Rats: NPI-028. J Altern Complement., v. 8 (2), p. 175–183, 2002.

KIM, K. Composition comprising *Hovenia dulcis* Thunb. extract, *Lindera obtusilobe* Blume extract or herbal mixture extract thereof. US2005/0160699. 2005.

KIM, O.K. Protective effects of extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., v. 30, p. 1260-1265, 2001.

KIMURA, Y. *et al.* Three New Saponins from the Leaves of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). J.C.S. PERKIN, 1981

KOBAYASHI, Y.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y. Novel Dammarane Triterpenoid Glycosides from the Leaves of *Hovenia dulcis*. X-Ray Crystal Structure of Hovenolactone Monohydrate. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1982.

KOLLER, G.; ALEXANDER III, J.K. The Rainsin Tree – Its Use, Hardiness and Size. *Arnoldia*, v.39(1), p.7-15. 1979.

LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercrítico: quo vadis? *Rev Analytica*. n. 2, p. 30-37, 2002.

LANINI, J. *et al.* “O que vêm da terra não faz mal” - relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. *Rev Bras Farmacogn*, v. 19, n. 1A, p. 121-129, 2009.

LAPA, A.J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O., *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª Ed. Florianópolis, UFSC. Porto Alegre: UFRGS, cap. 35, p. 181-196, 2000.

LEE, H.Y.; KIM, H.S.; PARK, Y.S. Hovenodulinol, an active compound extracted from *Hovenia dulcis* Thunb, a process for preparing the same, and an alcohol decomposing agent or an agent for alleviating lingering intoxication containing the same. Patente WO02/24678A1, 2002.

LEE, Y.A.; CHAE, H.J.; MOON, H.Y. Effect of *hovenia dulcis* Thunberg var. koreana nakai fruits extracts on glucose, lipid metabolism and antioxidant activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Life Sc Bull Korea*, v. 11 (4), 2005.

LI, G., *et al.* Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. *Arch. Pharm. Res.*, v. 28 (7), p. 804-809, 2005.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 126-129, 2002.

LIMA, J.M. *et al.*, Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta Daninha*, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LIMA, O. A. *et al.* Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica:Técnica e Interpretação. Editora Guanabara Koogan, sexta edição, 1985.

LIMA, R.B. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. *Rodriguésia*, v. 57 (2), p. 247-249, 2006.

LINDSEY, J.R. *et al.* Murine chronic respiratory disease. Significance as a research complicated and experimental production with *Mycoplasma pulmonis*. *American J Pathol.*, v.64, p. 675-716, 1971.

- LI-PING, R. *et al.* Improving the solubility of ampelopsin by dispersions and inclusion complexes. *J Pharm Biomed An.*, v. 38, p. 457-464, 2005.
- LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. *Phytopharmaceutical technology*. Boca Raton: CRC, 1989.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.*, v.75, p. 469-486, 2003.
- MAPHOSA, V.; MASIKA, P.J.; MOYO, B. Toxicity evaluation of the aqueous extract of the rhizome of *Elephantorrhiza elephantina* (Burch.) Skeels. (Fabaceae), in rats. *Food Chem Toxicol.*, v. 48, p.196–201, 2010.
- MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. *J Bras Fitomed.*, n. 2, v. 3, p. 74-76, 2005.
- MARQUES, L.C. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C.M.O., *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2ª Ed. Florianópolis, UFSC. Porto Alegre: UFRGS, cap. 14, p. 259-289, 2000.
- MASTERS, K. *Spray Drying*. 2 ed. New York, John Wiley, 1976.
- MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições UFC, segunda edição, 1997.
- MATOS, L.C.; MARTINS, B. Hepatites tóxicas:revisão da literatura. *Ver Soc Port Med Int.*, v. 12 (4), p. 239-258, 2005.
- MELLO J.R.B. *et al.* Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gossypium herbaceum* (Algodoeiro) em Ratos Wistar. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 27 (1), p. 46-55, 2008.
- MELLO, F.B.; LANGELOH, A.; MELLO, J.R.B. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cassia angustifólia*. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 26 (2), p. 230-7, 2007.
- MEYER, B.N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v.45, p.31-4, 1982. Apud: FERREIRA, A.A. *et al.* Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.8, n.2, p.14-18, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17 de 16/04/2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. D.O.U. Brasília, 2010e.
- MOREL, A.F.; MACHADO, E.C.; WESSJOHANN, L.A. Cyclopeptide alkaloids of *Discaria febrifuga* (Rhamnaceae). *Phytochem.*, v. 39(2), p.431-434, 1995.

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica para o Laboratório – Princípios e Interpretações. Editora Médica Missau, 4 edição, 2003.

NA, C.S.; JUNG, N.C.; KIM, S.H. Therapeutic composition for diabetes containing lower alcohol insoluble extract fraction of *Hovenia dulcis* thunberg or polysaccharides separated therefrom. KR100417287 (B1). 2004.

NA, C.S.; JUNG, N.C.; KIM, S.H. Lower alcohol-insoluble extract of *Hovenia dulcis* Thunb. and a polysaccharide isolated therefrom. WO03/059369A1. 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.C. Lehninger: Princípios da Bioquímica. 4.ed. São Paulo: Sarvier. Parte II. 2006.

NOVAES, R.D. *et al.* Bark extract of *Bathysa cuspidata* attenuates extra-pulmonary acute lung injury induced by paraquat and reduces mortality in rats. Int. J. Exp. Path., v. 93, p. 225–233, 2012.

OKUMA, Y. *et al.* Effect of extracts from *Hovenia dulcis* Thunb. on alcohol concentration in rats and men administered alcohol. J Jpn Soc Nutr Food Sc., v.48(3), p.167-172, 1995.

OLIVEIRA, A. B. *et al.* A normatização dos fitoterápicos no Brasil. Visão Acad., v. 7, n. 2, 2007.

OLIVEIRA, A.C. Influência da concentração do EDTA, tempo e temperatura de armazenagem sobre parâmetros hematológicos de cães no hemograma automatizado e manual. Dissertação de mestrado (Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Programa de medicina tradicional. *Pautas para la avaliacion de medicamentos herbarios*. Genebra:OMS, 1991.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Proposed WHO Guidelines for Good Clinical Practice (GCP) for Trials on Pharmaceutical Products. WHO Drug Information, v.6, n.4, p.170-188, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Who Monographs on selectad medicinal plants. World Health Organization Geneva, v.1, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Who Monographs on selectad medicinal plants. World Health Organization Geneva, v.2, 2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in

Rodent. Paris: Head of Publications Service, 1995. Disponível em <http://www.oecd.org/publications>. Acesso em: 22/06/2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris: Head of Publications Service, 2001. Disponível em <http://www.oecd.org/publications>. Acesso em: 22/06/2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for testing of chemicals. Paris: Head of Publications Service, 2011. Disponível em <http://www.oecd.org/publications>. Acesso em: 22/10/2011.

PARDAL, P.P.O.; ITHO, S.F. Envenenamento por plantas. In: GERÊNCIA GERAL DE TOXICOLOGIA DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Toxicologia. Disponível em: <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/apresent.htm>. Acesso em: 23/05/2011.

PAULO P.T.C. *et al.* Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). Rev Bras Farmacogn., v. 19(1A), p. 68-76, 2009.

PINTO, T.J.A. *et al.* Ensaios toxicológicos e de inocuidade. In: Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo, Editora Atheneu, p.291, 2000.

PRETTO, A. Parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cádmio. Dissertação de mestrado em Bioquímica toxicológica. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

PROVITAL GROUP. Myriceline. Centerchem, Inc., 2006. Disponível em: <http://www.centerchem.com>, acesso em: 20/05/2010.

REN-BO, A. *et al.* Cytoprotective Constituent of Hoveniae Lignum on Both Hep G2 Cells and Rat Primary Hepatocytes. Arch. Pharm. Res. v. 30 (6), p. 674-677, 2007.

RIGATTO, P.A. *et al.* Características Físicas, Químicas e Anatômicas da Madeira de *Hovenia dulcis*. Comunicado técnico ISSN 1517-5030, EMBRAPA, 2001.

ROSAS, L.V. *et al.* *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Braz. J. Med. Biol. Res., 2007.

SANTOS, A.M.S. *et al.* Medicinas Tradicionais no Vale do Rio Negro (Amazonas, Brasil). Observações sobre Etnofarmacologia e o Uso da Planta Saracura-Mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*): Atividade

- Farmacológica e/ou Eficácia Simbólica. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Ciências Humanas, Belém, v. 1, n. 1, p. 137-147, 2005.
- SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. Patologia Veterinária. Editora Roca, São Paulo, p. 183-290, 2011.
- SCHALM, O.W. *et al.* Hematologic Techniques. Chalm's Veterinary Hematology. 4 ed, Lea & Febiger, cap. 2, 1986.
- SEUNG, M. Y.; SUNGYONG, M.; JIN-HYUN, K. Recovery and pre-purification of (+)-dihydromyricetin from *Hovenia dulcis*. Process Biochem., 2005.
- SHEN, Y. *et al.* Dihydromyricetin As a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. J Neurosc., v. 32(1), p. 390-401, 2012.
- SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, Cap.23, p. 577-614, 2004.
- SIMÕES, C.M.O., *et al.* "Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul", Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, ed. 5, 1998.
- SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. J Agric Food Chem., v. 50, p. 81-86, 2002.
- SONAGLIO, D. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 289-326, 2007.
- SOUSA, C.M.M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, M.T.; SILVA, M.D.; CARVALHO, R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. Einstein. v. 8, n. 1, p. 102-106, 2010.
- SUTTISRI, R.; LEE, I.S.; KINGHORN, A.D. Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. J Ethnopharmacol., v. 47, p.9-26, 1995.
- TAKAI, M.; OGIHARA, Y.; SHIBATA, S. New peptide alkaloids from *Hovenia dulcis* and *Hovenia tomentella*. Phytochem., v. 12, p. 2985-2986, 1973.
- THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Caps 21, 22, 23 e 26. São Paulo:Roca, 2007.
- THEML, H. *et al.* Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. Color Atlas of Hematology. 2 ed., Editora Thieme Stuttgart/New York, 2001.

TORRES, K.R. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. In: Congresso Brasileiro de Farmácia Homeopática, 7., 2009.

TROPICOS, BANCO DE DADOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: 24/05/2010.

TUROLLA, M.S.R. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. 2004. 131. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). 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. Rev Bras Cienc Farm, vol. 42, n. 2, 2006.

VEIGA, A.A.S. Isolamento e quantificação de flavonóides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Jatropha gossypifolia* L. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2008.

VOLPATO, G.T. *et al.* Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do *Diabetes mellitus*. Rev.Bras.Pl.Med., v.4(2), p.35-45, 2002.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine. v. 8. n. 5, p. 401-409, 2001.

XU, B.J. *et al.* A rapid screening for Alcohol Detoxification Constituents of *Hovenia Dulcis* by Microplate Reader. Agrc. Chem. Biotechnol., v. 46(), p. 105-109, 2003.

YAHYA, M.A.A.; FARHAN, A.H.A.; ADAM, S.E.I. Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. Fitoterapia, v. 71, p. 385-391, 2000.

YOO, S.M.; MUN, S.; KIM, J.H. Recovery and pré-purification of (+)-dihydromyricetin from *Hovenia dulcis*. Process Biochem., 2005.

YOSHIKAWA, K. *et al.* Antisweet natural products: VII. Hodulosides I,II,III, IV and V from the leaves of *Hovenia dulcis* Thunb. Chem Pharm Bull., v. 40(9), p. 2287-2291, 1992.

YOSHIKAWA, K. *et al.* Antisweet natural products: VIII. Structures of hodulosides VI-X from *Hovenia dulcis* Thunb. Var. *tomentella* Makino. Chem Pharm Bull., v. 41(10), p. 1722-1725, 1993.

YOSHIKAWA, K. *et al.* Hovetrichosides C-G, Five New Glycosides of Two Auronols, Two Neolignans, and a Phenylpropanoid from the Bark of *Hovenia trichocarea*. J. Nat. Prod. v. 61, p. 786-790, 1998a.

YOSHIKAWA, K.; KIMURA, Y.K.E.; ARIHARA, S. Lupane-triterpene and a 3(2-41)abeolupane glucoside from *Hovenia trichocarea*. *Phytochem.*, v. 49 (7), p. 2057-2060, 1998b.

YOSHIKAWA, K.; MIMURA, N; ARIHARA, S. Isolation and Absolute Structures of Enantiomeric 1,2-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol 1-O-Glucosides from the Bark of *Hovenia trichocarpa*. *J. Nat. Prod.* v. 61, p. 1137-1139, 1998c.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I,II and III, isolated from hoveniae semen seu fructus, the seed and fruits of *hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepaprotective activity. *J Pharm Soc Japan*, v.117(2), p.108-118, 1997.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Absolute stereostructures of hovenidulciosides A1 and A2, bioactive novel triterpene glycosides from hoveniae semen seu fructus, the seeds and fruits of *Hovenia dulcis* Thunb. *Chem Pharm Bull.* (Tokyo), v.43(3), p.532-534, 1995.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Bioactive saponins and glycosides. IV. Four methylmigrated 16,17-secodammarane triterpene glycosides from Chinese natural medicine, hoveniae semn seu fructus, the seeds and fruits of *Hovenia dulcis* THUNB.: absolute stereostructures and inhibitory activity on histamine release of hovenidulciosides A1, A2, B1 and B2. *Chem Pharm Bull.*, v. 44(9), p. 1736-1743, 1996.

YU, X.Z. *et al.* Optimization of Ultrasonic Extraction Process for Total Flavonoids from *Hovenia* Seeds by Response Surface Methodology. *Food Sc.*, v. 32, n. 12, 2011.

ZHANG, Y.S *et al.* Antioxidation properties and mechanism of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*. *Acta Pharm Sinica.*, v. 38(4), p. 241-244, 2003.

ANEXO I

RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.

O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria n.º 13, de 16 de janeiro de 2004, considerando o disposto no art.111, inciso II, alínea "a" § 3º do Regimento Interno, aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, considerando que a matéria foi submetida à apreciação da Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 8 de março de 2004, resolve:

Art. 1º Determinar a publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS ", anexo.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DAVI RUMEL

ANEXO

GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS

I.Considerações gerais:

1. Este guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a Resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos.
2. Os estudos de toxicidade devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido.

II. Toxicidade aguda

Avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas

1. Espécie animal - deve ser usada uma espécie de mamífero evitando-se animais com características genéticas especiais.
2. Sexo - devem ser utilizados machos e fêmeas;
3. Grupos e número de animais por teste (controle e tratado): No mínimo 6 machos e 6 fêmeas, por dose do produto;
4. Idade - os animais devem estar em idade adulta;
5. Via de administração - deve ser utilizada a mesma via proposta para o uso do produto.
6. Doses - suficientes para observação de possíveis efeitos adversos e estimativa da DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais). Se não forem observados efeitos adversos, utilizar a dose máxima possível.

7. Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas devem ser anotados. Deve ser observado o maior número possível de parâmetros, tais como alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos.

8. Período de observação - Durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, visando observar reversão ou não destes sinais. Desde a 24ª hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser observados a variação de peso e o consumo de alimentos. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e autopsiados. Caso sejam observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem ser realizados.

III. Toxicidade de doses repetidas (longa duração)

Avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas.

1. Espécie animal - devem ser usadas pelo menos duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não-roedora. As linhagens devem ser definidas evitando-se animais com características genéticas especiais.

2 Sexo - devem ser utilizados machos e fêmeas;

3 Grupos e número de animais por teste:

Roedores: No mínimo 10 machos e 10 fêmeas, por dose do produto

Não-roedores: no mínimo 3 machos e 3 fêmeas, por dose do produto.

Para cada estudo incluir um grupo controle com o veículo da formulação.

4 Idade - os animais devem estar em idade adulta jovem

5 Via de administração - deve ser utilizada a mesma via proposta para o uso do produto.

6 O período de administração do produto nos animais segue relação com o período proposto para utilização terapêutica, conforme tabela abaixo :

| Período de uso | Duração mínima do estudo das doses repetidas |
|---------------------------------|--|
| Até 30 dias de uso por ano | 4 semanas |
| Acima de 30 dias de uso por ano | 12 semanas |
| | |

7 Doses - no mínimo três, a saber, a dose que produza o efeito terapêutico (menor dose), a maior dose que produza um efeito adverso detectável, limitada pelo volume da dose, e uma dose intermediária, por exemplo a média geométrica entre a dose maior e menor dose.

8 Parâmetros a serem observados nos grupos experimentais e no grupo controle tratado com o veículo, tais como : alterações comportamentais, variação do peso corpóreo (semanal), o hemograma

completo e análises bioquímicas de sangue (sódio, potássio, gama-glutamiltanspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, glicose, proteínas totais e bilirrubina);

9. Exames anatomopatológicos

Exames macroscópicos devem ser realizados em todos os animais para todas as doses. Os exames histopatológicos devem ser realizados obrigatoriamente nos animais tratados com a maior dose. O material retirado dos animais deve ser mantido em estado de conservação por até cinco anos. Na ausência de alterações histopatológicas nos animais tratados com a maior dose e de alterações macroscópicas com as doses menores, torna-se desnecessária a realização de exames histopatológicos para as demais doses baixa e intermediária. Recomenda-se que sejam analisados macro e microscopicamente os órgãos abaixo relacionados: fígado, rins, pulmão, coração, esôfago e estômago, intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, adrenal, tireóide.

IV. Estudo especial - Genotoxicidade

Estudo que deve ser efetuado quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos.

1. 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;
2. Avaliação in vivo do dano em cromossoma em células hematopoiéticas de roedores (teste de micronúcleo)

V. Avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico:

Cumprir o disposto nos itens II, III, e quando indicado IV, além de realizar os seguintes testes adicionais:

1. Sensibilização dérmica
2. Irritação cutânea
3. Irritação ocular

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

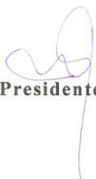
CERTIFICADO –

Certificamos que o Protocolo nº 009/2010 – CEEA sobre “Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis*”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Tânia Toledo de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/04/2010.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 009/2010 - CEEA about “Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis*” – Tânia Toledo de Oliveira - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 06/04/2010.

Juiz de Fora, 06 de Abril de 2010


Presidente/CEEA


Secretário/CEEA