

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
MAÍSA FREIRE CARTAXO PIRES DE SÁ**



**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Costus spicatus*
Swartz**

João Pessoa

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Costus spicatus*
Swartz**

MAÍSA FREIRE CARTAXO PIRES DE SÁ

**João Pessoa
2008**

MAÍSA FREIRE CARTAXO PIRES DE SÁ

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Costus spicatus*
Swartz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacologia).

Orientadora: Prof^a Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Co-orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**João Pessoa
2008**

S111a Sá, Máisa Freire Cartaxo Pires de

Avaliação da toxicidade pré-clínica do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Costus spicatus* Swartz/

Máisa Freire Cartaxo Pires de Sá. - João Pessoa, 2008.

118p.: il.

Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

Co-orientador: Isac Almeida de Medeiros

Tese (doutorado) UFPb/CCS

1. Toxicologia. 2. *Costus spicatus* Swartz. 3. Toxicidade.

UFPb/BC

CDU: 615.9 (043)

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Costus spicatus*
Swartz.**

MAÍSA FREIRE CARTAXO PIRES DE SÁ

Tese aprovada em 21/01/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Orientadora

Prof^a. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
Examinadora interna

Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Examinadora interna

Prof. Dr. Antônio Pedro de Araújo Filho
Examinador externo

Prof^a. Dra. Jane Sheila Higinó
Examinadora externa

**Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.
Mas, se você tiver grandes sonhos...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.**

Augusto Cury

***Ao meu esposo Luciano por todo
amor e incentivo;
Aos meus amados filhos Matheus e
Caio razão da minha vida.
Dedico***

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida e pela coragem de enfrentar e vencer mais uma empreitada.

Ao meu amado pai “**Naneco**” e à memória de minha inesquecível mãe “**Nita**” por todos os ensinamentos de dignidade, honestidade e verdade que sempre pautaram e pautarão a minha vida.

Aos meus irmãos e demais familiares pelo carinho e apoio.

À minha estimada orientadora, **Profª Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, pela amizade e confiança.

À **Profª Drª Liana Clébia Soares Lima de Moraes**, pelo apoio e amizade.

Ao amigo **Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar**, pelo apoio incondicional, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, pela confiança neste trabalho.

Às bioquímicas **Hosana Bandeira dos Santos** e **Kardilândia Oliveira**, pelo apoio na realização dos exames laboratoriais.

À **Profª Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo**, pela importante colaboração nos exames histopatológicos.

À **Profª Dra. Rita Baltazar**, pela identificação da espécie vegetal e por todo apoio a mim dispensado.

Aos funcionários do LTF/UFPB, **José Crispim Duarte** e **Raimundo Nonato da Silva Filho** e ao agrônomo **Fernando Antônio Viana** pelo importante papel na edificação deste trabalho.

Aos alunos e amigos **Aline, Jadson, João Carlos, Josué, Thayse, Nelson**, pelas demonstrações de afeto e importante cooperação durante todo o estudo.

Aos companheiros de pós-graduação, pelos bons momentos compartilhados.

A todos que contribuíram de alguma forma para a construção desta importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Aspectos etnobotânicos	8
1.2 OBJETIVOS	12
1.2.1 Objetivo geral	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 Local da Pesquisa	14
2.2 Materiais	14
2.2.1 Material botânico.....	14
2.2.2 Animais.....	15
2.2.2.1 <i>Artemia salina</i> Leach.....	15
2.2.2.2 Roedores.....	16
2.2.3 Aparelhagem.....	17
2.2.4 Drogas utilizadas.....	19
2.3 Metodologia	19
2.3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. spicatus</i>	19
2.3.2 Determinação da dose usual.....	21
2.3.3 Triagem fitoquímica.....	22
2.3.4 Triagem toxicológica através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> L.	23
2.3.5 Estudo toxicológico pré-clínico agudo	24
2.3.5.1 Triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda.	24
2.3.5.2 Evolução ponderal e consumo de água e alimento.....	24
2.3.5.3 Análise laboratorial de sangue.....	25
2.3.6 Ensaio toxicológico pré-clínico crônico	26
2.3.6.1 Tratamento dos animais.....	26

2.3.6.2 Sinais tóxicos gerais e letalidade.....	27
2.3.6.3 Evolução ponderal e consumo de água e alimento.....	27
2.3.6.4 Temperatura.....	27
2.3.6.5 Glicemia.....	28
2.3.6.6 Teste do campo aberto (“open-field”).....	28
2.3.6.7 Teste “Rota Rod”.....	29
2.3.6.8 Análise laboratorial de sangue.....	29
2.3.6.9 Exame anatomopatológico.....	29
2.3.7.0 Análise estatística.....	30
3 RESULTADOS.....	32
3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de <i>C. spicatus</i> (EHB) e triagem fitoquímica.....	32
3.2 Triagem toxicológica através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> L.....	33
3.3 Estudo toxicológico pré-clínico agudo.....	33
3.3.1 Triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda.....	33
3.3.2 Evolução ponderal, consumo de água e alimento.....	33
3.3.3 Análise laboratorial do sangue.....	35
3.3.3.1 Parâmetros bioquímicos.....	35
3.3.3.2 Parâmetros hematológicos.....	42
3.4 Estudo toxicológico pré-clínico crônico.....	45
3.4.1 Sinais tóxicos gerais e letalidade.....	45
3.4.2 Evolução ponderal, consumo de água e alimento.....	45
3.4.2.1 Evolução ponderal.....	45
3.4.2.2 Consumo de água e ração.....	48
3.4.3 Temperatura	62
3.4.4 Glicemia	62
3.4.5. Avaliação comportamental.....	64
3.4.5.1 Teste do campo aberto.....	64
3.4.5.2 Teste no “Rota-Rod”.....	68
3.4.6 Análise laboratorial do sangue.....	70
3.4.6.1 Parâmetros bioquímicos.....	70
3.4.6.2 Parâmetros hematológicos.....	80
3.4.7 Estudo anatomopatológico.....	85

4 DISCUSSÃO.....	90
5 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos gerais de <i>C. spicatus</i>	9
Figura 2	<i>Artemia salina</i> Leach.....	15
Figura 3	Rato <i>Wistar (Rattus norvegicus)</i>	16
Figura 4	Analizador bioquímico automático Cobas Mira Plus® - Roche..	18
Figura 5	Aparelho de Rota-rod.....	18
Figura 6	Aparelho de campo aberto (LTF/UFPB).....	18
Figura 7	Desenho esquemático da marcha para obtenção do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de <i>C. spicatus</i>	20
Figura 8	Cortes histológicos mostrando degeneração hidrópica hepatocelular, em discreto grau, na zona 1 (área periportal), representada por microvacúolos citoplasmáticos opticamente vazios (A: hematoxilina-eosina; B: tricrômico de Masson; X400).....	86
Figura 9	Cortes histológicos mostrando foco de necrose hepatocelular associado a discreto afluxo de linfócitos (A) e dilatação sinusoidal perivenular (B). (A: hematoxilina-eosina – X400; B: tricrômico de Masson – X250).....	86
Figura 10	Cortes histológicos mostrando discreta fibrose perissinusoidal, com topografia em zona 3, observada em animais machos. Vermelho picrossirius – A: X250; B: X400).....	87
Figura 11	Cortes histológicos mostrando espaço portal com tríade vasculo-biliar inserida em matriz fibroconjuntiva não expandida (A). Portite linfocitária representada por adensamento linfóide, em animal macho submetido (B). A: vermelho picrossirius X100; hematoxilina-eosina X100.....	88
Figura 12	Cortes histológicos mostrando pulmão com arquitetura lobular preservada e rede alveolar de paredes finas (setas curtas). Bronquíolos com lumes pérvios, revestimento epitelial típico e adensamento linfóide marginal (setas longas) Hematoxilina-eosina. A (X100); B (X250).....	89
Figura 13	Cortes histológicos mostrando hiperplasia linfóide A-B: peribronquiolar (A-B: setas curtas) com congestão venular (seta longa: A). Hematoxilina-eosina X100 (A) e X250 (B)..	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Determinação da triagem fitoquímica do EHB de <i>C. spicatus</i> ...	32
TABELA 2	Variação da evolução ponderal de ratos, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de <i>C. spicatus</i> durante 14 dias.....	34
TABELA 3	Consumo de água e ração de ratos, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de <i>C. spicatus</i> durante 14 dias.....	34
TABELA 4	Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de <i>C. spicatus</i> durante o ensaio de toxicidade aguda.....	36
TABELA 5	Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de <i>C. spicatus</i> durante o ensaio de toxicidade aguda.....	43
TABELA 6	Valor médio do peso semanal de ratos (machos e fêmeas) durante as 13 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i>	46
TABELA 7	Consumo médio semanal de água (mL) por ratos durante as 13 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i>	49
TABELA 8	Consumo médio semanal de ração (g) por ratos durante as 13 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i>	56
TABELA 9	Efeito da administração crônica de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre a glicemia dos animais durante ensaio de toxicidade crônica.....	63
TABELA 10	Efeito da administração prolongada de diferentes doses de EHB das folhas de <i>C. spicatus</i> sobre a ambulação, “rearing” e defecação de ratos no teste de campo aberto. Valor médio das 6 quinzenas de tratamento.....	65
TABELA 11	Efeito da administração prolongada de diferentes doses de EHB das folhas de <i>C. spicatus</i> sobre o “grooming” dos ratos Wistar no teste de campo aberto.....	66
TABELA 12	Efeito da administração prolongada de diferentes doses de EHB em ratos no Teste de “rota rod”.....	69
TABELA 13	Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> durante o ensaio de toxicidade crônica.....	72
TABELA 14	Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> durante o ensaio de toxicidade crônica.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Dosagem de uréia no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	37
Gráfico 2	Dosagem de creatinina no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	37
Gráfico 3	Dosagem de colesterol total no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	38
Gráfico 4	Dosagem de FAL no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	38
Gráfico 5	Dosagem de proteínas totais no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	39
Gráfico 6	Dosagem de albumina no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	39
Gráfico 7	Dosagem de potássio no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	40
Gráfico 8	Dosagem de ácido úrico no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	40
Gráfico 9	Dosagem de triglicerídios no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	41
Gráfico 10	Dosagem de AST no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> , nos ensaios de toxicidade aguda.....	41
Gráfico 11	Dosagem de leucócitos de ratas tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de <i>C. spicatus</i> nos ensaios de toxicidade aguda.....	44
Gráfico 12	Valor médio do peso de ratos na 2ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	47
Gráfico 13	Valor médio do peso de ratas na 2ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	47
Gráfico 14	Consumo de água de ratos na 5ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	50
Gráfico 15	Consumo de água de ratos na 10ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	50
Gráfico 16	Consumo de água de ratos na 11ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	51
Gráfico 17	Consumo de água de ratos na 12ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	51
Gráfico 18	Consumo de água de ratos na 13ª semana de tratamento	

	crônico com diferentes doses de EHB de <i>Costus spicatus</i>	52
Gráfico 19	Consumo de água de ratas na 3ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	52
Gráfico 20	Consumo de água de ratas na 5ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	53
Gráfico 21	Consumo de água de ratas na 6ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	53
Gráfico 22	Consumo de água de ratas na 7ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	54
Gráfico 23	Consumo de água de ratas na 9ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	54
Gráfico 24	Consumo de água de ratas na 13ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de <i>C. spicatus</i>	55
Gráfico 25	Consumo de ração por ratos tratados com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 5ª semana de tratamento crônico.....	57
Gráfico 26	Consumo de ração por ratos tratados com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 7ª semana de tratamento crônico.....	57
Gráfico 27	Consumo de ração por ratos tratados com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 8ª semana de tratamento crônico.....	58
Gráfico 28	Consumo de ração por ratas tratadas com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 2ª semana de tratamento crônico.....	58
Gráfico 29	Consumo de ração por ratas tratadas com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 5ª semana de tratamento crônico.....	59
Gráfico 30	Consumo de ração por ratas tratadas com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 6ª semana de tratamento crônico.....	59
Gráfico 31	Consumo de ração por ratas tratadas com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 8ª semana de tratamento crônico.....	60
Gráfico 32	Consumo de ração por ratas tratadas com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 9ª semana de tratamento crônico.....	60
Gráfico 33	Consumo de ração por ratas tratadas com diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> na 13ª semana de tratamento crônico.....	61
Gráfico 34	Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre o ato de limpeza (“grooming”) de ratos no teste de campo aberto.....	67
Gráfico 35	Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre o ato de limpeza (“grooming”) de ratas no teste de campo aberto.....	67
Gráfico 36	Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre o tempo de permanência de ratos no “rota rod” na primeira quinzena.....	70
Gráfico 37	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de uréia no soro de ratos B) grupos satélites.....	75
Gráfico 38	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de colesterol no soro de ratos B) grupos satélites.....	75
Gráfico 39	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de triglicerídios no soro de ratos B) grupos satélites.....	76

Gráfico 40	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de LDH no soro de ratos B) grupos satélites.....	76
Gráfico 41	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de amilase no soro de ratos B) grupos satélites.....	77
Gráfico 42	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de proteínas totais no soro de ratos B) grupos satélites.....	77
Gráfico 43	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de albumina no soro de ratos B) grupos satélites.....	78
Gráfico 44	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de uréia no soro de ratos B) grupos satélites.....	78
Gráfico 45	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de LDH no soro de ratos B) grupos satélites.....	79
Gráfico 46	A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre os níveis de triglicerídios no soro de ratos B) grupos satélites.....	79
Gráfico 47	Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre neutrófilos de ratos.....	83
Gráfico 48	Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre linfócitos de ratos.....	83
Gráfico 49	Efeito da administração de diferentes doses do EHB de <i>C. spicatus</i> sobre linfócitos de ratos.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - ácido acetil-salicílico
ALT - Alanina Amino Transferase
AST - Aspartato transaminase
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APG II - Angiosperm Phylogeny Group II
CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CK - Creatina Quinase
CPK - Creatina Fosfoquinase
CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
DU - dose usual
3 X DU - 3 vezes a dose usual
9 X DU - 9 vezes a dose usual
EHB - Extrato Hidroalcoólico Bruto
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético
FAL - Fosfatase Alcalina
HULW - Hospital Universitário Lauro Wanderley
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
HDL - lipoproteína de alta densidade
LABETOX - Laboratório de Ensaio Toxicológicos
LTF - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
MS - Ministério de Saúde
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RE - Resolução Específica
rpm - rotações por minuto
SVS - Secretaria de Vigilância Sanitária
SNC - Sistema Nervoso Central
VCM - Volume Corpuscular Médio

RESUMO

SÁ, MAÍSA FREIRE CARTAXO PIRES. Avaliação da toxicidade pré-clínica do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Costus spicatus* Swartz. (Tese). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. 2008.

Costus spicatus Swartz (Costaceae) conhecida com o nome de “cana do brejo” é usada como diurético e em doenças do trato urinário particularmente, para expelir cálculo renal. O objetivo deste trabalho foi realizar estudo toxicológico pré-clínico agudo e crônico, com o extrato hidroalcoólico bruto (EHB) das folhas de *C. spicatus* de acordo com a RE nº 90/2004 da ANVISA. Inicialmente realizou-se uma triagem fitoquímica que demonstrou a presença de esteróides e flavonóides, principalmente. Ainda determinou-se a CL₅₀ do extrato como sendo 294,7 µg/mL através do bioensaio com *Artemia salina* L. A triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda foram realizadas utilizando-se ratos Wistar e a dose de EHB foi 2 g/kg. Na avaliação comportamental o extrato não mostrou interferência sobre o SNC. Não ocorreram alterações na evolução ponderal nem no consumo de água e alimentos em ambos os sexos. O estudo hematológico evidenciou leucopenia nas fêmeas. Nos parâmetros bioquímicos observou-se aumento dos níveis de colesterol, FAL, proteínas totais, albumina e potássio e uma diminuição da uréia e creatinina em ambos os sexos. Em machos ocorreu elevação de triglicerídios e redução dos níveis de ácido úrico. As fêmeas mostraram níveis elevados de AST. No estudo da toxicidade crônica foram administradas as doses 14 mg/kg, 42 mg/kg e 126 mg/kg do EHB. A temperatura e glicemia dos animais permaneceram normais durante o tratamento. Com relação ao consumo de água, os resultados são diversos. Na avaliação do consumo de alimento, verificou-se que houve aumento da ingesta de ração em ambos os sexos. No tangente a evolução ponderal os animais de ambos os sexos aumentaram de peso somente na 2ª semana de tratamento com a dose de 126 mg/kg. No teste de campo aberto ficou caracterizada alteração central, em machos, houve aumento do “grooming” na dose de 42 mg/kg e nas fêmeas diminuição deste comportamento nas doses 14 mg/kg e 126 mg/kg. O tratamento com EHB (126 mg/kg) mostrou diminuição significativa do desempenho de ratos machos no rota-rod. Com relação ao estudo bioquímico alterações foram observadas em ambos os sexos e nos seguintes parâmetros: uréia, colesterol total, triglicerídios, LDH, amilase, proteínas totais, sódio e potássio. A maioria destas alterações foi reversível no grupo satélite. Na análise dos parâmetros hematológicos ficou evidente a ligeira tendência à neutrofilia e linfocitopenia tanto em machos quanto em fêmeas. Pode-se notar que o EHB possui baixa toxicidade frente a *Artemia salina* L. Os estudos toxicológicos pré-clínicos agudo e crônico do EHB de *C. spicatus* em ratos demonstraram baixa toxicidade na dose de uso popular e poucas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos nas maiores doses. Na avaliação microscópica o EHB não promoveu alterações histológicas de caráter clínico importante no tocante ao coração, rins, e pulmões. No fígado houve modificações histopatológicas de relevância clínica na dose de 126 mg/kg. De acordo com análises dos dados obtidos, é possível inferir que o EHB das folhas de *C. spicatus* apresenta baixa toxicidade.

Palavras chaves: Toxicidade, *C. spicatus*, Ensaios pré-clínicos.

ABSTRACT

SÁ, MAÍSA FREIRE CARTAXO PIRES DE. Evaluation of the pre-clinical toxicity of the hydroalcoholic crude extract of leaves from *Costus spicatus* Swartz. (Thesis). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. 2008.

Costus spicatus Swartz (Costaceae) known as “cana-do-brejo” is used as diuretic and in diseases of the urinary tract, particularly for expelling urinary stones. The objective of the present work was accomplished acute and chronic toxicological studies with the hydroalcoholic crude extract (EHB) of the leaves of *C. spicatus* in agreement with the RE 90/2004 ANVISA. A phytochemical screening and the bioassay using *Artemia salina* Leach were executed. The phytochemical screening showed the presence mainly of steroids and flavonoids. The medium value of the LC₅₀ (294,70 µg/mL) was determined through the *Artemia salina* assay. The acute toxicological assays were realized using Wistar rats and the dose of EHB was 2 g/kg. In the behavioral evaluation the extract did not demonstrate influence on the CNS. Changes did not occur in the weight evolution, water and food consumption in males and females rats. The hematological study evidenced decrease in levels of leucocytes in females. In relation to the biochemical parameters it was seen increase of total cholesterol, FAL, total proteins, albumin and potassium and decrease of urea and creatinin seric levels in animals of both sexes. In males occurred increase of triglycerides and decrease of uric acid levels. The females showed increase in AST levels. In the chronic toxicity studies were administered the doses of 14 mg/kg, 42 mg/kg e 126 mg/kg of the EHB. The temperature and glycemc levels did not show any alteration during treatment. In relation to the water consumption, the results were various. In both sexes was observed increased of the food consumption. The males and females rats increased body weight on the 2nd week of the treatment in the dose of 126 mg/kg. In test open field was characterized central change, in males, occurred a rise of the grooming in the dose of 42 mg/kg and females decreased this behavior in the doses of 14 mg/kg and 126 mg/kg. The treatment with the EHB 126 mg/kg showed significant impairment of males rats rota-rod performance. In relation to biochemical study, changes were seen in animals of both sexes and in the following parameters: urea, total cholesterol, triglycerides, LDH, amylase, total proteins, sodium and potassium. Most of these alterations were reversible on the satellite group. In the hematological parameters analysis it become clear the light tendency to a rise of neutrophils and reduction of lymphocytes of both sexes. The toxicological screening using *Artemia salina* L. demonstrated that EHB has low toxicity. Pre-clinical toxicological acute and chronic studies of the EHB of *Costus spicatus* in rats demonstrated low toxicity in the dose of popular use and few alterations in the hematological and biochemistry parameters in the highest doses. In the microscopic evaluation the EHB did not promote histological alterations relevant on heart, kidneys and lungs. Histopathological changes in the liver were seen in dose of 126 mg/kg. In accord with analyses of the results, is possible to infer that the hydroalcoholic crude extract of leaves from *C. spicatus* show low toxicity.

Key words: Toxicity, *Costus spicatus* Swartz, pre-clinical assays.

Introdução
Introdução

1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos naturais, em especial da flora vegetal, no tratamento de diversas patologias. No Brasil, o uso de plantas medicinais utilizadas principalmente em rituais de cura pelos povos indígenas foi descrito pelos portugueses no ano de 1500, quando de seu descobrimento (PETROVICK; MARQUES; DE PAULA, 1999; FERRO, 2006). Nos dias atuais as plantas com propriedade medicinal são comercializadas em diferentes locais, desde feiras livres, drogarias, farmácias, mercados populares e até mesmo em quintais residenciais em diferentes regiões do país (MACIEL et al., 2002).

Atualmente é perceptível a multiplicação dos programas de fitoterapia apoiados pelo Serviço Público de Saúde (ALVES, 2006). Todavia, inúmeras espécies medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, podendo assim acarretar um sério problema de saúde pública. É importante ressaltar que efeitos adversos, adulteração do produto, toxicidade e interações medicamentosas são possíveis de ser verificados tanto com medicamentos alopáticos convencionais quanto com os fitoterápicos (VEIGA e ANGELO, 2005; LIMA, 2007).

A portaria nº 971 de 3 de maio de 2006 do Ministério da Saúde, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Esta portaria define a fitoterapia como “terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal”. Tem como objetivos incorporar e implementar as Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, na perspectiva da prevenção de agravos e da promoção e

recuperação da saúde, com ênfase na atenção básica, voltada para o cuidado continuado, humanizado e integral em saúde; contribuir para a ampliação do acesso às Práticas Integrativas e Complementares, garantindo qualidade, eficácia e segurança no uso; promover a racionalização das ações de saúde. Apresenta como uma das suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e da Relação Nacional de Fitoterápicos (BRASIL, 2006).

O Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006).

Pesquisas demonstram que a despeito da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos trabalhos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são usadas somente com base em informações etnofarmacológicas (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Portanto, o estudo farmacológico das drogas vegetais, constitui um passo importante na aquisição de novos conhecimentos científicos e aprimoramento da medicina tradicional, permitindo que os resultados dos estudos farmacológico e clínico-farmacológico sejam retomados à população, com identificação da espécie, parte empregada, modo de preparo, melhores informações de uso e segurança e eficácia assegurada (SIXEL e PECINALLI, 2005).

Embora os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos e baixa incidência de efeitos colaterais, não são considerados como substâncias inócuas, sendo extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos para

fornecer a comunidade dados científicos sobre segurança ou toxicidade das plantas (ASSEMI, 2001).

A toxicologia é uma ciência voltada para o conhecimento de todos os aspectos das intoxicações, desde a prevenção de sua ocorrência até a recuperação do paciente (BRITO, 1994; MACHADO, 2004).

As substâncias químicas, que são transformadas em medicamentos, devem ter eficácia terapêutica e não apresentar toxicidade. Infelizmente, todas as substâncias químicas possuem o potencial de causar efeitos indesejáveis. Entretanto, é fundamental que durante o processo de desenvolvimento dos fármacos sejam selecionadas substâncias que apresentem uma boa margem de segurança entre a dose que causa os efeitos desejáveis ou terapêuticos e a que causa os efeitos indesejáveis ou tóxicos (KLAASSEN, 2006).

Para o desenvolvimento de novos medicamentos é necessária a realização de estudos pré-clínicos que consiste de testes em animais de laboratório e uma fase clínica ou testes clínicos, quando os medicamentos são testados nos seres humanos. A fase pré-clínica tem por objetivo principal o fornecimento de informações suficientes acerca da farmacologia e toxicologia da substância em análise para que assim possam ser realizados estudos clínicos com uma margem de segurança razoável e pré-estabelecida (PIVETTA, 2006).

A avaliação toxicológica é realizada com ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos, o que muitas vezes é difícil, pois os resultados podem variar muito entre espécies. Nestes casos, os exames hematológicos, bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação devem ser realizados, bem como a

avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA, OLIVEIRA e NAGEM, 2003).

Nesse sentido, a toxicologia pré-clínica que trata de testes descritivos de toxicidade animal tem elevada relevância visto que os efeitos produzidos pelas substâncias químicas em animais de laboratório, quando adequadamente qualificados, servem para direcionar e correlacionar à toxicidade em seres humanos. Os efeitos tóxicos observados no homem encontram-se geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Soma-se ainda o fato de que a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; BARROS e DAVINO, 2003).

Para que um medicamento fitoterápico seja registrado e prescrito, ele precisa ser estudado cientificamente, seguindo os mesmos critérios utilizados para o desenvolvimento dos alopáticos, visando confirmar sua segurança e eficácia clínica. Deste modo, passos importantes como estudos farmacológicos pré-clínicos, estudos toxicológicos em animais (agudo e crônico) e estudos clínicos devem ser realizados, utilizando protocolos rígidos (CALIXTO, 2001).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem passando por transformações nos últimos tempos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas objetivando a regulamentação desses medicamentos desde a Portaria nº 06 de 1995 que determinava prazos para que a indústria farmacêutica apresentasse dados sobre a eficácia e dados de segurança dos medicamentos supracitados, passando pela RDC nº 17 de 2000 até a Resolução RDC nº 48/2004 e RE 90 de 16 de março de 2004 atualmente em vigor,

que dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos propondo um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica cujo objetivo principal é indicar métodos padronizados a fim de executar tais estudos (BRASIL, 1995; BRASIL, 2000; BRASIL, 2004).

Este trabalho com o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Costus spicatus* Swartz baseou-se na RE 90/2004 sendo realizados ensaios de toxicidade aguda e crônica de doses repetidas ou longa duração (BRASIL, 2004).

Por definição, a toxicidade aguda avalia o efeito nefasto produzido dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única ou de várias doses de uma substância em um período de 24 horas (BRITO, 1994).

A toxicidade aguda é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornece subsídios a cerca dos riscos à saúde resultantes de uma exposição de curta duração (BRITO, 1994; LARINI, 1997). Neste contexto, este estudo foi realizado visando servir de alicerce para estabelecer um regime posológico para pesquisas sobre toxicidade crônica (com doses repetidas), além de proporcionar informações iniciais sobre o modo de ação tóxico do fármaco em questão.

A toxicidade crônica diz respeito ao efeito nocivo que é produzido no animal resultante da administração repetida e diária da substância, considerando-se o aumento de suas concentrações ou de seus metabólitos, sobre tecidos sensíveis. O estudo da toxicidade crônica tem por objetivo caracterizar o perfil toxicológico de uma substância administrada repetidamente a uma espécie de mamífero por longos períodos de tempo. Fornece informações quanto aos riscos potenciais para a saúde, resultantes de uma exposição oral de repetidas doses de um dado agente por um período longo e conhecimentos adicionais sobre órgãos-alvo, possibilidade de

efeitos cumulativos e informações iniciais de segurança concernentes à exposição da substância-teste para o homem (BRITO, 1994; LARINI, 1997; CARVALHO, 2005).

A escolha da espécie *C. spicatus* fundamentou-se na sua larga utilização pela população brasileira, considerando que esta planta é dotada de propriedades terapêuticas importantes e que na sua constituição química registra-se a presença de uma gama de compostos, por exemplo, flavonóides glicosilados, taninos, ácido oxálico, sitosterol, saponinas, mucilagens, pectinas (ALBUQUERQUE, 1989; CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA, QUINTAS, 1998; VIEIRA e ALBUQUERQUE, 1998; SILVA; BERNARDO; PARENTE, 1999 e 2000). Além disso na revisão bibliográfica realizada não foi encontrado registros do perfil toxicológico desta planta.

Levantamentos bibliográficos, inclusive, através do Banco de Dados da Universidade Illinois, Chicago, denominado “Natural Products Alert” (NAPRALERT) demonstraram que a espécie *C. spicatus* é desconhecida do ponto de vista científico toxicológico.

Como não foram encontrados relatos científicos no tocante a toxicidade dessa espécie, esta pesquisa se inseriu na perspectiva de prover informações científicas sobre os aspectos toxicológicos desta planta medicinal, fornecendo subsídios para investigações clínicas futuras através de ensaios toxicológicos pré-clínicos utilizando protocolos científicos rígidos, internacionalmente aceitos, que são descritos na Resolução 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

1.1 Aspetos etnobotânicos

A família Costaceae consiste de quatro gêneros e possui mais de 150 espécies. As espécies do gênero *Costus* são nativas de áreas tropicais da Ásia, África, Austrália e das Américas. O gênero *Costus* é constituído por mais de 100 espécies. Outros gêneros incluem *Tapinochilos*, com cerca de 20 espécies, *Dimerocostus* (duas espécies) e *Monocostus* uma espécie (MONTOSO GARDENS, 2007).

Existem relatos de que constituintes das plantas dessa família encontradas na Malásia não apresentam atividades biológicas, entretanto, muitas outras espécies da família Costaceae apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (IWU e ANYANWU, 1982; SIRAT, 1994; GASPARRI, 2005).

C. spicatus é uma espécie pertencente a esta família e tem distribuição em várias partes do mundo como no sul do México, Yucatan, Costa Rica, norte da Colômbia e Brasil. A designação “cana-do-brejo” é também usada para indicar outras espécies de *Costus* que potencialmente possuem a mesma utilização na medicina popular. Planta perene, rizomatosa, ereta, não ramificada, de 1-2 metros de altura. Folhas alternas, cartáceas, bainhas papiráceas de 25-40 cm de comprimento. Inflorescências terminais, grandes brácteas, vistosas que protegem as flores de cor amarelada. A espécie reproduz-se por sementes ou vegetativamente através de rizoma. É cultivada como ornamental e como medicinal (LORENZI e MATOS, 2002).



Figura 1: Aspectos gerais de *C. spicatus*.

QUADRO 1: Classificação da espécie de *C. spicatus* (APG II, 2003).

Ordem	Zingiberales Griseb
Família	Costaceae Nakai
Gênero	<i>Costus</i>
Espécie	<i>Costus spicatus</i> Swartz
Nome vulgar	“cana-do-brejo” “cana-de-macaco”

No Brasil a planta é conhecida como “cana-do-brejo” é encontrada em matas litorâneas (SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000). É conhecida ainda como “canarana”, “cana-do-mato”, “cana-de-macaco”, “cana-branca-do-brejo”, “periná”, “jacuacangá”, “ubacaia”, “paco-caatinga” (CORRÊA, 1984; CARRICONDE, 1996; SILVA; DINIZ; OLIVEIRA, 2002).

Pesquisas realizadas sob o ponto de vista etnofarmacológico (CARRICONDE, 1996; SILVA; DINIZ; OLIVEIRA, 2002;), demonstraram uma vasta utilização da planta *C. spicatus*, sobretudo de suas folhas e hastes, cujas formas farmacêuticas habituais são: infusos, decoctos, alcoolaturas.

A grande diversidade de espécies do gênero *Costus* encontradas no Brasil e suas propriedades medicinais contribuem para que estas plantas tenham ampla utilização no meio popular (CORRÊA, 1984; CARRICONDE, 1996).

A infusão de folhas, hastes e rizomas destas espécies são utilizadas no tratamento de males da bexiga e uretra. Têm-se mostrado eficaz na expulsão de cálculos renais. Apresentam outras propriedades terapêuticas, por exemplo, atividades antimicrobiana, antiinflamatória e emoliente. Citam-se ainda como usos fármaco-terapêuticos: adstringente, diurético, depurativo, diaforético, emenagogo, usada no tratamento das nefrites, uretrite, blenorragia e leucorréia. O decocto é empregado em injeções uretrais e em irrigações vaginais e tratamento de úlceras cutâneas (CARRICONDE, 1996; ARAÚJO et al., 1999; SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000; SILVA; DINIZ; OLIVEIRA, 2002).

Estudo realizado por Caceres et al. 1987 em ratos, com decocto da casca do caule de *C. spicatus* administrado através de sonda nasogástrica, demonstrou ação diurética.

Algumas espécies da família Costaceae têm sido relatadas por possuírem atividades biológicas tais como: antifúngica, antioxidante, inseticida, antimicrobiana e antiinflamatória (HABSAH et al., 2000). Trabalhos microbiológicos realizados com a espécie *C. spicatus* demonstraram atividade contra vários microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dentre outros (MISAS et al., 1979).

Estudo químico realizado com as folhas de *C. spicatus* culminou com o isolamento e elucidação estrutural de flavonóides glicosídicos, os quais exibiram propriedades antiinflamatórias, tendo efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico ativada por macrófagos. Resultados sugestivos que podem justificar o uso deste vegetal na medicina tradicional brasileira em desordens inflamatórias (SILVA et al., 2000; GASPARRI, 2005).

Outros estudos demonstraram que o extrato aquoso (planta inteira) de *Costus spiralis* Roscoe administrado por via oral reduziu a formação de cálculos renais em ratos induzidos por cristais de oxalato de cálcio ou implantes de disco de zinco na bexiga urinária. A dose de 0,5 g/kg do extrato que demonstrou propriedade lítica foi efetiva em ambos os sexos e não apresentou sinais de toxicidade ou alterações na atividade motora dos animais por mais de quatro semanas de administração (ARAÚJO VIEL et al., 1999).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Contribuir com estudo científico de *C.spicatus*;
- Realizar ensaios toxicológicos pré-clínicos agudo e crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. spicatus* de acordo com a Resolução RE nº 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária com algumas modificações.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar revisão bibliográfica sobre o gênero *Costus* e, em especial, *C. spicatus*;
- Realizar ensaio toxicológico preliminar com *Artemia salina* L.;
- Avaliar a toxicidade aguda e crônica do extrato hidroalcoólico de *C. spicatus* em ratos Wistar mediante a observação, nesta espécie, dos parâmetros autonômicos e centrais bem como alterações em parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos.

Materialis e Métodos

Materialis e Métodos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local da pesquisa

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos foram desenvolvidos no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no biotério Prof. Thomas George-LTF-UFPB do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica prof. Delby Fernandes de Medeiros LTF/CCS/UFPB e nos laboratórios de análises clínicas e patologia clínica do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da Universidade Federal da Paraíba.

O projeto foi protocolado no Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) com o nº 0501/05.

2.2 Materiais

2.2.1 Material botânico

O material botânico utilizado nos ensaios foram folhas de *C. spicatus* obtido do horto de plantas medicinais do LTF-UFPB, onde a planta é cultivada, sob a supervisão do agrônomo Fernando Antônio Viana. A identificação e descrição morfológica foi realizada pela botânica Prof^a Dr^a Rita Baltazar, do setor de botânica CCEN-UFPB. Uma amostra representativa encontra-se no Herbário Lauro Pires Xavier, desta Universidade.

2.2.2 Animais

Neste estudo foram utilizadas duas espécies animais: larvas de *Artemia salina* L. e ratos Wistar *Rattus norvegicus*.

2.2.2.1 *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* L. foram provenientes do Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sendo guardados sob resfriamento de 5 °C até a execução do experimento. Larvas de *Artemia salina* L. (Figura 2), um crustáceo da classe Anostracea, (Brine Shrimp Test), foram utilizadas na forma de metanúpio, sendo calculada a Concentração Letal Média (CL₅₀), um dos parâmetros de avaliação da atividade biológica/toxicológica (LOPES et al.,2006).



Figura 2: *Artemia salina* Leach

2.2.2.2 Roedores

Ratos Wistar (Figura 3), albinos (*Rattus norvegicus*), adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não-grávidas), pesando entre 200 e 300 gramas, não devendo ultrapassar em 20 % o peso entre eles, fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do LTF da Universidade Federal da Paraíba. Todos os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, contendo cinco animais em cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de 27 ± 2 °C, sem uso de qualquer tipo de medicação, tendo livre acesso a comida (tipo *pellets* da ração marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno com bicos em vidro colocados nas grades metálicas das gaiolas localizadas na sua parte superior.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas (com fase iluminada das 6 às 18 horas).



Figura 3: Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

2.2.3 Aparelhagem

- Luminária com lâmpada de 40W;
- Pipeta Pasteur para bioensaio;
- Analisador bioquímico automático (Figura 4) – Cobas Mira Plus[®] - Roche Diagnostic System - para determinações bioquímicas no soro;
- Analisador de íons seletivos, Iselab[®], para determinações dos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio;
- Analisador hematológico celular automático – Cobas Argos 50[®] - Roche Diagnostic System - para obtenção de hemograma e dosagem de plaquetas.
- HEMATEL 200[®] e microscópio Olympus[®], para confirmação e controle da contagem das células sanguíneas;
- Balança analítica AID[®] – HR – 120g – Japão;
- Balança eletrônica BG – 8000 GEHAKA[®];
- Centrífuga BIO ENG[®] BE 4000, para separação do soro;
- Densitrômetro BTS - 235[®] Biosystems, para eletroforese de proteínas, realizadas em fitas de acetato de celulose;
- Glicosímetro ADVANTAGE[®] Boehringer Mannheim: monitor de glicemia com fitas reativas;
- Microscópio RML5[®] Askmania-Germany, utilizado nas análises histológicas;
- Termômetro digital, modelo MC – 3BC[®], OMRON/China;
- Aparelho de rota-rod[®]: (Figura 5) fabricado por Ugo Basile (Itália), modelo 7750. Originalmente descrito por DUNHAM e MIYA, 1957. Avalia a capacidade motora dos animais.

- Aparelho de Campo Aberto ou “open field”: (Figura 6) desenvolvido pelo LTF/UFPB, semelhante ao descrito por BROADHURST, 1960, com adaptações de MORAIS et al., 1998, para avaliação da capacidade exploratória dos animais.



Figura 4: Analisador bioquímico Automático Cobas Mira Plus® - Roche



Figura 5: Aparelho de rota-rod



Figura 6: Aparelho de campo aberto (LTF/UFPB).

2.2.4 Drogas utilizadas

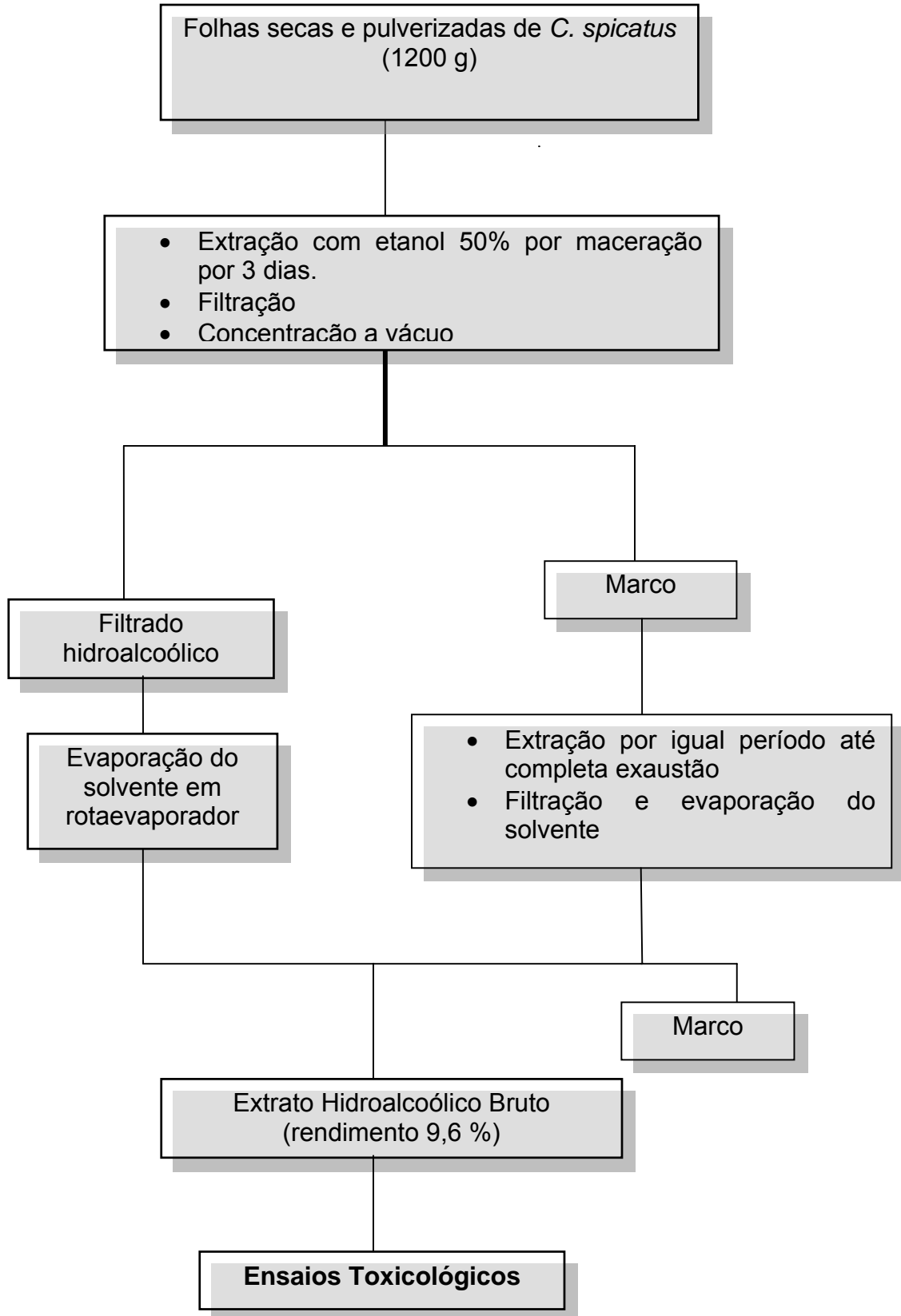
- Extrato hidroalcoólico bruto (EHB) das folhas de *C. spicatus*
- EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)
- Solução formol 10%
- Álcool etílico 95% (MERCK, BRASIL)

2.3 Metodologia

2.3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus*.

As folhas frescas de *C. spicatus*, pesando 12,0 kg, foram submetidas à secagem em estufa com ar circulante, a 38 °C, por 72 horas, e trituradas em moinho tipo Harley. O material pulverizado (1,2 kg) foi submetido à extração por maceração com etanol 50% (etanol:água 1:1). Em seguida o material foi filtrado e submetido a uma nova extração por igual período. As soluções hidroalcoólicas obtidas, após concentração do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a 60 °C, deram origem ao extrato hidroalcoólico bruto o qual serviu de matéria prima para a realização dos ensaios toxicológicos pré-clínicos.

Figura 7: Desenho esquemático da marcha para obtenção do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus*.



2.3.2 Determinação da dose usual

Com o intuito de determinar as doses a serem utilizadas nos ensaios toxicológicos pré-clínicos crônico foram feitas preparações com folhas: infusos e alcoolatura de acordo com a indicação popular.

A alcoolatura de folhas de *C. spicatus* foi obtida por maceração de 30 gramas de folhas frescas, durante 3 dias, em álcool a 95°. O álcool utilizado foi de graduação elevada dado o conteúdo aquoso das folhas frescas.

Os infusos foram feitos da seguinte forma: 15 gramas de folhas frescas em 500 mL de água fervente e o outro 5 gramas de folhas secas para 100 mL de água fervente durante 15 minutos. Feitas as preparações, procedeu-se a realização da determinação do peso seco. Tomou-se 1 mL de cada preparação, transferiu-se para um cadinho tarado e o colocou em estufa a 100 - 105 °C. Após a evaporação do solvente obteve-se um resíduo sólido, cuja quantidade pode-se dizer que é específica (PRISTA et al., 1990).

Foram obtidos os seguintes resíduos secos: 1,3 mg/mL, 5 mg/mL e 6 mg/mL, respectivamente, infuso folhas frescas, infuso folhas secas e alcoolatura.

Para a alcoolatura a dose usual obtida foi 1,30 mg/kg/dia (fundamentado na posologia 15 mL/dia), o infuso das folhas frescas foi de 8,4 mg/kg/dia (posologia 450 mL de chá/dia) e com o infuso de folhas secas foi de 14,3 mg/kg/dia.

A dose usual obtida foi baseada no resíduo do infuso feito com as folhas secas visto sua posologia ser de até 200 mL/dia. Considerando que um indivíduo humano adulto pesa em torno de setenta quilos, a dose calculada para esta preparação é de 14,3 mg/Kg/dia, sendo estabelecida a dose **14 mg/Kg/dia** comumente utilizada na terapêutica humana.

A Resolução 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece um guia para a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos, o esquema de doses propostos por esta Resolução é que sejam utilizadas no mínimo três doses diferentes, espaçadas geometricamente. A dose que produz o efeito terapêutico (menor dose), a maior dose que produza um efeito adverso limitada pelo volume da dose, e uma dose intermediária.

Ficou estabelecido que as doses **14 mg/Kg/dia (dose de uso popular)**, **42 mg/Kg/dia (3 X a dose de uso popular)** e **126 mg/Kg/dia (9 X a dose de uso popular)**, seriam utilizadas na investigação da toxicidade crônica do EHB de *C. spicatus* em ratos.

2.3.3 Triagem fitoquímica

Os testes para pesquisa dos metabólitos secundários (saponinas, esteróides, flavonóides e taninos), foram realizados segundo método desenvolvido por Wall (1954), com pequenas modificações (AGRA e BARBOSA-FILHO, 1990), utilizando-se o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. spicatus*.

A) Saponinas

- Teste de espuma
- Teste de hemólise

B) Esteróides

- Reação de Liebermann-Buchard

C) Alcalóides

- Reação de Dragendorff

- Reação de Mayer
- Reação de Bertrand
- Reação de Bouchardat

D) Taninos

- Reação com Cloreto Férrico a 2%
- Reação de Gelatina a 0,5%

E) Flavonóides

- Fita de magnésio
- Fluorescência

2.3.4 Triagem toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* L.

O bioensaio com *Artemia salina* L. (Brine Shrimp Test) foi realizado de acordo com a metodologia de McLaughlin e Rogers (1998). Cerca de 25 mg de cistos de *Artemia salina* L. foram incubados em um recipiente dividido em dois compartimentos por uma parede vasada no centro, contendo água do mar à temperatura de 20 a 30 °C, com um pH entre 8 - 9. Em um dos compartimentos havia incidência de uma lâmpada de 40 watt, para onde migravam os metanúplios, obtidos com a eclosão dos cistos após 48 horas de incubação.

Iniciou-se com uma solução de concentração 40 µg/mL do EHB, as demais concentrações testadas deste extrato foram 120, 360, 480 e 600 µg/mL. O ensaio foi realizado em duplicata com as concentrações do extrato, buscando-se determinar a relação dose-resposta, enquanto um grupo controle foi colocado em contato apenas com a água do mar. Cada tubo com a substância-teste, contendo 10 larvas de *Artemia salina* L. incluindo o controle, foi preenchido até alcançar o volume

final de 5 mL com a água do mar e foi incubado, no escuro, por 24 horas. As larvas vivas e mortas foram contadas e o valor da concentração letal 50% (CL₅₀) foi determinado usando o método estatístico de Probitos (PARRA et al., 2001) utilizando o programa Microcal Origin 6.0.

2.3.5 Estudo toxicológico pré-clínico agudo

2.3.5.1 Triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda

Os animais, fêmeas e machos, agrupados em igual proporção, cinco em cada caixa, foram tratados com o extrato hidroalcoólico de *C. spicatus* (n=6 por dose e sexo) por gavagem, com a dose de 2 g/kg. O grupo de animais controle recebeu água da torneira, de acordo com seus respectivos pesos. Realizadas as devidas administrações foram iniciadas as observações nos seguintes tempos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez por dia, sempre ao mesmo horário até completar 14 dias de observação.

As observações eram feitas seguindo um protocolo utilizado para avaliação de sinais tóxicos gerais, desenvolvido por Almeida et al (1999).

2.3.5.2 Evolução ponderal e consumo de água e alimento

Os animais foram pesados antes da administração do extrato e durante os dias do período de observação até completar os 14 dias.

O consumo de água foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento. Foram disponibilizadas mamadeiras graduadas com água (500 mL/dia), no dia

seguinte era verificada a quantidade ingerida pelos animais. De maneira similar o consumo de alimentos (ração) foi avaliado, sendo disponibilizado em cada gaiola 250 g/dia de ração.

2.3.5.3 Análise laboratorial de sangue

Transcorridos os 14 dias de observação, os animais sobreviventes de ambos os grupos (controle e tratado) foram submetidos a um jejum de 12 horas. No 15º dia após o tratamento, foi realizada a coleta das amostras de sangue através de sangria do plexo braquial, após o sacrifício dos animais mortos por tração cervical. O sangue foi coletado em tubos (devidamente identificados) com anticoagulante (EDTA) para realização de exames hematológicos e em tubos com gel separador – Microtainer Becton Dickson® – que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro para determinação dos parâmetros bioquímicos.

Com respeito aos parâmetros hematológicos estes foram analisados na série vermelha (eritograma): contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração hemoglobínica média (CHCM) e contagem plaquetas. A série branca (leucograma) foi avaliada através da contagem global e diferencial de leucócitos. Para esta avaliação foi utilizado o analisador celular COBAS ARGOS 50® (ROCHE). Os esfregaços sangüíneos foram corados automaticamente no HEMATEL 200 e analisados em microscópio (OLYMPUS®) para confirmação de contagem diferencial de células.

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados por diferentes métodos. Por métodos enzimáticos foram determinados: glicose, uréia, creatinina, colesterol total,

triglicéridios e ácido úrico. Por métodos cinéticos: transaminases (AST e ALT), amilase e fosfatase alcalina. Pelo método de biureto foi determinado o teor de proteínas totais e albumina. O analisador bioquímico usado para estas determinações foi COBAS MIRA PLUS® (ROCHE). Os íons sódio e potássio foram avaliados pelo analisador de íons seletivos ISELAB, utilizando-se o método do eletrodo íon seletivo (MILLER, 1999).

2.3.6 Estudo toxicológico pré-clínico crônico

Assim como os ensaios toxicológicos agudos, os protocolos experimentais da toxicidade crônica, também foram orientados principalmente pela Resolução Específica nº 90/2004 da ANVISA.

2.3.6.1 Tratamento dos animais

Os animais pré-selecionados foram distribuídos em quatro grupos contendo 20 animais cada (10 fêmeas e 10 machos), dos quais três grupos tratados e um grupo controle. Os grupos experimentais receberam, por gavagem, três diferentes doses do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. spicatus*, a saber: **14 mg/kg (dose de uso popular), 42 mg/kg (3 X a dose de uso popular) e 126 mg/kg (9 X a de uso popular)**. O grupo controle foi tratado diariamente com água, veículo utilizado na dissolução do EHB. As administrações ocorriam, diariamente, no período da manhã, perfazendo um total de 13 semanas.

Com o intuito de avaliar por meio do estudo de alguns parâmetros a reversibilidade de eventuais efeitos tóxicos provocados pelo extrato em análise,

trinta por cento dos animais machos e fêmeas tratados com as doses 14 mg/kg, 42 mg/kg e 126 mg/kg foram mantidos vivos até 30 dias após o sacrifício dos outros animais (**grupo satélite**).

2.3.6.2 Sinais tóxicos gerais e letalidade

Diariamente, sempre após administração das doses do extrato e do grupo controle eram observados possíveis sinais de toxicidade conforme protocolo experimental corrente no nosso laboratório proposto por Almeida et al. (1999) para toxicidade aguda. As observações perduraram 13 semanas. Eventuais ocorrências de óbitos eram registradas e realizadas estudos macroscópicos das vísceras dos animais que morreram durante o período de experimentação.

2.3.6.3 Evolução ponderal, consumo de água e alimento

De modo semelhante ao descrito para o tratamento agudo, todos os animais eram pesados diariamente e contabilizado o consumo de água e alimento até completar as 13 semanas.

2.3.6.4 Temperatura

Para medida da temperatura corporal foi utilizado um termômetro digital modelo MC – 3BC[®] – ORON/China, cujo termosensor era lubrificado com vaselina líquida e introduzido cinco centímetros pelo reto (atingindo o cólon), semanalmente, em todos os animais, antes do início e durante todo o período de tratamento.

2.3.6.5 Glicemia

Durante as treze semanas de tratamento, o nível glicêmico dos animais foi avaliado quinzenalmente da seguinte forma: os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas e em seguida imobilizados em contêntores plásticos e uma gota de sangue foi coletada na veia caudal e analisada em fita reativa para dosagem de glicemia. A leitura foi efetivada em monitor de glicemia Marca Advantage-Boehringer Mannheim®.

2.3.6.6 Teste do campo aberto (“open field”)

Para avaliação comportamental dos animais foi utilizado o aparelho de campo aberto (CARLINI et al., 1986). Os animais tratados e controle tiveram sua movimentação espontânea (ambulação) registrada pelo número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões de campo. Foi ainda avaliado o número de comportamentos de autolimpeza, o ato de levantar e o número de bolos fecais como índice de sua emocionalidade.

Este teste foi realizado quinzenalmente, uma hora após a administração do EHB, com animais tratados e animais controle que foram expostos (durante 3 minutos para cada animal) ao aparelho para a observação dos parâmetros acima descritos (MASUR; MARTZ; CARLINI; 1971).

2.3.6.7 Teste “Rota Rod”

Animais tratados e controle foram colocados na barra giratória do aparelho “rota rod”, com velocidade constante de 9 rpm, e registrado o tempo de permanência dos mesmos, com três reconduções (DUNHAM e MIYA, 1957; MORAIS et al., 1998). Este experimento era realizado quinzenalmente, para avaliação de possíveis alterações motoras, 1 hora após o tratamento com as diferentes doses do EHB de *C. spicatus*.

2.3.6.8 Análise laboratorial de sangue

Após as treze semanas de tratamento para avaliação da toxicidade crônica foram coletadas amostras de sangue, através de sangria do plexo braquial, dos animais, machos e fêmeas, dos grupos tratados com o EHB de *C. spicatus* e do grupo controle para a análise laboratorial do sangue, seguindo a metodologia descrita no ensaio agudo. O procedimento foi semelhante para os grupos satélites.

2.3.6.9 Exame anatomopatológico

Concluído o tratamento crônico, os animais foram mortos por tração cervical (40% de cada grupo) e suas vísceras (pulmão, coração, fígado e rins) foram removidas e colocadas em recipientes previamente identificados e preparados com solução de formol a 10%. O material coletado foi encaminhado para o laboratório a

fim de ser realizado o exame anatomopatológico nos órgãos dos animais tratados com a maior dose do extrato de *C. spicatus* (126 mg/kg).

As secções teciduais dos órgãos excisados, fixados em formalina tamponada, após 24 horas, foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subseqüentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e vermelho picrossirius e examinados ao microscópio óptico.

2.3.7.0 Análise estatística

Nos testes de toxicidade frente a *Artemia salina* foi utilizado o método estatístico de probitos no programa Microcal Origin 6.0 (FINNEY, 1971).

Nos testes de toxicidade em ratos, os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média para cada grupo de animais. Os resultados foram analisados realizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Dunnet, Teste “t” e Mann-Whitney com limites de segurança de 95 %. Nestas análises foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 4.02.

Resultados

Resultados

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus* (EHB) e triagem fitoquímica.

O extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus* (EHB) apresentou um rendimento de 9,6%. O “screening” fitoquímico demonstrou a presença principalmente de esteróides e flavonóides (Tabela 1).

Tabela 1: Determinação da triagem fitoquímica do EHB de *C. spicatus*.

FITOQUÍMICA		PARTE DA PLANTA
GRUPO QUÍMICO	MÉTODOS	FOLHAS
ALCALÓIDES	Bourchardat	-
	Mayer	-
	Dragendoff	-
	Ácido sílico-tungstíco	-
ESTERÓIDES	0,12	+
	0,25	+
	0,50	++
TANINOS	Gelatina 0,50	+
	2,00	+
	FeCl ₃ 2,00	+
FLAVONÓIDES	Fita de magnésio	++
	Fluorescência	++
SAPONINAS	Espuma	+

(-) Reação negativa

(++) Reação moderadamente positiva

(+) Reação fracamente positiva

(+++) Reação fortemente positiva

(MATOS, 1997)

3.2 Triagem toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* L.

No bioensaio usando larvas de *Artemia salina* L. o tratamento com o EHB de *C. spicatus* não demonstrou a ocorrência de mortes na concentração de 40 µg/mL sendo 600 µg/mL a concentração responsável por 100% de óbitos. A concentração letal 50% (CL₅₀) obtida para o EHB de *C. spicatus* foi 294,7 µg/mL.

3.3 Estudo toxicológico pré-clínico agudo

3.3.1 Triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda

Durante o período das 4 horas que se seguiram à administração de 2 g/kg do EHB, os animais não demonstraram sinais de toxicidade. Nenhuma morte foi observada durante os 14 dias de experimento. A observação ocorreu aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia após o tratamento e uma vez por dia nos 13 dias seguintes.

3.3.2 Evolução ponderal, consumo de água e alimento

A administração do EHB na dose de 2 g/kg não alterou a evolução ponderal de ambos os sexos em relação aos respectivos grupos controle, conforme pode ser visto na Tabela 2.

O consumo médio de água e alimentos dos animais (machos e fêmeas) não foi alterado de forma significativa com a administração do EHB na dose 2 g/kg (Tabela 3).

Tabela 2: Variação da evolução ponderal de ratos, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de *C. spicatus* durante 14 dias.

Tratamento	Machos	Fêmeas
Variação de peso (g)		
Controle	13,5 ± 2,4	10,8 ± 1,1
EHB 2 g/kg	17,1 ± 1,7	11,2 ± 1,3

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. $p > 0,05$.

Tabela 3: Consumo de água e ração de ratos, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de *C. spicatus* durante 14 dias.

	Machos	Fêmeas
Consumo de água (mL)		
Controle	241,8 ± 13,8	188,6 ± 15,1
EHB 2 g/kg	262,9 ± 17,2	173,6 ± 14,4

	Machos	Fêmeas
Consumo de ração (g)		
Controle	203,1 ± 6,5	149,0 ± 8,0
EHB 2 g/kg	194,9 ± 5,9	160,2 ± 7,6

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. $p > 0,05$.

3.3.3 Análise laboratorial de sangue

3.3.3.1 Parâmetros bioquímicos

Os resultados das análises dos parâmetros bioquímicos do sangue obtido dos animais submetidos ao experimento estão representados na Tabela 4.

Conforme os dados, pode-se observar que o EHB na dose de 2 g/kg reduziu o nível de uréia (gráfico 1) e creatinina (gráfico 2) ao mesmo tempo em que aumentou os níveis de colesterol total (gráfico 3), fosfatase alcalina (gráfico 4), proteínas totais (gráfico 5), albumina (gráfico 6) e potássio (gráfico 7) em ambos os sexos.

Outras alterações bioquímicas foram vistas apenas com os machos. Nos gráficos 8 e 9 podem ser observadas a diminuição sérica de ácido úrico e elevação produzida pelo extrato nos níveis de triglicerídios, respectivamente.

Ainda foi observado, apenas com as fêmeas, o aumento nos níveis de AST (gráfico 10).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de *C. spicatus* durante o ensaio de toxicidade aguda.

Parâmetros bioquímicos	Fêmeas		Machos	
	Controle	EHB 2 g/kg	Controle	EHB 2 g/kg
Glicose (mg/dL)	92,2 ± 3,3	86,2 ± 2,9	87,5 ± 3,2	94,2 ± 3,3
Uréia (mg/dL)	41,15 ± 1,3	29,2 ± 1,8*	44,1 ± 1,4	33,2 ± 2,1*
Creatinina (mg/dL)	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0*	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0*
Ácido úrico (mg/dL)	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1	0,7 ± 0,0*
Colesterol total (mg/dL)	50,1 ± 1,8	66,7 ± 3,7*	60,2 ± 1,2	77,7 ± 2,1*
Triglicerídios (mg/dL)	95,2 ± 1,2	96,3 ± 5,4	92,8 ± 1,3	128,8 ± 1,1*
AST (U/L)	116,8 ± 3,4	163,0 ± 15,4*	114,7 ± 2,8	128,3 ± 6,0
ALT (U/L)	53,5 ± 2,3	59,8 ± 4,6	53,8 ± 0,8	59,3 ± 1,5
Fosfatase alcalina (U/L)	81,0 ± 2,7	164,8 ± 25,5*	96,3 ± 2,7	164,7 ± 16,9*
Proteínas totais (g/dL)	6,1 ± 0,2	7,6 ± 0,3*	6,6 ± 0,2	7,3 ± 0,1*
Albumina (g/dL)	3,4 ± 0,1	4,7 ± 0,1*	3,5 ± 0,1	4,3 ± 0,3*
Globulina (g/dL)	2,6 ± 1,0	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Sódio (mEq/L)	139,3 ± 0,7	153,2 ± 3,3	150,8 ± 2,7	158,3 ± 4,2
Potássio (mEq/L)	4,8 ± 0,1	9,5 ± 0,6*	4,9 ± 0,0	8,3 ± 0,3*
Cálcio (mEq/L)	7,7 ± 0,8	7,0 ± 0,4	7,8 ± 0,2	7,7 ± 0,1
Magnésio (mEq/L)	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,4 ± 0,0

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

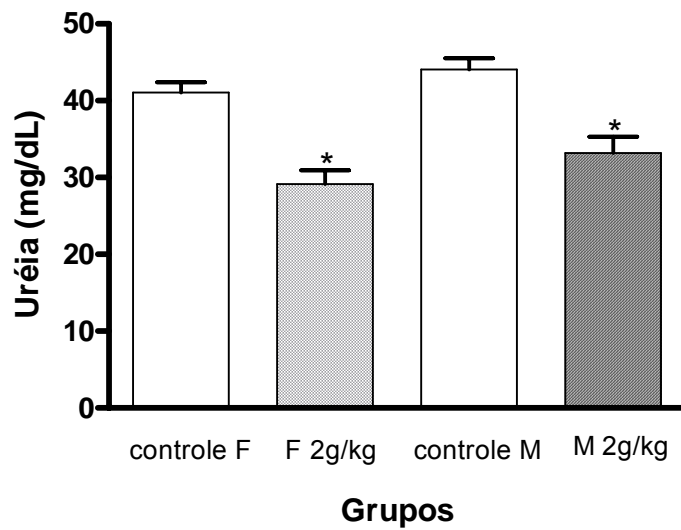


Gráfico 1: Dosagem de uréia no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

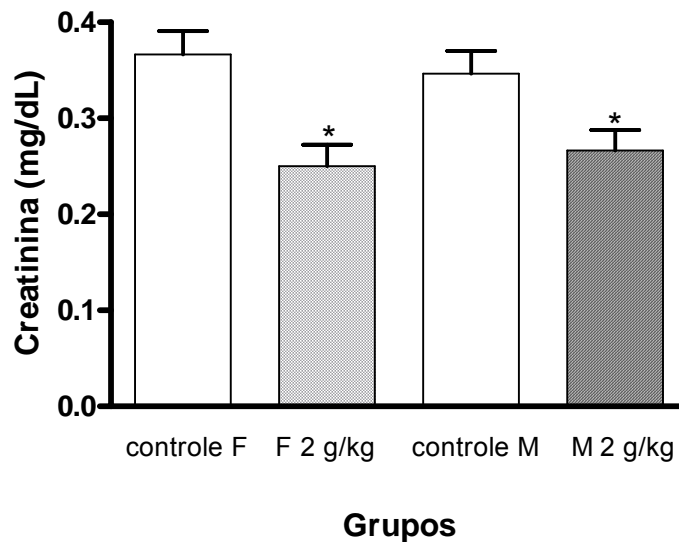


Gráfico 2: Dosagem de creatinina no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

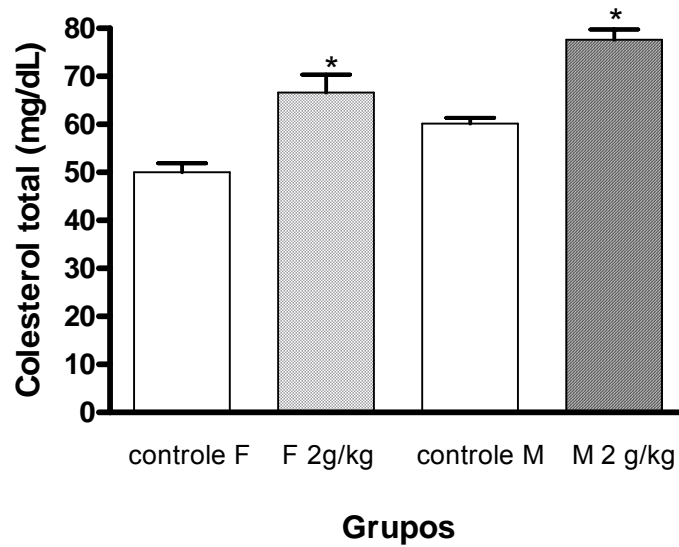


Gráfico 3: Dosagem de colesterol total no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

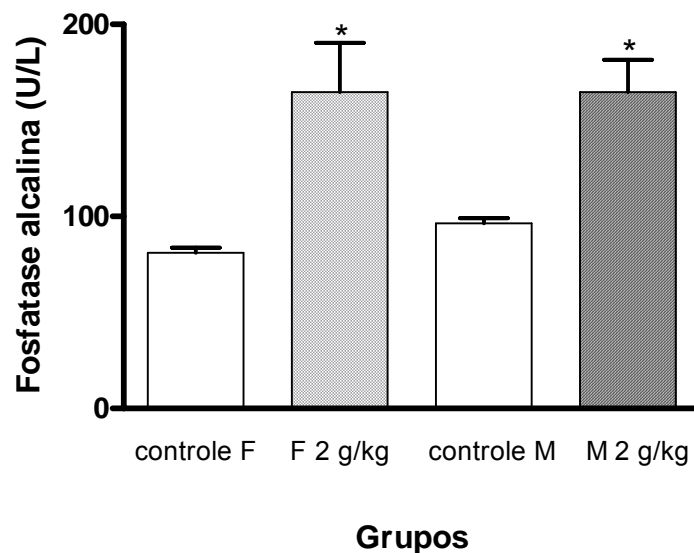


Gráfico 4: Dosagem de FAL no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

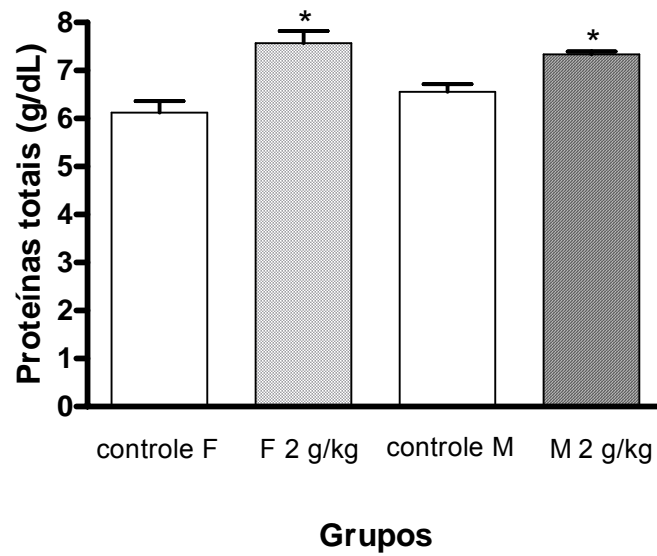


Gráfico 5: Dosagem de proteínas totais no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

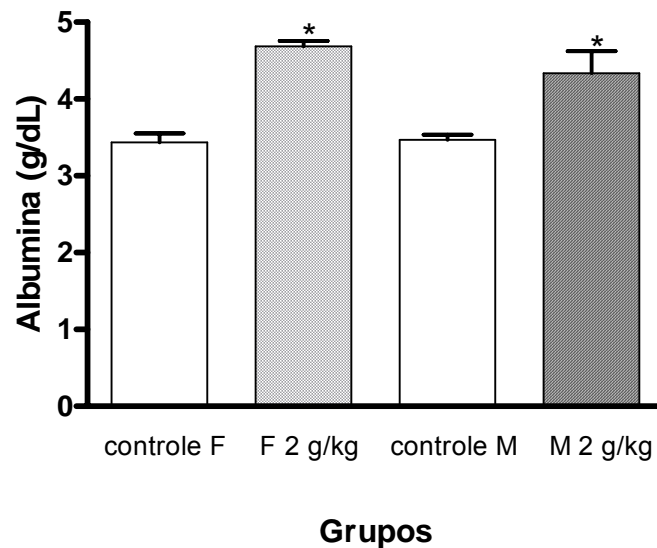


Gráfico 6: Dosagem de albumina no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

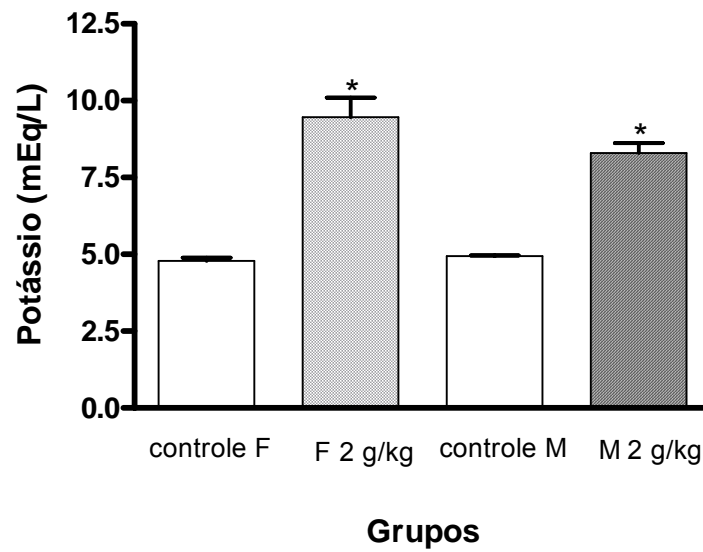


Gráfico 7: Dosagem de potássio no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

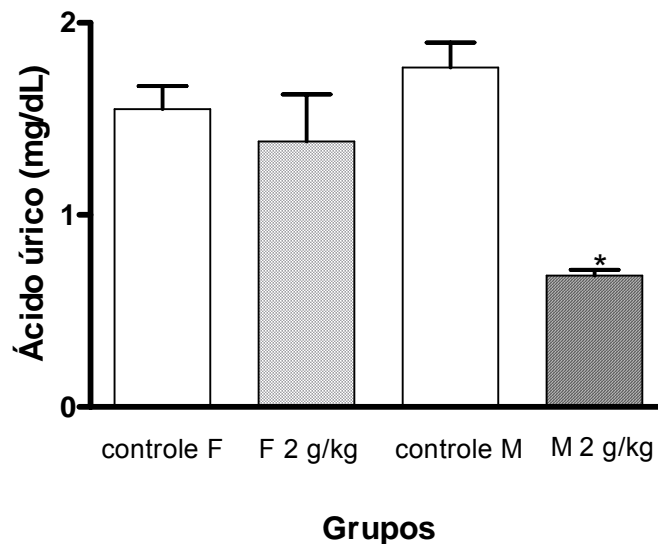


Gráfico 8: Dosagem de ácido úrico no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

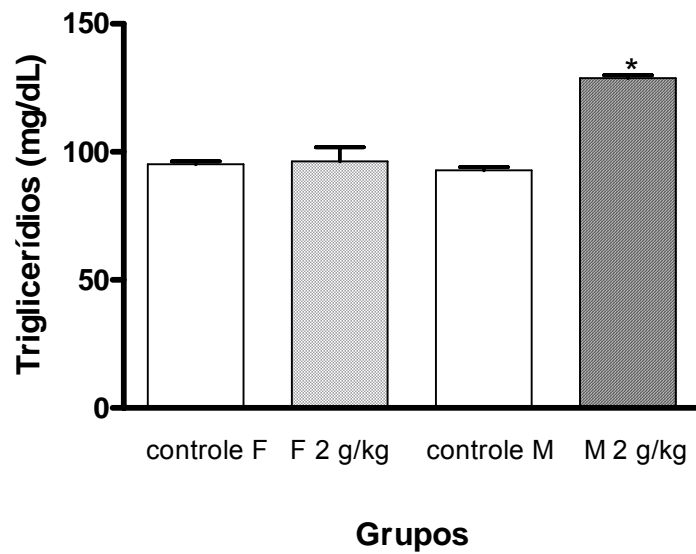


Gráfico 9: Dosagem de triglicerídios no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

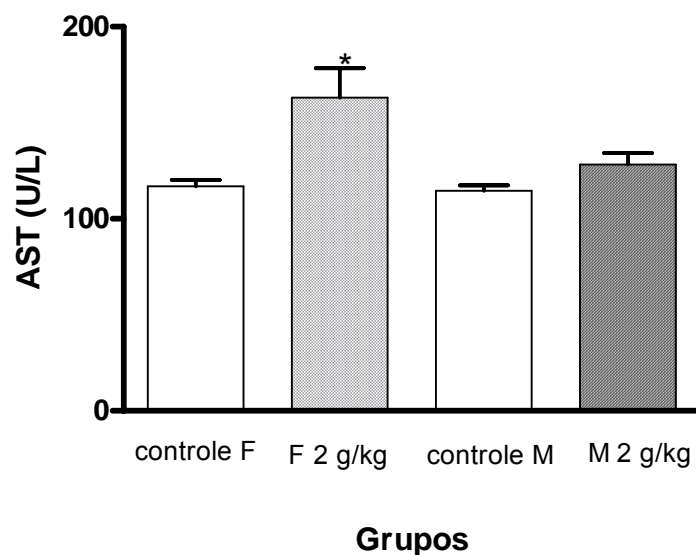


Gráfico 10: Dosagem de AST no soro de ratos, ambos os sexos, tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus*, nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05. (F = fêmea; M = macho).

3.3.3.2 Parâmetros hematológicos

Algumas alterações foram observadas com relação aos parâmetros hematológicos. O extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus* promoveu aumento no volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) em ambos os sexos e redução da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) somente nos machos. Na série branca foi registrada leucopenia nas fêmeas (gráfico 11). Ainda observou-se uma trombocitose em fêmeas e machos (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos tratados com a dose de 2 g/kg do EHB de *C. spicatus* durante o ensaio de toxicidade aguda.

Parâmetros hematológicos	Fêmeas		Machos	
	Controle	EHB 2 g/Kg	Controle	EHB 2 g/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,1 ± 0,3	6,8 ± 0,2	7,4 ± 0,2	7,6 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	14,2 ± 0,5	14,5 ± 0,4	14,6 ± 0,2	15,0 ± 0,2
Hematócrito (%)	40,3 ± 0,7	41,2 ± 0,9	41,3 ± 0,4	44,8 ± 1,2
VCM (μ^3)	51,0 ± 0,4	59,8 ± 0,4*	54,5 ± 0,6	59,0 ± 0,6*
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	18,5 ± 0,2	21,2 ± 0,2*	19,2 ± 0,3	19,9 ± 0,2
CHCM (%)	36,0 ± 0,4	35,5 ± 0,3	35,5 ± 0,2	33,9 ± 0,2*
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,4 ± 0,6	4,8 ± 0,7*	7,5 ± 0,3	7,0 ± 0,6
Neutrófilos (%)	22,5 ± 1,7	20,2 ± 3,4	19,7 ± 2,3	18,7 ± 1,8
Eosinófilos (%)	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,0
Linfócitos (%)	74,0 ± 2,0	74,3 ± 2,9	76,2 ± 1,1	75,0 ± 1,0
Monócitos (%)	3,0 ± 0,5	4,2 ± 1,7	3,5 ± 0,3	5,0 ± 1,1
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	641,3 ± 48,7	1073,0 ± 122,9*	656,3 ± 43,9	1204,0 ± 107,7*

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student/Mann-Whitney.*p < 0,05.

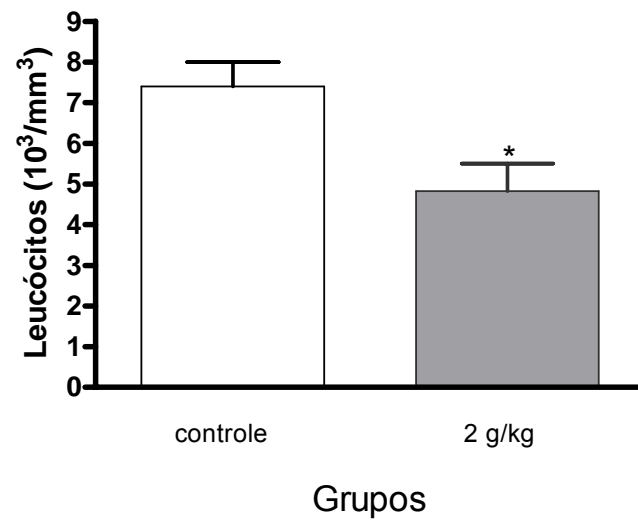


Gráfico 11: Dosagem de leucócitos de ratos tratados com a dose de 2 g/kg de EHB de *C. spicatus* nos ensaios de toxicidade aguda. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student/Mann-Whitney.*p < 0,05.

3.4 Estudo toxicológico pré-clínico crônico

Os resultados da avaliação crônica de ratos (fêmeas e machos) tratados com o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus* nas doses de 14 mg/kg (dose popular), 42 mg/kg (3 X a dose de uso popular) e 126 mg/kg (9 X a dose de uso popular) são expostos a seguir.

3.4.1 Sinais tóxicos gerais e letalidade.

De um modo geral, ao longo do tratamento com EHB das folhas de *C. spicatus* não foram observados sinais tóxicos de grande intensidade. Ressalta-se apenas uma morte de um rato macho que recebeu tratamento contínuo na dose de 126 mg/kg durante oito semanas. A avaliação macroscópica das vísceras não demonstrou anormalidades.

3.4.2 Evolução ponderal, consumo de água e alimento.

3.4.2.1 Evolução ponderal.

A análise dos resultados mostrou que houve uma distribuição homogênea do peso dos animais tratados cronicamente. Do ponto de vista estatístico houve aumento significativo de peso nos machos que recebeu a dose de 126 mg/kg somente na 2ª semana de tratamento (Tabela 6 e gráfico 12). De forma análoga, nas fêmeas ocorreu um aumento de peso significativo com o tratamento com EHB também na dose de 126 mg/kg e na 2ª semana (Tabela 6 e gráfico 13).

Tabela 6: Valor médio do peso semanal de ratos (machos e fêmeas) durante as 13 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EHB de *C. spicatus*.

Machos

Semanas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	220,4 ± 10,3	224,1 ± 7,8	210,4 ± 9,9	225,4 ± 5,0
2	255,6 ± 11,9	257,4 ± 9,1	248,0 ± 11,7	261,4 ± 5,6*
3	263,6 ± 11,9	267,4 ± 9,1	259,1 ± 12,2	272,3 ± 6,2
4	283,0 ± 13,5	285,4 ± 10,5	275,6 ± 12,4	286,9 ± 6,6
5	295,6 ± 14,6	300,0 ± 11,5	289,6 ± 13,3	308,7 ± 7,6
6	304,1 ± 15,5	309,2 ± 12,0	296,5 ± 14,0	315,1 ± 7,5
7	312,8 ± 17,3	321,1 ± 12,3	307,5 ± 15,1	326,0 ± 6,4
8	309,0 ± 20,0	322,6 ± 12,5	310,5 ± 15,5	334,2 ± 8,0
9	322,6 ± 20,7	334,9 ± 12,7	321,7 ± 16,5	342,7 ± 8,6
10	325,5 ± 19,9	337,1 ± 12,8	327,4 ± 17,1	350,2 ± 9,6
11	331,0 ± 20,7	344,7 ± 13,9	332,9 ± 17,9	358,2 ± 10,1
12	333,4 ± 20,7	345,8 ± 14,1	333,8 ± 18,0	357,4 ± 10,2
13	340,4 ± 20,9	350,3 ± 13,9	340,6 ± 18,5	362,3 ± 9,8

Fêmeas

Semanas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	215,9 ± 11,9	200,3 ± 7,3	211,0 ± 7,8	228,1 ± 11,4
2	204,7 ± 12,5	198,0 ± 7,1	214,9 ± 6,7	261,2 ± 22,8*
3	217,8 ± 12,2	209,9 ± 5,8	221,8 ± 6,5	234,2 ± 11,4
4	220,9 ± 12,4	222,5 ± 8,1	224,7 ± 5,8	240,7 ± 10,8
5	220,0 ± 11,3	222,9 ± 6,6	228,4 ± 7,1	240,1 ± 11,3
6	228,5 ± 12,7	226,9 ± 7,4	231,4 ± 5,8	246,0 ± 12,5
7	226,9 ± 11,1	228,0 ± 7,0	232,6 ± 6,1	249,8 ± 11,5
8	228,7 ± 11,9	236,5 ± 7,2	237,7 ± 6,5	253,6 ± 12,3
9	228,7 ± 12,3	234,1 ± 6,4	236,0 ± 6,3	249,0 ± 11,5
10	227,8 ± 11,5	244,4 ± 8,6	245,2 ± 6,6	255,6 ± 12,3
11	231,8 ± 12,7	245,0 ± 8,3	242,6 ± 5,9	255,4 ± 11,4
12	234,3 ± 13,5	242,3 ± 7,0	241,3 ± 7,8	255,8 ± 12,1
13	233,1 ± 13,1	245,7 ± 6,6	244,2 ± 7,0	258,1 ± 12,6

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet
*p < 0,05.

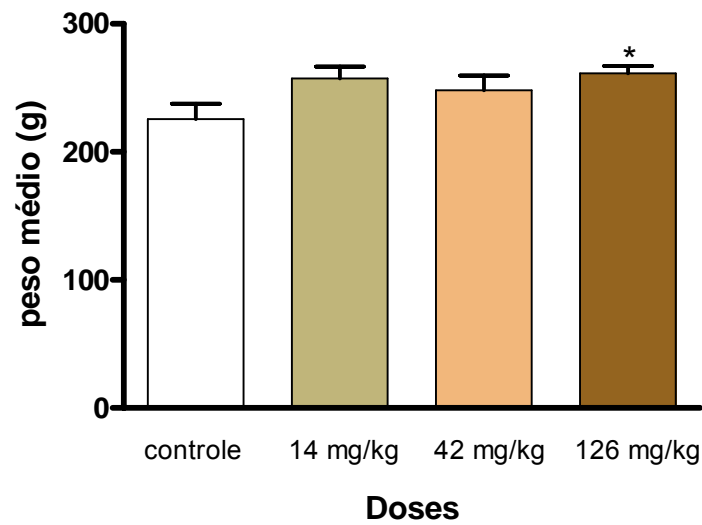


Gráfico 12: Valor médio do peso de **ratos** na 2ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

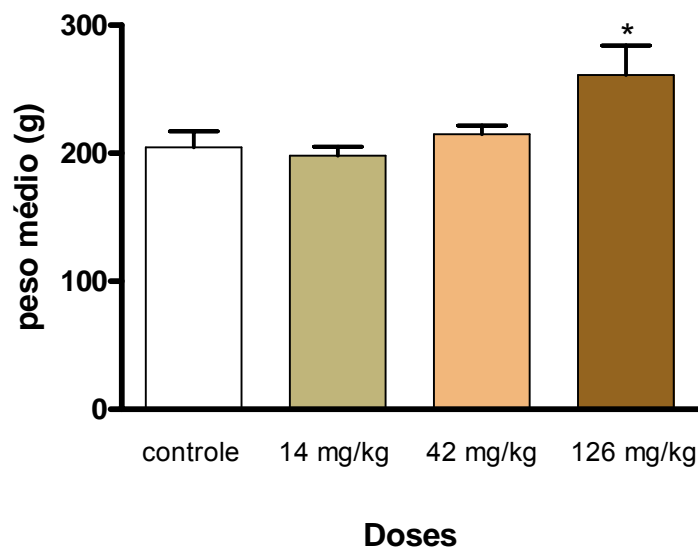


Gráfico 13: Valor médio do peso de **ratas** na 2ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

3.4.2.2 Consumo de água e ração

Os resultados, que podem ser vistos na Tabela 7, mostram que a administração prolongada provocou poucas alterações no que diz respeito ao consumo de água e alimento de machos e fêmeas tratados diariamente com diferentes doses do EHB de *C. spicatus*. Os machos apresentaram aumento no consumo de água na 5ª semana nas doses de 14 mg/kg e 42 mg/kg (gráfico 14) e na dose de 126 mg/kg houve redução do consumo de água na 10ª semana (gráfico 15), 11ª semana (gráfico 16), 12ª semana (gráfico 17) e 13ª (gráfico 18). As fêmeas mostraram redução do consumo de água somente na 7ª semana (gráfico 22) na dose de 42 mg/kg. Apresentaram aumento do consumo na dose de 126 mg/kg na 3ª semana (gráfico 19), 5ª semana (gráfico 20), 6ª semana (gráfico 21) 9ª semana (gráfico 23) e na 13ª semana (gráfico 24) que também mostrou aumento do consumo de água na dose usual.

No que se refere ao consumo de ração (Tabela 8), os machos aumentaram o consumo de alimento na 5ª semana (gráfico 25) nas três doses usadas. Houve também aumento na 7ª semana (gráfico 26) e 8ª semana (gráfico 27) na dose 126 mg/kg. As fêmeas apresentaram aumento significativo do consumo de ração na 2ª semana na dose 14 mg/kg (gráfico 28). Ocorreu aumento também na dose de 126 mg/kg nas seguintes semanas: 5ª semana (gráfico 29), 6ª semana (gráfico 30), 8ª semana (gráfico 31), 9ª semana (gráfico 32) e 13ª semana (gráfico 33).

Tabela 7: Consumo médio semanal de água (mL) por ratos durante as 13 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EHB de *C. spicatus*.

Machos

Semanas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	178,0 ± 9,4	186,5 ± 3,4	178,5 ± 3,3	183,0 ± 8,4
2	177,0 ± 4,6	184,0 ± 4,3	182,5 ± 4,7	176,0 ± 8,3
3	157,5 ± 4,6	168,5 ± 3,9	166,5 ± 4,8	167,5 ± 12,3
4	156,0 ± 7,3	165,0 ± 4,2	166,5 ± 6,1	157,0 ± 7,7
5	146,5 ± 5,3	171,5 ± 4,5*	169,0 ± 3,2*	165,5 ± 9,1
6	164,0 ± 5,4	166,0 ± 3,8	165,0 ± 4,5	157,5 ± 7,4
7	153,0 ± 6,4	161,5 ± 3,9	158,0 ± 4,0	154,5 ± 5,7
8	160,5 ± 4,6	166,0 ± 3,6	160,0 ± 4,4	161,0 ± 7,2
9	163,5 ± 5,3	163,5 ± 5,0	164,0 ± 3,6	146,5 ± 9,9
10	168,0 ± 5,4	172,5 ± 5,5	165,5 ± 5,6	135,5 ± 10,9*
11	174,5 ± 4,7	161,5 ± 3,8	165,0 ± 5,3	136,5 ± 12,9*
12	172,0 ± 5,3	167,0 ± 3,9	165,5 ± 3,0	137,5 ± 11,9*
13	173,0 ± 2,3	167,1 ± 5,7	166,5 ± 6,3	142,0 ± 9,7*

Fêmeas

Semanas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	129,0 ± 15,7	152,5 ± 6,4	135,0 ± 4,4	149,5 ± 6,3
2	148,5 ± 5,6	160,0 ± 6,0	150,0 ± 5,5	153,0 ± 6,0
3	128,5 ± 6,3	141,5 ± 5,3	129,0 ± 5,3	153,5 ± 2,7*
4	132,0 ± 4,6	135,5 ± 5,2	120,0 ± 5,7	142,0 ± 3,7
5	118,4 ± 13,0	141,0 ± 4,7	134,5 ± 5,4	154,0 ± 5,5*
6	123,5 ± 3,7	136,5 ± 4,0	134,5 ± 5,8	151,5 ± 5,0*
7	127,0 ± 5,0	137,0 ± 2,9	121,5 ± 5,1*	133,0 ± 3,8
8	122,5 ± 4,9	128,5 ± 3,9	127,0 ± 6,8	137,0 ± 4,2
9	125,0 ± 4,0	142,0 ± 3,5	135,0 ± 6,9	146,0 ± 5,6*
10	130,0 ± 6,4	131,5 ± 3,6	121,0 ± 8,1	142,5 ± 5,2
11	120,5 ± 6,4	123,0 ± 2,8	123,0 ± 6,7	133,0 ± 4,7
12	123,5 ± 4,6	125,0 ± 2,8	117,0 ± 6,2	138,0 ± 4,5
13	109,5 ± 3,1	124,0 ± 3,0*	119,5 ± 5,5	134,5 ± 4,2*

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet
*p < 0,05.

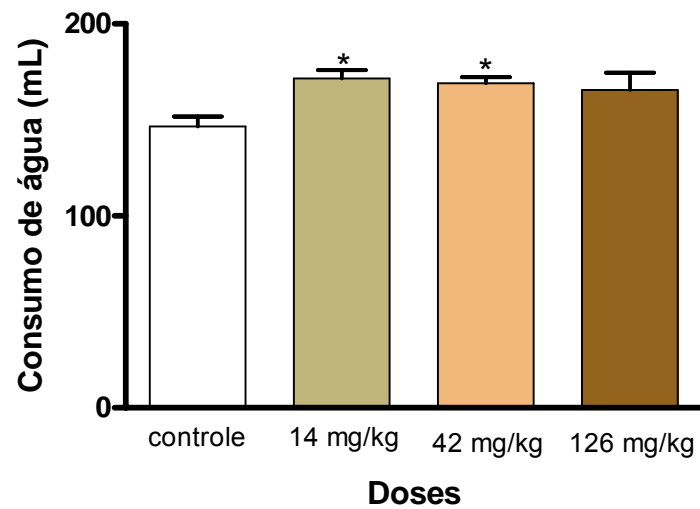


Gráfico 14: Consumo de água de **ratos** na 5ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.



Gráfico 15: Consumo de água de **ratos** na 10ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

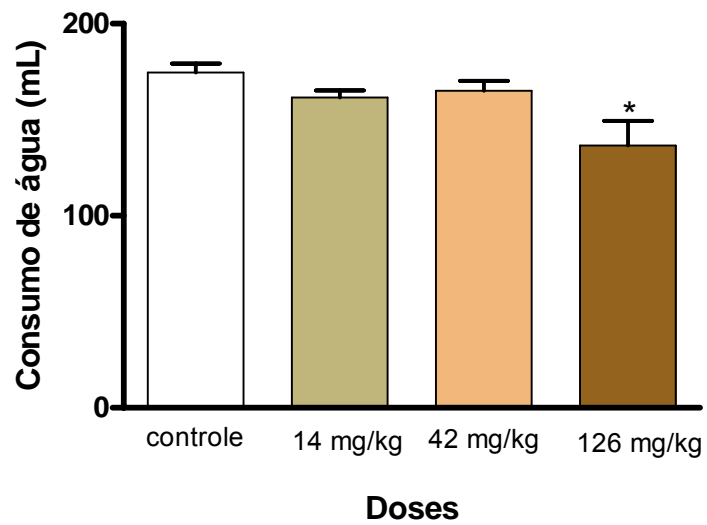


Gráfico 16: Consumo de água de **ratos** na 11ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.



Gráfico 17: Consumo de água de **ratos** na 12ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.



Gráfico 18: Consumo de água de **ratos** na 13ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *Costus spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

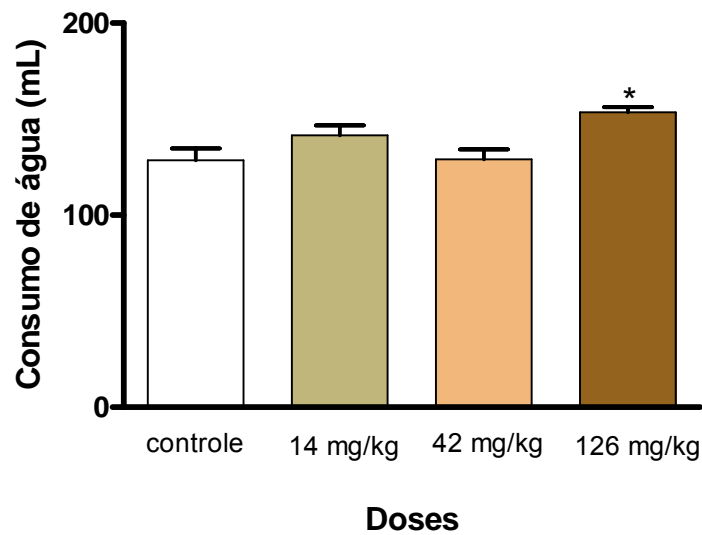


Gráfico 19: Consumo de água de **ratas** na 3ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

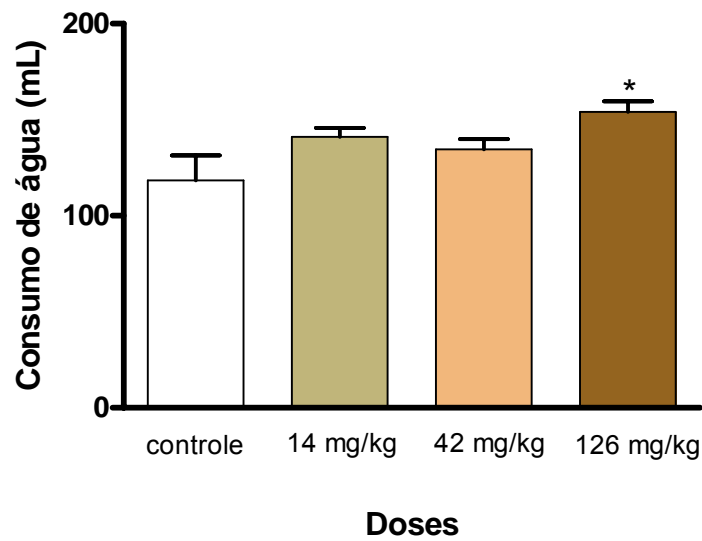


Gráfico 20: Consumo de água de **ratas** na 5ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

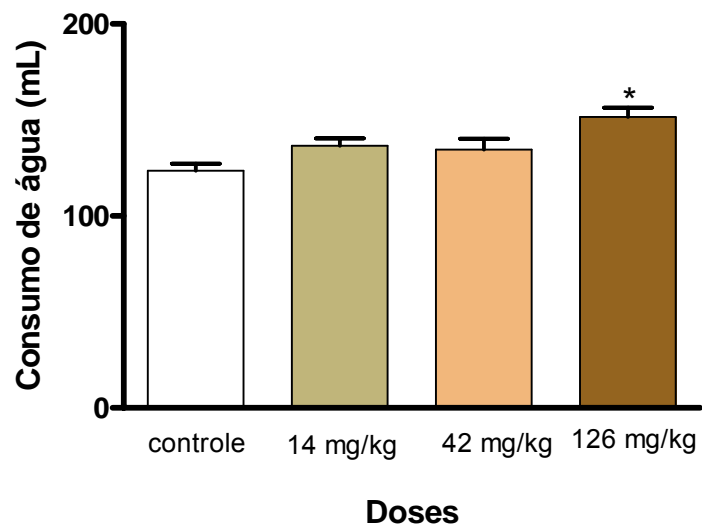


Gráfico 21: Consumo de água de **ratas** na 6ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

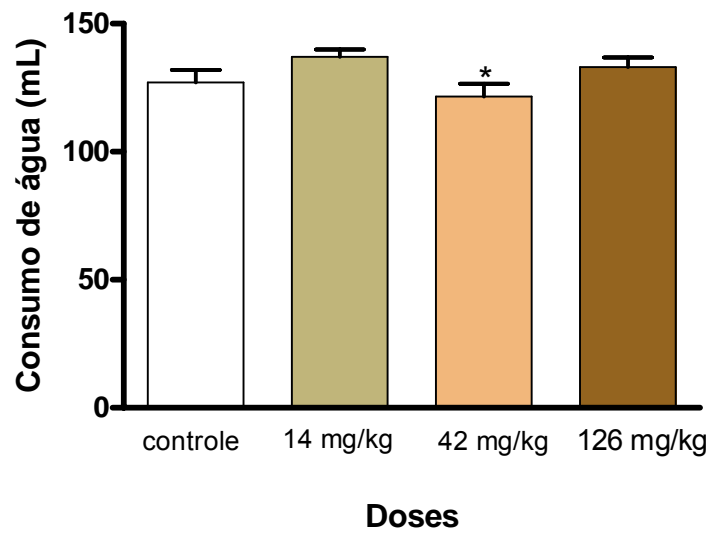


Gráfico 22: Consumo de água de **ratas** na 7ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

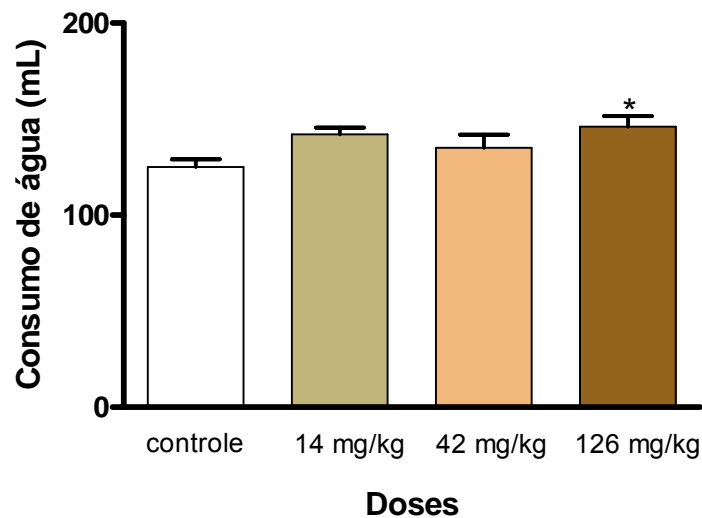


Gráfico 23: Consumo de água de **ratas** na 9ª semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

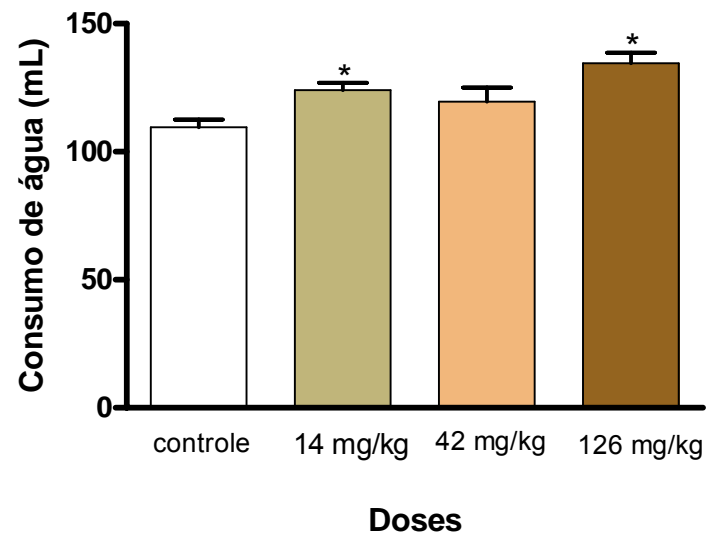


Gráfico 24: Consumo de água de **ratas** na 13^a semana de tratamento crônico com diferentes doses de EHB de *C. spicatus*. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

Tabela 8: Consumo médio semanal de ração (g) por ratos durante as 13 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EHB de *C. spicatus*.

Machos

Semanas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	116,5 ± 1,7	120,0 ± 2,5	119,4 ± 2,0	116,1 ± 3,4
2	120,6 ± 2,6	116,3 ± 1,4	113,3 ± 2,7	114,4 ± 3,7
3	106,1 ± 2,5	106,5 ± 2,0	101,3 ± 1,6	109,4 ± 3,7
4	105,7 ± 2,8	112,2 ± 2,0	102,0 ± 2,0	112,4 ± 2,0
5	86,0 ± 2,3	102,5 ± 1,3*	98,6 ± 1,4*	106,5 ± 2,0*
6	107,4 ± 3,9	112,7 ± 1,9	104,2 ± 1,9	114,4 ± 4,4
7	97,2 ± 1,7	102,9 ± 1,4	99,1 ± 1,6	106,9 ± 3,9*
8	101,6 ± 3,0	109,6 ± 2,0	104,9 ± 2,2	113,9 ± 3,9*
9	96,4 ± 3,1	105,1 ± 3,4	99,8 ± 2,3	98,89 ± 5,3
10	107,5 ± 1,7	113,0 ± 2,7	109,0 ± 1,6	96,50 ± 6,9
11	103,0 ± 1,8	104,9 ± 2,3	107,0 ± 1,8	94,37 ± 6,4
12	103,4 ± 3,2	100,5 ± 3,0	97,5 ± 5,5	94,10 ± 5,4
13	114,1 ± 1,3	112,2 ± 1,9	109,3 ± 1,7	105,8 ± 4,5

Fêmeas

Semanas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	73,8 ± 5,7	80,0 ± 1,9	78,5 ± 2,2	84,7 ± 3,1
2	83,2 ± 2,2	93,4 ± 2,5*	87,7 ± 1,7	85,2 ± 2,9
3	75,8 ± 2,9	79,0 ± 3,1	76,8 ± 3,2	81,2 ± 2,1
4	79,9 ± 3,2	80,3 ± 2,7	77,7 ± 1,6	85,1 ± 2,0
5	71,2 ± 2,0	75,5 ± 1,9	73,1 ± 1,4	86,9 ± 3,0*
6	80,8 ± 1,7	84,9 ± 3,1	87,1 ± 2,8	92,0 ± 1,9*
7	71,9 ± 3,6	80,5 ± 1,9	70,3 ± 2,0	76,5 ± 2,2
8	75,2 ± 3,1	73,9 ± 2,6	75,7 ± 2,5	84,5 ± 1,9*
9	74,7 ± 3,3	82,3 ± 2,1	76,8 ± 1,9	85,3 ± 3,2*
10	79,1 ± 2,2	76,4 ± 3,3	73,8 ± 4,2	87,4 ± 2,3
11	72,9 ± 2,6	70,6 ± 2,7	70,0 ± 1,7	80,1 ± 3,3
12	74,2 ± 3,2	65,1 ± 4,5	66,2 ± 4,5	85,7 ± 2,3
13	75,8 ± 1,8	73,9 ± 1,9	78,6 ± 2,2	84,9 ± 2,0*

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnett
*p < 0,05.

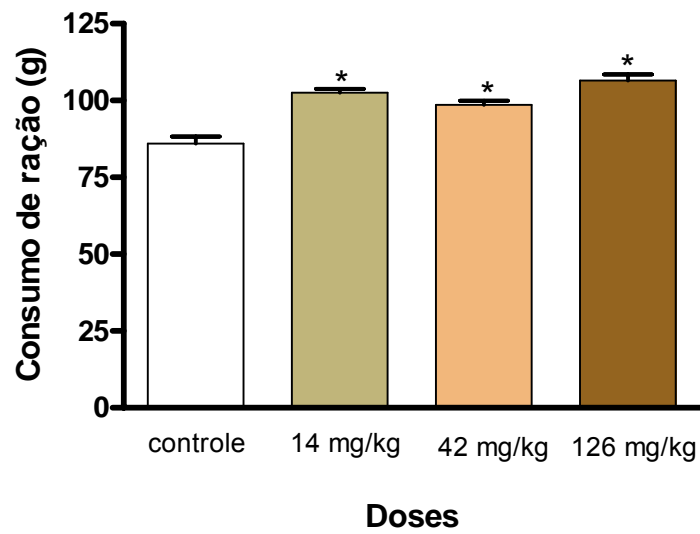


Gráfico 25: Consumo de ração por **ratos** tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 5ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

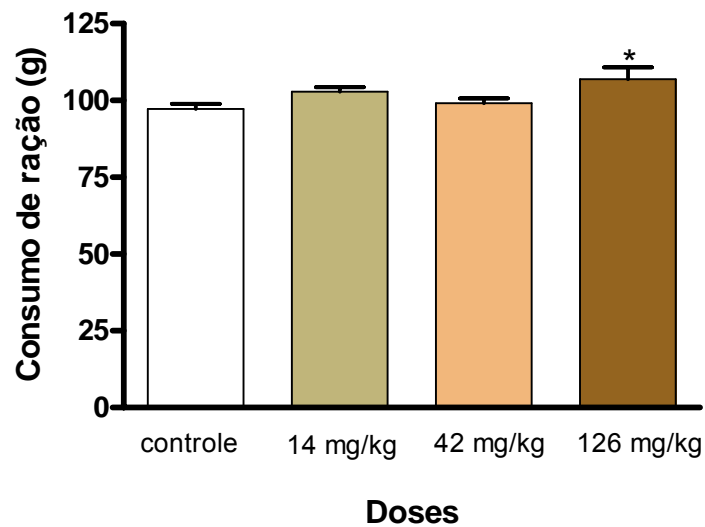


Gráfico 26: Consumo de ração por **ratos** tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 7ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

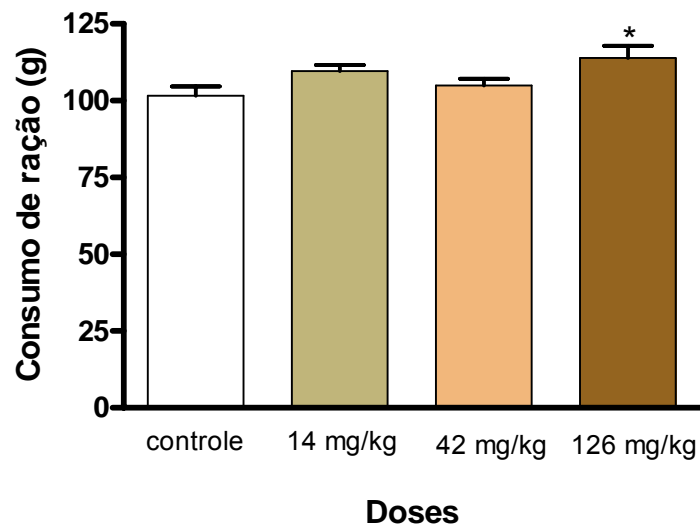


Gráfico 27: Consumo de ração por **ratos** tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 8ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

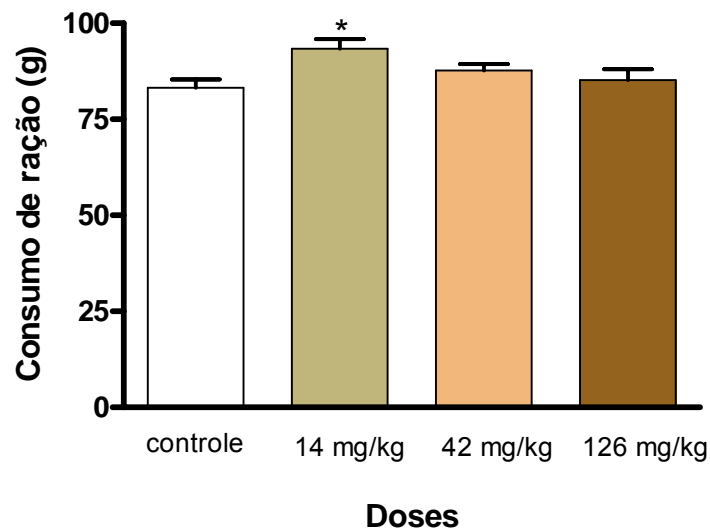


Gráfico 28: Consumo de ração por **ratas** tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 2ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. *p < 0,05.

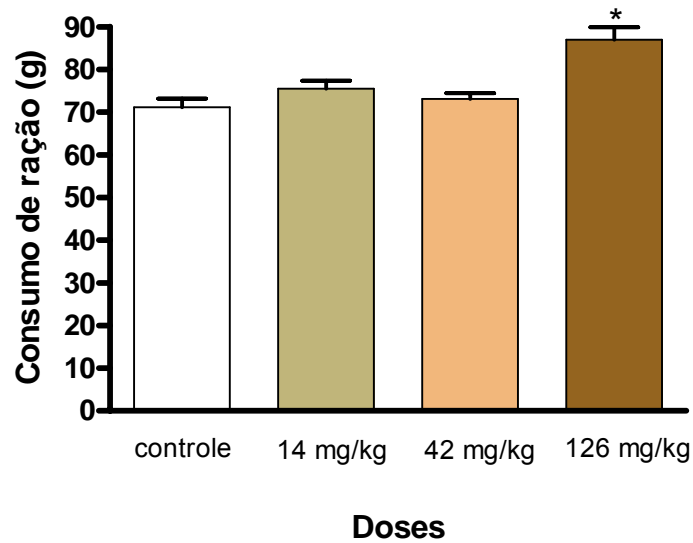


Gráfico 29: Consumo de ração por **ratas** tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 5ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

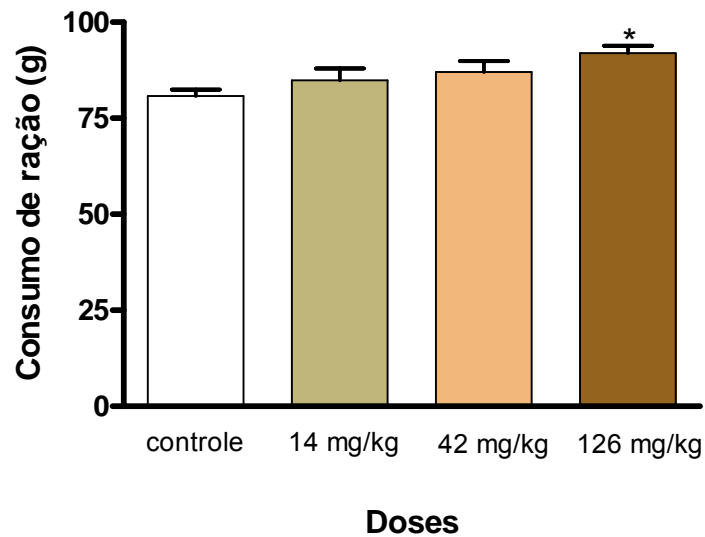


Gráfico 30: Consumo de ração por **ratas** tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 6ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

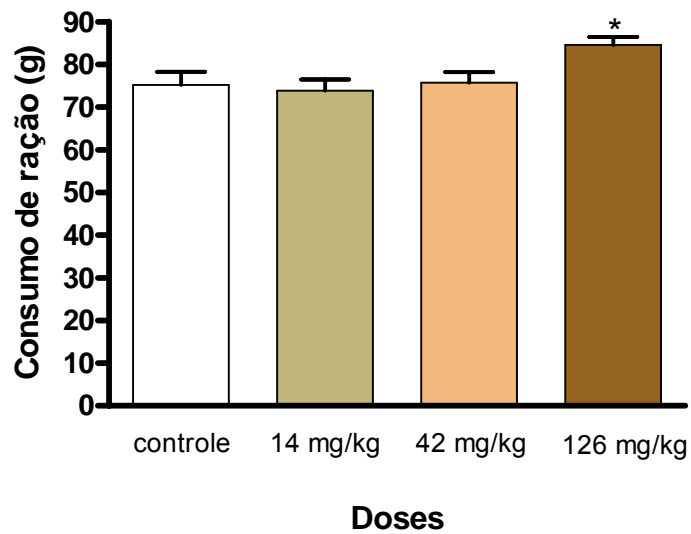


Gráfico 31: Consumo de ração por **ratas** tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 8ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

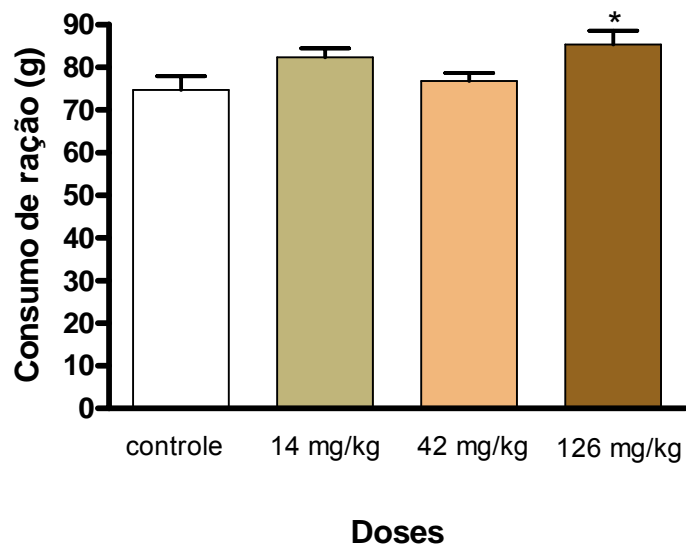


Gráfico 32: Consumo de ração por **ratas** tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 9ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

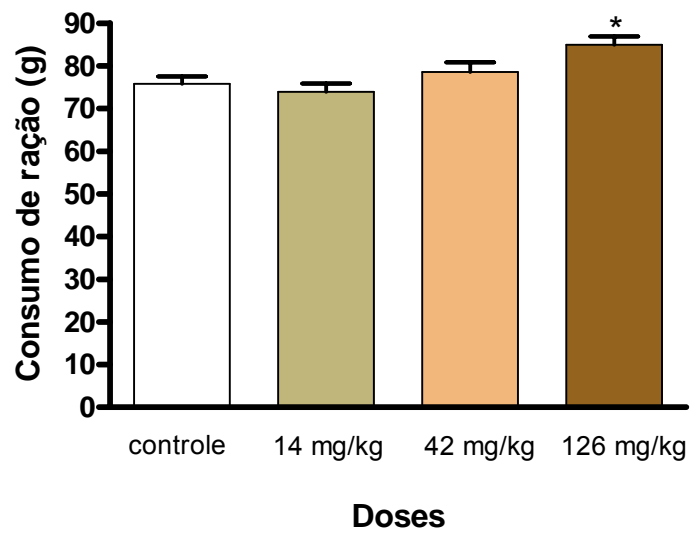


Gráfico 33: Consumo de ração por **ratas** tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* na 13ª semana de tratamento crônico. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

3.4.3 Temperatura

Durante todo o experimento não foram observadas alterações significativas desse parâmetro nos grupos tratados de ambos os sexos em relação aos seus respectivos controles. Nos machos a temperatura variou de 36,5 – 38,1 °C e para as fêmeas a temperatura conservou-se entre 37,1 – 38,9 °C.

3.4.4 Glicemia

O nível glicêmico dos animais tratados (machos e fêmeas) nas doses estabelecidas não foi alterado de modo significativo durante todo o tratamento quando comparados com o controle, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9: Efeito da administração crônica de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre a glicemia dos animais durante ensaio de toxicidade crônica.

Machos

Quinzenas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
0	86,9 ± 1,6	91,3 ± 1,5	108,0 ± 3,5	96,0 ± 2,7
1	82,8 ± 1,1	89,1 ± 1,4	91,3 ± 3,2	91,4 ± 1,7
2	87,2 ± 2,5	90,3 ± 1,8	79,0 ± 1,8	86,5 ± 0,6
3	79,4 ± 2,5	83,0 ± 1,1	76,9 ± 2,2	85,0 ± 2,7
4	78,8 ± 1,8	85,5 ± 1,8	86,1 ± 2,6	88,1 ± 2,0
5	75,0 ± 3,5	77,8 ± 0,6	74,1 ± 2,0	81,0 ± 1,0
6	80,1 ± 3,0	86,0 ± 1,0	78,7 ± 1,4	76,5 ± 2,4

Fêmeas

Quinzenas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
0	92,8 ± 2,2	111,1 ± 6,5	99,6 ± 2,2	99,4 ± 1,9
1	81,8 ± 1,0	87,8 ± 1,3	94,5 ± 2,2	88,9 ± 0,7
2	79,7 ± 0,9	88,4 ± 1,3	83,8 ± 0,6	83,7 ± 0,7
3	79,9 ± 1,5	84,9 ± 2,5	87,1 ± 1,3	81,6 ± 1,0
4	76,0 ± 3,0	89,8 ± 1,2	95,0 ± 2,6	84,9 ± 1,3
5	81,3 ± 1,3	79,7 ± 1,5	82,7 ± 1,0	80,3 ± 0,9
6	85,7 ± 2,4	86,6 ± 1,5	81,9 ± 0,3	84,2 ± 0,9

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. $p > 0,05$.

3.4.5 Avaliação comportamental

3.4.5.1 Teste do campo aberto

Com relação aos parâmetros **ambulação**, **“rearing”** e **defecação** nenhuma alteração estatisticamente significativa foi visualizada em ambos os sexos. Os valores médios da administração crônica podem ser visualizados na Tabela 10. Com relação ao parâmetro **“grooming”**, machos e fêmeas apresentaram mudanças em relação aos grupos controles (Tabela 11). Nos machos ocorreu aumento do comportamento estereotipado de auto-limpeza na dose de 42 mg/kg (gráfico 34) e as fêmeas apresentaram redução deste comportamento nas doses de 14 mg/kg e 126 mg/kg (gráfico 35).

Tabela 10: Efeito da administração prolongada de diferentes doses de EHB das folhas de *C. spicatus* sobre a **ambulação**, “**rearing**” e **defecação** de ratos no teste de campo aberto. Valor médio das 6 quinzenas de tratamento.

Ambulação				
	controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
Machos	28,4 ± 2,4	20,8 ± 2,5	20,5 ± 3,5	29,8 ± 2,6
Fêmeas	24,8 ± 2,8	29,0 ± 2,6	26,9 ± 2,7	26,5 ± 2,4

“Rearing”				
	controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
Machos	11,9 ± 2,1	7,7 ± 2,0	6,5 ± 1,8	10,3 ± 2,9
Fêmeas	12,3 ± 2,2	11,6 ± 2,2	7,7 ± 1,4	6,9 ± 1,9

Defecação				
	controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
Machos	2,9 ± 0,5	3,8 ± 0,5	4,1 ± 0,3	3,3 ± 0,2
Fêmeas	4,0 ± 0,6	2,5 ± 0,6	3,4 ± 0,4	2,5 ± 0,6

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet. p > 0,05.

Tabela 11: Efeito da administração prolongada de diferentes doses de EHB das folhas de *C. spicatus* sobre o “grooming” dos ratos Wistar no teste de campo aberto.

Machos

Quinzenas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	0,8 ± 0,2	5,2 ± 2,0	8,0 ± 2,4*	4,8 ± 1,0
2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,8 ± 1,6*	0,2 ± 0,1
3	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,8	5,4 ± 2,7*	0,2 ± 0,1
4	0,0 ± 0,0	5,6 ± 2,3	1,6 ± 1,1*	3,8 ± 1,6
5	3,4 ± 1,9	0,0 ± 0,0	4,0 ± 2,2*	3,4 ± 1,3
6	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3	1,4 ± 0,9*	3,2 ± 1,5

Fêmeas

Quinzenas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	15,8 ± 5,5	9,2 ± 3,7*	14,8 ± 3,9	5,2 ± 1,9*
2	14,8 ± 5,5	2,2 ± 1,3*	13,6 ± 5,6	2,8 ± 1,6*
3	12,6 ± 3,6	0,8 ± 0,3*	4,2 ± 2,6	4,2 ± 0,8*
4	7,0 ± 2,2	2,0 ± 0,8*	4,8 ± 2,7	0,2 ± 0,1*
5	9,0 ± 2,5	2,6 ± 1,3*	12,2 ± 3,8	6,4 ± 3,0*
6	5,6 ± 1,7	3,0 ± 1,0*	5,4 ± 1,3	2,8 ± 1,4*

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet.
*p < 0,05.

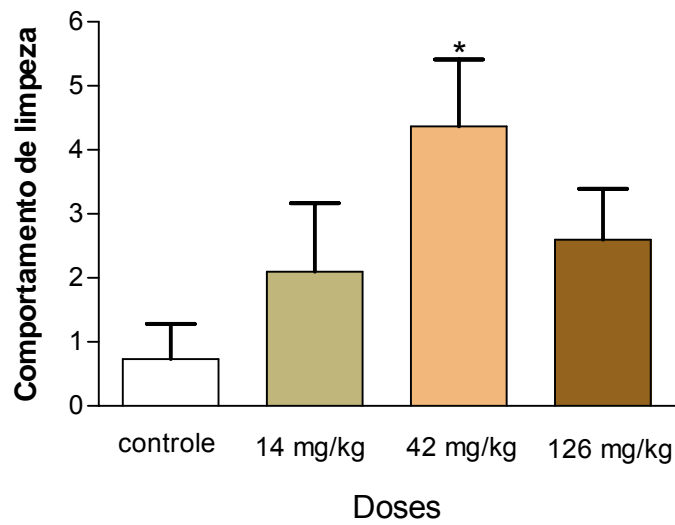


Gráfico 34: Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre o ato de limpeza (“grooming”) de ratos no teste de campo aberto. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10) no período de 6 quinzenas. One-way ANOVA/Dunnet.*p < 0,05.

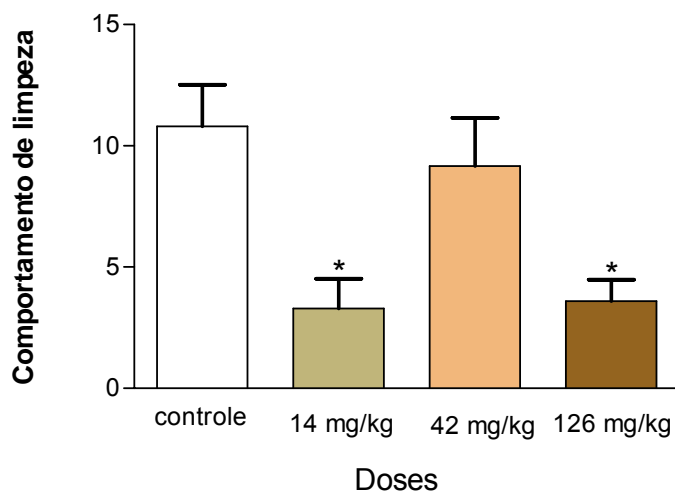


Gráfico 35: Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre o ato de limpeza (“grooming”) de ratas no teste de campo aberto. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10) no período de 6 quinzenas. One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

3.4.5.2 Teste no “Rota Rod”

No transcorrer deste experimento, as fêmeas tratadas com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* não mostraram qualquer alteração no tempo de permanência da barra giratória do aparelho de “rota rod”. Enquanto os machos que receberam a maior dose do extrato (126 mg/kg) apresentaram um “deficit” significativo no desempenho sobre a barra giratória na 1^a quinzena de tratamento (Tabela 12, Gráfico 36).

Tabela 12: Efeito da administração prolongada de diferentes doses de EHB em ratos no Teste de “rota rod”.

Machos

Tempo médio de permanência em segundos				
Quinzenas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	180,0 ± 0,0	170,4 ± 6,4	150,4 ± 11,6	79,6 ± 13,6*
2	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0	176,2 ± 2,5	115,8 ± 18,3
3	161,2 ± 12,5	176,6 ± 2,3	168,4 ± 7,7	100,0 ± 17,4
4	172,8 ± 4,8	156,2 ± 9,8	162,6 ± 11,6	130,2 ± 21,0
5	180,0 ± 0,0	160,0 ± 10,6	180,0 ± 0,0	132,0 ± 19,7
6	180,0 ± 0,0	174,4 ± 3,7	170,4 ± 6,4	170,2 ± 6,2

Fêmeas

Tempo médio de permanência em segundos				
Quinzenas	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
1	151,2 ± 12,5	150,6 ± 19,6	136,2 ± 18,1	180,0 ± 0,0
2	180,0 ± 0,0	165,2 ± 9,9	144,4 ± 18,0	180,0 ± 0,0
3	172,4 ± 5,1	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0
4	161,2 ± 12,5	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0
5	167,4 ± 8,4	180,0 ± 0,0	168,6 ± 7,6	180,0 ± 0,0
6	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0	180,0 ± 0,0

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnet.
*p < 0,05.

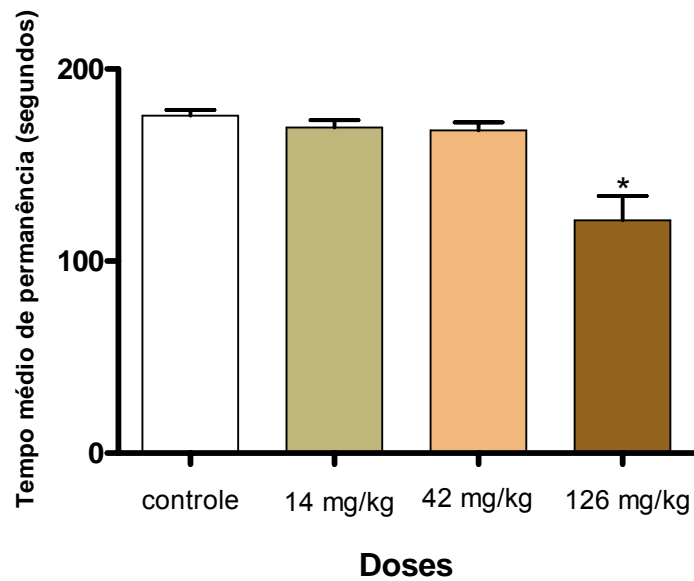


Gráfico 36: Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre o tempo de permanência de ratos no “rota rod” na primeira quinzena de tratamento. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

3.4.6 Análise laboratorial de sangue

3.4.6.1 Parâmetros bioquímicos

O tratamento com o EHB na dose de **14 mg/kg** (DU) mostrou alterações apenas nos animais machos, nos seguintes parâmetros: **colesterol** (controle $54,7 \pm 1,4$ – DU $83,0 \pm 0,7$), **LDH** (controle $1080,0 \pm 34,8$ – DU $1659,0 \pm 149,9$), **triglicerídios** (controle $97,0 \pm 17,2$ – DU $179,0 \pm 17,4$), **amilase** (controle $415,3 \pm 37,1$ – DU $630,7 \pm 21,8$), **proteínas totais** (controle $6,3 \pm 0,1$ – DU $7,9 \pm 0,2$) e **albumina** (controle $2,6 \pm 0,1$ – DU $3,6 \pm 0,1$). A dose usual mostrou ainda

alteração nos níveis séricos de **sódio** em ambos os sexos (machos: controle $145,0 \pm 0,0$ – DU $145,0 \pm 0,4$ e fêmeas: controle $149,0 \pm 2,6$ – DU $140,0 \pm 0,4$).

As alterações bioquímicas observadas que tiveram alteração estatisticamente significativa nos machos durante o tratamento crônico com a dose **42 mg/kg** (3 DU) do EHB foram: **amilase** (controle $415,3 \pm 37,1$ – 3 DU $525,0 \pm 17,3$), **proteínas totais** (controle $6,3 \pm 0,1$ – 3 DU $7,5 \pm 0,1$), **albumina** (controle $2,6 \pm 0,1$ – 3 DU $3,5 \pm 0,1$) e **colesterol** (controle $54,7 \pm 1,4$ – 3 DU $76,3 \pm 4,0$). Em ambos os sexos os parâmetros que apresentaram alterações significativas nesta dose foram: **uréia** (machos: controle $47,3 \pm 1,8$ – 3 DU $61,0 \pm 1,8$ e fêmeas: controle $42,3 \pm 2,6$ – 3 DU $61,0 \pm 2,3$) e **sódio** (machos: controle $150,0 \pm 0,0$ – 3 DU $143,3 \pm 1,1$ e fêmeas: controle $149,0 \pm 2,6$ – 3 DU $139,3 \pm 1,5$). As fêmeas mostraram ainda uma redução significativa nos níveis de **potássio** (controle: $6,8 \pm 0,3$ e 3 DU: $6,0 \pm 0,1$).

Com relação ao tratamento com a dose **126 mg/kg** (9 DU) foi observada uma diminuição dos níveis séricos de **triglicerídios** (controle: $158,0 \pm 37,0$ e 9 DU: $56,0 \pm 9,3$) nas fêmeas e redução dos níveis de sódio tanto em machos (controle: $150,0 \pm 0,0$ – 9 DU: $141,3 \pm 0,2$) quanto nas fêmeas (controle: $149,0 \pm 2,6$ – 9 DU: $141,0 \pm 1,0$). Todos estes dados estão assinalados na Tabela 13 e foram comparados com valores padronizados previamente por Diniz, 2000.

Tabela 13: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* Swartz durante o ensaio de toxicidade crônica.

Grupos	Fosfatase Alcalina (U/L)	CK (U/L)	LDH (U/dL)	Amilase (U/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)	Magnésio (mEq/L)
Machos								
DINIZ, 2000	100,0 – 131,0	-	-	-	5,1 – 6,8	3,1 – 3,5	2,3 – 2,9	1,7 – 2,2
Controle	176,7 ± 39,2	4582,0 ± 1305,0	1080,0 ± 34,8	415,3 ± 37,1	6,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1
14 mg/kg	167,3 ± 6,8	2540,0 ± 794,7	1659,0 ± 149,9*	630,7 ± 21,8*	7,9 ± 0,2*	3,6 ± 0,1*	4,3 ± 0,1	2,9 ± 0,1
42 mg/kg	177,7 ± 19,3	2016,0 ± 326,3	1233,0 ± 90,1	525,0 ± 17,3*	7,5 ± 0,1*	3,5 ± 0,1*	3,9 ± 0,0	3,1 ± 0,1
126 mg/kg	127,0 ± 13,4	5682,0 ± 1546,0	1282,0 ± 234,4	411,3 ± 25,1	6,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1	-
Fêmeas								
DINIZ, 2000	57,0 – 101,0	-	-	-	5,5 – 6,9	3,1 – 3,5	2,3 – 3,0	1,7 – 2,3
Controle	109,0 ± 4,7	3150,0 ± 555,2	668,3 ± 88,5	381,3 ± 40,3	7,0 ± 0,3	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,2	2,7 ± 0,1
14 mg/kg	79,7 ± 7,8	3657,0 ± 435,0	937,3 ± 64,5	348,3 ± 16,5	7,2 ± 0,2	3,3 ± 0,0	3,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1
42 mg/kg	108,0 ± 5,7	4229,0 ± 810,2	1457,0 ± 95,0*	296,7 ± 24,3	7,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2	2,7 ± 0,2
126 mg/kg	102,7 ± 30,5	3842,0 ± 86,1	843,0 ± 57,8	365,3 ± 25,6	6,7 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2	-

Os valores expressam a média ± e.p.m. (n=6). *p < 0,05 (ANOVA seguido de Teste de Dunnet).

Tabela 13: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* Swartz durante o ensaio de toxicidade crônica (continuação).

Grupos	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídios (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Machos								
DINIZ, 2000	76,0 – 98,0	51,0 – 61,0	0,4 – 0,6	44,0 – 60,0	61,0 – 115,0	0,9 – 1,3	67,0 – 89,0	37,0 – 59,0
Controle	138,7 ± 13,1	47,3 ± 1,8	0,7 ± 0,0	54,7 ± 1,4	97,0 ± 17,2	1,3 ± 0,1	167,7 ± 1,8	70,3 ± 6,8
14 mg/kg	154,3 ± 12,6	48,3 ± 2,2	0,8 ± 0,0	83,0 ± 0,7*	179,0 ± 17,4*	1,4 ± 0,0	166,7 ± 17,0	70,3 ± 2,2
42 mg/kg	159,3 ± 6,5	61,0 ± 1,8*	0,7 ± 0,0	76,3 ± 4,0*	107,3 ± 12,7	1,4 ± 0,0	153,3 ± 11,1	71,3 ± 1,5
126 mg/kg	132,0 ± 6,2	41,0 ± 0,6	0,6 ± 0,0	61,7 ± 1,5	84,7 ± 13,1	1,2 ± 0,0	132,3 ± 12,4	57,7 ± 0,6
Fêmeas								
DINIZ, 2000	78,0 – 100,0	52,0 – 62,0	0,4 – 0,6	37,0 – 53,0	83,0 – 105,0	1,2 – 1,6	76,0 – 100,0	45,0 – 61,0
Controle	122,0 ± 5,3	42,3 ± 2,6	0,8 ± 0,0	80,0 ± 12,0	148,3 ± 31,0	1,3 ± 0,1	157,7 ± 5,5	67,3 ± 7,2
14 mg/kg	127,0 ± 3,5	50,3 ± 0,6	0,8 ± 0,0	73,0 ± 2,6	128,3 ± 4,7	1,0 ± 0,1	156,7 ± 11,5	59,3 ± 5,5
42 mg/kg	145,0 ± 5,0	61,0 ± 2,3*	0,6 ± 0,1	76,7 ± 5,1	126,0 ± 19,1	1,6 ± 0,0	170,3 ± 13,2	73,0 ± 1,6
126 mg/kg	115,7 ± 9,7	38,0 ± 4,1	0,7 ± 0,0	72,7 ± 5,5	56,0 ± 9,3*	1,2 ± 0,1	160,0 ± 19,5	68,0 ± 6,8

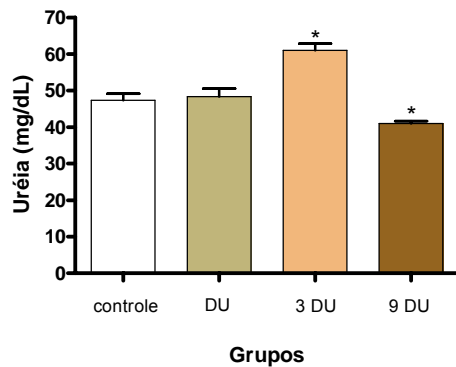
Os valores expressam a média ± e.p.m. (n=6). *p < 0,05 (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

Tabela 13: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* durante o ensaio de toxicidade crônica (continuação).

Grupos	Sódio (mEq/L)	Potássio (mEq/L)
Machos		
MELO, 2005	148,3 ± 9,8	5,0 ± 0,1
Controle	150,0 ± 0,0	6,9 ± 0,2
14 mg/kg	145,0 ± 0,4*	6,7 ± 0,1
42 mg/kg	143,3 ± 1,1*	6,4 ± 0,3
126 mg/kg	141,3 ± 0,2*	6,3 ± 0,1
Fêmeas		
MELO, 2005	140,4 ± 2,1	4,8 ± 0,4
Controle	149,0 ± 2,6	6,8 ± 0,3
14 mg/kg	140,0 ± 0,4*	6,5 ± 0,1
42 mg/kg	139,3 ± 1,5*	6,0 ± 0,1*
126 mg/kg	141,0 ± 1,0*	6,2 ± 0,2

Os valores expressam a média ± e.p.m. (n=6). *p < 0,05 (ANOVA seguido do teste de Dunnet).

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

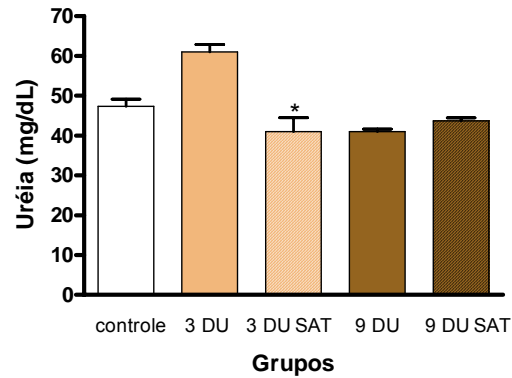
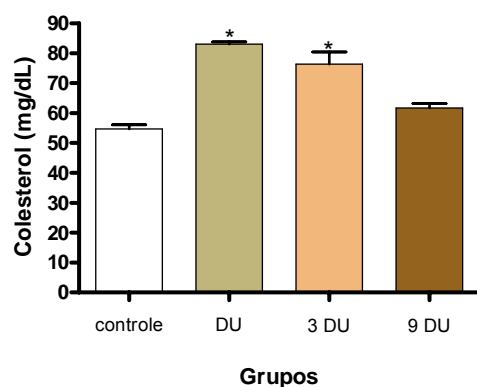


Gráfico 37: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de uréia no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

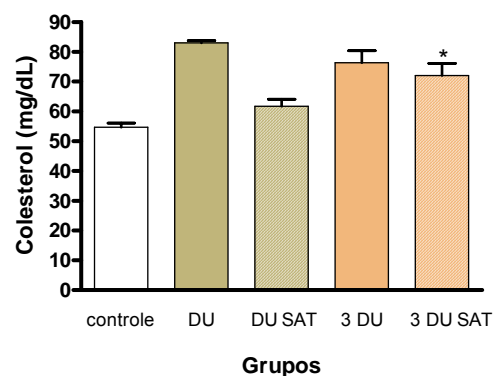
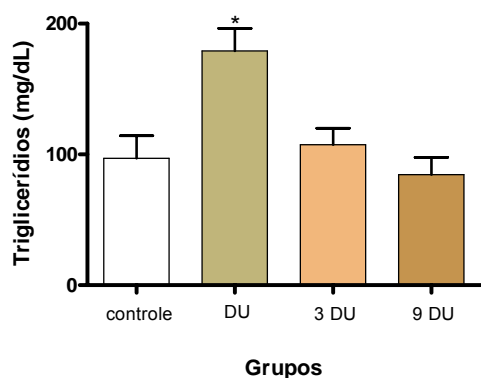


Gráfico 38: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de colesterol no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

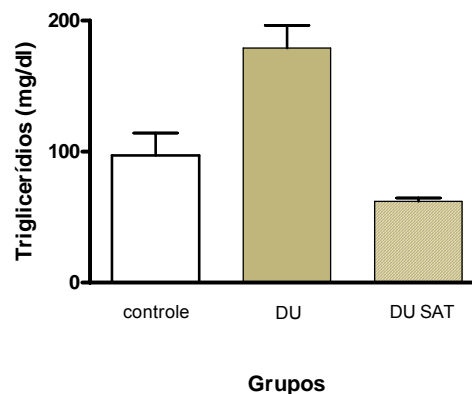
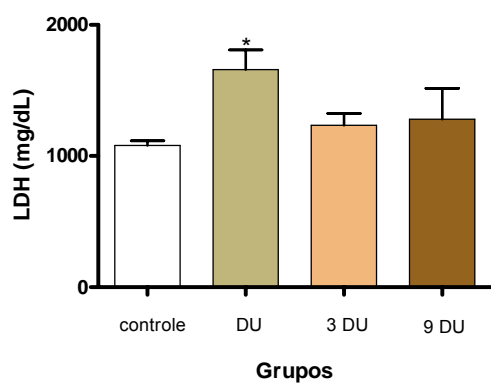


Gráfico 39: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de triglicerídios no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

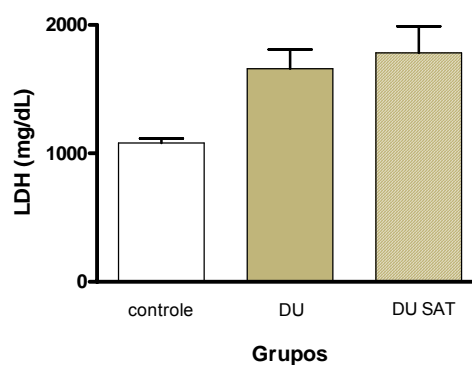
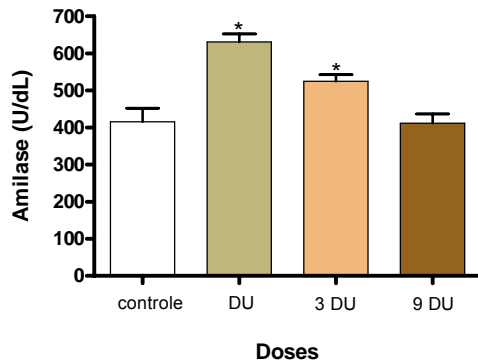


Gráfico 40: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de LDH no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

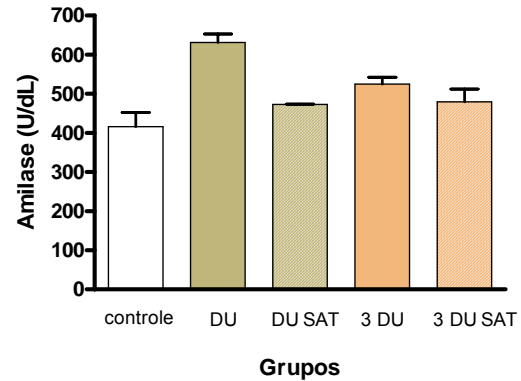
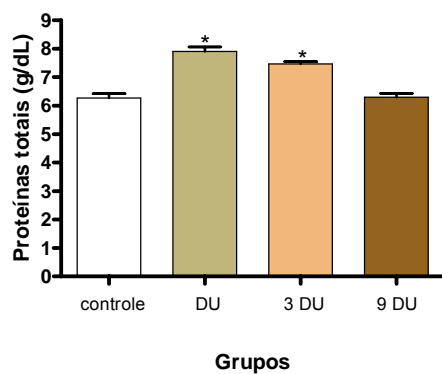


Gráfico 41: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de amilase no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

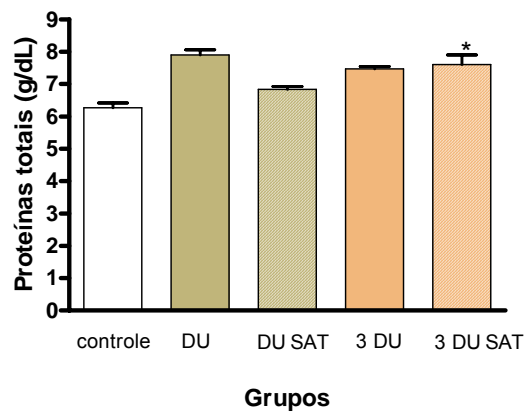
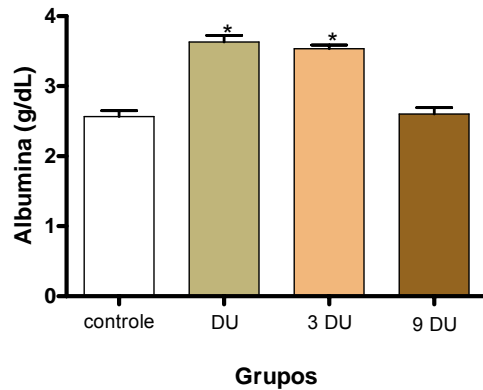


Gráfico 42: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de proteínas totais no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

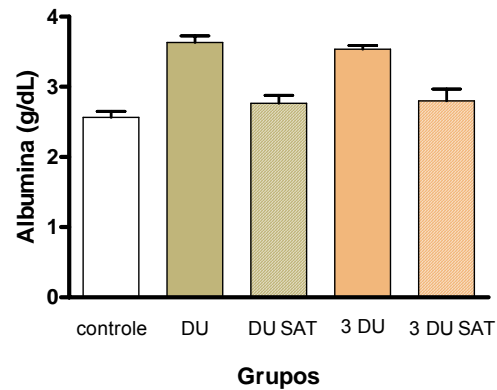
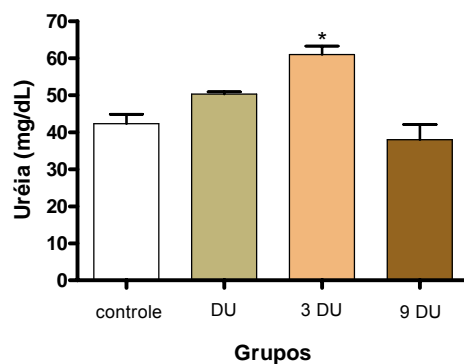


Gráfico 43: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de albumina no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

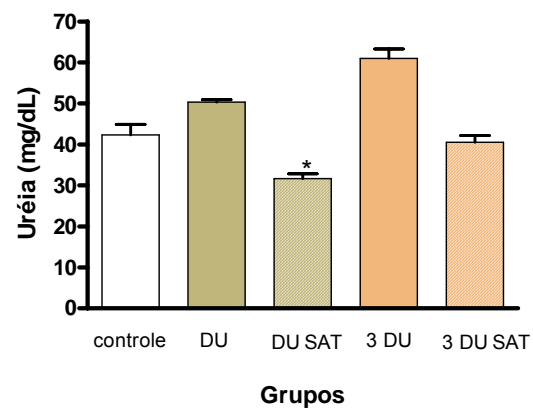
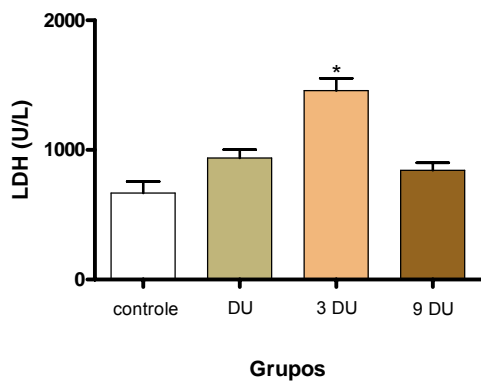


Gráfico 44: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de uréia no soro de **ratos** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

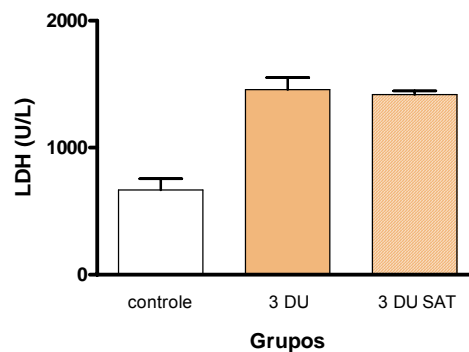
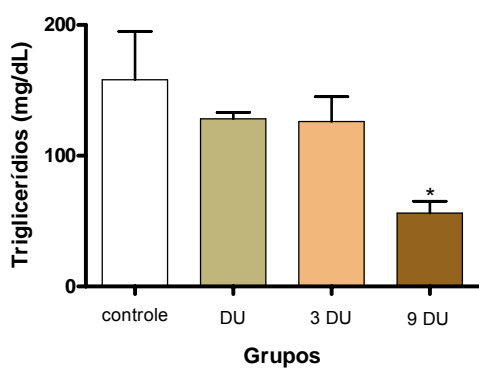


Gráfico 45: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de LDH no soro de **ratas** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

A) tratamento crônico



B) grupos satélites (SAT)

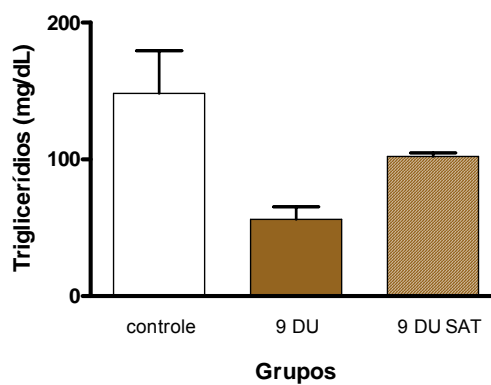


Gráfico 46: A) Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre os níveis de triglicerídios no soro de **ratas** B) grupos satélites. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet. *p < 0,05.

3.4.6.2 Parâmetros hematológicos

No que diz respeito aos parâmetros hematológicos (Tabela 14) não foram observadas alterações significativas nas fêmeas, exceto nos linfócitos na maior dose utilizada que alterou para menos ($66,3 \pm 2,0$) em relação ao controle ($77,0 \pm 2,6$).

A Tabela 14 mostra ainda as alterações estatisticamente significantes que ocorreram em alguns parâmetros nos machos. Houve redução nas hemácias na maior dose usada, a hemoglobina oscilou para menos na DU e na maior dose e para mais na dose intermediária. Houve redução no hematócrito (DU e 9 X DU). Em todas as doses utilizadas houve redução do VCM. Diminuição do HCM (dose usual). Aumento CHCM (9 X dose usual), aumento de neutrófilos (9 X dose usual) e redução de linfócitos na dose de 126 mg/kg.

Tabela 14: Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHB de *C. spicatus* durante o ensaio de toxicidade crônica.

Machos

	(DINIZ, 2000)	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	6,9 - 9,1	9,0 \pm 0,0	9,1 \pm 0,1	9,2 \pm 0,1	8,2 \pm 0,2*
Hemoglobina (g/dL)	14,0 - 15,0	16,1 \pm 0,0	15,6 \pm 0,0*	16,4 \pm 0,1*	14,7 \pm 0,1*
Hematócrito (%)	39,0 - 43,0	51,1 \pm 0,5	48,3 \pm 0,1*	51,1 \pm 0,9	44,1 \pm 0,7*
VCM (μ^3)	52,0 - 56,0	57,2 \pm 0,4	53,3 \pm 0,3*	55,5 \pm 0,3	53,8 \pm 0,3
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	18,0 - 20,0	18,0 \pm 0,1	17,3 \pm 0,1*	17,9 \pm 0,2	17,9 \pm 0,3
CHCM (%)	35,0 - 37,0	31,4 \pm 0,3	32,4 \pm 0,1	32,2 \pm 0,3	34,0 \pm 0,4*
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,8 - 10,0	7,6 \pm 1,4	5,6 \pm 0,4	3,9 \pm 0,2	7,2 \pm 2,2
Neutrófilos (%)	13,0 - 27,0	21,7 \pm 0,8	23,7 \pm 2,4	17,7 \pm 1,5	30,0 \pm 2,2*
Linfócitos (%)	71,0 - 84,0	72,0 \pm 1,3	69,7 \pm 2,0	76,0 \pm 2,0	60,3 \pm 1,4*
Monócitos (%)	0,0 - 4,0	5,3 \pm 1,5	5,3 \pm 1,1	5,0 \pm 1,0	8,0 \pm 1,3
Eosinófilos (%)	0,0 - 4,0	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,4
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	-	972,3 \pm 27,8	953,7 \pm 12,8	914,7 \pm 74,0	942,0 \pm 60,1

Os valores expressam a média \pm e.p.m. (n=6). *p < 0,05 (ANOVA seguido de Teste de Dunnet).

Tabela 14: Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos tratados com diferentes doses do EHA de *C. spicatus* durante o ensaio de toxicidade crônica (continuação).

Fêmeas

	(DINIZ, 2000)	Controle	14 mg/kg	42 mg/kg	126 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	6,5 - 8,4	7,5 ± 0,1	7,7 ± 0,3	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	12,0 - 15,0	14,7 ± 0,1	15,2 ± 0,5	15,1 ± 0,3	14,8 ± 0,2
Hematócrito (%)	33,0 - 42,0	43,6 ± 0,9	45,1 ± 1,8	45,1 ± 1,1	42,6 ± 0,4
VCM (μ^3)	50,0 - 52,0	59,0 ± 1,2	58,7 ± 0,2	57,1 ± 0,6	55,7 ± 1,3
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	18,0 - 19,0	19,9 ± 0,1	19,8 ± 0,3	19,1 ± 0,1	19,3 ± 0,3
CHCM (%)	35,0 - 37,0	33,8 ± 0,4	33,7 ± 0,4	33,6 ± 0,1	34,7 ± 0,5
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,2 - 11,0	4,7 ± 0,7	3,8 ± 0,3	4,9 ± 0,2	6,0 ± 0,6
Neutrófilos (%)	17,0 - 28,0	17,3 ± 2,3	23,3 ± 2,4	18,3 ± 1,4	27,0 ± 3,2*
Linfócitos (%)	65,0 - 78,0	77,0 ± 2,6	70,0 ± 1,6*	75,3 ± 1,3	66,3 ± 2,0*
Monócitos (%)	0,0 - 4,0	4,0 ± 0,4	5,0 ± 0,7	5,0 ± 0,7	5,7 ± 1,4
Eosinófilos (%)	0,0 - 2,0	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,4	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,0
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	-	768,3 ± 45,2	714,0 ± 64,5	891,7 ± 30,8	784,0 ± 131,8

Os valores expressam a média ± e.p.m. (n=6). *p < 0,05 (ANOVA seguido de Teste de Dunnet).

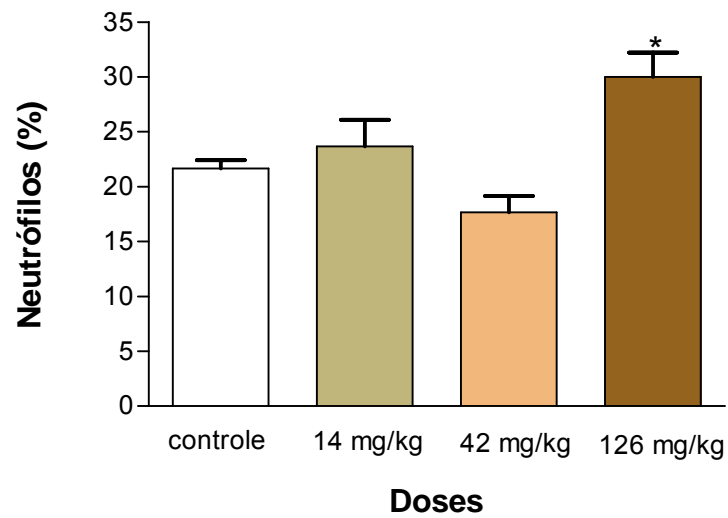


Gráfico 47: Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre neutrófilos de **ratos**. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

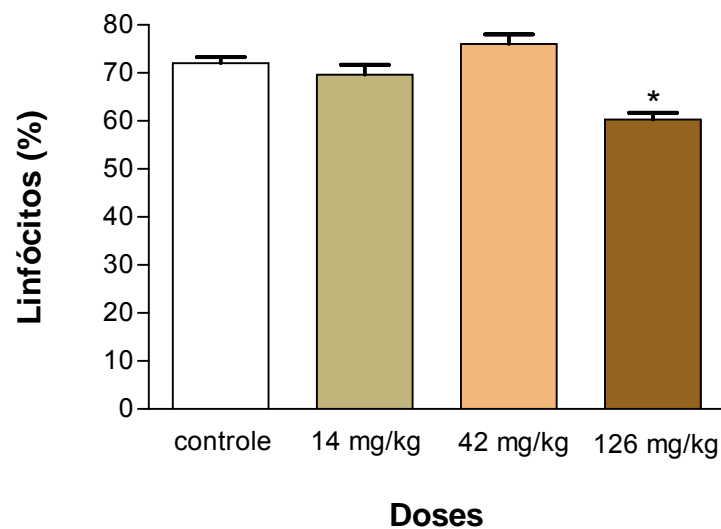


Gráfico 48: Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre linfócitos de **ratos**. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

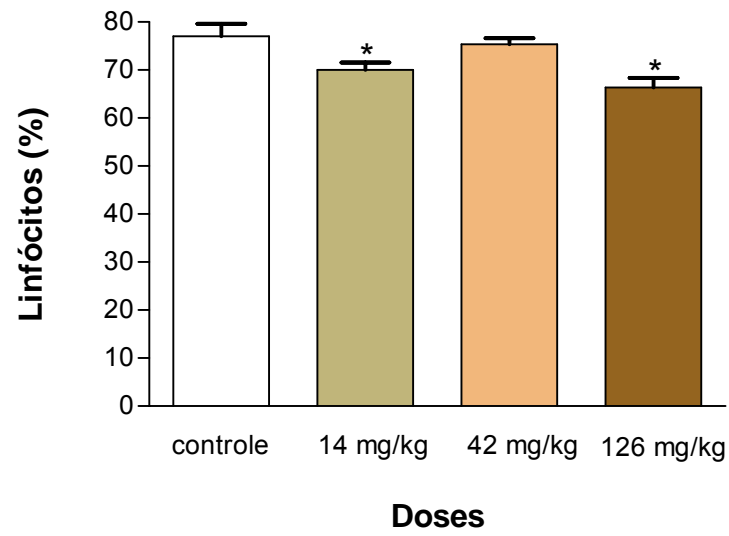


Gráfico 49: Efeito da administração de diferentes doses do EHB de *C. spicatus* sobre linfócitos de ratas. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnet.*p < 0,05.

3.4.7 Estudo anatomopatológico

No teste de toxicidade crônica, o estudo histológico incluiu animais de ambos os sexos, submetidos à dose de 126 mg/kg do EHB das folhas de *C. spicatus*. Avaliaram-se o coração, pulmão, fígado e rins de todos esses animais. Do ponto de vista macroscópico, os órgãos não apresentaram alterações anatômicas. Na avaliação microscópica, o coração e rins encontravam-se dentro dos limites da normalidade histológica. No fígado e pulmões evidenciaram-se alterações pouco significativas, contudo constantes em todos os animais estudados. As alterações hepáticas caracterizaram-se pelo aparecimento de discreta degeneração hidrópica, com distribuição aleatória no parênquima (Figura 8 A e B) e pela presença de pequenos e isolados focos de necrose hepatocelular (Figura 9 A), para os quais ocorreu migração de linfócitos pouco numerosos. Ainda no parênquima, ao nível da zona 3 (região perivenular), dilatação sinusoidal estava associada à hiperplasia de células de Küpffer, ambas em grau leve (Figura 9 B). Ademais, nos animais machos observou-se a ocorrência de discreta fibrose perissinusoidal, também em zona 3 (Figura 10). Os espaços portais, em geral pequenos e regularmente distribuídos, foram referencial para visualização da arquitetura histológica lobular do fígado (Figura 11 A). Entretanto, três dos seis animais analisados representaram sede de alterações mínimas, caracterizadas por portite linfocitária, sem expansão fibrosa da matriz conjuntiva (Figura.11 B).

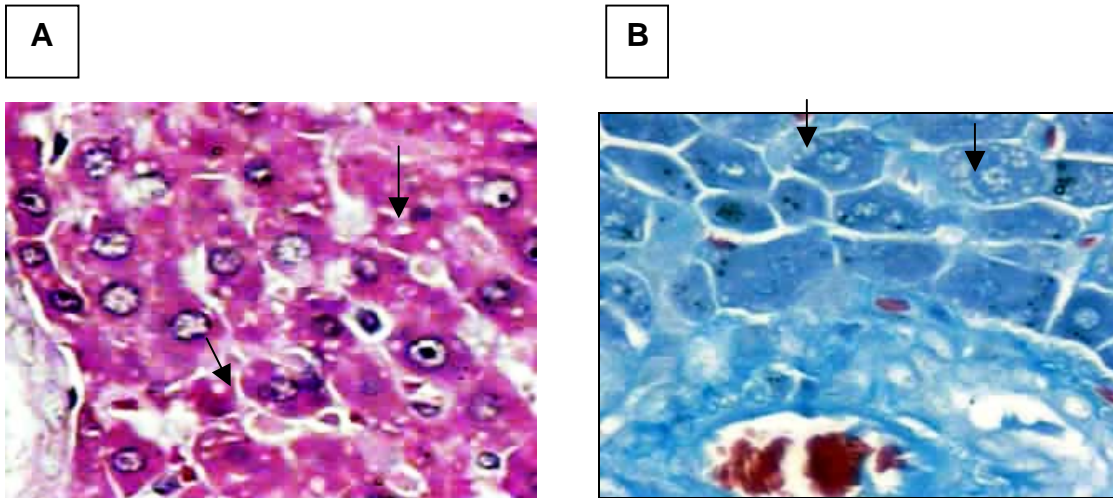


Figura 8: Cortes histológicos mostrando degeneração hidrópica hepatocelular, em discreto grau, na zona 1 (área periportal), representada por microvacúolos citoplasmáticos opticamente vazios (A: hematoxilina-eosina; B: tricrômico de Masson; X400)

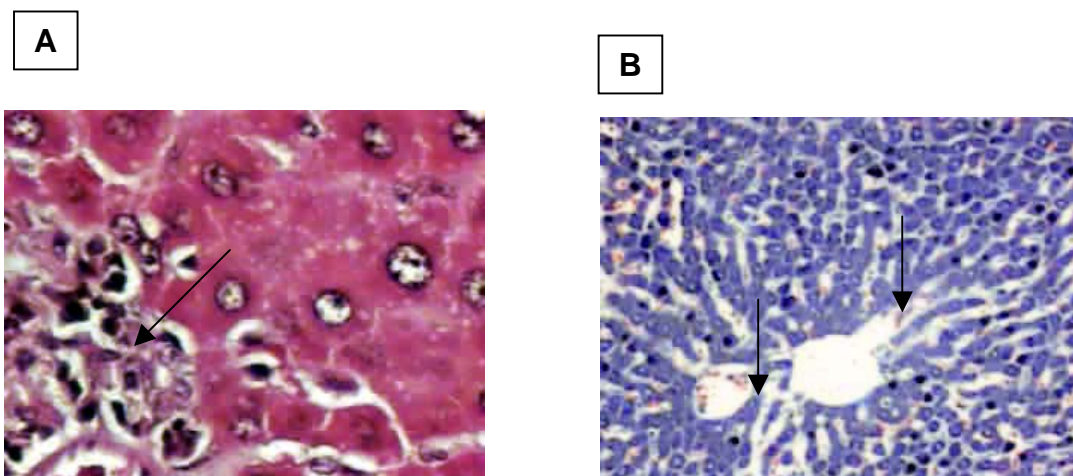


Figura 9: Cortes histológicos mostrando foco de necrose hepatocelular associado a discreto afluxo de linfócitos (A) e dilatação sinusoidal perivenular (B). (A: hematoxilina-eosina – X400; B: tricrômico de Masson – X250)

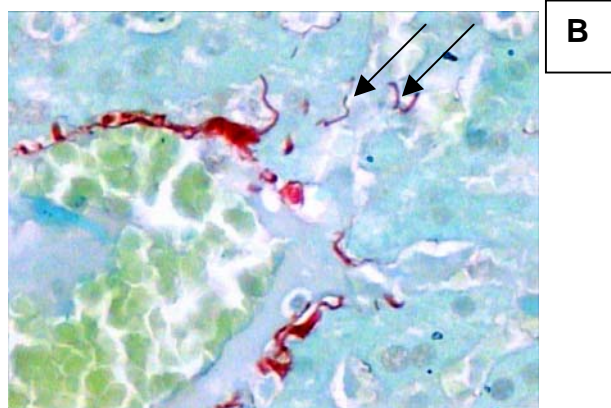
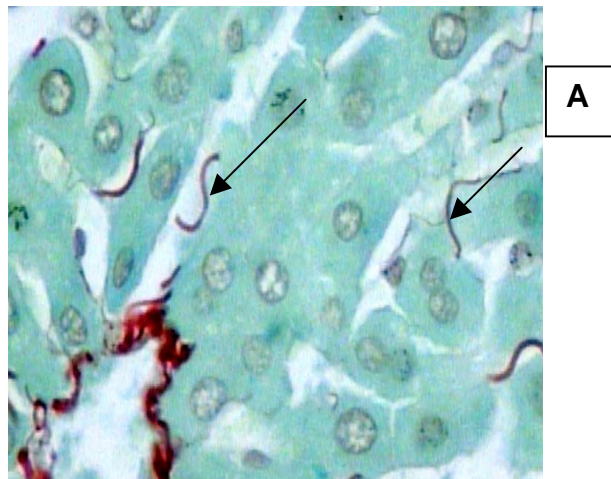


Figura 10: Cortes histológicos mostrando discreta fibrose perissinusoidal, com topografia em zona 3, observada em animais machos. Vermelho picrossirius – A: X400 ; B: X250

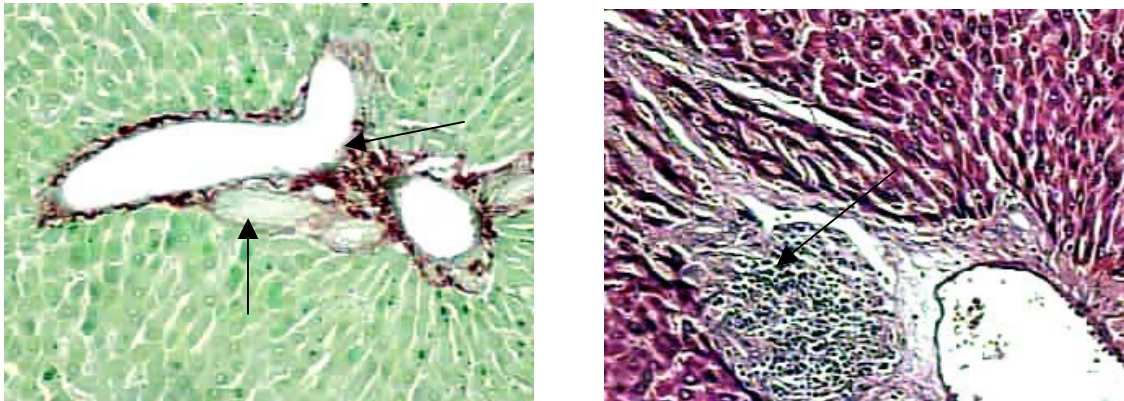


Figura 11: Cortes histológicos mostrando espaço portal com tríade vasculo-biliar inserida em matriz fibroconjuntiva não expandida (A). Portite linfocitária representada por adensamento linfóide, em animal macho. (B). A: vermelho picrossirius X100; hematoxilina-eosina X100.

O estudo histológico dos pulmões revelou arquitetura lobular parenquimatosa preservada, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. A matriz septal escassa e laxa, eventualmente comportava capilares congestos, sem haver, contudo, sinais de hemorragia recente ou antiga (Figura 12 A-B). No tecido conjuntivo peribronquial, destacou-se a presença de agregados linfóides foliculares, não encapsulados, em estreita associação com vênulas peribronquiolares e com a própria mucosa bronquiolar (Figura 13 A-B), representando evidências de estimulação do sistema imunitário BALM (Tecido Linfóide Associado a Brônquios). Finalmente, nenhum estigma de atipias celulares epiteliais ocorreu na amostra analisada.

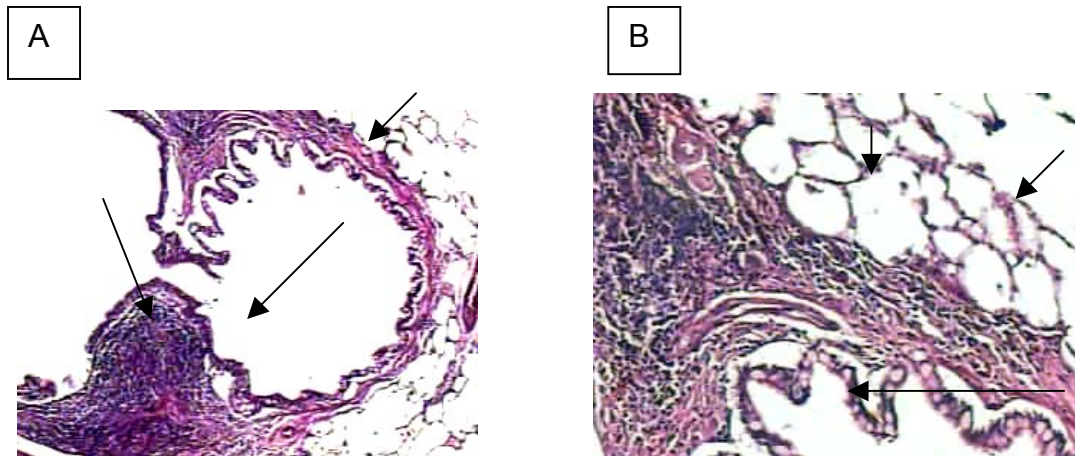


Figura 12 A-B: Cortes histológicos mostrando pulmão com arquitetura lobular preservada e rede alveolar de paredes finas (setas curtas). Bronquíolos com lumes pérvios, revestimento epitelial típico e adensamento linfóide marginal. (setas longas) Hematoxilina-eosina. A (X100); B (X250).

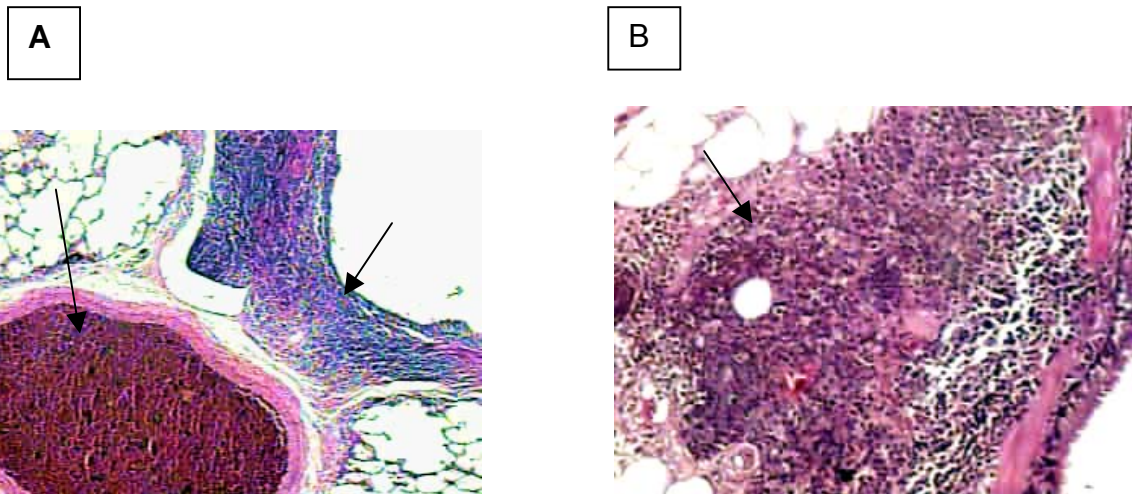


Figura 13 A-B: Cortes histológicos mostrando hiperplasia linfóide peribronquiolar (A-B: setas curtas) com congestão venular (seta longa: A). Hematoxilina-eosina X100 (A) e X250 (B).

Discussão
Discussão

4 DISCUSSÃO

Toda a história da humanidade nos revela o quanto homens e mulheres sempre se preocuparam em vencer enfermidades buscando formas de aliviar a dor e restabelecer a saúde. Nesse sentido é notória a utilização dos produtos naturais especialmente onde condições sócio-econômicas são precárias, notadamente, nos rincões do Nordeste brasileiro onde o uso de plantas na cura das doenças ainda é uma realidade.

A despeito da grande importância de produtos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados, no que concerne a toxicologia tendo em vista a ampla diversidade de espécies vegetais largamente utilizadas no nosso país.

Os testes em animais são realizados anteriormente aos testes clínicos como forma de tentar prevenir efeitos adversos ao homem (BARROS e DAVINO, 2003).

Ponderando-se sobre a relevância destes aspectos é que propomos realizar um estudo que teve por objetivo a investigação da toxicidade pré-clínica aguda e crônica das folhas de *C. spicatus* coletadas no horto de plantas medicinais do LTF/UFPB, onde a planta é cultivada.

Após a obtenção do extrato hidroalcoólico, realizou-se a triagem fitoquímica. Esta triagem consiste em uma análise química para detectar presença ou a ausência de metabólitos secundários utilizando reagentes de coloração ou precipitação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985; AGRA e BARBOSA FILHO, 1990).

A análise fitoquímica do EHB das folhas de *C. spicatus* vai de encontro a estudos de espécies do mesmo gênero anteriormente realizados que evidenciaram a existência de flavonóides, taninos e saponinas (SILVA et al, 2000). A triagem revelou

a presença de esteróides com uma reação moderadamente positiva (++) , taninos com uma reação fracamente positiva (+) e na fluorescência dos flavonóides uma reação moderadamente positiva (++) .

Para realização deste trabalho foram feitas algumas preparações com folhas frescas e secas a fim de se determinar a dose usualmente utilizada pela população, dentre as preparações com folhas frescas, destaque para a alcoolatura que de acordo com Prista (1990) é uma forma farmacêutica que resulta da ação dissolvente e extrativa do álcool sobre as drogas vegetais. No entanto, ficou estabelecido que as doses **14 mg/Kg/dia (dose de uso popular)**, **42 mg/Kg/dia (3 X a dose de uso popular)** e **126 mg/Kg/dia (9 X a dose de uso popular)**, seriam utilizadas na investigação da toxicidade crônica do EHB de *C. spicatus* em ratos as quais foram determinadas a partir do infuso de folhas secas, cuja concentração dos princípios ativos se fez mais presente que na alcoolatura e também contemplando a forma de como a planta é utilizada pela população.

O estudo foi iniciado com a triagem toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* L, que teve como finalidade direcionar os estudos toxicológicos subseqüentes em ratos.

Artemia salina L. é um microcrustáceo amplamente utilizado como indicador de toxicidade em um bioensaio que utiliza a CL₅₀ (Concentração letal 50%) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (NÓBREGA, 2005). O valor médio da CL₅₀ determinado no teste para a espécie *C. spicatus* foi 294,70 µg/mL, desta forma, segundo o método utilizado, constatou-se que a espécie em estudo é considerada de baixa toxicidade. Para CL₅₀ menor que 1000 µg/mL, as espécies são relacionadas com baixa toxicidade (MCLAUGHIN e ROGERS, 1998; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; SILVA et al., 2007).

O ensaio farmacológico pré-clínico agudo consiste em uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, o que permite obter informações acerca dos riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida, servindo como base para a pesquisa crônica (BRITO, 1994).

Estudo realizado em ratos com o EHB das folhas de *C. spicatus* no ensaio para a investigação da dose letal 50 % (DL50), demonstrou que o EHB não induziu a morte de nenhum animal, quando estes foram submetidos à dose máxima de 2 g/kg por via oral, sugerindo que a espécie *C. spicatus* apresenta baixa toxicidade (VASCONCELOS, 2004).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado a partir do EHB das folhas de *C. spicatus*, em ratos submetidos à dose de 2 g/kg (equivalente a cerca de 143 vezes a dose de uso popular).

A triagem farmacológica descrito por Almeida et al. (1999) apresenta uma metodologia simples para “screening” de extratos, substâncias, dentre outros produtos de origem vegetal com possíveis atividades no Sistema Nervoso Central, avaliando-se através de uma variedade de comportamentos pré-estabelecidos, os quais são ressaltados presumivelmente em qualquer Laboratório de Farmacologia Experimental, que correspondem a atividades estimulantes e depressoras em nível de SNC e ações sobre o Sistema Nervoso Autônomo. Na observação dos parâmetros descritos no protocolo não foi evidenciada nenhuma alteração em ambos os sexos no período de tempo avaliado.

O consumo de água e ração foi avaliado diariamente durante o tratamento agudo com o extrato e o peso corporal dos animais foi observado no 1º dia e no 14º dia, não sendo visualizadas alterações significantes em animais de ambos os sexos.

Na análise laboratorial do sangue, realizada após o término do tratamento agudo, foram verificadas algumas alterações hematológicas e bioquímicas que tiveram significância estatística. Com relação aos parâmetros hematológicos foram observados: aumento no volume corpuscular médio (VCM) e na hemoglobina corpuscular média (HCM) em ambos os sexos e redução da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) somente apresentada nos machos. Abalizados em comparações com a literatura é possível perceber que as alterações, em sua maioria, estão dentro da faixa de variabilidade estabelecida anteriormente por Diniz, 2000. Além do mais não foi visualizada a presença de anemia nos animais (ambos os sexos) investigados visto os valores do hematócrito e a concentração de hemoglobina se encontrar dentro de parâmetros pré-estabelecidos. É importante ressaltar que a caracterização semiológica de qualquer anemia exige o conhecimento de dados hematológicos, como por exemplo, o valor globular ou grau de coloração eritrocitária e o tamanho das hemácias (GORINA, 1984; MILLER, 1999). Isto sugere que apesar dos dados serem validados do ponto de vista estatístico, tais alterações não possuem relevância clínica.

A diminuição de leucócitos observada em fêmeas quando do tratamento com 2 g/kg de EHB foi bastante significativa. Convém lembrar que a dose em questão é bastante elevada e representa uma exposição que não é vista no cotidiano das pessoas que fazem uso desta planta. A ingestão de algumas substâncias, por exemplo, benzeno, metais pesados, fenilbutazona, sulfamidas, cloranfenicol, antibióticos β -lactâmicos, antivirais entre outros podem induzir uma leucopenia tóxica (GORINA, 1984; MILLER, 1999; SILVA, 2006). Uma série de estudos realizados em ratos tem demonstrado que as fêmeas são mais sensíveis às drogas que os machos, esta variação parece resultar de diferenças hormonais. Os

hormônios femininos inibem o sistema enzimático microssomal aumentando a sensibilidade das fêmeas às drogas (MELLO, 2002).

Nos parâmetros bioquímicos foram registrados aumento nos níveis de potássio, magnésio, colesterol total, fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina e redução nos níveis de uréia e creatinina em ambos os sexos. A gravidade clínica da hipercalemia relaciona-se com o risco de parada cardíaca ou fibrilação ventricular quando os níveis se aproximam de 9-10 mEq/L (GORINA, 1984). Porém, nada foi verificado, na prática, que correspondesse a tal quadro.

Classicamente utilizada como parâmetro de avaliação da função renal a uréia vem sendo aos poucos substituída pela dosagem da creatinina para essa finalidade. Entretanto, o encontro dos níveis séricos elevados de uréia ainda levantam em primeiro lugar a hipótese de insuficiência renal. O tratamento agudo com EHB na dose de 2 g/kg foi capaz baixar concentrações sangüíneas de ambos os parâmetros.

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em praticamente todos os tecidos corporais ocorrendo em níveis particularmente elevados no epitélio intestinal, túbulos renais, ossos, leucócitos, fígado e placenta. Elevações leves ou moderadas são observadas em muitos pacientes com distúrbios parenquimatosos hepáticos, tais como hepatite e cirrose, tendo sido relatados aumentos transitórios em praticamente todos os tipos de hepatopatias (MILLER, 1999; MILLER, 2002). Por se tratar de uma exposição em curto prazo e numa dose elevada (2 g/kg) é necessário uma investigação a longo prazo a fim de se constatar se estas mudanças perdurarão. A princípio pode-se inferir que as alterações verificadas promovidas pelo extrato, apesar de estatisticamente significativas, parecem ter relação com a alta dose administrada, respaldando o axioma da toxicologia que “a dose faz o veneno”.

As alterações que ocorreram apenas em machos foram a elevação dos níveis séricos de triglicerídios e diminuição do ácido úrico.

Espécies do gênero *Costus* são relatadas na literatura como potenciais redutores de cálculos renais (ARAÚJO VIEL et al., 1999). É importante ressaltar neste aspecto o mecanismo de formação de cálculos renais. Existem quatro tipos principais: a maior parte dos cálculos, de 75 a 80% contém cálcio, representado essencialmente por oxalato de cálcio. Outros 15% constituídos por fosfato de magnésio e amônia (são chamados cálculos de estruvita), 6% são cálculos de ácido úrico e 1 a 2% são formados por cistina (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996; SAMPAIO; RODRIGUES; FAVORITO 2001; ATMANI et al., 2004). É digno de nota o fato de o EHB das folhas de *C. spicatus* reduzir níveis séricos de ácido úrico em animais tratados a curto prazo.

Ainda tratando do ensaio agudo, outros parâmetros que ocupam significância estatística nos animais de ambos os sexos estão proteínas totais e albumina. Os níveis séricos destes dois parâmetros estão elevados em relação ao controle embora não ultrapassem muito os valores descritos previamente por Diniz, 2000 para os animais roedores do LTF/UFPB.

Os níveis da aspartato transaminase mostraram-se acima do normal nas fêmeas quando comparados ao grupo controle e a limites pré-estabelecidos. O fato de o extrato elevar os níveis séricos destas enzimas não significa dizer que o mesmo apresenta-se como um agente tóxico, uma vez que existem na terapêutica medicamentosa vários fármacos que apresentam uma larga incidência de efeitos colaterais desta natureza, a exemplo do que ocorre com os agentes antiinflamatórios não esteroidais. Inúmeros trabalhos têm relatado aumento significativo das transaminases em pacientes que utilizam tais medicamentos. O diclofenaco

demonstra uma reação adversa comum que é uma mudança na função hepática em nível destas enzimas (podendo afetar entre 1 a 10 pessoas a cada 100). Há elevação sérica de transaminases (AST e ALT) com o uso de aspirina e evidências epidemiológicas sugerem que o AAS tem um papel potencializador na patogênese da lesão hepática. O paracetamol pode determinar injúria hepática grave com concentrações plasmáticas da droga acima de 300 µg/mL, tornando evidente que disfunção hepática pode ser traduzida pelo aumento das taxas dessas enzimas (ARAUJO LIMA et al., 2001; KRAYCHETE, 2002; CARVALHO, 2006).

Deve-se ressaltar que o fígado é o órgão responsável pela formação de albumina. Extenso dano hepatocelular pode diminuir o nível sérico de albumina, já que a síntese dessa fração protéica se dá exclusivamente na célula hepática. Em condições normais, o fígado é pouco importante à síntese das proteínas plasmáticas, contudo, nas hepatopatias crônicas os histiócitos que convergem ao fígado aumentam a capacidade de síntese dessas proteínas por esse órgão (GORINA, 1984; MILLER, 1999; MILLER, 2002).

As alterações hematológicas discutidas anteriormente e as alterações bioquímicas, que poderiam ser compreendidas como efeitos tóxicos do extrato foram a elevação dos níveis de colesterol total, triglicerídios, aumento de AST, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina e potássio. Apesar disso, estes resultados, embora de significado estatístico, parecem não ter importância clínica considerando-se que a dose administrada foi 2 g/kg, ou seja, a dose que corresponde a cerca de 140 vezes a de uso popular preconizada por Vasconcelos (2004).

Portanto, os resultados da avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos durante a avaliação aguda parecem retratar indícios de toxicidade hepática na alta dose utilizada.

Uma vez concluídos os ensaios toxicológicos agudos com o EHB das folhas de *C. spicatus* partimos então à realização de um estudo de toxicidade crônica cujo objetivo principal é assinalar os aspectos toxicológicos de uma determinada substância administrada repetidamente e em dosagens diferentes a uma espécie de mamífero por um período longo de tempo (BRITO, 1994; SIPES; DART; FISCHER, 2006).

Ensaio toxicológicos pré-clínicos crônicos foram realizados em ratos de ambos os sexos utilizando-se o EHB das folhas de *C. spicatus*, administrado por via oral, em diferentes doses: dose de uso popular (14 mg/kg), 3 X a dose de uso popular (42 mg/kg) e 9 X a dose de uso popular (126 mg/kg). O ensaio foi conduzido por um período de 90 dias e parâmetros como temperatura corporal, glicemia, consumo de água e ração, evolução ponderal, avaliação comportamental, parâmetros hematológicos e bioquímicos e estudo histológico foram avaliados.

A temperatura apresentou-se normal durante todo o ensaio, variando de 36,5 - 38,1 °C para os machos e 37,1 - 38,9 °C para as fêmeas, podendo mostrar que a relação metabolismo/regulação conservou-se preservada durante a administração prolongada do extrato da planta.

Com relação à aferição da glicemia quinzenal no estudo crônico, foi observado que os animais, de ambos os sexos, não apresentaram alterações estatisticamente significativas em nível glicêmico.

Os efeitos da administração crônica sobre o consumo de água e alimentos mostraram alterações significativas em ambos os sexos. Com relação ao consumo de água, as fêmeas apresentaram uma redução no consumo na 7^a (42 mg/kg) e aumento nas 3^a, 5^a, 6^a e 9^a semanas (126 mg/kg). Na 13^a semana de tratamento ocorreu elevação no consumo de água nas doses 14 mg/kg e 126 mg/kg.

Os machos demonstraram aumento significativo apenas durante a 5ª semana nas doses de 14 mg/kg e 42 mg/kg, seguido de redução do consumo da 10ª a 13ª semana na maior dose utilizada. As fêmeas aumentaram o consumo de ração na 2ª semana na maior dose utilizada. As fêmeas aumentaram o consumo de ração na 2ª semana (14 mg/kg) e na 5ª, 6ª, 8ª, 9ª e 13ª semanas (126 mg/kg). Os machos também apresentaram aumento no consumo de alimento na 5ª semana nas três doses usadas e na 7ª e 8ª (126 mg/kg).

Conforme pode ser visto, os resultados são os mais diversos, ora o consumo de água aumenta, ora o consumo é diminuído. O consumo de ração apresentou-se aumentado em ambos os sexos. Não parece possível correlacionar a ingestão de água e alimento com evolução ponderal e conseqüente ação do extrato da planta. Foi observado, ainda, que ratos de ambos os sexos aumentaram de peso apenas na 2ª semana de tratamento na dose de 126 mg/kg.

O teste de campo aberto foi realizado para a avaliação de alterações comportamentais com o auxílio do aparelho de campo aberto proposto por Carlini et al. (1986), no intuito de analisar a atividade exploratória dos animais mediante sua movimentação espontânea (ambulação), o número de comportamentos de auto limpeza ("grooming"), de levantar ("rearing") e o número de bolos fecais sendo possível inferir sobre o índice de emocionalidade dos animais (Masur et al., 1971). A avaliação da interferência do EHB de *C. spicatus* sobre o comportamento emocional do animal, indicou alterações sobre o sistema nervoso central na dose de 42 mg/kg em ratos e nas doses de 14 mg/kg e 126 mg/kg em fêmeas.

O tratamento com EHB das folhas de *C. spicatus*, por via oral, apresentou resultado significativo apenas no comportamento de auto-limpeza e isto pode ser visto no decorrer do ensaio de toxicidade crônica. No que diz respeito ao tratamento

dos machos com o EHB observou-se alterações do parâmetro auto-limpeza na dose de 42 mg/kg, via oral, muito embora nenhuma alteração significativa tenha sido observada nos parâmetros de ambulação, levantar e defecação. Este efeito pode estar relacionado à presença de substâncias que promovem efeitos depressores do SNC, entretanto, nada poderia ser confirmado uma vez que não foram observadas alterações dos demais parâmetros. Todavia, no tocante a toxicidade crônica, este efeito observado isoladamente tem pouca relevância.

Nas fêmeas também apenas o parâmetro de auto-limpeza foi alterado, principalmente nas doses de 14 mg/kg e 126 mg/kg. A análise destes resultados permite sugerir que há uma influência do extrato sobre o SNC, mas nada pode ser conclusivo visto termos a considerar que os demais parâmetros permaneceram inalterados corroborando com a hipótese de que este extrato tem baixa toxicidade.

O teste no aparelho de “rota-rod” foi realizado a fim de investigar alterações motoras. Foi constatado um “deficit” no tempo de permanência apenas dos animais do sexo masculino na barra giratória, sendo bem evidente na 1ª quinzena de tratamento, a tendência à redução do desempenho dos animais no aparelho é patente durante todo o tratamento na maior dose utilizada (126 mg/kg). Substâncias que possuem potente ação depressora sobre o SNC promovem resultados positivos no teste do “rota-rod” (Carlini, 1986). A diminuição do tempo de permanência dos animais no aparelho de “rota-rod” poderia ser explicada por um efeito depressor, que foi aparente apenas na maior dose, bem como por uma possível ação neurotóxica. Independente da causa se percebe que esta alteração é transitória uma vez que não se observa nas quinzenas seguintes. Aliado aos resultados do teste de campo-aberto estas observações reforçam a hipótese de que

o EHB administrado durante 90 dias não apresenta alta toxicidade em ratos de ambos os sexos sobre o SNC.

No estudo crônico do EHB, foi realizada a análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos nos grupos tratados com as três doses e nos grupos satélites. As fêmeas apresentaram ligeira tendência a linfocitopenia nas doses 14 mg/kg e 126 mg/kg e neutrofilia na maior dose utilizada, contudo, essas alterações estão dentro de limites pré-estabelecidos (DINIZ, 2000; MARIZ, 2006). Evidenciou-se também uma tênue disposição a neutrofilia e linfocitopenia nos machos na dose 126 mg/kg. Os neutrófilos são as células de primeira linha de defesa contra infecções e nas reações inflamatórias as alterações neste tipo de leucócito são melhor percebidas. Têm ação fagocítica e, se mortos, podem provocar necrose tecidual devido a liberação de suas enzimas lisossômicas para o interstício (GUIDUGLI-NETO, 1997). A linfocitopenia pode ser causada por várias doenças e condições. A quantidade de linfócitos pode diminuir brevemente durante condições de estresse severo como infecções crônicas e durante o tratamento envolvendo drogas, por exemplo, a prednisona (MANUAL MERCK, 2006). As alterações nestes parâmetros não foram revertidas quando analisados estatisticamente o grupo satélite. Todavia, conforme dito anteriormente, as diferenças em relação ao grupo controle e dados da literatura foram sutis.

As oscilações nos parâmetros bioquímicos também ocorreram em machos e fêmeas. O estudo destes itens é importante para se verificar efeitos do EHB sobre o metabolismo destas substâncias, permitindo a interpretação de distúrbios hepáticos ou renais. Em sua maioria, as variações foram reversíveis quando do estudo estatístico dos respectivos grupos satélites.

Foram visualizados nos machos aumento no colesterol total (DU e 3 DU), triglicerídios (DU), LDH (DU), amilase (DU e 3 DU), proteínas totais (DU e 3 DU), ligeiro aumento da albumina (doses usual e intermediária) e a uréia apresentou-se aumentada na dose 42 mg/kg e reduzida na maior dose utilizada.

A elevação dos níveis de colesterol total e triglicerídios não foram observadas no grupo satélite na dose de 14 mg/kg, ou seja, houve reversibilidade total deste efeito quando da retirada do extrato (de $83,0 \pm 0,7$ para $61,7 \pm 2,4$). Ocorreu uma ligeira tendência à regressão nos níveis de colesterol no grupo satélite da dose de 42 mg/kg (de $76,3 \pm 4,0$ para $72,0 \pm 4,1$), todavia, não teve relevância estatística. Ainda fazendo referência ao colesterol foi vista uma elevação da sua taxa na maior dose utilizada mesmo após o término do tratamento, o mesmo ocorrendo com triglicerídios nas doses de 42 mg/kg e 126 mg/kg, o que pode ser devido a distúrbios metabólicos dos próprios animais.

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) exercem vários efeitos antiaterogênicos. Participam em vias metabólicas que removem o colesterol da parede arterial e também iniciam a oxidação das lipoproteínas aterogênicas (MALLOY e KANE, 2003). A função principal da HDL parece ser a remoção do excesso de colesterol livre da periferia, a condução ao fígado e a promoção da metabolização e secreção na bile, o que é conhecido como transporte reverso de colesterol (INEU et al., 2006). O tratamento com EHB promoveu um aumento substancial da HDL. Um fato que chamou atenção foi que não houve reversibilidade deste efeito quando se analisou o grupo satélite, parecendo que o EHB produz um efeito vasoprotetor pela elevação desta lipoproteína. Estudo químico realizado com as folhas de *C. spicatus* culminou com o isolamento e elucidação estrutural de flavonóides glicosídicos, tamarixetina, kaempferide, quercetina (SILVA et al., 2000).

Vários estudos têm comprovado efeitos benéficos dos flavonóides e a sua baixa toxicidade a exemplo dos que foram conduzidos com flavonóides e com flavonas como a quercetina e luteonina que demonstraram efeitos antioxidantes na prevenção de câncer e também como inibidores da formação de placas ateroscleróticas (LIMA et al., 2003). Convém salientar a presença abundante de flavonóides na espécie em estudo, conforme foi visto na triagem fitoquímica.

A amilase é uma enzima que participa da digestão de carboidratos de alto peso molecular na saliva e no estômago. Está presente em vários tecidos e órgãos, sendo mais concentrada principalmente no pâncreas, todavia a amilase do soro normal é originada, em grande parte no fígado. Sua redução pode significar tanto insuficiência pancreática, quanto dano hepático (HENRY, 1995; MILLER, 1999; MILLER, 2002). O que se observou no tratamento crônico foi um aumento em sua taxa que logo voltou aos índices normais quando analisados os grupos satélites.

Observam-se aumentos da amilase em várias condições: nas pancreatites agudas e pancreatites secundárias a hepatites virais agudas e úlcera penetrante no pâncreas. Além disso, foram descritas alterações discretas da amilase sangüínea em vários distúrbios abdominais pancreáticos: gastrite, úlcera duodenal, trombose da veia porta, dentre outras (GORINA, 1984).

A elevação das proteínas totais e albumina mostraram-se reversíveis. Apesar disso, na dosagem das proteínas totais dos grupos satélites ocorreu um discreto aumento nos grupos **3 X DU** (de $7,5 \pm 0,1$ para $7,6 \pm 0,3$) e **9 X DU** (de $6,3 \pm 0,1$ para $6,9 \pm 0,0$), no entanto esses achados parecem não ter importância clínica visto estarem muito próximos aos descritos anteriormente (MARIZ, 2006). A albumina alterou discretamente, não sendo considerado efeito tóxico relevante.

A eliminação excessiva de uréia está relacionada a desordens renais descompensação cardíaca, aumento no catabolismo protéico devido à alta ingestão de proteína, exercício intenso, queimaduras e febres, choque hemorrágico, disenteria aguda (LIMA et al., 2001). O tratamento crônico promoveu um aumento significativo da uréia na dose 42 mg/kg em ambos os sexos tendo voltado aos níveis normais quando retirou-se o tratamento. Aumentos dos níveis séricos de uréia, pode representar alteração renal, decorrente da maior necessidade de trabalho deste órgão, para eliminar grande quantidade da substância teste (DINIZ, 2004). No tocante aos rins os exames histológicos não apresentaram anormalidades.

A maioria das alterações anteriormente citadas não permanece após o período de tratamento. A reversibilidade desses efeitos é algo extremamente importante, pois além de demonstrar que os parâmetros alterados voltam ao normal após suspensão da droga, indica também a capacidade de reação do organismo que recebeu a droga (FÉRES et al., 2006).

Nos exames microscópicos, o coração e rins de ratos de ambos os sexos mostraram-se dentro dos parâmetros da normalidade, ou seja, sem particularidades histológicas.

Embora todos os tecidos tenham alguma capacidade de metabolizar drogas, o fígado é o principal órgão que exerce essa função (CORREIA, 2005). Provavelmente, devido a esse fator, o fígado é o órgão mais afetado pelos efeitos tóxicos de substâncias, mesmo que esses efeitos possam atingir todos os sistemas e órgãos (MENDES, 1988). Pôde-se observar, nas condições do presente trabalho que o EHB na dose de 126 mg/kg mostrou ação tóxica hepática, uma vez que os exames histológicos demonstraram a ocorrência de focos pequenos e isolados de hepatocitólise (necrose lobular) associados à exsudação de mononucleares, não

sendo vista atividade regenerativa celular, induzindo subversão estrutural ou arquitetural do tecido hepático. Esse achado necroinflamatório lobular associou-se à portite linfocitária, em três dos seis animais analisados, havendo ainda degeneração hidrópica hepatocelular, em zona 1 (periportal). A degeneração hidrópica é referida como lesão de preservação celular. Usualmente é decorrente da isquemia a que é submetido o tecido hepático, porém outros fatores como drogas e toxinas também podem estar implicadas na produção dessa alteração parenquimatosa (CASTRO, 2002).

Em machos e fêmeas, o estudo microscópico do tecido conjuntivo peribronquial dos pulmões, revelou a presença de agregados linfóides foliculares, não encapsulados, em estreita associação com vênulas peribronquiolares e com a própria mucosa bronquiolar (Figuras 11 A-B e 12 A-B), representando evidências de estimulação do sistema imunitário BALT (“Bronchial-Associated Lymphoid Tissue”). Vale ressaltar, ademais, que não houve qualquer evidência de atipias estruturais - nucleares ou citoplasmáticas, nem arquiteturais, nos órgãos da população animal estudada, pelo que se pode admitir, que, nas doses preconizadas nesta pesquisa, o fitoterápico não possui efeitos oncogênicos.

Portanto, os resultados desse estudo demonstram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. spicatus*, apresentou alguns efeitos adversos nos estudos toxicológicos pré-clínicos na dose popular 14 mg/kg, como aumento nos níveis de colesterol total, triglicerídios e amilase. O aumento do colesterol HDL pode representar um efeito desejável uma vez que a presença elevada desta lipoproteína no sangue traz vários benefícios ao homem.

O extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *C. spicatus* apresenta-se com baixa toxicidade, exceto por alterações em alguns parâmetros, conforme mencionado. Neste aspecto, seguem algumas reflexões que são de extrema valia:

- A despeito da presença de alterações, no geral, o EHB das folhas de *C. spicatus* apresentou-se bem tolerável;
- A maioria das alterações que ocorreram nas doses mais elevadas e a longo prazo são completamente reversíveis com a retirada do extrato;
- Alguns medicamentos em uso apresentam mesmo em doses terapêuticas uma série de alterações orgânicas, às vezes, irreversíveis, por exemplo, os glicocorticóides são capazes de ocasionar uma gama de complicações como: diabetes, osteoporose, hipertensão arterial, obesidade, lipólise com redistribuição de gordura, cegueira, etc. alguns destes irreversíveis, sendo determinados pela dosagem e tempo de tratamento. Apesar disso, constituem uma importante opção na terapêutica para uma gama de enfermidades (MACÊDO e OLIVEIRA, 2006).
- Esse relato nos faz lembrar o axioma mais importante da toxicologia que diz: “a dose faz o veneno” já que qualquer substância química pode ser tóxica se a dosagem empregada ou à exposição à substância for bastante alta (MELO, 2005; SIPES; DART; FISCHER, 2006).
- O trabalho foi realizado com o EHB de folhas, produto da extração exaustiva com álcool a 50%, pressupõe-se uma concentração mais elevada do que a usada pela população que na maioria das vezes utiliza o chá (infuso ou decocto) o qual demanda menor tempo de extração dos princípios ativos e cujo agente solvente é a água. Com base nos estudos realizados pode-se inferir que o extrato desta planta apresenta uma boa margem de segurança.

Conclusão

Conclusão

5 CONCLUSÕES

- O EHB possui baixa toxicidade frente a *Artemia salina* L., uma vez que o valor obtido da CL₅₀ (294,7 µg/mL) foi menor que 1000 µg/mL.
- Os estudos toxicológicos pré-clínico agudo e crônico do EHB de *C. spicatus* em ratos demonstraram reações adversas na dose de uso popular e pequenas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos nas doses de 42 mg/kg e 126 mg/kg.
- Grande parte das alterações induzidas pelas doses mais altas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram revertidas após suspensão do uso, fato verificado pela análise dos parâmetros do grupo satélite.
- Levando-se em consideração que a população utiliza o chá das folhas de *C. spicatus* para obter uma ação antilítase renal, foi importante demonstrar que os estudos levaram a uma redução significativa do ácido úrico nos machos tratados agudamente com EHB na dose de 2 g/kg (143 vezes a dose de uso popular).
- O EHB não promoveu alterações histológicas de caráter clínico importante no tocante ao coração, rins e pulmões, no entanto, no fígado, houve modificações histopatológicas de relevância clínica na dose de 126 mg/kg.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Levantamento da flora medicinal da Paraíba e triagem fitoquímica. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.3, p.71-72, 1990.
- ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas Medicinais de Uso Popular**. ABEAS, Brasília, 1989. 100p.
- ALMEIDA, R.N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.80, p.72-76, 1999.
- ALVES, M. J. Q. F. Estudos pré-clínicos com plantas medicinais: base para a fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2003.
- ARAÚJO VIEL, T. et al. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.93-198, 1999.
- ARAUJO LIMA, A. A. L. et al. Estudo das aminotransferases em ratos cirróticos hepatectomizados após aplicação de laser. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.16, suppl.1, p.44-46, 2001.
- ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Gingko, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.44, n.4, p.824-835, 2001.
- ATMANI, F. et al. Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsute* L. on experimentally nephrolithiasic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95: p.87-93, 2004.
- BARROS, S. B. M. e DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Ateneu, p.59-67, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 90 de 16 de março de 2004.** Dispõe sobre o Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos. D.O.U. – Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de mar. 2004e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de fevereiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, 01 de Fevereiro de 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 04 de maio de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de junho de 2006.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*.** Campinas, SP: Editora da UNICAMP. 1994. 122p.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. In: EISENK, H. J. **Experiments in Personality.** London: Routledge and Kegan Paul, 1960. p. 31-71.

CACERES, A. et al. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v.19, n.3, p.233-245, 1987.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A. ; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos, 2001.

CAÑIGUERAL, S.; VILA, R. Y.; WICHTL, M. (Eds). **Plantas Medicinales y drogas vegetales**. OEMF, Milán. 1997.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapt). Effects of teas prepared from leaves on Laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v.17, p.37-64, 1986.

CARRICONDE, C. – De volta as raízes. Publicação do centro nordestino de medicina popular - Ano XI – nº 57 – Janeiro/Fevereiro – 1996.

CASTRO, A.F. Achados histológicos em 48 pacientes transplantados do fígado: biópsias do enxerto pós-reperfusão (tempo zero) e de três a 15 dias pós-transplante. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.38, n.4, p.301-306, 2002.

CARVALHO, A.C.B. – **Avaliação legal da publicidade de produtos naturais e investigação toxicológica dos produtos anunciados**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB. João Pessoa. 2005. 244p.

CARVALHO, W.A. Antiinflamatórios não-esteróides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7ª ed. 2006.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas Mediciniais – do cultivo à terapêutica** – 2a Ed. Editora Vozes. Petrópolis, 1998. 247p.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v.1. 1984. p. 483.

CORREIA, M.A. Biotransformação das drogas. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9ª ed. 2005.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª ed. 1996.

DINIZ, M.F.F.M. Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba. 147 p. 2000.

DINIZ, M.F.F.M et al. Ensaio toxicológico pré-clínico agudo com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl em ratos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.8, n.2, p.135-142, 2004.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A rote on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association Scientific Edit**, v.16, n.3.1957.

FÉRES, C.A.O. et al., Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v.108, p.450-456, 2006.

FERRO, D. História da Fitoterapia. In: **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

FINNEY, D.J. Probit analysis. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1971. 31p.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *costus spicatus***. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil. Canoas. 2005. 79p.

GORINA, A.L. **A clínica e o laboratório**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12^a ed. 1984.

GUIDUGLI-NETO, J. Elementos de Patologia Geral, 1997. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoartebibl.htm>, acesso em 11/10/07.

HABSAB, M. et al. Sreening of Zinziberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 403-410, 2000.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. São Paulo: Editora Manole, 1995.

MONTOSO GARDENS, 2007. Disponível em <http://www.montosogardens.com/costaceae.htm>, acesso em: 06/11/2007, às 20:45 horas.

INEU, M.L. et al. Manejo da HDL: Avanços recentes e perspectivas além da redução de LDL. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.87(6), p.788-794, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de medicamentos**. São Paulo, 1985.

IWU, M.M.; ANYAWU, B.N. Steroidal constituent of *Costus afer*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 263, 1982.

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11^a ed. 2006.

KRAYCHETE, D. Antiinflamatórios não-hormonais. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6^a ed. 2002.

LARINI, L. L. Avaliação Toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. Editora Manole. São Paulo, p.43-58, 1997.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.158-163, 2006.

LIMA, C.M.B.L. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato hidroacoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2007. 108p.

LIMA, L.R.P. et al. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.38(4), p.1-9, 2001.

LIMA, L.R.P., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v.16 n.3 p.305-314, 2003.

LOPES, W.B.L. et al. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais.** Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/B/Desenvolvimento.pdf>, acesso em 27 de novembro de 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MACÊDO, J.M.S.; OLIVEIRA, I.R. Corticosteróides. In: SILVA, P. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7^a ed. 2006.

MACHADO, A.R.L. Intoxicações medicamentosas agudas. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Farmacologia clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3^a ed. 2004.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v.25, 429-438, 2002.

MALLOY, M.J.; KANE, J.P. Drogas utilizadas na hiperlipidemia. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8^a ed. 2003.

MANUAL MERCK – Saúde para a Família. Editada pela Merck Research Laboratories, 2006. Disponível em: http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/patients/manual_Merck/editorial.html, acesso em 11/10/07.

MARIZ, S.R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16(3): 372-378, 2006.

MASUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-) Δ^9 – trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in a open-field arena. **Psychopharmacology**. v.19:388-397. 1971.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Fortaleza: Edições UFC. 2^a ed. 1997.

MCLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v.32, p.513-524, 1998.

MELO, A.F.M. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos com a casca do caule de *Anacardium occidentale* Linn.** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB. João Pessoa. 2005. 129p.

MELLO, A.C. Biotransformações das drogas. In: SILVA, P. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6^a ed. 2002.

MENDES, F.T. Fígado e drogas. In: DANI, R.; CASTRO, L.P. **Gastroenterologia clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

MILLER, O. **Laboratório para o clínico.** Rio de Janeiro: Editora Atheneu 8^a ed., 1999.

MILLER, O. **O Laboratório e as Técnicas de Imagem no Diagnóstico Clínico.** São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

MISAS, C.A.J. et al. Contribution to the biological evaluation of Cuban plants. **Revista Cubana Medicina Tropical**, v.31, p.13-19, 1979.

MORAIS, L.C.S.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.57-61, 1998.

NÓBREGA, E. M. M. A. et al. Avaliação da toxicidade do extrato de *Erythrina mulungu* frente a *Artemia salina* L each., **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.18, p.90, 2005.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, p.395-400, 2001.

PETROVICK, P.R.; MARQUES, L.C.; DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 51-55, 1999.

PIVETTA, O. Nascimento de uma nova molécula. Disponível em: <http://cfww.org/pub/edition>, acesso em: 22/11/2006.

PRISTA, L.V.N. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. Editora Gulbenkian. 1990. 602p.

SAMPAIO, F.J.B.; RODRIGUES, H.C.; FAVORITO, L.A. Litíase renal In: NETTO JR, N.R.; WROCLAWSKI, E.R. **Urologia – Fundamentos para o clínico**. São Paulo: Editora Sarvier. 2001.

SIPES, I.G.; DART, R.C.; FISCHER, L.J. Toxicologia. In: MINNEMAN, K.P.; WECKER, L.; LARNER, J.; BRODY, T.M. **Farmacologia humana**. Rio de Janeiro: Elsevier, 4^a ed. 2006.

SILVA, M.G.; DINIZ, M.F.F.M.; OLIVEIRA, R.A.G. – **Fitoterápicos – Guia do profissional de saúde**. Secretaria do Estado da Paraíba. João Pessoa – PB, 2002.

SILVA, B.P., BERNARDO, R.R., PARENTE, J.P. A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 51, p 931-1935, 1999.

SILVA, B.P., BERNARDO, R.R., PARENTE, J.P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v.53, p.87-92, 2000.

SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7^a ed. 2006.

SILVA, T.M.S. et al. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17(1), p35-38, 2007.

SIRAT, H.M. Study on the terpenoids of *Zingiber ottensi*. **Planta Medica**, v.60, p.497, 1994.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, p.13-14, 2005.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.2, p.199-306, 2006.

VASCONCELOS, T. H. C. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos e clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE)**. Tese de Doutorado em Produtos Naturais Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa , 2004.

VEIGA, V.F.J.; ANGELO, C. P. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, L.S., ALBUQUERQUE, J.M. **Fitoterapia Tropical – Manual de Plantas Medicinais**. FCAP - Serviço e Documentação e Informação. Belém, 1998.

VIRGÍLIO, L.J.; MARQUES, L.C. Avaliação dos efeitos da resolução RDC 17 sobre fitoterápicos de registros antigos. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.14, p 03-06, 2004.

YUNES, R., PEDROSA, R C, FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos do Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147-152, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)