

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



**MARIA DE FÁTIMA DUQUES DE AMORIM**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE TOXICIDADE  
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA PELA KAVA (*Piper methysticum*)**

***Correlação entre o perfil bioquímico e lesões celulares e/ou  
matriciais, avaliadas por análise histológica e imunoistoquímica  
hepática***

**João Pessoa – PB**

**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 PROF. DELBY  
FERNANDES DE MEDEIROS

---

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE TOXICIDADE  
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA PELA KAVA (*Piper methysticum*)

*Correlação entre o perfil bioquímico e lesões celulares e/ou  
matriciais, avaliadas por análise histológica e imunoistoquímica  
hepática*

---

**Orientadoras:**

Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

João Pessoa – PB

2008

**MARIA DE FÁTIMA DUQUES DE AMORIM**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE TOXICIDADE  
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA PELA KAVA (*Piper methysticum*)**

***Correlação entre o perfil bioquímico e lesões celulares e/ou  
matriciais, avaliadas por análise histológica e imunoistoquímica  
hepática***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, da Universidade Federal da Paraíba, área de concentração Farmacologia, para obtenção do grau de Doutor.

**Orientadoras:**

Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

**João Pessoa – PB**

**2008**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE TOXICIDADE EXPERIMENTALMENTE  
INDUZIDA PELA KAVA (*Piper methysticum*)**

***Correlação entre o perfil bioquímico e lesões celulares e/ou matriciais,  
avaliadas por análise histológica e imunoistoquímica hepática***

**MARIA DE FÁTIMA DUQUES DE AMORIM**

**MÉDICA**

Tese aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2008

---

Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo  
Orientadora

---

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz  
Orientadora

---

Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade  
Examinador

---

Prof. Dr. João Modesto Filho  
Examinador

---

Prof. Dr. Marcelo Fernandes Rangel  
Examinador

---

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida  
Examinador

---

Profa. Dra. Carmem Lúcia de Assis Madruga  
Suplente

## **DEDICATÓRIA**

A Brígido e Maria das Dores, Maria Duques, Nelly e Wandelcy, pais, irmã e sogros, que se ainda estivessem entre nós, orgulhosamente fariam coro ao nosso contentamento.

A Waldir, Pedro, Renata, Paulo e Juliana, João e Carol, que alegram imensamente a minha vida, dando-me forças para as realizações.

## AGRADECIMENTOS

A Waldir Pedrosa Dias de Amorim, “*pedaço de mim, metade adorada de mim*”, companheiro ímpar.

A Pedro, Paulo e João Duques de Amorim, pelo sentido que dão à minha vida.

Às minhas orientadoras, Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo e Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, cujas atribuições múltiplas não as impediram de estar sempre disponíveis, permitindo a execução desta pesquisa. Ambas, cada uma a seu modo, são parte deste trabalho, pois ultrapassaram o limite da orientação formal, merecendo meu especial reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, reconhecido na comunidade científica internacional por sua contribuição ao estudo da fibrogênese hepática, por aceitar participar desta banca, honrando sobremaneira este trabalho, na pessoa de quem agradeço igualmente aos outros componentes.

Ao Prof. Dr. Edison Roberto Parise, chefe do Serviço de Gastroenterologia/Hepatologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP; Profa. Dra. Virgínia Junqueira, coordenadora do Laboratório de Geriatria da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP e Profa. Dra. Karin Argenti Giavarotti, deste mesmo laboratório, pela disponibilidade e atenção.

À Dra. Edna Porto, pelo constante incentivo.

Aos colegas de disciplina do Departamento de Nutrição-CCS-UFPB, Alexandre Henriques e Eleonora Sales, por compreenderem a necessidade desta realização, assumindo minhas atividades docentes.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, à diretoria do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof.

Delby Fernandes de Medeiros (LTF) e a todos os professores, cuja vontade de partilhar o espírito científico fez-me crescer.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Almeida, que juntamente com a Profa. Dra. Liana Clébia, fizeram sugestões importantes relacionadas à parte comportamental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, do Laboratório de Bioequivalência do LTF, pela prestimosa solicitude.

Às Dras. Kardilândia Oliveira, Raquel de Sousa e Hosana Bandeira Santos, pela realização dos exames bioquímicos e hematológicos.

Ao Prof. Dr. Aécio Flávio Meirelles de Souza, coordenador do Centro de Referência em Hepatites do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, pelas oportunas observações.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna, Prof. Dr. Neir Antunes Paes e Prof. Dr. Jozemar Pereira dos Santos, colaboradores na análise estatística.

À Profa. Glória Gama, cuja correção do texto em língua inglesa aprimorou este trabalho.

Aos estudantes João Carlos Pita, Jadson G. Dantas, Josué A. Ramalho, Thayse V. Palomaro, Nelson L. B. Junior e Aline Xavier, pela ajuda competente e amigável de todos.

A Ana Cecília Bezerra Carvalho, Alessandra Camilo da S. Castello Branco, Arquimedes Fernandes M. de Melo, Marianna V. Sobral, integrantes deste Programa de Pós-graduação, cada um com uma parcela de contribuição.

Ao técnico do LTF José Crispim Duarte, cujo trabalho foi indispensável ao desenvolvimento desta pesquisa.



A Tânia Alves, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela presteza e bom atendimento.

A Tatiana, Fabiany, Sônia, Fernanda e Débora, funcionárias do Endocenter - Unidade do Fígado e Gastroenterologia, que colaboraram comigo de várias maneiras.

Ao laboratório Virchow, nas pessoas da Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo e Prof. Dr. Carlos Alberto Fernandes Ramos, bem como ao técnico Eugenio Pacelli Sitônio Trigueiro Filho, pela realização das análises imunoistoquímicas.

Ao Laboratório Nycomed Pharma Ltda., que, por meio dos seus representantes Ildo Ferreira, Jaime Santana e Rosane Estevão, me apoiou com envio de material científico.

A todos que me auxiliaram de algum modo, aqui inominados.

No palheiro dos haveres cotidianos,  
cabe às ciências investigar razões,  
só à poesia, especular paixões.

*Waldir Pedrosa Amorim*

AMORIM, MARIA DE FÁTIMA DUQUES. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE TOXICIDADE EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA PELA KAVA (*Piper methysticum*). *Correlação entre o perfil bioquímico e lesões celulares e/ou matriciais, avaliadas por análise histológica e imunoistoquímica hepática*. (Tese de Doutorado). Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. CCS/LTF/UFPB, 2008.

## RESUMO

A kava (*Piper methysticum* G. Forst), da família das *Piperaceae*, historicamente consumida nas ilhas do Pacífico de forma social e com fins terapêuticos, é um fitoterápico usado em vários países como ansiolítico. Recentemente, vários casos de hepatite tóxica, alguns com evolução fulminante, necessitando de transplante hepático, foram atribuídos ao seu uso, embora haja controvérsias sobre essa alegada hepatotoxicidade. Este trabalho objetivou avaliar, em modelo experimental de toxicidade crônica, as possíveis alterações hepáticas decorrentes do uso da kava. Oitenta ratos Wistar adultos de ambos os sexos, comparados a grupo controle pareado, receberam via oral, por gavagem, o extrato WS 1490 de *Piper methysticum*, na dose usual (4,3 mg/kg) e três e nove vezes aquela dose (12,9 e 38,7 mg/kg), com sacrifício após 13 semanas. Aferiu-se o consumo de água e ração, peso corporal, temperatura e glicemia, realizando-se também testes de avaliação comportamental e motora. Parte da amostra constituiu um grupo satélite, observado por 45 dias após a suspensão da kava. A avaliação incluiu exames bioquímicos e hematológicos, bem como estudo anatomopatológico de vários órgãos, procedendo-se análise imunoistoquímica nas amostras de fígado que apresentaram alterações histológicas, com semiquantificação da expressão alfa-actina de músculo liso (a-AML). Houve diferenças significativas no consumo de água, que diminuiu nas três doses em algumas semanas. O mesmo se verificou no consumo de ração, principalmente com 12,9 mg/kg entre as fêmeas. Eventualmente, a temperatura sofreu oscilações e hiperglicemia foi um achado ocasional. A frequência de ambulação e o comportamento levantar (*rearing*) ocasionalmente diminuiram nas fêmeas. Já o tempo de execução do comportamento de limpeza (*grooming*) foi menor em todas as doses entre machos, em duas semanas. No labirinto em cruz elevado os grupos se assemelharam. Não houve alteração bioquímica sugestiva de toxicidade hepática, tendo ocorrido neutrofilia, linfocitopenia e eosinofilia em alguns grupos. Macroscopicamente e histologicamente, coração, pulmões, rins de tratados e controles foram semelhantes. O fígado teve aspectos macroscópicos similares aos controles. À histologia, exibiu arquitetura do tipo lobular e alterações microvasculares (congestivas e inflamatórias sinusoidais, com reatividade das células de Kupffer) e inflamação portoparenquimatosa linfomonocitária, com degeneração hidrópica inconstante, além da necrose hepatocelular (individual, focal e multifocal), na ausência de expressão de a-AML. Tais alterações sofreram regressão parcial após 45 dias de suspensão do tratamento. Os resultados foram parcialmente concordantes com a literatura publicada, de desenhos variáveis. Concluiu-se que, o extrato de kava WS 1490, nas doses e no período empregados, provocou alterações histológicas compatíveis com hepatite tóxica, sem, no entanto, alterar os parâmetros sorológicos de avaliação hepática ou desencadear alterações fibrogênicas precoces detectáveis pelas análises imunoistoquímicas.

Descritores: Kava. *Piper methysticum*. Hepatite tóxica. Histologia. Imunoistoquímica.

## ABSTRACT

Extracts of Kava (*Piper methysticum* G. Forst), from *Piperaceae* family, were consumed in Pacific Islands with socially and therapeutic purposes. It is an anxiolytic herbal medicine used in many countries. Recently, some cases of kava-induced hepatotoxicity, requiring liver transplantation, have been reported, leading to its banishment in most countries worldwide. Despite this, some authors contest these data. The purpose of this study was to evaluate, in experimental model of toxicity, whether an extract of kava affects the liver. Eighty adult Wistar rats, male and female, have received, orally, by gavage, different doses of kava extract WS1490: 4,3 mg/kg, usual dose; 12,9 and 38,7 mg/kg, three and nine times the usual dose. They were compared with a paired placebo group, observed for 13 weeks and subsequently sacrificed. During the assay, intake of food and water, body weight, temperature and blood glucose were measured. The animals were submitted to behavioral tests. A satellite group were preserved and observed for 45 days after kava withdrawal. Biochemical and hematological parameters were tested. Organs were submitted to macroscopical and histological analysis. Immunohistochemical analysis were performed in liver samples with signs of injury, with smooth muscle alpha actin – alpha-SMA monoclonal antibody. Intake of water was significantly reduced on the three doses in few weeks; the same was observed in the intake of food, more evidently in females, with 12,9 mg/kg of kava extract. Temperature eventually oscillated; hyperglycemia was occasional. The measurements in open field tests showed these data: in females, locomotor activity and frequency of rearing were eventually reduced; time spent with grooming was also reduced in males, in all doses, for two weeks. On the elevated plus maze, the behavioral of all groups was similar. Biochemical analysis were similar to controls, suggesting no hepatotoxicity. It has occurred neutrophilia, lymphocytopenia and eosinophilia in some groups treated with kava extract. No macroscopical abnormalities were detected in the examined organs. No histological differences were observed for all groups in heart, lungs and kidneys. Histological analyses of liver samples showed lobular architecture in all groups. Pathological findings included microvascular abnormalities (hepatic sinusoidal were congested, with inflammatory signs) and Kupffer cells activation. Portal and parenchymatous inflammation were seen, with lymphomonocytic infiltration, hydropic degeneration, variable acidophilic retraction of liver cells. Moreover, hepatocellular necrosis (individual, focal and multifocal) was observed, without immunohistochemical expression of alpha-SMA. Some of these histological changes were reversed after 45 days. These results were partially according to published data. In conclusion, kava extract WS 1490 may elicit a toxic effect on the liver when administered in those doses and in that period, without altering the evaluated blood liver parameters or activating early fibrogenic changes detected by immunohistochemical assay.

**Keywords:** Kava. *Piper methysticum*. Toxic hepatitis. Histology. Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Piper methysticum</i> ou kava .....	34
<b>Figura 2:</b> Histologia normal do fígado (Zonas 1, 2 e 3) .....	55
<b>Figura 3:</b> Necrose hepática extensa (superdosagem de acetaminofen) .....	56
<b>Figura 4:</b> Colestase .....	57
<b>Figura 5:</b> Aspecto histológico constante em animais dos grupos controle e submetido ao tratamento com a kava: arquitetura lobular hepática, com veia hepática terminal (setas) apresentando paredes finas (A: vermelho picrossirius - X 100; B: hematoxilina-eosina – X400) .....	131
<b>Figura 6:</b> Congestão microvascular (A: dose 4,3 mg/kg – X100 ; B – dose 12,9 mg/kg – X400; tricrômico de Masson).....	133
<b>Figura 7:</b> Linfócitos em lume de sinusóides (setas), em animais tratados com as doses de 12,9 mg/kg (A) e 38,7 mg/kg (B) – hematoxilina-eosina X400. ....	133
<b>Figura 8:</b> Células de Kupffer reativas em ratos tratados com as doses de 4,3 mg/kg (A), 12,9 mg/kg (B) e 38,7 mg/kg (C) de kava (hematoxilina-eosina X400). ....	134
<b>Figura 9:</b> Dilatação e inflamação sinusoidais, em animal tratado com a dose 12,9 mg/kg de kava (hematoxilina-eosina X400). ....	134
<b>Figura 10:</b> Matriz de similaridade: análise de parâmetros histológicos comparando grupos tratados com a kava, em diferentes doses, por 13 semanas e grupo controle. Os grupos tratados são diferentes do grupo controle, particularmente com a dose 12,9 mg/kg. C=controle; DU (dose usual)=4,3 mg/kg; 3DU (três vezes a dose usual) = 12,9 mg/kg; 9 DU (nove vezes a dose usual) = 38,7 mg/kg. ....	135
<b>Figura 11:</b> Aspectos histológicos do tecido hepático no grupo controle – espaço portal pequeno (seta longa), com tríade vâsculo-biliar disposta em matriz conjuntiva (A: X400) e traves hepatocelulares (seta curta) radialmente distribuídas em torno da veia hepática terminal (estrela), em B: X100). Hematoxilina-eosina. ....	136
<b>Figura 12:</b> Discreto exsudato linfocitário (setas) infiltra a matriz fibroconjuntiva de espaços portais, na intoxicação de ratos com a dose de 4,3 mg/kg (A-B: hematoxilina-eosina X400).....	137
<b>Figura 13:</b> Necrose hepatocelular focal associada à exsudação celular linfoistiocitária (seta), em zona 3, de animal tratado com a dose de 4,3 mg/kg (hematoxilina-eosina; A: X100; B: X400). ....	138
<b>Figura 14:</b> Múltiplos focos de necrose lobular acompanhados de exsudação linfomonocitária (seta larga) e inflamação sinusoidal (seta fina) - A: X400; portite linfocitária discreta (seta curva) - B: X100. Hematoxilina-eosina. Ratos tratados com 12,9 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> . ....	139

- Figura 15:** Reação tissular hepática associada à administração de 38,7 mg/kg de kava: inflamação portal (escore 2) predominantemente linfocitária (seta longa) e foco de necrose lobular com afluxo de células inflamatórias mononucleares (seta larga), além de sinais de degeneração hidrópica microvacuolar (seta fina e curta). Hematoxilina-eosina A-B X400 .....141
- Figura 16:** Expressão positiva para alfa-actina em leiomiócitos da parede de veia hepática terminal (A-C: seta fina) e de arteríolas hepáticas (seta larga), em contraste com a marcação negativa na zona 3 (estrela) e no espaço portal com inflamação (D: seta curva) perissinusoidal (A-D: X400 – dose 12,9 mg/kg) .....142
- Figura 17:** Expressão da alfa-actina em espaço portal de animais do grupo 12,9 mg/kg, com destaque para a positividade da imunorreação em células musculares lisas de parede vascular arteriolar e venular, bem como de fibroblastos portais (seta). A-B X400.....142
- Figura 18:** Controle externo da expressão de alfa-actina anti-músculo liso: demonstração da ativação da miofibroblastos ou células estelares, em processo de fibrogênese hepática humana, em topografia perissinusoidal .....143
- Figura 19:** Alterações microvasculares em zona 3 do lóbulo hepático. A - dose de 12,9 mg/kg: congestão venular e dilatação sinusoidal (seta longa); B-C – dose 38,7 mg/kg: dilatação sinusoidal com linfócitos luminares (seta curta); D – dose 4,3 mg/kg: células de Kupffer reativas (seta larga). A: tricrômico de Masson X100; B-C-D: hematoxilina-eosina X 400.....150
- Figura 20:** Portite linfocitária crônica, discreta (A: 4,3 mg/kg; B: 12,9 mg/kg – seta longa) e focos de necrose lobular associados à exsudação linfoistiocitária (C: 4,3 mg/kg; D: 38,7 mg/kg – seta curta). A-B-C-D: hematoxilina-eosina X400. ....154

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Consumo de água em mililitros (mL), aferido diariamente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Na comparação com os controles, este foi significativamente menor na dose 4,3 mg/kg na 3<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana; na 8<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> com 12,9 mg/kg e foi maior na 5<sup>a</sup> semana, no grupo 38,7 mg/kg. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....87
- Gráfico 2:** Consumo médio de água em mililitros (mL), aferido diariamente, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Na comparação com os controles, este foi significativamente menor na dose 4,3 mg/kg na 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana; com 12,9 mg/kg foi menor em todo o experimento, exceto na 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana e com 38,7 mg/kg na 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....88
- Gráfico 3:** Consumo de ração em gramas (g), aferido diariamente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Este foi significativamente menor que os controles na dose 4,3 mg/kg na 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana e com 12,9 mg/kg na 7<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....91
- Gráfico 4:** Consumo de ração em gramas (g), aferido diariamente, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), com significante menor consumo que os controles na dose 4,3 mg/kg, na 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana; 12,9 mg/kg em todas, exceto na 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, e 8<sup>a</sup> semana; 38,7 na 1<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....92
- Gráfico 5:** Peso médio em gramas (g), aferido semanalmente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), com semelhança estatística em todas as doses e ganho de peso de todos os grupos. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....95
- Gráfico 6:** Peso em gramas (g), aferido semanalmente, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Houve ganho de peso, que variou para menos, com significância estatística, na dose 4,3 mg/kg na 2<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semanas, como ocorreu com 38,7 mg/kg na 2<sup>a</sup> semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....95
- Gráfico 7:** Temperatura retal em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), aferida semanalmente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Esta variou para menos, com significância estatística, nas doses 4,3 e 12,9 mg/kg na 3<sup>a</sup> semana; com 38,7 mg/kg na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas. Foi maior nas três doses na 11<sup>a</sup> semana e também na 4<sup>a</sup> semana, com a maior dose. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....98

<b>Gráfico 8:</b> Temperatura retal em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), aferida semanalmente, de ratas tratadas com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> , durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), sem diferenças estatísticas. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	99
<b>Gráfico 9:</b> Glicemia caudal, em miligramas por decilitro (mg/dL), basal e aferida a cada duas semanas, de ratos tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> , durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ). Com exceção da glicemia significativamente maior na dose 38,7 mg/kg, na 4ª semana, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. * = Diferença significativa .....	101
<b>Gráfico 10:</b> Glicemia caudal, em miligramas por decilitro (mg/dL), basal e aferida a cada duas semanas, de ratas tratadas com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> , durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), sem diferenças estatísticas. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	101
<b>Gráfico 11:</b> Aspartato aminotransferase (AST) em unidades internacionais por litro (UI/L) de ratos machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	106
<b>Gráfico 12:</b> Alanino aminotransferase (ALT) em unidades internacionais por litro (UI/L) de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), semelhante em todos os grupos, exceto com 4,3 mg/kg, quando este parâmetro foi significativamente menor. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. * = Diferença significativa .....	107
<b>Gráfico 13:</b> Fosfatase alcalina (FA), em unidades internacionais por litro (UI/L), de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), semelhante em todos os grupos. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	107
<b>Gráfico 14:</b> Albumina sérica em gramas por decilitro (g/dL) de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	108
<b>Gráfico 15:</b> Gama glutamiltransferase ( $\gamma\text{GT}$ ) em unidades internacionais por litro (UI/L) de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	109
<b>Gráfico 16:</b> Bilirrubina total, em gramas por decilitro (g/dL), de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett, $p<0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....	109



**Gráfico 17:** Valores médios das plaquetas dos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa em relação ao grupo controle (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett, kruskal-Wallis, p<0,05). Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....112

**Gráfico 18:** Frequência de ambulação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....114

**Gráfico 19:** Frequência de ambulação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, em ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, com diferença significativa com relação ao grupo controle na 8ª semana, com a dose 12,9 mg/kg (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa .....114

**Gráfico 20:** Frequência do comportamento levantar (*rearing*), avaliada a cada duas semanas, no experimento de campo aberto, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05), sem diferença significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....116

**Gráfico 21:** Frequência do comportamento levantar (*rearing*), avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05), significativamente menor que o grupo controle na 8ª semana, com a dose 12,9 mg/kg. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.\* = Diferença significativa.....116

**Gráfico 22:** Tempo de execução, em segundos (s), do comportamento de limpeza (*grooming*), avaliado a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas. Este foi significativamente menor com relação ao grupo controle na 2ª semana nas três doses; com 38,7 mg/kg na 4ª semana e também em todas as doses na 6ª semana (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.....118

**Gráfico 23:** Tempo de execução, em segundos (s), do comportamento de limpeza (*grooming*), avaliado a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05), sem diferença significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....118

**Gráfico 24:** Frequência de defecação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....120

**Gráfico 25:** Frequência de defecação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais

por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....120

**Gráfico 26:** Tempo de permanência, em segundos (s), avaliado a cada duas semanas, no aparelho de *Rota-rod*, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas ( $n = 5$  animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. Não houve diferença significativa .....122

**Gráfico 27:** Tempo de permanência, em segundos (s), avaliado a cada duas semanas, no aparelho de *Rota-rod*, de ratas tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster, durante 13 semanas ( $n = 5$  animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. Não houve diferença significativa .....122

**Gráfico 28:** Freqüência média de entradas nos braços fechado e aberto, no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), de ratos, machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* e do grupo controle de referência, tratado com 0,5 mg/kg de diazepam via oral ( $n = 5$  animais por dose; ANOVA, Dunnett, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre os grupos. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....126

**Gráfico 29:** Tempo médio de permanência, em segundos, nos braços fechado e aberto, no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), de ratos, machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* e do grupo controle de referência, tratado com 0,5 mg/kg de diazepam via oral ( $n = 5$  animais por dose; ANOVA, Dunnett, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre os grupos. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo .....127

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Reações adversas sistêmicas relacionadas ao uso da kava .....	62
<b>Quadro 2:</b> Parâmetros analisados na avaliação histológica dos pulmões .....	79
<b>Quadro 3:</b> Parâmetros analisados na avaliação histológica do coração .....	80
<b>Quadro 4:</b> Parâmetros analisados na avaliação histológica dos rins e sistemas excretorios .....	80
<b>Quadro 5:</b> Parâmetros analisados na avaliação histológica do fígado .....	81
<b>Quadro 6:</b> Avaliação da arquitetura histológica hepática e de alterações microvasculares de ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas, por grupo, sexo e unidade experimental .....	132
<b>Quadro 7:</b> Avaliação da arquitetura histológica hepática e de alterações microvasculares de ratos machos e fêmeas do grupo satélite, 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G Foster durante 13 semanas .....	149

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Consumo semanal de água em mL (Média ± Erro padrão), da 1ª à 7ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	85
<b>TABELA 2:</b> Consumo semanal de água em mL (Média ± Erro padrão), da 8ª à 13ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	86
<b>TABELA 3:</b> Consumo semanal de ração em gramas (g) (Média ± Erro padrão), da 1ª à 7ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	89
<b>TABELA 4:</b> Consumo semanal de ração em gramas (g) (Média ± Erro padrão), da 8ª à 13ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	90
<b>TABELA 5:</b> Evolução ponderal em gramas (g) (Média ± Erro padrão), da 1ª à 7ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	93
<b>TABELA 6:</b> Evolução ponderal em gramas (g) (Média ± Erro padrão), da 8ª à 13ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	94
<b>TABELA 7:</b> Temperatura corporal em graus Celsius (°C) (Média ± Erro padrão), da 1ª à 7ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	96
<b>TABELA 8:</b> Temperatura corporal em graus Celsius (°C) (Média ± Erro padrão), da 8ª à 13ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	97
<b>TABELA 9:</b> Glicemia em mg/dL (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	100
<b>TABELA 10:</b> Parâmetros bioquímicos (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	103
<b>TABELA 11:</b> Parâmetros bioquímicos (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	104
<b>TABELA 12:</b> Parâmetros bioquímicos (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	105
<b>TABELA 13:</b> Parâmetros hematológicos (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	110

<b>TABELA 14:</b> Parâmetros hematológicos (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	111
<b>TABELA 15:</b> Frequência de ambulação no experimento de campo aberto (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	113
<b>TABELA 16:</b> Frequência de execuções do comportamento levantar ( <i>rearing</i> ) (Média ± Erro padrão) no experimento de campo aberto, de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	115
<b>TABELA 17:</b> Tempo de execução, em segundos, do comportamento de limpeza ( <i>grooming</i> ) no experimento de campo aberto (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	117
<b>TABELA 18:</b> Número de bolos fecais no experimento de campo aberto, em ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	119
<b>TABELA 19:</b> Tempo de permanência em segundos (s) na barra giratória do aparelho <i>Rota-rod</i> , de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	121
<b>TABELA 20:</b> Frequência de entradas e tempo de permanência (Média ± Erro padrão), em segundos (s), no labirinto em cruz elevado ( <i>pluz maze</i> ), de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas, e do grupo controle de referência, tratado com diazepam .....	123
<b>TABELA 21:</b> Peso em gramas (g) (Média ± Erro padrão), (n=3), do fígado de ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas.....	129
<b>TABELA 22:</b> Peso em gramas (g) (Média ± Erro padrão), (n=3), do coração e rins de ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de <i>Piper methysticum</i> G. Foster, durante 13 semanas .....	130
<b>TABELA 23:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa, do fígado de ratos machos e fêmeas do grupo controle .....	136
<b>TABELA 24:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos machos e fêmeas tratados diariamente com 4,3 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	137
<b>TABELA 25:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos machos e fêmeas tratados diariamente com 12,9 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	139
<b>TABELA 26:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos machos e fêmeas tratados com 38,7 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> G. Foster durante 13 semanas .....	140

<b>TABELA 27:</b> Parâmetros bioquímicos de ratos do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental .....	144
<b>TABELA 28:</b> Parâmetros bioquímicos de ratas do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental .....	145
<b>TABELA 29:</b> Parâmetros hematológicos de ratos do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental .....	146
<b>TABELA 30:</b> Parâmetros hematológicos de ratas do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de <i>Piper methysticum</i> G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental .....	147
<b>TABELA 31:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos do grupo satélite dos animais tratados com 4,3 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	151
<b>TABELA 32:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos do grupo satélite dos animais tratados com 12,9 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	152
<b>TABELA 33:</b> Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos do grupo satélite dos animais tratados com 38,7 mg/kg de <i>Piper methysticum</i> G. Foster .....	153

## LISTA DE ABREVIATURAS

a-AML = alfa-actina anti-músculo liso

ADH = Álcool desidrogenase

ALT = Alanina aminotransferase

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST = Aspartato aminotransferase

BD = Bilirrubina direta

BI = Bilirrubina indireta

BT = Bilirrubina total

C = Celsius

CK = creatinoquinase

Ca<sup>+2</sup> = Cálcio

CCS = Centro de Ciências da Saúde

cDNA = c-ácido desoxiribonucleotídeo

CHCM = concentração da hemoglobina corpuscular média

CK = Creatinoquinase

COX= Cicloxigenase

CYP450= Citocromo P450

CIOMS = Council for International Organizations of Medical Sciences

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

d = Dia

DEF = Dicionário de Especialidades Farmacêuticas

DHM = Diidrometisticina

DHL = Desidrogenase láctica

DIPS = Drug Interaction Probability Scale

DL<sub>50</sub> = Dose letal para 50% dos animais

DMY = Dimetoxiangonina

ED<sub>50</sub> = Efeito da dose para 50% dos animais

EDTA = Ácido etilenodiamino tetracético

EV = Endovenosa

FA = Fosfatase alcalina

FDA = Food and Drug Administration

g = Grama

GABA = Ácido gama aminobutírico

γGT = Gama glutamiltransferase

5-HT<sub>1A</sub> = 5-hidroxitriptamina 1A

5-HT<sub>6</sub> = 5-hidroxitriptamina 6

5-HT<sub>7</sub> = 5-hidroxitriptamina 7

HAM-A = Hamilton Anxiety Rating Scale

HCM = hemoglobina corpuscular média

HE = Hematoxilina-eosina

HULW = Hospital Universitário Lauro Wanderley

IL-6 = Interleucina 6

K = Potássio

Ka = Kavaína

kg = Quilograma

L = Lâmina histológica

LABETOX = Laboratório de Ensaio Toxicológicos

LTF = Laboratório de Tecnologia Farmacêutica



M = Metisticina

MAO-B = Monoaminoxidase B

MDA = malondialdeído

mg = Miligrama

Mg = Magnésio

MS = Ministério da Saúde

Na = Sódio

NADPH = Dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NAPRALERT = Natural Products Alert

NMDA = N-metil-D-aspartato

PBS = Phosphate buffered saline; solução salina tamponada

PT = Proteínas totais

PXR = Receptor de pregnanos X

RNAm = RNA mensageiro

ROS = Reative oxygen species; espécies reativas de oxigênio

rpm = Rotações por minuto

SBH = Sociedade Brasileira de Hepatologia

SBP = Sociedade Brasileira de Patologia

SNC = Sistema nervoso central

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa

UFPB = Universidade Federal da Paraíba

UI = Unidade internacional

VCM = Volume corpuscular médio

VHT = Veia hepática terminal

VO = Via oral

Y = langonina

Z = Zona do lóbulo hepático

## SUMÁRIO<sup>1</sup>

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>1.1 Fitoterapia: uma questão histórica</b> .....	28
<b>1.2 Qualidade, segurança e eficácia das drogas vegetais</b> .....	29
<b>1.3 Fitoterápicos e hepatotoxicidade</b> .....	30
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	34
<b>2.1 Histórico, distribuição geográfica do cultivo e papel fitoterápico de <i>Piper methysticum</i> ou kava</b> .....	34
<b>2.2 Uso terapêutico da kava e ações farmacológicas sistêmicas</b> .....	37
<b>2.3 Metabolismo hepático das kavapironas</b> .....	43
<b>2.4 Uso terapêutico de fitoterápicos e efeitos adversos</b> .....	45
<b>2.5 Hepatotoxicidade induzida por drogas</b> .....	47
<b>2.6 Toxicidade hepática relacionada ao uso da kava</b> .....	51
<b>2.7 Histologia hepática</b> .....	54
<b>2.7.1 Histologia normal</b> .....	54
<b>2.7.2 Alterações histológicas na doença hepática induzida por drogas</b> .....	56
<b>2.7.3 Alterações histológicas na doença hepática relacionada ao uso da kava</b> .....	57
<b>2.8 Outras reações adversas relacionadas ao uso da kava</b> .....	58
<b>2.8.1 Alterações dermatológicas e oculares</b> .....	58
<b>2.8.2 Alterações neurológicas</b> .....	59
<b>2.8.3 Manifestações orais</b> .....	60
<b>2.8.4 Desnutrição, dislipidemia e doença cardiovascular</b> .....	61
<b>2.8.5 Linfopenia e risco de infecção</b> .....	61
<b>2.9 Interações da kava com outras substâncias</b> .....	62
<b>2.10 Estado atual da questão</b> .....	65
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	66
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	66
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	66
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
<b>4.1 Local do estudo</b> .....	67

---

<sup>1</sup> De acordo com a norma da ABNT 6027/2002

<b>4.2 Animais experimentais</b>	67
<b>4.3 Gaiolas utilizadas</b>	68
<b>4.4 Critérios de inclusão</b>	68
<b>4.5 Critérios de exclusão</b>	68
<b>4.6 Tamanho da amostra</b>	69
<b>4.7 Considerações éticas</b>	69
<b>4.8 Delineamento do estudo</b>	69
<b>4.9 Material botânico</b>	69
<b>4.10 Aparelhagem</b>	70
<b>4.11 Duração e descrição dos procedimentos</b>	71
<b>4.12 Parâmetros avaliados</b>	72
4.12.1 Consumo de água e alimento	72
4.12.2 Peso, temperatura, glicemia caudal	72
4.12.3 Avaliação comportamental e motora	72
4.12.4 Exames laboratoriais	74
4.12.5 Avaliação macroscópica dos órgãos	75
4.12.6 Análise histológica dos órgãos	76
4.12.7 Análise imunoistoquímica	82
4.12.8 Análise estatística	83
<b>5 RESULTADOS</b>	84
<b>5.1 Observações gerais</b>	84
<b>5.2 Consumo de água e de alimento</b>	84
<b>5.3 Peso corporal</b>	92
<b>5.4 Temperatura retal</b>	96
<b>5.5 Exames laboratoriais</b>	99
5.5.1 Glicemia	99
5.5.2 Parâmetros bioquímicos	102
5.5.3 Parâmetros hematológicos	110
<b>5.6 Parâmetros de observação comportamental e motora</b>	112
5.6.1 Campo aberto ( <i>open field</i> )	112
5.6.2 <i>Rota-rod</i>	120
5.6.3 Labirinto em cruz elevado ( <i>elevated plus maze</i> )	123
<b>5.7 Avaliação macroscópica dos órgãos</b>	127
5.7.1 Cavidade torácica	127

<b>5.7.2 Cavidade retroperitoneal</b>	<b>128</b>
<b>5.7.3 Cavidade abdominal</b>	<b>128</b>
<b>5.7.4 Peso dos órgãos</b>	<b>129</b>
<b>5.8 Análise histológica dos órgãos</b>	<b>130</b>
<b>5.8.1 Coração, pulmões e rins</b>	<b>130</b>
<b>5.8.2 Fígado</b>	<b>130</b>
<b>5.9 Análise imunoistoquímica</b>	<b>141</b>
<b>5.10 Grupo satélite</b>	<b>143</b>
<b>5.10.1 Observações gerais</b>	<b>143</b>
<b>5.10.2 Exames laboratoriais</b>	<b>143</b>
<b>5.10.3 Avaliação macroscópica dos órgãos</b>	<b>147</b>
<b>5.10.4 Análise histológica dos órgãos</b>	<b>148</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>155</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>186</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>208</b>
<b>APÊNDICE 1: Fichas de Hepatectomia: Avaliação Macroscópica</b>	<b>209</b>
<b>APÊNDICE 2: Fichas de Avaliação Macroscópica: Pulmões, Rins e Coração</b>	<b>210</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Fitoterapia: uma questão histórica

A fitoterapia é a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal, particularmente fitoterápicos e extratos, objetivando a profilaxia, atenuação ou cura de estados patológicos. Historicamente, no passado, a fitoterapia teve um papel hegemônico no arsenal terapêutico. Embora tenha sido, por muitos anos, relegada a um plano secundário, dado os avanços tecnológicos da indústria farmacêutica, constata-se um recrudescer do emprego das ervas, não somente nos países em desenvolvimento (CARLINI, 1988), mas também nos desenvolvidos (DeSMET, 2002).

Nos últimos anos, ocorreu, em todo o mundo, um aumento da utilização de fitoterápicos e suplementos alimentares, com o objetivo de tratar diversas doenças crônicas e promover a saúde dos indivíduos (ZHOU et al., 2007). Esse renascente uso da fitoterapia foi propiciado por vários fatores: a descoberta de graves reações adversas de certos fármacos sintéticos; o maior domínio do conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais; a aquisição de novas técnicas na preparação e de administração das mesmas. Ademais, o desenvolvimento de métodos analíticos gerou um melhor controle de qualidade, sugerindo-se, inclusive, que os fitoterápicos são mais seguros que as drogas sintéticas (ERNST, 2003). Além disso, são várias as indicações desses produtos, incluindo o tratamento de doenças hepáticas (STICKEL; SCHUPPMAN, 2007), distúrbios psiquiátricos (BEAUBRUN; GRAY, 2000; AKHONDZADEH; MALEKI, 2006; SARRIS, 2007), neurológicos (AKHONDZADEH; MALEKI, 2006) e gastroenterológicos (COMAR; KIRBY, 2005).

Sabe-se, no entanto, que as ervas medicinais têm sido utilizadas de forma crescente, mas sem a adequada orientação profissional (MILLER, 1998; BLENDIS, 2005). Essa constatação tem estimulado as pesquisas de forma multidisciplinar, objetivando o conhecimento sobre a eficácia e segurança na administração dos produtos botânicos.

Dentro desse contexto, deve-se ressaltar que, embora os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos e provavelmente menores efeitos colaterais, não são substâncias inócuas (ASSEMI, 2001). Diversos efeitos adversos relacionados ao seu uso são relatados na literatura. Dentre eles, destaca-se a ocorrência de hepatite tóxica, às vezes grave, associada ao consumo de produtos botânicos (WILLET et al., 2004).

## **1.2 Qualidade, segurança e eficácia das drogas vegetais**

Como para qualquer medicamento, é necessário garantir a qualidade, segurança e eficácia dos fitoterápicos. Contudo, em muitos países ocidentais as preparações botânicas são isentas das exigências de agências reguladoras impostas às drogas sintéticas, por ocasião do licenciamento para comercialização (STICKEL, 2007); além disso, a venda de muitos desses produtos é acessível por meio da internet, sem consulta a médico ou farmacêutico (STICKEL et al., 2005).

No Brasil, embora a utilização de plantas tidas como medicinais por uma substancial parcela da população seja consagrada, ainda são escassos os dados científicos confirmatórios da ausência de toxicidade ou da ação terapêutica da rica flora nacional, catalogada em mais de cem mil espécies. Estudos demonstram, através de ensaios pré-clínicos e clínicos, a eficácia ou inutilidade de certas plantas de uso popular, chamando ainda atenção para os efeitos tóxicos de outras (ALENCAR, 1994; ARAÚJO et al., 1991; CÔRTEZ, 1992; DINIZ, 2000).

Esse espírito investigativo dos últimos anos tem acompanhado a tendência mundial de incremento na realização de estudos controlados, principalmente com extratos padronizados. Esses estudos têm se mostrado úteis para definir indicações e posologia, como também para detectar possíveis efeitos colaterais, notadamente reações adversas aos constituintes da droga, alterações gastrointestinais, toxicidade hepática e até efeitos carcinogênicos (CAÑIGUERAL, 1989; CAÑIGUERAL, 1997; DER MARDEROSIAN, 1988). Entretanto, autores questionam a qualidade dos ensaios relacionados aos fitoterápicos, julgando-os incompletos e com várias falhas, o que prejudica o resultado final (GAGNIER, 2006).

### 1.3 Fitoterápicos e hepatotoxicidade

Muitos tratamentos à base de ervas têm sido responsabilizados por efeitos hepatotóxicos, em seres humanos (LEKEHAL et al., 1996), razão pela qual o potencial lesivo dos produtos naturais não deve ser subestimado (DUFOUR; ST-PIERRE, 2002).

A literatura especializada não apresenta um número importante de relatos de hepatotoxicidade induzida por plantas medicinais, mas, ao longo do tempo, tem aumentado a preocupação com os eventos adversos a elas relacionados. Dourakis et al. (2002) descreveram um caso de icterícia aguda semelhante a uma hepatite, em homem de 62 anos de idade, caucasiano, com hipercolesterolemia e hiperglicemia, após quatro meses de consumo de chá, contendo a planta medicinal *Teucrium capitatum* L. Foram excluídos outros fatores que pudessem ter causado o achado histológico de necrose hepatocelular aguda com formação de pontes. Foi suspenso o uso do referido chá, com melhora clínica consecutiva. Nove semanas após, constatou-se a normalização dos níveis séricos de bilirrubinas e aminotransferases. Os autores alertaram, então, para os cuidados de se manter, sob vigilância, a administração de certas drogas vegetais, advertindo que algumas não são tão inócuas, como em geral consideradas.

Pauwels et al. (1992) descreveram dano hepatocelular agudo e grave em duas mulheres, associado ao uso de calamêndria ou carvalho-anão (*germandrée petit chêne*), durante um a dois meses, indicado para o tratamento de redução de peso. A evolução clínica desses casos foi favorável após a interrupção do tratamento e, em um deles, houve recrudescência dos sintomas e das lesões hepáticas, subsequente à readministração dessa erva. Esses autores alertaram que, diante de alterações que denotem doença hepática sem causa aparente, deve-se investigar a ocorrência de automedicação, com produtos à base de ervas potencialmente tóxicas.

Hepatotoxicidade crônica após o uso prolongado da calamêndria também foi relatada em três casos por Ben Yahia et al. (1993). A visão desses autores sobre o potencial lesivo para o fígado de certos fitoterápicos coincide com relatos precedentes (DOURAKIS et al., 2002; PAUWELS et al., 1992). Tais eventos, ocorridos na França, culminaram com medidas proibitivas pelas autoridades de



saúde, com relação à utilização dessa erva no território francês (BEN YAHIA et al., 1993).

Há também descrições de casos de injúria hepática grave, ocorridas em Israel e na Suíça, com o uso de produtos Herbalife®, considerados como suplementos nutricionais botânicos (STICKEL, 2007).

Recentemente, vários casos de dano hepático, inclusive com desenvolvimento de hepatite fulminante, foram associados ao uso da kava ou kava-kava (*Piper methysticum* G. Forster), planta que, em algumas regiões do mundo, tem largo uso social e medicinal, de caráter essencialmente popular (RUSSMANN et al., 2001). Kraft et al. (2001) também relataram um caso de insuficiência hepática fulminante, após o uso dessa substância, em uma mulher com 60 anos de idade, que evoluiu para a realização de transplante hepático. O exame histológico revelou necrose hepatocelular, panlobular, com colestase intra-hepática. Pelo quadro histológico e exclusão de outras causas, imputou-se à kava a responsabilidade da falência hepática aguda.

Diante desses relatos, o organismo *Food and Drug Administration* (FDA) publicou nos Estados Unidos um documento advertindo os consumidores sobre o risco potencial de dano hepático grave relacionado ao uso de suplementos dietéticos contendo kava, utilizada para reduzir estresse, ansiedade, tensão, insônia e sintomas da menopausa (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2002). Embora a injúria hepática tenha sido rara, o FDA considerou necessário informar aos consumidores sobre esse risco potencial.

Na Alemanha, em 2002, compostos contendo kava foram proibidos pelas autoridades da farmacovigilância (SCHULZE et al., 2003) e, no mesmo ano, as do Canadá também emitiram um alerta (MILLS et al., 2004; WOOLTORTON, 2002). Esses produtos, todavia, mantiveram-se no circuito comercial, apesar da proibição e das advertências (CLOUGH, 2003; MILLS et al., 2003). A kava continua sendo vendida como fitoterápico em vários países, inclusive pela internet, com ampla propaganda (CARVALHO et al., 2005; DENNEHY, 2005).

No Brasil, as preparações fitoterápicas à base de kava, sob a forma de extratos, eram comercializadas livremente, sem prescrição médica. A partir de dados da literatura, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador nacional, inicialmente publicou, em 2001, alerta de farmacovigilância, informando a associação da kava a graves reações hepáticas, relatadas em outros países

(BRASIL, 2003). Posteriormente, editou Resolução (RE n° 356, de 28 de fevereiro de 2002, publicada no Diário Oficial em 04 de março de 2002), determinando a apreensão, no território nacional, de produtos farmacêuticos derivados da kava-kava, que não possuíssem a tarja vermelha, com a indicação de “Venda sob prescrição médica”, bem como a dos que não fossem registrados na referida agência (BRASIL, 2003a).

Desde quando se passou a questionar a segurança da kava, o mundo científico tem se ocupado sobremaneira com a questão da possível hepatotoxicidade dessa substância, embora autores considerem que, quando avaliados sob rigorosa investigação, a maioria dos relatos de casos de hepatite tóxica provavelmente não foram relacionados ao seu uso (ANKE; RAMZAN, 2004).

No entanto, os relatos de casos de hepatite aguda e falência hepática requerendo até mesmo transplante hepático, após a ingestão da kava, sucederam-se (STICKEL et al., 2005) e, apesar de algumas hipóteses no que concerne aos possíveis mecanismos hepatotóxicos, não há ainda respostas satisfatórias (ANKE; RAMZAN, 2004). Reveste-se de grande importância, portanto, o estudo das possíveis ou prováveis alterações tóxicas induzidas pela kava.

Atualmente o registro dos fitoterápicos é regido por regras ou resoluções definidas por agências reguladoras. No Brasil, estas regras são detalhadas na RDC n°. 48, editada em de 16 de março de 2004 pela ANVISA, constituindo o regulamento técnico, que atualizou essas normas (BRASIL, 2007). Nesse mesmo ano, houve a publicação da resolução RE n° 90/2004 da ANVISA (BRASIL, 2004), que indicou métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica, base para o registro e renovação de registro de fitoterápicos. Além disso, o Ministério da Saúde (MS) divulgou a orientação das políticas públicas concernentes aos fitoterápicos, visando o bem estar e a segurança da população (BRASIL, 2006a).

No entanto, em 2001, quando foi publicado pela ANVISA o alerta de farmacovigilância relacionado à kava, ou seja, antes das novas regras mais atualizadas, encontravam-se sendo comercializados no mercado brasileiro 16 fitoterápicos contendo kava: LAITAN®, BIODIVA®, KAVA CUR®, KAVA KAVA FLORA MEDICINAL®, KAVA KAVA TEUTO®, CALMITON®, KAVAKAN®, KAVAZEPAM®, KAVATRON®, KAVAIN®, CALMONEX®, KAVALAC®, ANSIOPAX®, KALMINET®, SPM 100®, KAVASEDON® (BRASIL, 2003).

Uma vez que os testes toxicológicos pré-clínicos são a principal ferramenta para se avaliar a toxicidade de uma substância e inferir os seus possíveis efeitos tóxicos em seres humanos (BARROS; DAVINO, 2003), considerou-se de relevância a realização do presente estudo, com um produto à base de kava, que, embora tenha sido submetido a testes experimentais anteriormente, foi registrado no Brasil sob outra legislação, com padrões diferentes da atual.

Diante dos relatos de hepatotoxicidade associada à kava e da existência de produtos à base dessa substância à venda no Brasil, a pesquisa experimental dos seus efeitos sobre o tecido hepático e outros órgãos, com avaliação de lesões celulares e/ou matriciais, por meio de análise histológica e imunoistoquímica, correlacionando-as ao perfil bioquímico e hematológico em animais, poderá contribuir com a elucidação dessa questão.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico, distribuição geográfica do cultivo e papel fitoterápico de *Piper methysticum* ou kava

Trata-se de um arbusto cultivado ao longo das ilhas do Pacífico Sul, incluído no arsenal botânico, com utilidade terapêutica (Figura 1). Com provável origem na Melanésia, a kava ou kava-kava medra abundantemente no clima ensolarado das ilhas da Polinésia, sendo também prevalente na Oceania (TURNER, 1986). Pertence ao grupo das *Piperaceae* (YAMADA et al., 2003).



**Figura 1:** *Piper methysticum* ou kava

Fonte: [http://www.erowid.org/plants/show\\_image.php?i=kava/piper\\_methysticum1.jpg](http://www.erowid.org/plants/show_image.php?i=kava/piper_methysticum1.jpg).

Acesso em: 8 de janeiro de 2008.

Usada por habitantes nativos, foi descoberta pelo homem branco durante as primeiras viagens dos europeus às Ilhas do Pacífico, no século XVIII. Nessa época,

o consumo do vegetal tinha um papel central nas cerimônias religiosas e na vida política e social desse povo. Esse papel social era comparável ao exercido pelo mescal ou peiote (*Lophophora williamsii*) em tribos nativas americanas, pelas folhas de cocaína no Peru e ainda pelo ópio no Oriente Médio e Ásia (SINGH, 1992; TURNER, 1986).

A primeira descrição da planta foi feita por botânicos suecos, durante a primeira expedição do capitão James Cook ao sul do Pacífico, em 1768-1771 (BILIA et al., 2004). Existem relatos escritos desde 1772 que evidenciam o uso da kava pelos habitantes das ilhas do Pacífico e, em vários países europeus, encontravam-se preparações contendo o seu extrato seco (NOWAKOWSKA et al., 1998).

Embora a utilização tenha sido reduzida pelas ações proibitivas da colonização missionária, bem como pela introdução do etilismo naquelas sociedades nativas, a kava ainda hoje é consumida, principalmente no oeste da Polinésia, tanto por ocasião de cerimônias formais, como de modo corriqueiro, sobretudo pelo interesse renovado de manutenção das tradições étnicas (SINGH, 1992).

Com efeito relaxante e narcótico, essa tradicional e antiga bebida, de cor marrom e sabor amargo, era preparada a partir dos seus rizomas, constituindo um hábito desfrutado, durante séculos, entre os nativos daquelas ilhas, por ocasião de reuniões sociais e culturais (SCHULZ et al., 1998).

A kava tem ainda um importante papel na medicina nas ilhas de Fiji, Tonga e Samoa, sendo usada em tratamentos como calmante e relaxante, bem como no combate à fadiga (LEBOT et al., 1992). Seus especiais componentes antidepressivos promoviam estados de euforia e paz. Assim, suplementos contendo tal erva proporcionavam relaxamento, com alívio da ansiedade e da tensão, reduzindo também sintomas do climatério, dentre outros. Ainda era considerada surpreendente para o tratamento de cefaléias, pois mantinha a mente alerta, a despeito de promover relaxamento corporal.

Acreditava-se ainda que a kava curasse sífilis e gonorréia. Para muitos habitantes, devolvia o vigor, promovia o desaparecimento de dores gástricas e curava furúnculos. Em adição ao uso do pó extraído dos rizomas, algumas pessoas também usavam a folha da erva no tratamento geral das doenças, bem como, sob a forma de macerado, para aplicações tópicas (LEBOT et al., 1992; SINGH, 1992).

A kava foi consumida, no passado, em quase todas as ilhas do Pacífico, abrangendo as áreas da Nova Guiné até o Havaí, exceto Nova Caledônia, Nova

Zelândia e a maioria das ilhas Salomão. Nos dias atuais, seu uso é visto principalmente em Samoa e Tonga e na maior parte da Melanésia, incluindo Fiji. (TURNER, 1986).

No Haváí, a kava ou *awa*, como também é chamada, foi usada desde o século XIX, pelos chefes políticos e pelos *kahunas* ou mestres, bem como pelos cidadãos comuns, objetivando, terapêuticamente, o relaxamento corporal. Ainda no passado, Tonga, Fiji e Samoa foram os maiores centros de consumo dessa erva, onde as cerimônias com a kava representaram um ritual eclético, com misto de magia e religiosidade (TURNER, 1986).

Na Europa e Estados Unidos, é vendida sob a forma de extratos padronizados, alcoólico ou cetônico, indicados para ansiedade e tensão. Na Oceania, além dessas duas indicações, propalam-se suas ações polivalentes, pois além de ser considerada sonífera, combate a fadiga, a obesidade, atua como desobstruente do trato urinário, tendo ainda propriedades antiasmáticas e anti-reumáticas. Também é usada no controle dos sintomas da menopausa e como relaxante muscular (ASSEMI, 2001; ESCHER et al., 2001).

Uma das principais publicações referente aos produtos farmacêuticos distribuídos no Brasil, o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF) 2005/06, lista os seguintes produtos contendo kava: Kavakan®, em cápsulas de 150 miligramas (mg), contendo 235 mg de extrato seco de *Piper methysticum* F., com 30% de kavalactonas, equivalente a 70 mg de kavalactonas; Kavasedon®, em cápsulas com 50 mg, Ansiopax®, em cápsulas com 250 mg e Laitan®, em cápsulas contendo 100 mg de extrato seco WS 1490 de *Piper methysticum*, equivalente a 70 mg de kava-kava (DEF, 2005).

Laitan® é um produto fabricado na Alemanha, pelo laboratório farmacêutico Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., importado e distribuído no Brasil pelo laboratório ALTANAPharma, que solicitou e obteve cancelamento do registro de comercialização do mesmo junto à ANVISA, em fevereiro de 2006 (BRASIL, 2006).

No DEF 2006/07, constam Kavakan®, Kavasedon® e Ansiopax®, com as mesmas composições acima discriminadas que constavam no DEF 2005/06 e ainda Kavahexal®, sob a forma de comprimidos de 400 mg de extrato seco de *Piper methysticum* (DEF, 2006).

O banco de dados mundial sobre plantas medicinais com sede na Universidade de Chicago / EUA, *Natural Products Alert* (NAPRALERT) disponibiliza

as referências dos estudos realizados sobre as atividades farmacológicas e tóxicas da kava.

## **2.2 Uso terapêutico da kava e ações farmacológicas sistêmicas**

A indicação clínica dos medicamentos fitoterápicos, à base do extrato seco e padronizado da kava, é para o tratamento de ansiedade, tensão e agitação. A dose terapêutica usual é de 120 a 240 mg diários de kavalactonas, via oral (WHEATLEY, 2005). Quanto ao tempo adequado de utilização, há estudos clínicos controlados realizados durante quatro, cinco, oito e 24 semanas e há sugestão de uso durante 1 a 8 semanas, recomendando-se que não sejam ultrapassados três meses de tratamento (LEHRL, 2004; MALSCH; KIESER, 2001; WITTE et al., 2005).

Vários estudos sugerem uma ação eficaz da kava como substância ansiolítica, tanto quanto os benzodiazepínicos. É o único fitoterápico com estudos clínicos controlados que corroboram sua eficácia no tratamento da ansiedade (ANDREATINI et al., 2001). Os ensaios clínicos demonstram propriedades sedativas e hipnóticas, sem provocar alterações no estado de alerta ou na coordenação motora (ANDREATINI et al., 2001; BILIA et al., 2002; CONNOR; DAVIDSON, 2002; LEHRL, 2004).

Os rizomas ou raízes laterais da erva contêm um percentual variável de 3 a 20% de resinas, apresentando compostos farmacologicamente ativos, conhecidos como kavapironas (alfapironas) ou kavalactonas, conforme demonstrado por H. J. Meyer (SINGH, 1992). As kavapironas são consideradas responsáveis por sua atividade farmacológica, tanto em humanos, quanto em animais (PITTLER; ERNST, 2000; PITTLER; ERNST, 2003; SIMÉONI; LEBOT, 2002; UEBELHACK et al., 1998).

Há 18 diferentes kavalactonas, porém as principais são: metisticina (M), diidrometisticina (DHM), kavaína, também denominada kavina ou kawina (Ka), diidro-kavaína, dimetoxiangonina (DMY) e iangonina (Y), correspondendo a 96% do extrato orgânico (LEBOT; LEVESQUE, 1989; SCHULZ et al., 1998; SINGH, 1992). A absorção no trato gastrointestinal é rápida, e em ratos, após ingestão oral, ocorre absorção em 30 minutos, com meia-vida plasmática variando de 90 minutos a 2-3 horas (SCHULZ, 1998).

É também metabolizada no fígado pelo sistema enzimático citocromo P450 (CYP450). A eliminação das kavalactonas se dá através da urina e das fezes, sendo sua absorção melhor a partir de extratos especialmente preparados do que da forma bruta da planta (KELEDJIAN et al., 1988).

Embora seja conhecido que o extrato da kava tem propriedades ansiolíticas, desconhece-se se esses efeitos são devidos ao conteúdo total dos seus constituintes primários, as kavalactonas, ou por efeito de um ou mais desses constituintes isolados (FELTENSTEIN et al., 2003).

Para tentar responder a essa questão, Feltenstein et al. (2003), administraram preparados contendo extrato de *Piper methysticum* em pintos com 8 dias de idade. Um grupo recebeu o extrato com o conteúdo total de kavalactonas e outros grupos receberam o extrato com as kavalactonas com diferentes concentrações de suas frações. O grupo controle foi constituído por animais pareados, aos quais foi administrado clordiazepóxido, na dose de 5 mg/kg.

Nesse experimento, foi demonstrado que, quando comparados ao clordiazepóxido, tanto o extrato com o conteúdo global, como com a fração das kavalactonas com maior concentração de dihidrokavaína, tinham efeitos ansiolíticos equivalentes, sugerindo que esse constituinte seja suficiente para conferir ao *Piper methysticum* suas propriedades ansiolíticas (FELTENSTEIN et al., 2003).

Em animais de laboratório, as kavalactonas induzem efeitos tranqüilizante, hipnótico, relaxante da musculatura esquelética e lisa, além de ação espasmolítica. Seu efeito hipnótico tem início rápido e a duração da sua ação é considerada adequada, provocando apenas mínimos efeitos matinais (WHEATLEY, 2005).

As kavapironas têm efeitos diferentes nos neurotransmissores e nos seus receptores. Os mecanismos que explicam a ação farmacológica provavelmente envolvem redução da excitabilidade do sistema límbico (do hipocampo e sobretudo do complexo amigdaliano), além de outras estruturas desse importante sistema responsável pela regulação das emoções (WALDEN et al., 1997). Estudos demonstram que esses compostos ativos ligam-se aos receptores gama-aminobutíricos (GABA), inibem a recaptação de norepinefrina, antagonizam a monoaminoxidase B e diminuem a liberação de glutamato, sem afetar os receptores opióides (ASSEMI, 2001).

Não parecem ligar-se diretamente aos receptores benzodiazepínicos. Seu efeito sonífero, na ausência de sedação, é provavelmente explicado por essa ação



no sistema nervoso central (SNC), bem como o surgimento de sensações de prazer, na medida em que os sentimentos de medo e ira são minimizados. Foi demonstrado, em experimentos com gatos, que as estruturas límbicas, particularmente o complexo amigdaliano representam o local preferencial de ação, tanto da D,L-kavaína como do extrato total da kava. Mediante a participação dessas estruturas na modulação dos processos emocionais, é possível explicar a promoção do sono pela kava, mesmo na ausência de sedação, por sua ação nesses sítios (HOLM et al., 1991).

Postula-se que as propriedades farmacológicas da kava incluam bloqueio de canais de sódio operados por voltagem, aumento da ligação aos receptores GABA tipo A, diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios por bloqueio de canais de cálcio, diminuição da recaptção neuronal de noradrenalina, inibição reversível de monoaminoxidase B e supressão da síntese do ecosanóide tromboxano A<sub>2</sub>, que antagoniza os receptores GABA A (CLOUATRE, 2004). Embora se sugira que a kava seja um antagonista da dopamina, os dados disponíveis são inconclusivos (STEVINSON et al., 2002).

Distúrbios do sono associados à ansiedade não psicótica podem ser tratados com o extrato da kava (LEHRL, 2004). Foi sugerido também que a kava pode ser útil no tratamento de epilepsias, distúrbio bipolar, depressão e ansiedade, condições caracterizadas por excitabilidade celular aumentada (GRUNZE; WALDER, 1999).

Embora também tenha sido proposto, por evidências experimentais, que esses efeitos ansiolíticos e de sedação ocorram porque as kavalactonas atuam sobre receptores GABA do hipocampo e núcleos amigdalianos (BOONEN; HABERLEIN, 1998; ERNST, 2002; JUSSOFIE et al., 1994), sua baixa atividade sobre tais receptores sugerem que talvez este não seja o mecanismo principal de produção do efeito ansiolítico. Tal efeito estaria mais relacionado à propriedade bloqueadora de recaptção de norepinefrina, conforme demonstrado *in vitro* (SEITZ, 1997; SCHULZ et al., 1998).

A metisticina e a kavaína são inibidores de canais de sódio operados por voltagem em neurônios de ratos (MAGURA et al., 1997). Evidências sugerem efeito serotoninérgico e antagonista de canais de cálcio da kavaína, porém a ação dessa kavalactona é heterogênea, tendo predominantemente efeito anti-excitatório (GRUNZE; WALDER, 1999).

Dinh et al. (2001), utilizando extratos das folhas e raízes da kava para testar, *in vitro*, a afinidade das kavapironas aos receptores do SNC, concluíram que ambos têm ação inibitória potente sobre a ligação com receptores GABA A, opióides  $\mu$  e  $\delta$  (mu e delta), de dopamina D<sub>2</sub>, de histamina (H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>), serotonina (5HT<sub>6</sub> e 5HT<sub>7</sub>) e de benzodiazepínicos, embora maior potência inibitória tenha ocorrido com o extrato das folhas.

Grunze et al. (2001) sugerem que as kavapironas também atuam nos receptores da serotonina, pois têm efeitos aditivos à ipsapirona, substância ansiolítica agonista de receptores 5HT<sub>1A</sub>, o que provavelmente contribui para seus efeitos ansiolíticos e indutores do sono. Além disso, a inibição de canais de sódio pode contribuir com suas propriedades antiepilépticas. As lactonas kavaína e metisticina apresentam propriedades anticonvulsivantes, com ação mediada por receptores de canal de cálcio. Também o fato de antagonizar canais de cálcio tipo L e agir como um modulador positivo de correntes de potássio, pode ter importância na estabilização do humor. Propõe-se ainda que a inibição de dopamina ou norepinefrina possa ter um papel na atividade farmacológica de *Piper methysticum*.

Martin et al. (2002), baseando-se em pesquisas recentes indicando que a kavaína bloqueia canais iônicos no tecido neural, relaxa o íleo e as vias aéreas pré-contráidas, decidiram investigar se esse composto alteraria a função do músculo liso vascular. Para tanto, pré-contráiram, com fenilefrina, anéis de aorta torácica de rato Sprague-Dawley e os submeteram a banhos com a kavaína em diferentes concentrações. Demonstraram que houve relaxamento desses anéis e que, no entanto, não houve atenuação da contração quando a solução não continha cálcio, indicando que a sinalização intracelular provavelmente não havia sido afetada.

A kavaína também não atenuou a contração provocada pela adição de cálcio ao tecido despolarizado. Nos anéis pré-tratados com nifedipina, bloqueador seletivo de canais de cálcio tipo L, o relaxamento mediado pela kavaína foi inibido. Já nos anéis previamente contraídos com um ativador de canal de cálcio tipo L, a kavaína induziu um relaxamento completo, que dependeu da concentração utilizada. Esses dados sugerem que a kavaína altera a contração do músculo liso da parede vascular, provavelmente inibindo canais de cálcio (MARTIN, 2002).

Considera-se a kava e, sobretudo, os seus constituintes metisticina e dihidrometisticina, como substâncias com atividade neuroprotetora. Backhauss e Krieglstein (1992) provocaram isquemia cerebral focal em experimento com

roedores, que receberam o extrato da kava por via oral, na dose de 150 mg/kg, 1 hora antes da isquemia. Compararam-nos a outro grupo em que a isquemia foi induzida após administração do anticonvulsivante memantina. Os efeitos da kava foram comparáveis aos produzidos pela memantina, pois ambas reduziram significativamente a área infartada.

Postula-se que a neuroproteção observada possa ser consequência do antagonismo aos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), que são os receptores do neurotransmissor glutamato, importante substância transmissora de excitação cerebral (SCHELOSKY et al., 1995; SCHULZ et al., 1998).

Efeito anestésico local pela kavaína é evidenciado, em humanos, através da mastigação de raízes de kava-kava, que, igualmente, inibem os canais de sódio e cálcio (GLEITZ et al., 1995; MAGURA et al., 1997). Analgesia e também redução da agregação plaquetária são efeitos atribuídos, respectivamente, ao bloqueio da atividade das enzimas cicloxigenase (COX) e tromboxano-sintetase (GLEITZ et al., 1997).

Atividade antioxidante moderada em alguns compostos da kava, com inibição de enzimas cicloxigenase I (COX-I) e cicloxigenase II (COX-II), foi relatada por Wu et al. (2002).

Em relação à incidência de câncer nas ilhas do Pacífico, resultados de estudo de Steiner (2000), demonstraram que há uma correlação inversa entre esta e o consumo de kava. Investigando as possíveis razões para as baixas taxas de incidência de câncer nas ilhas Fiji, quando comparadas às de outras ilhas do Pacífico, Yamada et al. (2003) isolaram as kavalactonas e avaliaram *in vitro* a sua atividade em relação ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Somente a dihidrokavaína apresentou atividade inibitória contra esse fator, mas com baixa atividade nas células. Foi sugerido que, por inibir CYP1A2, o consumo de kava poderia ter efeito protetor contra carcinogênicos ambientais (RUSSMANN et al., 2005).

Uebelhack et al. (2003) investigaram o efeito *in vitro* do extrato da kava e de kavapironas sintéticas puras na monoaminoxidase B (MAO-B) plaquetária. Demonstraram que o extrato da kava é um inibidor da MAO-B, tanto em plaquetas intactas, como nas lisadas em homogenados e que as diferenças estruturais entre as kavapironas levam a diferenças na potência da inibição. Afirmaram ainda que as duas kavapironas mais potentes foram dimetoxiangonina e metisticina, seguidas de

yangonina, dihidrometisticina, dihidrokavaína e kavaína. Sugeriram que essa inibição possa ser um mecanismo importante para sua atividade psicotrópica.

Pittler e Ernst (2000), em revisão sistemática e metanálise de sete estudos controlados publicados na literatura, concluíram que, em todos eles, foi demonstrada a superioridade da kava no tratamento da ansiedade em relação ao placebo. Em três estudos, houve diferença significativa na redução do escore da escala Hamilton ou escala HAM-A de ansiedade (*Hamilton Rating Scale for Anxiety*) com o uso da kava, quando comparado com o uso do placebo. Essa escala, na qual sinais e sintomas são pontuados, produzindo um escore final, é utilizada, entre outras, para avaliação da ansiedade (BEAUBRUN; GRAY, 2000; LEHRI, 2004; OLIVEIRA; SISTO, 2004).

Esses mesmos autores realizaram, em 2003, metanálise de 11 estudos randomizados, duplo-cego e placebo-controle envolvendo 645 participantes, que utilizaram o extrato da erva como monoterapia para o tratamento da ansiedade. Com base nos dados encontrados, concluíram mais uma vez que, quando comparado com o placebo, o extrato da kava é um tratamento sintomático efetivo para a ansiedade (PITTLER; ERNST, 2003).

Os efeitos colaterais relatados nesses ensaios clínicos revisados nessa metanálise foram moderados, transitórios e pouco freqüentes, justificando o interesse em opções terapêuticas como a kava, devido aos efeitos colaterais associados ao uso dos ansiolíticos disponíveis, como os benzodiazepínicos (SCHULZ et al., 1998). Os dados resultantes sugeriram que a kava é relativamente segura para tratamentos de curta duração (1 a 24 semanas), embora outras pesquisas sejam necessárias, particularmente em relação à segurança do uso prolongado deste tratamento (PITTLER; ERNST, 2003).

Apesar da maioria dos estudos demonstrarem que a kava é eficaz no tratamento da ansiedade e da insônia, alguns autores questionam sua eficácia e o uso terapêutico dessa substância.

Jacobs et al. (2005) consideram que são poucas as evidências dessa eficácia. Esses autores realizaram ensaio controlado com 391 indivíduos com diagnóstico dessas duas condições e seus achados contrapõem-se às conclusões de Pittler e Ernst (2000) e às de Pittler e Ernst (2003), uma vez que os indivíduos utilizando o extrato da kava (100 mg três vezes ao dia, via oral, por duas e quatro semanas), não demonstraram diferenças significantes nas escalas de avaliação de

ansiedade e tensão, comparados com aqueles tratados com placebo pelo mesmo período.

Esses resultados deram, pois, suporte ao questionamento de Jacobs et al. (2005) quanto a real eficácia terapêutica da kava, apesar do volume de trabalhos na literatura, que demonstram ser essa substância efetivamente ansiolítica.

Também Connor et al. (2006) consideram que os resultados de três estudos com a kava, controlados com placebo e venlafaxina, não dão suporte ao uso terapêutico da kava no transtorno de ansiedade generalizada.

Recente revisão crítica, abordando o uso terapêutico de 27 produtos botânicos e fórmulas à base de ervas, considera que ainda são necessários mais estudos quanto ao uso da kava no tratamento da fobia, pânico e desordens obsessivo-compulsivas (SARRIS, 2007).

### **2.3 Metabolismo hepático das kavapironas**

A metabolização das drogas é um fenômeno dinâmico, realizada principalmente pelo CYP450, constituído por grande variedade de isoenzimas, localizadas nos microssomas do retículo endoplasmático liso, no lado citoplasmático da membrana celular, particularmente nos hepatócitos (SOUZA et al., 2006). Essas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de muitas drogas, estando agrupadas em famílias (CYP1-10) e subfamílias denominadas por letras e números. A maioria das drogas e toxinas é metabolizada pela subfamília CYP3A4 (WILKINSON, 2005).

De acordo com Shen (1997), a via bioquímica para detoxicação das kavalactonas é o CYP450, e, se elas têm efeito psicoativo, também interagem com medicações concomitantes, envolvendo provavelmente inibição dessas vias enzimáticas. As kavapironas da *Piper methysticum* G. Forst foram identificadas como sendo substâncias inibidoras das enzimas do CYP450, sobretudo do CYP3A4, que, nos humanos, metaboliza a maioria dos substratos, podendo ocorrer uma variação na sua expressão, quando há exposição a xenobióticos (UNGER et al., 2002).

Mathews et al. (2002) investigaram a inibição desse sistema enzimático microssomial do fígado humano, pelo extrato da kava e pelas kavalactonas

identificadas individualmente. Quando da incubação de microsomas hepáticos humanos, o extrato total da kava causou diminuição da atividade do CYP450, que variou conforme sua concentração. Houve inibição das atividades do CYP1A2 (56% de inibição), 2C9 (92%), 2C19 (86%), 2D6 (73%), 3A4 (78%), e do 4A9/11 (65%), mas as atividades do CYP2A6, 2C8 e 2E1 não foram afetadas.

As atividades do CYP2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 também foram avaliadas após incubação de microsomas hepáticos humanos com as principais kavalactonas isoladas - a kavaína (Ka), a dimetoxiangonina (DMY), a metisticina (M), a dehidrometisticina (DHM), e com a dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). A Ka não inibiu estas enzimas, mas houve inibição do CYP2C9 por DMY (42%), M (58%), e DHM (69%), além da inibição do 2C19 por DHM (76%), do 2D6 por M (44%) e do 3A4 por DMY (40%), M (27%) e DHM (54%). Esses dados indicam que a kava tem um elevado potencial para causar interação de drogas, por meio da inibição das enzimas do CYP450, responsáveis pelo metabolismo da maioria dos agentes terapêuticos (MATHEWS et al., 2002).

Zou et al. (2002) incubaram, *in vitro*, constituintes de 25 produtos à base de ervas com isoenzimas do CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4). Os constituintes da kava avaliados (dimetoxiangonina, dihidrometisticina e metisticina) demonstraram ser potentes inibidores das isoenzimas 1A2 e 2C19.

Raucy (2003) avaliou a ativação do CYP3A4 por indutores protótipos (fenitoína, fenobarbital e omeprazol), flavonóides dietéticos (quercetina, resveratrol e curcumin) e produtos botânicos (extratos de sementes de uva, ginseng, silimarina e kava-kava), determinando a produção do RNA mensageiro (RNAm), em culturas primárias de hepatócitos de 17 indivíduos. Os produtos botânicos testados produziram maior quantidade de RNAm, demonstrando maior expressão de CYP3A4 que os controles. Apenas a kava produziu aumento de atividade da enzima luciferase, sugerindo que esta requer receptores de pregnanos X (PXR), para mediar a indução de CYP3A4 (RAUCY, 2003).

Recentemente, Russmann et al. (2005), avaliando a taxa metabólica de cinco diferentes drogas, pela determinação da atividade de várias enzimas do CYP450, sugeriram que ocorre inibição de CYP1A2 em consumidores freqüentes do extrato aquoso tradicional da kava, em Nova Caledônia.

## 2.4 Uso terapêutico de fitoterápicos e efeitos adversos

Os efeitos adversos e as interações medicamentosas associadas ao uso de produtos botânicos são ainda desconhecidos, pois, diferentemente das drogas convencionais, não há regulamentação relacionada à pureza e à potência dos seus constituintes, havendo maior probabilidade de ocorrerem efeitos adversos (CUPP, 1999).

Em clínicas de Hepatologia nos Estados Unidos, cerca de 20 a 30% dos pacientes com doenças hepáticas referem uso desses produtos (STEDMAN, 2002). Apesar do número crescente de americanos adeptos desse tipo de terapêutica, com fins inclusive preventivos, não se tem adotados rigorosos procedimentos científicos exigidos pelo organismo regulador daquele país, o FDA, para aprovação antes de serem comercializados (CUPP, 1999). Por essa razão, Cupp (1999), considera que, produtos que não forem adequadamente testados, não devem ser comercializados para o tratamento, cura ou prevenção de doença. Também sugere que os profissionais incluam na anamnese, questões sobre o uso dessas substâncias.

Existem muitas publicações sobre a medicina alternativa e complementar. Haller et al. (2002) afirmam que houve uma proliferação de textos de referência médica que pretendem orientar os profissionais de saúde, cujos pacientes utilizam terapias à base de ervas. Para avaliar esses textos, fizeram uma revisão sistemática dos trabalhos publicados na base de dados *Medline* entre 1996 e 2000 e identificaram os relatos de potenciais eventos adversos relacionados às 12 ervas, definidas como suplementos dietéticos botânicos, mais freqüentemente referidas nos atendimentos do ano de 1998, pelo *California Poison Control System* - centro toxicológico de São Francisco, Estados Unidos. Concluíram que, embora tenha havido diferenças nos textos de referência, as informações toxicológicas eram insuficientes e, às vezes, incorretas, no que se refere à avaliação e manejo dos efeitos adversos provocados por esses produtos.

Segundo Marcus e Grollman (2002), enquanto as evidências de toxicidade relacionada ao uso de produtos botânicos usados como remédios se acumulam, há

uma percepção que estes são seguros, baseada no uso tradicional e não em estudos sistemáticos, cujo desenho possibilita a detecção de efeitos adversos.

Muitos produtos contêm inúmeros componentes não declarados, quantidades excessivas de substâncias, às vezes em nível tóxico e até metais pesados. Além disso, desconhece-se, na maioria das vezes, o potencial que têm de interagir com outras drogas, passando o seu uso a constituir um risco terapêutico, sobretudo em pessoas idosas, que utilizam várias medicações para doenças crônicas (MARCUS; GROLLMAN, 2002).

O uso de produtos naturais na medicina popular é milenar (CORDEIRO et al., 2005), e estes parecem ser considerados pelo público como medicamentos inócuos (MILLER, 1998; STICKEL et al., 2005).

A publicidade, empenhada em aumentar os lucros da indústria farmacêutica, é responsável por várias irregularidades no que concerne a popularização de produtos naturais, vendidos com isenção ou não de prescrição medic. Alguns desses produtos são potencialmente tóxicos, podendo promover riscos à população que os utiliza (CARVALHO, 2005).

Contrariamente à crença popular, muitos medicamentos à base de ervas podem provocar sérios riscos à saúde, ora por efeitos adversos diretos, ora por interação com outras drogas. Embora os que advoguem o seu uso argumentem que o uso tradicional evidencia a sua segurança, há muitas limitações nesse tipo de evidência (De SMET, 2002). Assim, se é fácil determinar que uma substância é tóxica quando ela provocou diversos efeitos adversos agudos em um grande número de usuários, é difícil, no entanto, reconhecer os efeitos tardios e infreqüentes. Muitas vezes, até as conseqüências sobre o embrião e o feto e os efeitos carcinogênicos são de reconhecimento pouco evidente (De SMET, 2002).

Há que se considerar ainda que, entre os indivíduos, ocorre variabilidade na resposta às drogas, que depende de múltiplos fatores, tais como os ambientais e genéticos, além de diferenças na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma dada substância pelo organismo (WILKINSON, 2005).

Embora recomende que esses medicamentos não devam ser prescritos sem evidências de eficácia e segurança baseadas em estudos rigorosos, De Smet (2002) entende que eles exercem um grande apelo para a população e que seu uso é disseminado, sendo pois, imperativo questionar o paciente sobre sua utilização,



notadamente diante de problemas de saúde inexplicáveis, obrigando também o especialista a conhecer suas indicações e os potenciais efeitos colaterais adversos.

## **2.5 Hepatotxicidade induzida por drogas**

A doença hepática induzida por drogas é o principal efeito tóxico do uso de substâncias com fins terapêuticos (BONKOVSKY et al., 2006). Nos Estados Unidos, em torno de 0,1% a 3% de todas as internações hospitalares são relacionadas à toxicidade por drogas e se suspeita ainda que muitos casos deixem de ser diagnosticados (HARTLEB et al., 2002). Também naquele país, mais de dois milhões de casos de reações adversas a drogas ocorrem anualmente e o número de óbitos relacionados a essas reações atinge a cifra de cem mil mortes por ano (WILKINSON, 2005).

Sendo o fígado o principal órgão de metabolização de praticamente todas as drogas, potencialmente pode ocorrer lesão hepática secundária ao uso da maioria das substâncias utilizadas com fins terapêuticos (HARTLEB et al., 2002).

Hepatotxicidade é definida como a injúria ao fígado causada pela exposição à droga ou a outro agente não infeccioso, associada a prejuízo na função hepática. Quando há alteração na função do órgão é que se manifestam sintomas e se estabelece doença clinicamente significativa (NAVARRO; SENIOR, 2006).

Considera-se que, frente à grande quantidade de drogas prescritas, o número de efeitos adversos que atingem o fígado é relativamente pequeno. Na maioria dos casos, a toxicidade hepática por drogas manifesta-se como hepatite aguda, sendo esta freqüentemente reversível e de evolução benigna. No entanto, o espectro da doença hepática induzida por drogas pode variar de alterações bioquímicas moderadas à falência hepática aguda (HARTLEB et al., 2002).

Reações a drogas podem ser agudas, manifestando-se como hepatite aguda com necrose hepatocelular, doença colestática ou ainda hepatite aguda colestática. Podem também ser crônicas, formas menos comuns, que incluem hepatite crônica, colestase crônica, doença hepática gordurosa com esteato-hepatite não alcoólica, fibrose, cirrose, inflamação granulomatosa, doença venooclusiva, peliose hepática e neoplasias benigna ou maligna (KAPLOWITZ, 2001). Essas reações podem ser previsíveis ou intrínsecas, ocorrendo virtualmente em qualquer indivíduo, que utilize

uma superdosagem de uma substância como, por exemplo, o acetaminofen. Podem também ser imprevisíveis ou idiossincrásicas, estas, dependendo da droga, acometendo 0,01% a 1% dos indivíduos a ela expostos (KAPLOWITZ, 2001). As reações idiossincrásicas podem cursar ou não com manifestações imunoalérgicas, em função da modulação da resposta tissular à injúria pelos fatores genéticos do indivíduo (BONKOVSKY et al., 2006).

Um dos maiores problemas relacionados à avaliação da doença hepática induzida por drogas é a atribuição de causalidade. Existem numerosas causas potenciais de lesão hepática, mas não há um teste patognomônico na doença hepática induzida por drogas (BONKOVSKY et al., 2006). Na maioria dos casos, o diagnóstico é baseado em evidências circunstanciais. Vários critérios são utilizados na prática clínica: exclusão de outras causas, melhora do quadro após suspensão da droga, fatores de risco associados. Embora não exista um padrão ouro para o diagnóstico, escalas para avaliação de causalidade podem ser utilizadas, facilitando a interpretação clínica dos achados.

A escala de Naranjo estima a probabilidade de uma reação adversa ter sido causada por uma dada droga (NARANJO et al., 1981). Frequentemente utiliza-se também a do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS), ou outra validada por Maria e Vitorino (KAPLOWITZ, 2001).

Essas escalas subtraem ou adicionam pontos a partir de elementos da história clínica, tais como o tempo de aparecimento da reação e o uso da substância; a evolução após a suspensão da droga suspeita, presença ou ausência de fatores de risco, além de considerar a exclusão de outras causas não relacionadas a drogas (BONKOVSKY et al., 2006).

Recentemente, foi proposto um novo instrumento de avaliação, a *Drug Interaction Probability Scale* (DIPS), para quando, na prática clínica, as reações adversas envolverem duas drogas, a que é afetada – a droga objeto, e a que causa a mudança na droga objeto – a droga precipitante, pois se considera que as escalas existentes não são apropriadas para avaliar eventos adversos relacionados ao uso concomitante de substâncias. Essa nova ferramenta exige, para sua aplicação, o conhecimento das propriedades farmacológicas das substâncias em tela (HORN et al., 2007).

Aproximadamente 1000 drogas já foram implicadas como agentes causais de doença hepática e, nos Estados Unidos, a toxicidade hepática por drogas é a

causa mais comum de falência hepática aguda, variando de 1/3 a metade dos casos dessa condição que ocorrem naquele país. Representa um desafio diagnóstico e terapêutico, pois, embora a doença hepática assim induzida possa mimetizar todas as formas de doença hepatobiliar aguda e crônica, a manifestação clínica mais freqüente é a ocorrência de hepatite aguda icterícia ou de doença hepática colestática (KAPLOWITZ, 2003).

A freqüência com que estas reações adversas ocorrem tornou-se um desafio, não só para a indústria farmacêutica, mas para os órgãos regulamentadores da comercialização de produtos terapêuticos, uma vez que o potencial tóxico de algumas drogas não é evidenciado em estudos pré-clínicos, nem nas fases 1 a 3 de estudos clínicos (KAPLOWITZ, 2003).

As manifestações clínicas mais freqüentes da hepatite aguda são de sintomas sistêmicos, icterícia, elevação de aminotransferases, sobretudo da alanino aminotransferase (ALT), e da fosfatase alcalina (FA), cerca de cinco vezes o limite superior de normalidade. No entanto, eventualmente, em pacientes previamente saudáveis, ALT e aspartato aminotransferase (AST) podem atingir níveis 30 vezes maiores que o limite superior de normalidade, sem ocorrer sintomas ou sinais (AMORIM et al., 2005). A ingestão intencional de doses muito elevadas de acetaminofen pode provocar níveis extremamente elevados de aminotransferases (LEE, 2003). Em casos mais graves de toxicidade hepática, pode ocorrer coagulopatia e encefalopatia, indicativos de falência hepática aguda, sendo necessário o transplante de fígado.

Quando a toxicidade se apresenta como doença colestática, ocorre elevação da fosfatase alcalina e prurido, sendo esse quadro de resolução mais lenta e, em raras vezes, ocasionando doença biliar ductal e cirrose biliar. Pode ainda ocorrer um padrão misto de agressão, em que a hepatite é atípica (KAPLOWITZ, 2003).

A incidência destes eventos adversos não é bem conhecida, no entanto, relata-se que 5% das falências hepáticas induzidas por drogas devem-se ao uso de fitoterápicos (RUSSO et al., 2004).

O potencial de risco do uso medicinal de ervas também ainda não foi bem investigado, considerando-se um desafio para o futuro a pesquisa sistemática nessa área. Apesar de várias ervas medicinais isoladas ou em preparações combinadas serem associadas à ocorrência de hepatotoxicidade, muitas vezes uma relação causal pode não ser bem estabelecida (ERNST; PITTLER, 2003). Há casos em que

os constituintes dos preparados medicinais à base de ervas são considerados a causa do dano hepático, porém em outros, a interação entre a erva e outras drogas, a contaminação e/ou adulteração são responsabilizados pela toxicidade hepática (PITTLER; ERNST, 2003a).

Devido à ampla distribuição e uso de inúmeras preparações botânicas não só prescritas, mas de consumo decorrente de auto-medicação, Larrey (1994) sugere que, tanto os consumidores como os profissionais de saúde devem atentar para o fato delas não serem destituídas de risco, mantendo-se vigilantes em relação à sua potencial hepatotoxicidade.

De acordo com Souza (2003), o Brasil é país de flora abundante e o uso popular de ervas medicinais vem acarretando um aumento na incidência de doença hepática induzida por essas ervas, às vezes com evolução para o óbito, sendo, no entanto, de difícil comprovação a relação causa-efeito. Devido à inexistência de estudos epidemiológicos nacionais, as características clínicas da doença hepática induzida por drogas no nosso país restringem-se a trabalhos isolados ou a estudos prospectivos em patologias específicas, como as drogas antituberculose. Esse autor avaliou os casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal em Juiz de Fora, Minas Gerais, no período compreendido entre 1995 e 2003, com diagnóstico de doença hepática induzida por drogas. Registrou 60 casos, com predominância do sexo feminino (55%), sendo a média de idade  $54,4 \pm 18,6$  (20 a 88) anos. As manifestações de doença hepática incidiram principalmente nos pacientes acima de 45 anos e a icterícia foi o dado clínico mais importante, ocorrendo em 61,66% dos pacientes. Encontrou sete casos em que o surgimento da doença foi relacionado ao uso de plantas medicinais como sacaca, chá de dragão, chá de erva cavalinha, gengibre, porangaba e confrei.

Adicionalmente, Blendis (2005), aplicando questionário a indivíduos submetidos a transplante de fígado, encontrou, dentre 290 pacientes, 156 (54%) que admitiram fazer uso de produtos não prescritos. Dentre estes, 101 tomavam vitaminas continuamente e 55 faziam uso concomitante de vitaminas e fitoterápicos. A partir dessa constatação, considerou que a ocorrência de interações entre outras drogas e fitoterápicos é uma questão muito importante, sugerindo que as equipes de transplante hepático devam questionar detalhadamente se os pacientes usam vitaminas e/ou fitoterápicos e os educar sobre os riscos potenciais desse consumo.

Além disso, recomenda a extensão desse cuidado a todos os profissionais de saúde, o que também já propunha Wooltorton (2002).

Avorn (2006), também sugere que se deve realizar e publicar estudos relacionados à segurança das drogas, discutindo-os em conferências sobre riscos e benefícios quando do uso de substâncias com fins terapêuticos.

## **2.6 Toxicidade hepática relacionada ao uso da kava**

A kava é considerada potencialmente hepatotóxica (De SMET, 2002), mas o mecanismo ou mecanismos exatos pelos quais pode induzir lesão hepática não está bem estabelecido, além do que, não se pode precisar se seus efeitos hepatotóxicos são maiores que os dos ansiolíticos convencionais (ERNST, 2002; STRADER; SEEF, 2006).

Conhecem-se três mecanismos possíveis pelos quais as kavalactonas podem provocar hepatotoxicidade: inibição do CYP450, redução do conteúdo de glutathione (GSH) no fígado e, mais remotamente, inibição da atividade da enzima cicloxigenase (CLOUATRE, 2004; JOHNSON et al., 2003; WHITTON et al., 2003). Além disso, como a interação entre muitas drogas resulta da inibição ou indução de enzimas do CYP450, a kava tem potencial para ocasionar efeitos adversos, pois aumenta a interação entre drogas, ao promover inibição dessas enzimas, responsáveis pelo metabolismo de muitas substâncias (MATHEWS et al., 2002; WILKINSON, 2005).

São vários os relatos de ocorrência de hepatotoxicidade associada ao uso da kava. Segundo Haller et al. (2002), ela encontra-se entre as 12 ervas - definidas como suplementos dietéticos botânicos - mais freqüentemente referidas nos atendimentos do ano de 1998 pelo centro toxicológico de São Francisco, o *California Poison Control System*.

No entanto, as informações disponíveis atualmente sobre a toxicidade das kavapironas são ainda obscuras. Apesar da probabilidade das preparações sob a forma de extrato etanólico ou acetônico da kava provocarem hepatotoxicidade grave, é escassa a documentação referente aos casos relatados. Quando se avaliam os poucos casos bem documentados de hepatotoxicidade na Alemanha e na Suíça, um mecanismo idiossincrático, imunologicamente mediado, apresenta-se como o mais

provável, especialmente com o uso em doses elevadas, enquanto que o mecanismo tóxico direto parece ser bem menos provável (SCHULZE et al., 2003).

A frequência com que ocorre hepatotoxicidade também é desconhecida (MOULDS; MALANI, 2003). Um cálculo da incidência com base em relatos de casos, indica que a hepatotoxicidade relacionada à kava ocorre em 0,008 casos por milhão de doses diárias, o que significa um risco extremamente baixo (TESCHKE et al., 2003; THOMSEN et al., 2004). As primeiras publicações relacionando o consumo da kava à hepatotoxicidade, datam de 1988, em observações em aborígenes (MATHEWS et al., 1988). Desde então, sucederam-se trabalhos sugerindo esta associação.

Cairney et al. (2003a), avaliando indivíduos que haviam consumido 205 gramas de pó contendo kava, cerca de 150 vezes a dose para uso clínico, depararam-se com elevação de enzimas hepáticas. Isso os fez considerar que esse consumo representa um aumento no risco potencial de ocorrer dano hepático fatal.

Humberston et al. (2003), relataram caso de paciente com 14 anos de idade, previamente saudável, que foi submetida a transplante hepático, devido a falência hepática, com necrose hepatocelular compatível com hepatite química e sem nenhuma outra causa aparente capaz de provocar o quadro, além do consumo de produto contendo kava, durante os quatro meses anteriores. Sugeriram então, que os clínicos estejam atentos não só ao potencial tóxico de produtos à base de ervas, inquerindo a respeito do seu uso em casos de dano hepático inexplicável, mas também à possibilidade de ocorrer hepatotoxicidade induzida pela kava.

Gow et al. (2003) descreveram o caso de uma mulher de 56 anos que evoluiu para óbito por insuficiência hepática aguda, que foi associada ao uso de uma preparação contendo 60 mg de *Piper methysticum*, *Passiflora incarnata*, 50 mg e *Scutellaria lateriflora*, 100 mg. No entanto, na avaliação de Thomsen et al. (2004), a hepatotoxicidade do referido caso poderia ter sido causada por contaminantes do preparado ou até mesmo pelo cromo contido em suplemento mineral que também estava sendo consumido pela paciente.

Stickel et al. (2003), utilizando escala estabelecida para o diagnóstico de efeitos adversos hepáticos decorrentes de drogas, analisaram 29 casos de hepatite durante a ingestão de kava, ocorridos entre 1990 e 2002. Incluíram nessa análise sete casos anteriormente publicados, totalizando 36 casos entre homens e mulheres. Nove desenvolveram falência hepática fulminante, dos quais oito foram

submetidos a transplante hepático. Três pacientes evoluíram para o óbito, dois dos quais haviam sido transplantados sem sucesso. Dentre os casos analisados, o consumo referido de kava havia sido sob forma de extrato alcoólico ou acetônico. No exame histológico, evidenciaram-se necrose hepática e hepatite colestática. Os autores discutem a possibilidade da participação de fatores alérgicos e idiossincrásicos, enfatizando, contudo, a hepatotoxicidade potencialmente grave provocada pela kava.

Já Clough et al. (2003) consideram que não há evidências de dano hepático grave nas populações consumidoras de kava nas ilhas do Pacífico nem entre os indígenas australianos, que utilizam o seu extrato aquoso. Essa foi a conclusão de um estudo transversal que realizaram com 98 participantes, 36 dos quais nunca havia utilizado kava. Classificaram os 62 usuários do extrato aquoso em grupos, conforme o tempo de suspensão do consumo, que variou de 24 horas anteriores ao estudo, até cerca de um ano. A quantidade média de consumo, 118 gramas por semana, foi considerada moderada. O tempo do consumo variou de um a 18 anos, média de 12 anos. O grupo que utilizou a substância até a data mais recente, que foi 24 horas antes, apresentou níveis elevados de gamaglutamil transferase ( $\gamma$ GT) e de fosfatase alcalina (FA), porém nem a alanina aminotransferase (ALT) nem as bilirrubinas se alteraram.

Também não ocorreram alterações nos testes de função hepática de ratos aos quais Singh e Devkota (2003) administraram o extrato aquoso da kava, além de não terem encontrado anormalidades na formação de malondialdeído, que reflete a peroxidação lipídica.

Russmann et al. (2003) consideram que, não só os extratos disponíveis comercialmente, mas também os preparados tradicionais de kava podem, embora raramente, provocar dano hepático, com elevação significativa das aminotransferases e hiperbilirrubinemia. Sugerem, porém que, nos consumidores de elevadas quantidades desses últimos, a atividade elevada de  $\gamma$ GT, na presença de aminotransferases normais ou minimamente elevadas, seja provavelmente o resultado de indução de enzimas do CYP450, mais do que um sinal de dano hepático.

Johnson et al. (2003), ao identificarem dois novos metabólitos, 11-12-dihidroxi-7,8-kavaína-0-quinona e 11-12-dihidroxikavaína-0-quinona, a partir de experimentos *in vitro* incubando a kava e microssomas hepáticos, sugeriram que a

formação destes pode contribuir para a hepatotoxicidade em humanos, quando as vias metabólicas estiverem alteradas, o que pode ocorrer quando há interação entre drogas, diferenças genéticas de expressão enzimática ou mesmo saturação dessas vias.

O consumo maciço de kava pode, provavelmente, ocasionar desde elevações mínimas de  $\gamma$ GT até hepatite grave ou insuficiência hepática fulminante, requerendo transplante, conforme diversos casos já publicados na literatura. No entanto, o impacto das notificações de segurança sobre a venda de produtos contendo essa substância não parece ter sido muito importante nos países que não proibiram a sua comercialização. Esses continuam até a ser recomendados como seguros na maioria dos locais de venda, conforme demonstra estudo de campo realizado no Canadá (MILLS et al., 2004).

Em todo o mundo, cerca de 100 casos são atualmente associados ao uso da kava, apesar de muitos especialistas julgarem que a causalidade não é bem estabelecida nesses relatos. A indústria reagiu ao banimento dessa substância, assim como parcela da comunidade científica, reacendendo a polêmica, inclusive na esfera judicial, ensejando ações com vistas a readquirir o direito de comercialização de seus produtos no Reino Unido. Entretanto, embora não haja uma resposta definitiva para essa questão, ainda não se pode desconsiderar as evidências sobre a hepatotoxicidade da kava (ERNST, 2007).

## **2.7 Histologia hepática**

### **2.7.1 Histologia normal**

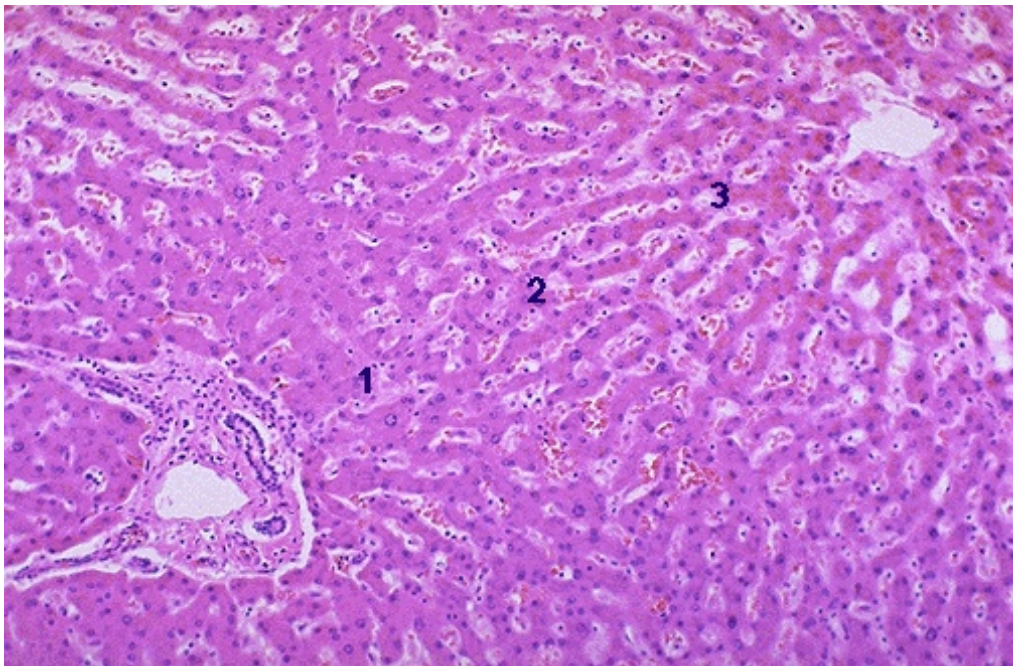
O conceito mais antigo sobre a organização histológica do fígado, atribuído a Kiernan, era puramente estrutural, pois considerava o lóbulo hepático de forma hexagonal, centrado por um ramo venoso, em torno do qual se distribuía, radialmente, as traves hepatocitárias (ARAÚJO, 1992). A periferia do lóbulo era delimitada por espaços portais, compreendendo as ramificações vasculares aferentes - veia porta e artéria hepática - e canalículos biliares. Sob essa ótica, o



sentido natural do fluxo da microcirculação não era considerado no que concerne à relação entre sinusóides, hepatócitos e veia hepática terminal (VHT). O fígado tem uma vascularização aferente dupla – arterial hepática e venosa portal, uma rede sinusoidal distribuída entre os hepatócitos e um sistema eferente, constituído por ramos da veia supra-hepática.

O sangue venoso, rico em nutrientes e o arterial, rico em oxigênio, se misturam no compartimento sinusoidal, sendo depois coletado pela VHT. Cada unidade microvascular nutre um território hepático, situado entre espaços intervasculares - o lóbulo ou ácino hepático, unidade estrutural, microcirculatória e funcional do fígado.

Levando-se em consideração o fluxo sanguíneo ao longo dos sinusóides, a partir das áreas portais e periportais até a VHT, o parênquima é definido em territórios distintos, ou seja, zona 1 ou periportal, zona 2 ou intermediária e zona 3 ou perivenular, em função de um gradiente decrescente de oxigênio e metabólitos, da zona 1 para a zona 3. Nessas diferentes áreas, a concentração de enzimas também pode variar, sendo os hepatócitos da zona 3 os mais vulneráveis à injúria (ARAÚJO, 1992). A figura 2 representa a histologia normal do fígado.



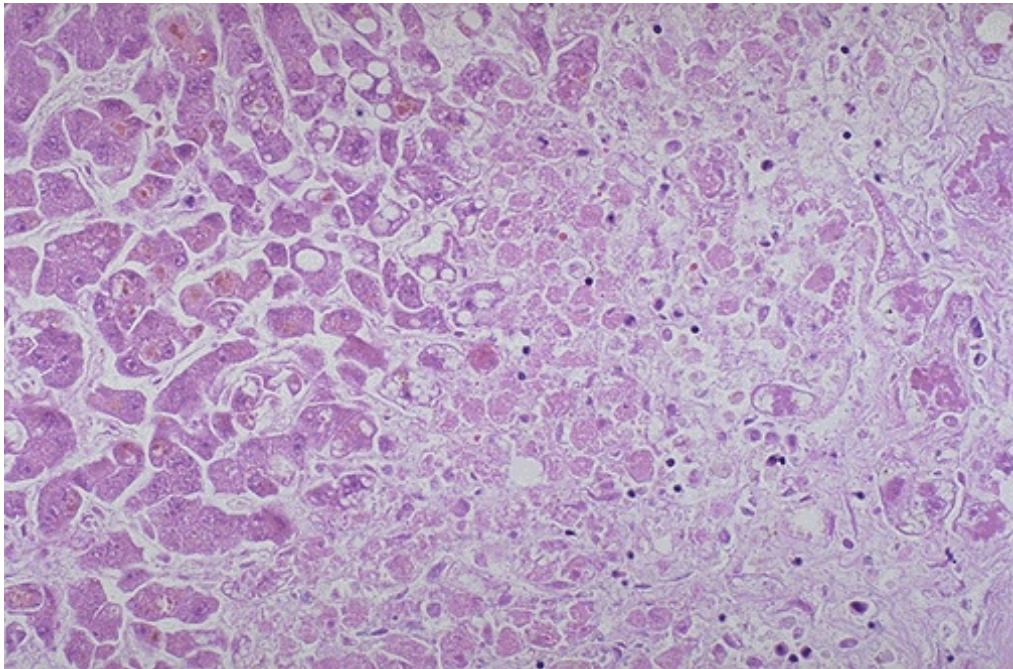
**Figura 2:** Histologia normal do fígado (Zonas 1, 2 e 3).

Fonte: <http://medlib.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER003.html>.

Acesso em 8 de janeiro de 2008.

### 2.7.2 Alterações histológicas na doença hepática induzida por drogas

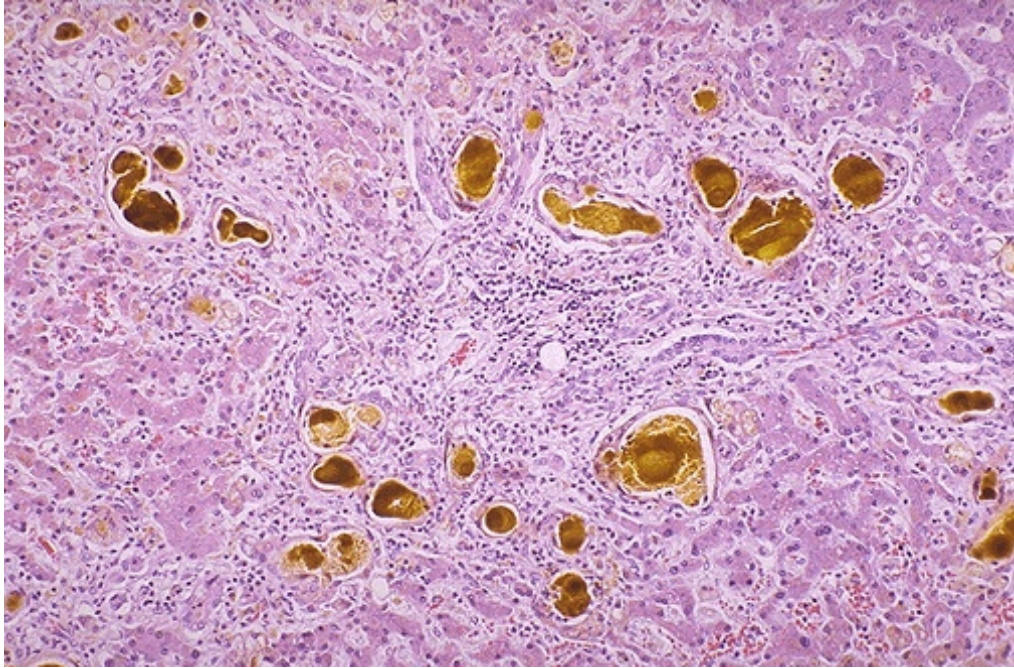
A figura 3 mostra uma área de necrose hepática extensa, resultante de superdosagem de acetaminofen. Os hepatócitos, à direita, já foram destruídos e os da esquerda estão em fase de destruição. Esse padrão pode ser visto numa variedade de hepatotoxinas, podendo ocasionar a falência hepática aguda, que leva à encefalopatia grave.



**Figura 3:** Necrose hepática extensa, por superdosagem de acetaminofen  
Fonte: <http://medlib.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER003.html>.  
Acesso em: 8 de janeiro de 2008

O acúmulo de pigmento amarelo-esverdeado observado na figura 4 é bile, num quadro de colestase, freqüentemente ocasionada por obstrução biliar extrahepática. No entanto, pode ocorrer também como consequência de processos autoimunes ou relacionado ao uso de drogas.





**Figura 4:** Colestase

Fonte: <http://library.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER020.html>  
Acesso em: 8 de janeiro de 2008

### **2.7.3 Alterações histológicas na doença hepática relacionada ao uso da kava**

Os achados histológicos de injúria hepática relacionada ao uso da kava parecem ser principalmente a hepatite colestática e necrose hepatocelular, de acordo com a análise de casos publicados num período de 12 anos, realizada por Stickel et al. (2003), destacando-se a presença de importante infiltrado eosinofílico em muitos casos.

Hepatite tóxica com necrose hepatocelular foi descrita por Humberston et al. (2003). No relato de Escher et al. (2001), em que um paciente de 50 anos em uso de kava evoluiu para insuficiência hepática grave, culminando com transplante hepático, o explante revelou extensa necrose hepatocelular e infiltração lobular e portal de linfócitos e eosinófilos. Russman et al. (2001), fizeram descrições mais complexas de hepatotoxicidade, chamando atenção para achado de infiltração portal, necrose em ponte, destruição interlobular de ductos biliares e colestase ductular, além de infiltrado celular misto, com linfócitos, eosinófilos e macrófagos ativados, envolvendo ductos biliares interlobulares. Musch et al. (2006), descreveram

lesão necroinflamatória lobular e portal ativa, sem indicativos de cirrose, em amostra de fígado de uma paciente em uso concomitante de kava e erva-de-São-João. Já DiSilvestro et al. (2007), em estudo experimental com ratos machos Sprague-Dawley alimentados com extratos de kava adicionados à ração em diferentes doses, não encontraram alterações histológicas na amostras de fígados desses animais, ao compará-los a um grupo controle. Com o objetivo de provocar hepatite tóxica, também administraram 500 mg/kg da hepatotoxina galactosamina, via intraperitoneal, em grupos pareados desses animais e em controles, 24 horas antes do sacrifício. Referem que, quando comparados aos animais com hepatite por galactosamina, os grupos que receberam a galactosamina e a dieta com a kava não apresentaram sinais histológicos de agravamento da hepatite experimentalmente induzida.

## **2.8 Outras reações adversas relacionadas ao uso da kava**

Em revisão sistemática da literatura especializada, para avaliar as possíveis reações adversas relacionadas ao uso da kava, Stevinson et al. (2002) sugeriram que estes são, em geral, raros, moderados e reversíveis, embora possam ser ocasionalmente mais graves. Incluem, além de dano hepático, distúrbios gastrointestinais, reações alérgicas cutâneas, cefaléia e vertigem, cansaço, intranqüilidade, tremores e complicações neurológicas.

### **2.8.1 Alterações dermatológicas e oculares**

Ernst (2000) afirma que os efeitos adversos dos remédios à base de ervas são às vezes negligenciados na dermatologia e sugere que os dermatologistas devam conhecer o seu potencial para causar efeitos colaterais, uma vez que praticamente todos são capazes de provocá-los. Inclui a kava entre as medicações populares botânicas capazes de provocar efeitos colaterais na pele.

O aparecimento de dermatopatias durante o consumo da kava é relatado na literatura e é feita uma associação causal entre as lesões cutâneas e o seu uso.

De acordo com Norton e Ruze (1994), os efeitos cutâneos decorrentes do uso da kava foram primeiramente mencionados pelos membros das expedições do capitão James Cook ao Pacífico, em 1776. A dermatopatia induzida pela kava manifesta-se por coloração amarelada da pele, com erupção descamativa peculiar, semelhante à ictiose. Tal condição é reversível e seu mecanismo é desconhecido, mas pode estar relacionado ao metabolismo do colesterol.

Segundo Ruze (1990), uma dermatite pelagróide é relacionada ao consumo da kava. Esse autor, avaliando 200 indivíduos das ilhas Tonga que consumiam bebida contendo *Piper methysticum*, também encontrou alterações cutâneas semelhantes às da ictiose, além de irritação ocular. Considerando que essas alterações de pele possam ser também relacionadas à deficiência de niacina, realizou estudo randomizado, administrando 100 mg, via oral, dessa vitamina a 29 desses indivíduos e os comparou a outros que receberam placebo. A melhora das lesões que ocorreu no grupo que recebeu nicotinamida foi, ao final do estudo, semelhante à encontrada no grupo controle, sugerindo que a deficiência de niacina não foi responsável pelas lesões.

Suss e Lehmann (1996) descreveram um caso de dermatite alérgica relacionada ao uso de bebida à base de kava, de aparecimento agudo e Cairney et al. (2003) encontraram um percentual de ocorrência de dermatopatia em 44,4% em grandes consumidores crônicos e de 14,3% em ex-consumidores, quando comparados a indivíduos que não consumiam essa substância.

A função visual de um indivíduo após o consumo de bebida preparada com a kava, foi avaliada por Garner e Klinger (1985), observando alterações na acomodação e convergência visuais, além de aumento no diâmetro da pupila e distúrbio oculomotor.

### **2.8.2 Alterações neurológicas**

De acordo com Spinella (2001), a grande disponibilidade e o uso disseminado de medicamentos à base de ervas aumentam o potencial para a

ocorrência de efeitos adversos nos indivíduos com epilepsia, pois o uso de sedativos ditos naturais, entre os quais inclui a kava, pode potencializar os efeitos dos antiepilépticos, aumentando o seu efeito sedativo e sobre as funções cognitivas.

Manifestações neurológicas são incomuns, porém Sibon et al. (2002) relataram três casos de meningismo, dois deles com alterações focais, após o uso da kava.

Meseguer et al. (2002) relataram caso de uma mulher com 45 anos de idade, que desenvolveu parkinsonismo grave, apresentando tremores persistentes alguns dias após iniciar o tratamento para ansiedade com o extrato de kava. O quadro melhorou após o tratamento com anticolinérgicos e, como ela tinha história familiar de tremor essencial, foi sugerido que o extrato de kava pode produzir parkinsonismo em indivíduos geneticamente suscetíveis.

Há, porém, divergências na literatura quanto à ocorrência de efeitos colaterais neurológicos. Estudos controlados sugerem que os extratos da kava não prejudicam o desempenho cognitivo e a vigilância, além de não potencializarem os efeitos dos depressores do SNC (STEVINSON et al., 2002).

Os resultados do estudo de Cairney et al. (2003), no qual compararam a função cognitiva e a movimentação ocular (sacada) em indivíduos grandes consumidores crônicos de kava, ex-consumidores e não consumidores dessa substância, demonstraram apenas mudanças sutis em funções cognitivas ou oculomotoras entre os grandes consumidores crônicos.

### **2.8.3 Manifestações orais**

Abebe (2003) afirma que o uso de substâncias à base de ervas é associado ao aparecimento de manifestações clínicas orais e inclui a kava como relacionada ao surgimento de discinesia oral e lingual.

#### **2.8.4 Desnutrição, dislipidemia e doença cardiovascular**

Ao comparar indivíduos grandes consumidores crônicos de kava, ex-consumidores e não consumidores dessa substância, Cairney et al. (2003) encontraram uma redução significativa do Índice de Massa Corpórea (IMC) nos grandes consumidores crônicos de kava e nos ex-consumidores.

Quanto aos níveis plasmáticos de colesterol total e do colesterol LDL (*low-density lipoprotein*), segundo Clough et al. (2004), o uso da kava por aborígenes australianos parece elevá-los, aumentando o risco de doença cardiovascular, embora também, ao que tudo indica, promova elevação do colesterol HDL (*high-density lipoprotein*). Esta foi a conclusão de estudo avaliando 340 indivíduos de uma dessas comunidades. Neste, não se observaram alterações nos triglicérides e a gordura corporal foi registrada como baixa, sendo ainda uma questão não resolvida se há ou não associação entre o uso da kava e a ocorrência de morte súbita naquela população (CLOUGH et al., 2004).

#### **2.8.5 Linfopenia e risco de infecção**

Cairney et al. (2003) encontraram linfócitos anormalmente baixos em indivíduos grandes consumidores crônicos de kava e em ex-consumidores, ao compará-los com indivíduos não consumidores dessa substância, sugerindo um risco elevado de ocorrência de infecções graves.

O quadro 1 resume as reações adversas sistêmicas relacionadas ao uso da kava.

Dermatite: erupção descamativa, pelagróide, semelhante à ictiose  
 Irritação ocular, distúrbio oculomotor, dilatação da pupila  
 Discinesia oral e lingual  
 Meningismo  
 Parkinsonismo  
 Alterações mínimas na função cognitiva  
 Sacada  
 Índice de Massa Corpórea (IMC) e gordura corporal: reduzidos  
 Colesterol total e LDL: elevados  
 Colesterol HDL: elevado  
 Morte súbita questionável  
 Linfopenia

**Quadro 1:** Reações adversas sistêmicas relacionadas ao uso da kava

## 2.9 Interações da kava com outras substâncias

Interação medicamentosa entre fitoterápicos e drogas convencionais ocorre, indubitavelmente, aumentando o risco de desenvolvimento de reações adversas (CÔTÉ et al., 2004; FUGH-BERMAN; ERNST, 2001). A ocorrência de interações entre outras drogas e fitoterápicos é uma questão muito importante (BLENDIS, 2005). Cordeiro et al. (2005) consideram que não se deve administrar nenhum fitoterápico concomitantemente a outros medicamentos sem orientação médica ou farmacêutica e sugerem também, assim como Blendis (2005), que esses profissionais questionem e alertem sobre o uso de ervas medicinais, dado seu alto poder de interação.

De acordo com Miller (1998), deve-se procurar conhecer o potencial de interação entre as drogas convencionais e as botânicas, pois considera que os indivíduos que se utilizam dessas últimas, geralmente o fazem sem a devida orientação profissional, além de não informarem o uso aos seus clínicos.

A falta de documentação minuciosa dos casos pode, muitas vezes, dificultar o seu estudo e, conseqüentemente, o avanço do conhecimento nessa área. Na



literatura especializada, as descrições das ocorrências de interações entre substâncias deixam a desejar, como demonstra uma revisão sistemática realizada por Fugh-Berman e Ernst (2001). Nela, foram avaliados os relatos de 188 casos de interações suspeitas. Dentre estes, 13% foram classificados como bem documentados e 18,5% como possíveis interações. O restante dos casos não foi considerado possível de ser avaliado.

Uma vez que a interação entre muitas drogas é o resultado da inibição ou indução de enzimas do CYP450 e que vários estudos já demonstraram a ação inibitória de várias kavalactonas sobre essas enzimas (CYP1A2, CYP2C9, 2C19, 2D6, 3A4 e 4A9/11), aumentando o risco de interação farmacocinética, sua administração concomitante a outras substâncias torna-as potencialmente tóxicas, pois pode ocorrer elevação dos seus níveis plasmáticos ou de seus metabólitos. (MATHEWS et al., 2002; UNGER et al., 2002; ZOU et al., 2002).

A kava é freqüentemente consumida associada a outros fármacos metabolizados pelo CYP3A4 e, em vários relatos de casos, além dela, outras medicações potencialmente hepatotóxicas estavam sendo utilizadas concomitantemente pelos pacientes (CORDEIRO et al., 2005; STEVINSON, 2002), aumentando o risco de hepatite tóxica.

Dados encontrados por Zou et al. (2002), estudando *in vitro* a expressão do cDNA (c-desoxiribonucleotídeo) humano das isoenzimas do CYP450, sugerem que os componentes da kava têm potencial para inibir o metabolismo de medicações cuja via primária de biotransformação seja o CYP450, que, se administradas concomitantemente à kava, aumentam o risco de interações.

A interação entre a kava e algumas substâncias é relatada na literatura. O uso concomitante de kava e alprazolam pode resultar em coma (MILLER, 1998) e a incidência de hepatotoxicidade pelo acetaminofen pode ser aumentada pelo uso concomitante de drogas potencialmente hepatotóxicas como a kava (ABEBE, 2002). Há também um relato de caso de potencial interação entre a kava e alprazolam, cimetidina e terazosin (De SMET, 2002). Donadio et al. (2000) descreveram a ocorrência de mioglobinúria e dor muscular grave em um paciente de 29 anos, que consumira preparado botânico em flaconetes de uma grama, contendo 500 mg de extrato de guaraná, 200 mg de ginkgo biloba e 100 mg de kava. Consideraram que, mesmo que essa condição possa ter outras etiologias, a combinação dos efeitos dessas três substâncias foi responsável pela rabdomiólise naquele indivíduo.

Estudos farmacológicos sugerem que há efeito aditivo entre as alfapironas da kava e fenobarbital, esteróides e benzodiazepínicos. Almeida e Grimsley (1996) comunicaram caso de um paciente com 56 anos de idade hospitalizado com um quadro de letargia e desorientação, sem presença de etanol no organismo, cujas medicações anteriores incluíam alprazolam, cimetidina e terazosin, além de, nos últimos três dias que precederam o início do quadro, ter havido consumo de kava. Consideraram este caso como uma possível interação entre as alfapironas da kava e o benzodiazepínico, sinalizando para o potencial perigo de interações perigosas entre a kava, de popularidade crescente e outras substâncias prescritas (ALMEIDA; GRIMSLEY, 1996).

Em relação à interação da kava com o etanol, Jamieson e Duffield (1990) já haviam demonstrado experimentalmente que, em camundongos, há aumento dos efeitos hipnóticos quando da utilização concomitante dessas substâncias. Além disso, demonstraram que o etanol eleva significativamente a toxicidade do extrato lipossolúvel (resina) da kava nesses animais. Consideraram que esse achado tem conseqüências clínicas importantes, devido ao freqüente consumo de kava associado ao de bebidas alcoólicas. Herberg (1993), porém, não detectou alteração em testes de cognição em humanos, mas Foo e Lemon (1997), noutro estudo clínico, observaram que a combinação da kava com o álcool parece propiciar prejuízo cognitivo.

Existe a hipótese que uma possível razão para a toxicidade hepática observada com o uso concomitante da kava e do álcool ocorreria devido à inibição da enzima álcool desidrogenase (ADH) pela kava, propiciando a diminuição da conversão do etanol a acetaldeído, seu principal metabólito, conforme Anke et al. (2006).

Esses autores, tentando estabelecer se um possível mecanismo para a alegada hepatotoxicidade da kava estaria relacionado à inibição da ADH pelas kavalactonas, investigaram se a interação farmacocinética entre esses constituintes da kava e o álcool por essa via metabólica corroboraria com aquela hipótese. Realizaram experimento, *in vitro*, em que as kavalactonas foram isoladas, purificadas e cristalizadas, avaliando então, por espectrometria, a influência de cada uma delas sobre atividade da ADH. As quatro kavalactonas puras, kavaína, metisticina, iangonina e dimetoxiangonina foram dissolvidas em metanol, em diferentes concentrações e nenhuma delas afetou mais que 10% da atividade da ADH.

Diante dos resultados, postulam que, uma vez que as kavalactonas estudadas não inibiram a atividade da ADH, é improvável que a interação da kava com o álcool seja por esse mecanismo, embora possa ocorrer por outros ainda não elucidados. No entanto, sugerem que esses achados não descartam o risco de interações farmacocinéticas ou farmacodinâmicas entre a kava e o álcool que possam ocorrer *in vivo*. Citam como exemplos a diminuição da conversão das kavalactonas a seus metabólitos e a possibilidade que aquelas ou seus constituintes menores possam causar inibição da ADH, *in vivo*, quando da ingestão concomitante do álcool e da kava (ANKE et al., 2006).

## 2.10 Estado atual da questão

Investigadores em diversos países iniciaram ou retomaram diversas linhas de pesquisa relacionadas ao estudo da kava, na tentativa de definir se esta é realmente uma substância hepatotóxica; havendo hepatotoxicidade, qual ou quais os mecanismos subjacentes; se o uso concomitante de outras substâncias poderia contribuir para sua ocorrência ou se seria fator preponderante; ou se a forma de preparação pode interferir na indução de doença hepática (DiSILVESTRO et al., 2007; SINGH; DEVKOTA, 2004; WHEATLEY; 2005; WHITTON et al., 2003).

Recentemente, Lüde et al. (2008) investigaram a citotoxicidade da kava, expondo células HepG2 e mitocôndrias isoladas de fígado de ratos a extratos metanólicos e acetônicos de kava. Os resultados mostraram que estes eram tóxicos para a mitocôndria, pois induziam inibição da cadeia respiratória, aumentavam a produção de ROS (*Reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigênio), diminuíam o potencial de membrana mitocondrial e eventualmente provocavam apoptose. Embora afirmem que esses achados provavelmente não respondam com exatidão às questões relacionadas aos humanos *in vivo* - uma vez que as propriedades farmacocinéticas da kava não são ainda totalmente conhecidas - sugerem que os efeitos tóxicos dos extratos de kava encontrada, *in vitro*, permitem especular que, sob certas condições, indivíduos podem desenvolver hepatotoxicidade causada pela ingestão de extratos da kava (LÜDE et al., 2008).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Observar a ocorrência de lesões hepáticas e eventualmente em outros órgãos – pulmões, rins e coração – induzidas pelo uso de *Piper methysticum*, em roedores.

### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaio toxicológico pré-clínico crônico em roedores, com o extrato de *Piper methysticum* ou kava, com base nas determinações da Resolução nº 90/2004 da ANVISA (BRASIL, 2004).
- Avaliar os efeitos da administração da kava (*Piper methysticum*) através de observação comportamental, controle do estado nutricional e determinação do perfil sorológico hematológico e bioquímico, direcionado para a avaliação hepática.
- Analisar as possíveis alterações histológicas e imunoistoquímicas hepáticas que possam ter sido ocasionadas pelo uso de *Piper methysticum* ou kava.
- Comparar os resultados aos obtidos em um grupo controle, adequadamente pareado.
- Observar, num grupo satélite, a ocorrência ou não de regressão das possíveis alterações identificadas no experimento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do estudo

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George-LTF-ANVISA-UFPB, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF), junto ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

As análises bioquímicas e histológicas foram, respectivamente, realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A imunohistoquímica foi realizada no Laboratório Virchow.

### 4.2 Animais experimentais

A população animal incluiu 80 ratos adultos da espécie Wistar (*Rattus norvegicus*), sendo 40 machos e 40 fêmeas, obtidos no biotério Thomas George do LTF, da UFPB. Durante o período do estudo, estes foram submetidos a condições ideais e constantes de ambiente, com umidade controlada, temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , em ciclo claro/escuro de 12 horas; a alimentação foi à base de ração tipo *pellets* da marca Purina®, composta por farelo de trigo, farelo de soja, milho moído integral, farinha de peixe, fosfato de cálcio, óleo de soja degomado, carbonato de cálcio e cloreto de sódio. Água potável foi oferecida *ad libitum* no decurso do experimento (DINIZ, 2000).

Submeteu-se um grupo controle de animais da mesma espécie a alimentação e condições ambientais idênticas, no transcorrer do experimento. Antes da realização de qualquer procedimento, os animais eram colocados no ambiente de trabalho, por pelo menos 30 minutos (DINIZ, 2000).

### **4.3 Gaiolas utilizadas**

O acondicionamento de todos os animais, durante o experimento, ocorreu em gaiolas de polietileno. Cada uma albergou um grupo de cinco animais. Nas grades metálicas da parte superior destas foram afixados comedouros e bebedouros, estes últimos sob a forma de garrafas graduadas de polietileno, com bicos de vidro.

### **4.4 Critérios de inclusão**

- ✓ Animais adultos, machos e fêmeas em igual proporção, saudáveis ao exame clínico, com idade de aproximadamente três meses.
- ✓ Peso corporal entre 200 e 300 gramas, com variação máxima de 20% entre os grupos.
- ✓ Fêmeas nulíparas
- ✓ Fêmeas não grávidas

### **4.5 Critérios de exclusão**

Foram excluídos deste estudo os animais que mostraram sinais clínicos de anormalidade física ou comportamental por ocasião da seleção. Também se excluíram os que não apresentaram as características descritas nos critérios de inclusão.

#### **4.6 Tamanho da amostra**

O grupo de estudo foi constituído por 60 animais, 30 machos e 30 fêmeas, os quais foram comparados com um grupo controle de 20 animais, sendo dez machos e dez fêmeas.

#### **4.7 Considerações éticas**

Esta pesquisa, realizada segundo as normas éticas para a prática didática-científica de vivisseção de animais, recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF), da UFPB (ANEXO 1).

#### **4.8 Delineamento do estudo**

Trata-se de estudo experimental, com ensaio toxicológico pré-clínico crônico.

#### **4.9 Material botânico**

Utilizou-se como material botânico fitoterápico, o produto Laitan®, do laboratório AltanaPharma, registrado no MS com o número 1.0639.0189.002-6, sob a forma farmacêutica de cápsulas, contendo o extrato seco WS 1490 da kava, acetônico, fórmula original da empresa Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Karlsruhe, Alemanha, lote 505223. Este medicamento, escolhido por apresentar melhor solubilidade em água, dentre três produtos comercializados e testados previamente, foi adquirido em farmácias locais e armazenado em temperatura

ambiente, protegido de luz e de umidade, desde a aquisição até o momento da administração no experimento.

Quantificou-se o número de cápsulas disponibilizadas, pesando-se o conteúdo de uma amostra de 10 cápsulas para avaliar a uniformidade de peso. Cada cápsula continha 100 mg do extrato WS 1490 de *Piper methysticum*, correspondendo a 70 mg de kavalactonas, conforme descreve a bula, com peso de  $245,00 \pm 1,17$  mg.

#### 4.10 Aparelhagem

A aparelhagem utilizada na presente pesquisa compreendeu os seguintes itens:

- ✓ Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus<sup>®</sup> - Roche Diagnostic System, para determinações bioquímicas no soro;
- ✓ Analisador de íons seletivos, Iselab<sup>®</sup>, para identificação dos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio;
- ✓ Analisador hematológico celular automático – Cobas Argos 50<sup>®</sup> - Roche Diagnostic System, para obtenção de hemograma e dosagem de plaquetas;
- ✓ HEMATEL 200<sup>®</sup> e microscópio Olympus<sup>®</sup>, para confirmação e controle da contagem das células sanguíneas;
- ✓ Balança analítica AID<sup>®</sup> – HR – 120 g, Japão;
- ✓ Balança eletrônica BG – 8000 GEHAKA<sup>®</sup>;
- ✓ Centrífuga BIO ENG<sup>®</sup> BE 4000, para separação do soro;
- ✓ Densitômetro BTS - 235<sup>®</sup> Biosystems, para dosagem e fracionamento de proteínas;
- ✓ Glicosímetro ADVANTAGE<sup>®</sup> Boehringer Mannheim, monitor de glicemia com fitas reativas;



- ✓ Microscópio óptico triocular LEICA® ATC 2000 acoplado à câmera fotográfica *Digital High Level Color Camera* SAMSUNG®;
- ✓ Termômetro digital, modelo MC – 3BC®, OMRON, China;
- ✓ Aparelho de *Rota-Rod*®, fabricado por Hugo Basile, modelo 7750;
- ✓ Aparelho de Campo Aberto (*open field*), desenvolvido pelo LTF;
- ✓ Aparelho de Labirinto em Cruz Elevado (*plus maze*), desenvolvido pelo LTF.

#### **4.11 Duração e descrição dos procedimentos**

Os animais, separados por grupos, foram submetidos a doses diárias do extrato WS 1490 de kava, correspondentes à dose usual de utilização, isto é 4,3 mg/kg e às doses de três e nove vezes a dose usual - 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg, respectivamente, via oral, por gavagem.

O conteúdo das cápsulas foi diluído em água destilada, sendo esta solução, em seguida, acrescida do solubilizante e emulsificante não iônico Cremophor®. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de água destilada e Cremophor®.

Diariamente, durante 30 minutos e sempre nos mesmos horários, pela manhã e à tarde, foram observados comportamento, respiração, locomoção e aspecto externo dos animais (ALMEIDA et al, 1999).

Ao término de 13 semanas, os animais foram sacrificados por tração cervical, sendo subseqüentemente coletado sangue, por sangria do plexo braquial, para realização de exames laboratoriais. Após incisão mediana toracoabdominal, foi realizado inventário das cavidades, para, em seguida, proceder a hepatectomia e retirada de outros órgãos (pulmões, coração e rins), para estudo anatomopatológico.

Com o objetivo de verificar reversão de possível quadro tóxico, caso ocorresse, de todos os grupos, 30% dos animais foram poupados, constituindo estes um novo grupo, denominado satélite, sacrificado 45 dias após as 13 semanas do experimento.

## **4.12 Parâmetros avaliados**

### **4.12.1 Consumo de água e alimento**

Aferiu-se diariamente o consumo de alimento, pesando-se, pela manhã, sempre no mesmo horário, a sobra da ração, subtraindo-se o resultado da quantidade total de ração colocada em cada dia anterior. O volume diário de água consumida foi aferido e anotado.

### **4.12.2 Peso, temperatura, glicemia caudal**

Peso corporal e temperatura retal foram aferidos semanalmente, enquanto que as dosagens de glicemia foram realizadas a cada duas semanas, no sangue obtido por meio de pequena incisão na ponta da cauda dos animais.

### **4.12.3 Avaliação comportamental e motora**

O estudo comportamental e motor constituíram-se dos testes de campo aberto, *Rota-rod* e labirinto em cruz elevado (*plus maze*). Para a realização do campo aberto e *Rota-rod*, a cada 2 semanas, selecionaram-se, de forma aleatória, cinco animais machos e cinco fêmeas dos grupos controle e experimental. Na véspera do sacrifício, ao final da 13<sup>a</sup> semana, procedeu-se ao teste de labirinto em cruz elevado, para o qual se escolheu aleatoriamente o mesmo número de animais. Como controle positivo para este teste foi empregado o diazepam, administrado via oral (VO), na dose de 0,5 mg/kg (GARRET et al., 2003).

Os testes de campo aberto e *Rota-rod* foram realizados sempre no mesmo horário, isto é, 2 horas após a administração do extrato de *Piper methysticum*, em sala com isolamento acústico, iluminação ambiente fria e tênue. Para o teste de

campo aberto, um foco de luz quente com lâmpada GE Brasil Cristal 40 *watts*, 220 *volts*, era direcionado à arena. As condições de temperatura eram as mesmas às quais os animais foram submetidos durante as 13 semanas do experimento. Os dois examinadores eram membros da equipe que diariamente visitava os animais e manipulava as gaiolas de condicionamento dos mesmos. Para o teste de labirinto em cruz elevado, foram mantidas as mesmas condições ambientais, com avaliação dos mesmos examinadores. Os animais foram colocados na sala 30 minutos antes do início da realização dos referidos testes.

#### ✓ **Campo aberto**

No teste de campo aberto, que avalia experimentalmente as variáveis comportamentais numa arena limitada por uma parede circular, segundo Broadhurst (1960), registrou-se a movimentação espontânea (ambulação) dos grupos tratados e controle pela frequência de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo pintadas no assoalho da arena. Aferiram-se também o tempo de execução do comportamento de autolimpeza (*grooming*), a frequência do ato de levantar (*rearing*) e o número de bolos fecais, considerados como índice de avaliação da emocionalidade e da atividade motora dos animais (CARLINI et al., 1986; GARRET et al., 2003).

#### ✓ **Rota-rod**

Os animais previamente selecionados dos grupos controle e tratados foram colocados um a um na barra giratória do aparelho de *Rota-rod* (Ugo Basile®), este com velocidade constante de nove rotações por minuto (rpm), por 180 segundos, anotando-se o tempo de permanência dos mesmos na barra, até três reconduções (DUNHAM; MIYA, 1957; MORAIS et al., 1998).

#### ✓ **Labirinto em cruz elevado**

Para avaliação do possível efeito ansiolítico do extrato utilizado, submeteram-se os animais ao labirinto em cruz elevado, constituído por dois braços abertos, medindo 50 x 10 cm, dispostos perpendicularmente a dois fechados com paredes laterais (50 x 10 x 40 cm), sem teto e com um quadrado central de 10 x 10 cm, com altura de 60 cm do assoalho. Os animais selecionados foram, então,

colocados um a um no quadrado central, e, durante 5 minutos, observaram-se a frequência de entradas e a porcentagem de tempo despendido nos braços aberto e fechado do labirinto (ALMEIDA et al., 2004).

#### **4.12.4 Exames laboratoriais**

Os exames laboratoriais gerais realizados incluíram parâmetros hematológicos e bioquímicos. Para determinação dos primeiros, o sangue coletado foi colocado em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA); para os exames bioquímicos, utilizaram-se tubos com gel separador – Microtainer Becton Dickson®, centrifugados durante 10 minutos, a 3500 rpm, obtendo-se o soro.

A avaliação hematológica compreendeu eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas. No estudo da série vermelha, foi procedida a contagem de hemácias e determinação de vários parâmetros, quais sejam: hematócrito e hemoglobina; volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma, foi realizada a contagem de leucócitos e da diferenciação celular.

No soro obtido, foram determinadas a glicemia, uréia, ácido úrico, colesterol total e triglicérides, por método enzimático. A determinação de creatinina foi realizada pelo método cinético. Aferiram-se ainda a amilase e creatinoquinase. Por método eletrodo íon seletivo, identificaram-se sódio, potássio, cálcio e magnésio.

Os exames relacionados à avaliação hepática incluíram a determinação dos níveis séricos de: AST, ALT, por método cinético; FA, bilirrubina total e frações e gama-glutamilttransferase ( $\gamma$ GT), por método cinético; proteínas totais e frações (método do bioreto) e desidrogenase láctica (DHL) (DINIZ, 2000; SINGH; DEVKOTA, 2003).

#### 4.12.5 Avaliação macroscópica dos órgãos

O exame macroscópico do fígado, pulmões, coração e rins de 24 animais, correspondendo a 30% dos grupos controle e tratado com as diferentes doses do extrato de *Piper methysticum*, constou de descrição das características gerais organolépticas e da tomada de peso dos espécimes cirúrgicos. Procedeu-se o seccionamento seriado dos órgãos, com observação e descrição das superfícies de corte, anotando-se os dados em formulários específicos (APÊNDICES 1 e 2), de acordo com o que se segue:

✓ Fígado:

Peso do órgão

Estudo da superfície externa:

- Aspecto da cápsula – lisa ou rugosa, brilhante, opalescente, aderente, vascularização.
- Cor - vermelha, vinhosa, pálida, pardacenta, amarelada, ferruginosa.

Consistência do órgão - elástica, firme, amolecida, endurecida.

Tipo de bordas - finas, rombas.

Superfície de corte

- Cor - vermelha, vinhosa, pálida, pardacenta, amarelada, ferruginosa.
- Aspecto do parênquima – homogêneo, presença ou ausência de nódulo, áreas de fibrose, hemorragia, enfartes.

✓ Pulmões:

- Pleura – lisa, rugosa, transparente, opalescente.
- Permeabilidade de brônquios
- Identificação dos lobos anatômicos
- Aspecto do parênquima pulmonar – esponjosidade, distribuição da árvore bronquial, áreas de fibrose, hemorragias, enfartes.

✓ Rins:

- Peso

- Delimitação da região cortical e medular, bem como do sistema pielocalicial; áreas de fibrose, hemorragia, enfartes.
- ✓ Coração:
  - Peso
  - Pericárdio – fino, transparente, rugoso, opalescente.
  - Permeabilidade dos vasos da base; conteúdo das cavidades atriais e ventriculares; aspecto do endocárdio (liso, brilhante, erosões); válvulas (anatômicas; fusionadas).
- ✓ Tubo digestivo superior e alças intestinais:
  - Estes órgãos não fizeram parte das análises histológicas, entretanto foram submetidos à inspeção externa.

#### **4.12.6 Análise histológica dos órgãos**

Os procedimentos técnicos para análise histológica incluíram, seqüencialmente, as seguintes etapas (MICHALANY, 1998):

- Após o exame macroscópico, procedeu-se à imersão imediata, em formalina tamponada, dos espécimes de evisceração. Os pulmões foram previamente submetidos à perfusão com a referida solução fixadora, via traquéia, por no máximo 12 horas. Os frascos contendo o material eram adequados e suficientemente amplos, para evitar deformações dos espécimes.
- Obtenção de secções para o processamento histológico, com utilização de pinça e navalha afiada, no intuito de evitar o dano do tecido, por compressões e trações.
- Fixação em formalina tamponada por 6 horas adicionais.
- Processamento dos tecidos em histotécnico marca OMA® (processador automático de tecidos), incluindo as fases a seguir:

- ✓ Desidratação em série crescente de soluções etanólicas, de 50% a 100%.
  - ✓ Clarificação ou diafanização em solução de etanol e xilol a 50% e em xilol puro.
  - ✓ Impregnação ou banho em parafina histológica fundida, em estufa do próprio histotécnico, com temperatura controlada a 60 °C.
  - Inclusão em parafina com confecção de blocos histológicos, sob temperatura igualmente controlada a 60°C, com auxílio de um autoinclusor marca LUPPE® e, subseqüentemente, resfriamento e solidificação em refrigerador.
  - Microtomia dos tecidos emblocados em parafina com navalhas descartáveis de aço, em espessura de 3 a 4 µm. Cada secção tecidual foi distendida em água de banho-maria histológico à temperatura entre 56°C a 60°C, sendo, por meio de pinça, distendida sobre as lâminas de vidro.
  - Colorações - o estudo histológico foi realizado com a coloração hematoxilina-eosina (HE) para todos os órgãos, tendo-se adicionado o tricrômico de Masson e vermelho picrossirius para a análise do tecido hepático.
  - Protocolos de coloração adaptados de acordo com a rotina de serviço do laboratório:
- **Coloração pela hematoxilina e eosina**
- Desparafinação dos cortes, com duas trocas de xilol;
  - Reidratação do material com uma seqüência de banhos de álcool
  - Lavagem em água destilada durante alguns minutos
  - Coloração hematoxilina – 3 a 5 minutos
  - Lavar em água corrente durante 10 minutos
  - Coloração com eosina – 3 a 5 minutos
  - Lavagem em água corrente
  - Lavagem rapidamente em água acidulada
  - Desidratação cuidadosa, utilizando álcool em concentrações crescentes (50%, 75%, 90%, 100%)
  - Clarificação

- Secagem
- Montagem em Entellan®, sob lamínula
- Secagem em estufa a 37 °C.

➤ **Coloração de Masson**

- Hematoxilina – 1 minuto com lavagem rápida da lâmina
- Ácido pícrico – 10 minutos e lavagem em água corrente por 10 minutos
- Vermelho Ponceau – 5 a 10 minutos, seguido de lavagem
- Ácido fosfomolibdico – 5 minutos, seguido de lavagem
- Azul de anilina – 1 a 3 minutos com lavagem após
- Ácido fosfomolibdico – 5 minutos, seguido de lavagem
- Água acética – 5 minutos
- Desidratação, clarificação e montagem, segundo técnica previamente especificada.

➤ **Coloração vermelho picrossirius**

- Desparafinização dos cortes histológicos em xilol
- Hidratação – série decrescente de álcool até a água destilada
- Solução de uso do vermelho picrossirius - 30 minutos
- Lavagem em água destilada (2 cubas)
- Álcool absoluto – 10 mergulhos rápidos
- Secagem em estufa, para completar a desidratação
- Xilol – 5 minutos
- Xilol – 1 minuto
- Montagem habitual com lamínula

Os critérios utilizados para a avaliação histológica dos pulmões, coração e rins estão dispostos respectivamente nos quadros 2, 3 e 4 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Para a avaliação histológica hepática, adotou-se o protocolo estabelecido pelas Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e Sociedade Brasileira de



Hepatologia (SBH), em reunião de consenso, discriminado no quadro 5 (GAYOTTO; COMITÊ SBP/SBH, 2000).

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Morfologia</b>
Arquitetura	Arquitetura parenquimatosa lobular normal, determinada pela presença da trama alveolar e estruturas bronquiais e bronquiolares, relativamente eqüidistantes
Vias áreas intrapulmonares	Bronquíolos pérvios, destituídos de cartilagem, irregularmente dicotomizados. Camada basal sem glândulas. Revestimento epitelial ciliado, simples ou pseudoestratificado, nas estruturas mais calibrosas, que exibem células mucossecretoras. Núcleos basais e normocromáticos.
Células neuroendócrinas de Kulchitsky (células K)	Presentes como células claras no epitélio de brônquios mais calibrosos (subsegmentares)
BALT (Tecido linfóide associado a brônquios)	Células epiteliais especializadas de brônquios e agregados linfóides associados a macrófagos. Estreita associação dos agregados linfóides (não encapsulados), com v�nulas peribronquiolares
Agregados linforreticulares em septo interlobular	Focais
Trama alveolar – revestimento e parede	Paredes finas revestidas por pneumócitos tipo I (células baixas) e tipo II (células subcolunares, nos ângulos dos alvéolos). Matriz alveolar escassa com capilares congestionados
Macrófagos intra-alveolares	Escassos
Rede vascular	Fina e regularmente distribuída

**Quadro 2:** Parâmetros analisados na avaliação histológica dos pulmões

<b>Estruturas histológicas</b>	<b>Análise</b>
<b>Epicárdio</b>	Aspecto do tecido conjuntivo Vascularização e inervação Revestimento mesotelial
<b>Miocárdio</b>	Ocorrência de fibrose e inflamação intersticial
<b>Endocárdio e válvulas cardíacas</b>	Presença de espessamentos por fibrose ou inflamação

**Quadro 3:** Parâmetros analisados na avaliação histológica do coração.

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Morfologia</b>
Arquitetura do parênquima	Lobos (pirâmide medular e tecido cortical recobrimo a sua base e lados) e arteríolas interlobulares.
Néfrons	Glomérulos ou corpúsculo de Malpighi (preservação, cápsula de Bowman, tufo capilar e mesângio) Sistema tubular (túbulos contorcidos proximais, alças de Henle e túbulos contorcidos distais) Conteúdos intratubulares Reação inflamatória estromal
Região medular	Sistema tubular (alça de Henle, segmento de túbulos contorcidos distais e túbulo coletor) reação inflamatória estromal intertubular
Pélvis	Cálices renais e da parede pélvica, com suas camadas estatigraficas (mucosa, muscular e fibrosa) e reação inflamatória
Rede vascular	Distribuição das artérias e veias interlobares e interlobulares

**Quadro 4:** Parâmetros analisados na avaliação histológica dos rins e sistemas excretores.

Parâmetros analisados	Morfologia	Escore (0 a 4)
Alterações estruturais	Arquitetura lobular normal	0
	Expansão fibrosa de espaços portais	1
	Expansão fibrosa de espaços portais com septos porta-porta	2
	Preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, podendo haver formação de nódulos	3
	Cirrose plenamente constituída, com predomínio áreas nodulares com relação, em relação a lóbulos remanescentes	4
Infiltrado inflamatório portal e perisseptal	Raros linfócitos portais	0
	Aumento discreto do número de linfócitos portais	1
	Aumento moderado do número de linfócitos portais	2
	Aumento acentuado de linfócitos portais	3
	Aumento muito acentuado do número de linfócitos portais	4
Atividade periportal e perisseptal	Ausência de lesões na interface espaço portal/parênquima	0
	Extravasamento de linfócitos ( <i>spill-over</i> ), não caracterizando a presença de necrose em “saca-bocado”	1
	Discreta necrose em “saca-bocado” (pequenas áreas em poucos espaços portais)	2
	Moderada necrose em “saca-bocado” (extensas áreas em poucos espaços portais ou pequenos focos em muitos espaços portais)	3
	Necrose em “saca-bocado” em extensas áreas de muitos espaços portais	4
Atividade parenquimatosa	Hepatócitos normais, isomorfos	0
	Alterações discretas incluindo: tumefação ou retração acidófila, eventualmente acompanhadas de infiltrado linfoistiocitário e raros focos de necrose	1
	Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfoistiocitários, em numerosos sítios	2
	Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfoistiocitários, em numerosos sítios, associada à áreas limitadas de necrose confluyente	3
	Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfoistiocitários em numerosos sítios, associada à necrose confluyente extensa/múltipla	4

**Quadro 5:** Parâmetros analisados na avaliação histológica do fígado

#### 4.12.7 Análise imunoistoquímica

Para rastrear a ocorrência de alterações fibrogênicas precoces, associadas ao uso de extrato de kava por 13 semanas, procedeu-se à análise imunoistoquímica nas amostras de fígado que apresentaram alterações histológicas.

O protocolo adotado para exame imunoistoquímico foi o estabelecido por Santos et al. (1999), adaptado às condições laboratoriais locais. Efetuaram-se cortes histológicos do material embocado em parafina, com espessura variável de 3 a 4 micrômetros, em lâminas previamente tratadas com solução a 4% de Silano® (3-amino propil-trietoxi-silano - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e acetona. A desparafinização e hidratação seguiram métodos de rotina, ou seja, aquecimento em estufa a 60°C, por 24 horas, com posterior submissão do material a banhos sucessivos de imersão em xilol, álcool e água corrente. A seguir procedeu-se à inibição das peroxidases endógenas, em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e metanol, durante 10 minutos.

Os cortes histológicos foram, então, submetidos à recuperação antigênica, em solução de citrato 10mM, pH 6,0, pela exposição das amostras ao calor úmido, utilizando-se banho-maria específico para esse tipo de procedimento, à temperatura de 98°C. Após esfriamento e lavagens em PBS (*Phosphate buffered saline*; solução salina tamponada com fostato 0,01M, em pH 7,4), realizou-se incubação em câmara úmida, com o anticorpo secundário, durante 20 minutos, em temperatura ambiente.

Subseqüentemente, realizou-se incubação das amostras com o anticorpo monoclonal alfa-actina anti-músculo liso (clone 1A4), na diluição de 1:200 microlitros, em PBS, em câmara úmida, durante a noite, a 4°C. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas à amplificação da reação, com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit StrepABC-Vectastain®), por 20 minutos, para a solução 1 e o mesmo tempo para a solução 2. Após lavagem dos cortes histológicos com PBS, realizou-se a revelação das reações com solução do substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB). Lavagem em água corrente foi praticada por 10 minutos, seguida de contra-coloração nuclear com hematoxilina de Harris e montagem das lamínulas com Entellan (Merck 1,07961), para leitura em microscopia óptica comum. Controles positivos e negativos, externos, atestaram a

fidedignidade da reação. Os resultados foram considerados positivos quando do aparecimento de colorações castanho-douradas nos citoplasmas.

O estudo imunoistoquímico foi realizado por dois patologistas independentes, previamente calibrados, que emitiram individualmente sua interpretação para cada imunoreação efetuada. Os casos de discordância foram reavaliados conjuntamente por ambos, de modo a se obter parecer consensual, nos resultados finais.

#### **4.12.8 Análise estatística**

Os dados obtidos foram digitados no programa *Excel (Microsoft Office)* e exportados para os pacotes estatísticos *Prism*, versão 3.0, e *SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 13.0. As técnicas estatísticas utilizadas foram: análise de variância (ANOVA), com um e dois fatores, incluindo os testes de comparações múltiplas Dunnett, teste *t* de Student. E os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Cochran. A aplicação deste último teste, apropriado para medidas dicotômicas e que permite comparar grupos estudados, se baseou na moda como uma medida representativa de cada grupo, em cada característica histológica. Também foram utilizadas análise de agrupamento hierárquica com métrica euclidiana e matriz de similaridade com a métrica de Jacquard, na qual, quanto mais próxima de um for a medida, mais o grupo estudado é semelhante ao grupo comparado (JOHNSON; WICHERN, 1992). O nível de significância para esta pesquisa foi 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

Os ensaios de toxicidade crônica realizados mostraram os seguintes resultados:

### 5.1 Observações gerais

Não ocorreram óbitos durante o tratamento. Quanto ao aspecto externo dos animais, observado durante as 13 semanas, não foram constatadas anormalidades na cor e distribuição dos pêlos, tampouco alterações oculares ou lesões externas.

### 5.2 Consumo de água e de alimento

Os valores médios do consumo de água dos ratos machos e fêmeas, tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster e dos animais do grupo controle, ao longo das 13 semanas de duração do experimento, encontram-se expressos nas tabelas 1 e 2.

**TABELA 1:** Consumo semanal de água em mL (Média  $\pm$  Erro padrão), da 1<sup>a</sup> à 7<sup>a</sup> semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

		Semanas						
		1	2	3	4	5	6	7
		<b>Machos</b>						
Controle		181,1 $\pm$ 4,5	176,8 $\pm$ 5	175,0 $\pm$ 3,7	168,2 $\pm$ 3,7	160,7 $\pm$ 4,5	154,6 $\pm$ 5,9	159,6 $\pm$ 4,4
4,3 mg/Kg		172,5 $\pm$ 2,8	167,9 $\pm$ 4,5	160,0 $\pm$ 2,5*	159,3 $\pm$ 2,5	159,3 $\pm$ 3,9	153,2 $\pm$ 5,5	150,4 $\pm$ 4
12,9 mg/Kg		176,1 $\pm$ 3,9	158,9 $\pm$ 6,2	164,6 $\pm$ 3,1	160,4 $\pm$ 3,1	162,1 $\pm$ 3,5	152,9 $\pm$ 4,5	150,0 $\pm$ 3,4
38,7 mg/Kg		186,1 $\pm$ 6,0	180,4 $\pm$ 5,6	180,0 $\pm$ 6,0	171,4 $\pm$ 6,0	181,4 $\pm$ 7,5*	160,7 $\pm$ 8,0	167,1 $\pm$ 7,4
		<b>Fêmeas</b>						
Controle		165,0 $\pm$ 6	158,2 $\pm$ 4,9	146,4 $\pm$ 5,2	143,2 $\pm$ 2,8	146,4 $\pm$ 2,5	131,1 $\pm$ 3,0	130,4 $\pm$ 4,3
4,3 mg/kg		163,6 $\pm$ 6,2	156,8 $\pm$ 6,0	141,1 $\pm$ 5,0	147,9 $\pm$ 7,1	156,4 $\pm$ 7,3	135,4 $\pm$ 6,8	128,6 $\pm$ 6,2
12,9 mg/kg		156,1 $\pm$ 4,9	131,4 $\pm$ 4,4*	123,2 $\pm$ 4,8*	124,3 $\pm$ 3,7*	129,3 $\pm$ 3,9	118,2 $\pm$ 6,6	106,8 $\pm$ 4,1*
38,7 mg/kg		158,2 $\pm$ 4,9	157,1 $\pm$ 5,3	147,1 $\pm$ 4,3	151,4 $\pm$ 3,0	146,4 $\pm$ 4,3	140,4 $\pm$ 5,2	143,6 $\pm$ 4,2

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

**TABELA 2:** Consumo semanal de água em mL (Média  $\pm$  Erro padrão), da 8<sup>a</sup> à 13<sup>a</sup> semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster.

	Semanas					
	8	9	10	11	12	13
<b>Machos</b>						
Controle	159,3 $\pm$ 4,3	161,8 $\pm$ 3,9	150,0 $\pm$ 6,4	174,6 $\pm$ 6,8	167,5 $\pm$ 5,2	181,4 $\pm$ 4,0
4,3 mg/kg	150,7 $\pm$ 3,5	149,3 $\pm$ 3,3	153,2 $\pm$ 3,9	152,9 $\pm$ 3,5*	150,7 $\pm$ 4,7	156,1 $\pm$ 3,4*
12,9 mg/kg	140,4 $\pm$ 2,9*	145,4 $\pm$ 3,5	148,6 $\pm$ 4,1	150,7 $\pm$ 4,9*	146,1 $\pm$ 4,7*	146,8 $\pm$ 2,7*
38,7 mg/kg	162,9 $\pm$ 7,4	160,0 $\pm$ 7,8	167,9 $\pm$ 7,9	164,6 $\pm$ 7,8	161,8 $\pm$ 8,5	162,5 $\pm$ 11,5
<b>Fêmeas</b>						
Controle	133,2 $\pm$ 4,0	138,6 $\pm$ 4,8	139,6 $\pm$ 4,8	158,6 $\pm$ 6,9	158,2 $\pm$ 7,9	174,6 $\pm$ 12,7
4,3 mg/kg	124,6 $\pm$ 7,1	126,8 $\pm$ 6,5	133,6 $\pm$ 6,5	136,1 $\pm$ 6,0*	123,6 $\pm$ 6,1*	128,6 $\pm$ 5,0*
12,9 mg/kg	111,4 $\pm$ 3,6*	99,6 $\pm$ 2,5*	105,0 $\pm$ 2,5*	115,7 $\pm$ 3,4*	105,4 $\pm$ 2,4*	97,9 $\pm$ 3,6*
38,7 mg/kg	132,5 $\pm$ 3,2	134,3 $\pm$ 56,7	133,2 $\pm$ 5,7	132,1 $\pm$ 2,3*	126,4 $\pm$ 4,5*	137,9 $\pm$ 7,1*

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

Os machos tratados diariamente com a dose usual de 4,3 mg/kg (DU) da kava (*Piper methysticum*) apresentaram valores médios de consumo de água significativamente menores que os do grupo controle, de acordo com a análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnett como pós-teste, na 3<sup>a</sup> (TABELA 1), 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semanas (TABELA 2). Nessa mesma dose, o consumo das fêmeas foi significativamente menor somente nas três últimas semanas do experimento.

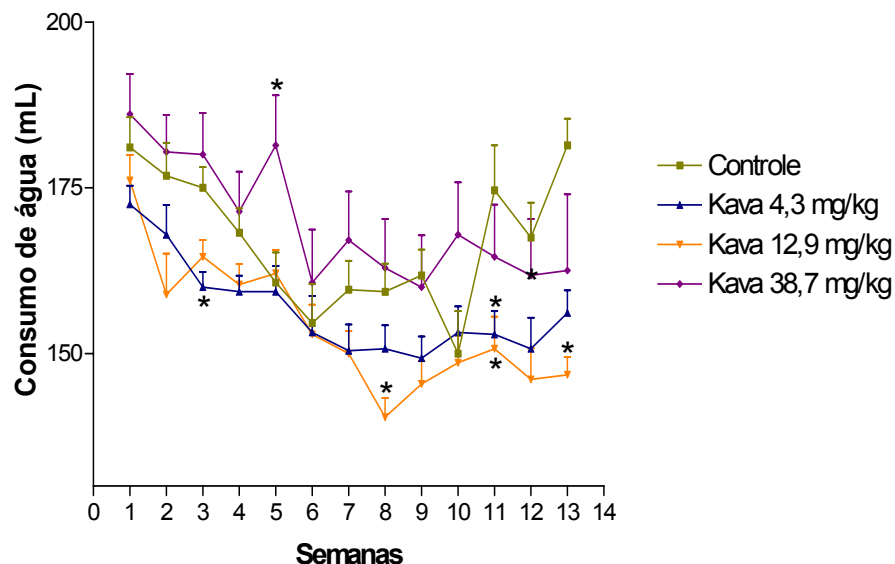
Com a dose diária 12,9 mg/kg, correspondente a três vezes a dose usual (9DU), os animais machos tiveram um consumo significativamente menor que os animais controle, na 8<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana (TABELA 2). Já as fêmeas tiveram



uma redução desse consumo em todas as semanas com exceção da 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> (TABELA 1).

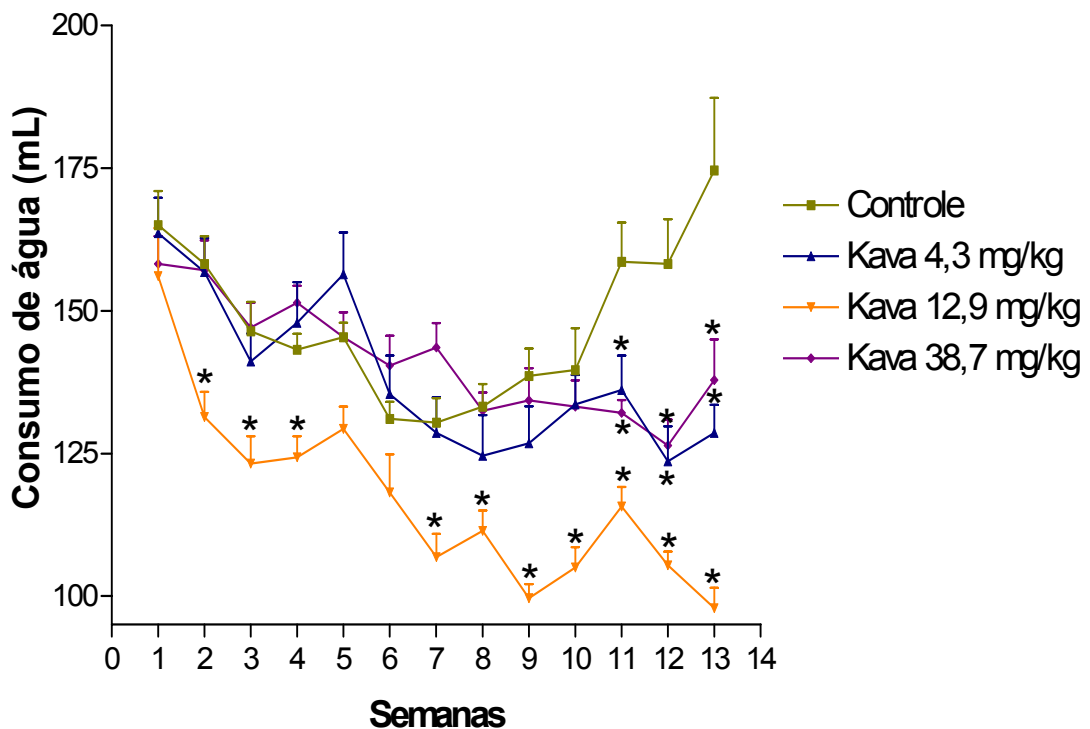
Os ratos tratados com a dose diária de 38,7 mg/kg, nove vezes a dose usual (3DU), tiveram consumo médio de água significativamente maior na 5<sup>a</sup> semana (TABELA 1), enquanto as fêmeas apresentaram comportamento distinto, uma vez que ocorreu diminuição do consumo nas três últimas semanas do experimento (TABELA 2).

O gráfico 1, expressando o consumo de água dos animais machos tratados comparados ao grupo controle, mostra as variações significativas que ocorreram durante o experimento. Houve também uma tendência de decréscimo desse consumo em relação ao início, sem significância estatística.



**Gráfico 1:** Consumo de água em mililitros (mL), aferido diariamente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Na comparação com os controles, este foi significativamente menor na dose 4,3 mg/kg na 3<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana; na 8<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> com 12,9 mg/kg e foi maior na 5<sup>a</sup> semana, no grupo 38,7 mg/kg. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

Analisando-se o consumo médio de água das fêmeas durante as 13 semanas (Gráfico 2), observa-se a que a redução deste foi mais freqüente com a dose 12,9 mg/kg. Houve decréscimo do consumo, ao longo do tempo, sem significância estatística.



**Gráfico 2:** Consumo médio de água em mililitros (mL), aferido diariamente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Na comparação com os controles, este foi significativamente menor na dose 4,3 mg/kg na 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana; com 12,9 mg/kg foi menor em todo o experimento, exceto na 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana e com 38,7 mg/kg na 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

As tabelas 3 e 4 mostram o consumo médio de ração dos ratos machos e fêmeas, tratados com *Piper methysticum* G. Foster durante as 13 semanas.

**TABELA 3:** Consumo semanal de ração em gramas (g) (Média ± Erro padrão), da 1ª à 7ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

		<b>Semanas</b>						
		1	2	3	4	5	6	7
<b>Machos</b>								
Controle		117,0±1,9	112,3±2,9	114,7±2,7	107,1±1,5	105,4±2,9	100,0±1,0	108,3±1,8
4,3 mg/kg		119,1±2,1	110,1±4,3	113,7±3,0	104,1±1,1	107,2±1,9	97,0±1,4	105,3±0,8
12,9 mg/kg		117,5±2,1	102,2±5,4	118,7±1,9	106,1±1,1	111,2±2,5	101,8±1,8	108,5±1,7
38,7 mg/kg		118,6±1,7	108,8±3,3	112,6±1,4	105,7±1,2	109,6±2,3	94,9±1,7	100,6±1,3*
<b>Fêmeas</b>								
Controle		100,3±3,5	91,6±3,7	90,1±4,5	81,2±1,9	91,7±2,1	77,1±2,1	73,7±2,8
4,3 mg/kg		90,5±3,1	86,0±3,9	83,6±3,3	77,6±2,9	85,6±4,6	72,4±2,1	75,8±2,8
12,9 mg/kg		94,0±3,8	82,3±4,5	81,8±3,3	75,1±1,2	76,1±2,1*	60,6±1,8*	66,6±1,8
38,7 mg/kg		87,3±2,9*	88,1±3,8	87,3±3,4	82,8±2,4	82,8±3,5	74,5±2,9	80,7±2,1

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

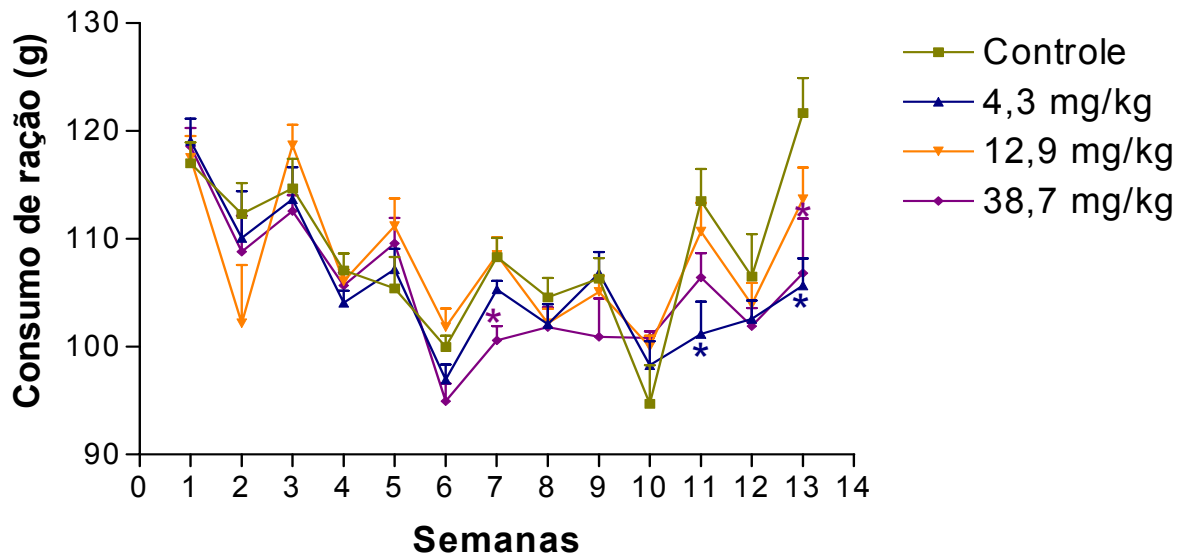
**TABELA 4:** Consumo semanal de ração em gramas (g) (Média ± Erro padrão), da 8<sup>a</sup> à 13<sup>a</sup> semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster.

		<b>Semanas</b>					
		8	9	10	11	12	13
		<b>Machos</b>					
Controle		104,6±1,8	106,3±1,9	94,7±3,6	113,5±3,0	106,5±3,9	121,7±3,2
4,3 mg/kg		102,1±1,8	106,8±2,0	98,3±2,2	101,2±3,0*	102,6±1,7	105,7±2,5*
12,9 mg/kg		102,2±1,3	105,1±1,5	100,0±1,0	110,7±2,7	103,9±2,	113,7±2,9
38,7 mg/kg		101,8±1,9	100,9±3,6	100,8±0,6	106,4±2,3	101,9±1,7	106,8±5,1*
		<b>Fêmeas</b>					
Controle		73,4±2,1	81,9±2,2	78,7±4,0	89,9±3,8	88,7±5,2	100,7±7,3
4,3 mg/kg		72,3±3,4	74,0±3,9	68,0±3,6	76,3±3,1*	69,5±3,5*	78,9±3,8*
12,9 mg/kg		72,1±2,8	65,2±2,7*	63,6±1,6*	77,1±2,5*	68,6±2,2*	65,1±2,7*
38,7 mg/kg		71,3±1,7	84,7±4,0	73,4±3,0	82,9±2,5	73,6±1,7*	83,9±4,5*

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

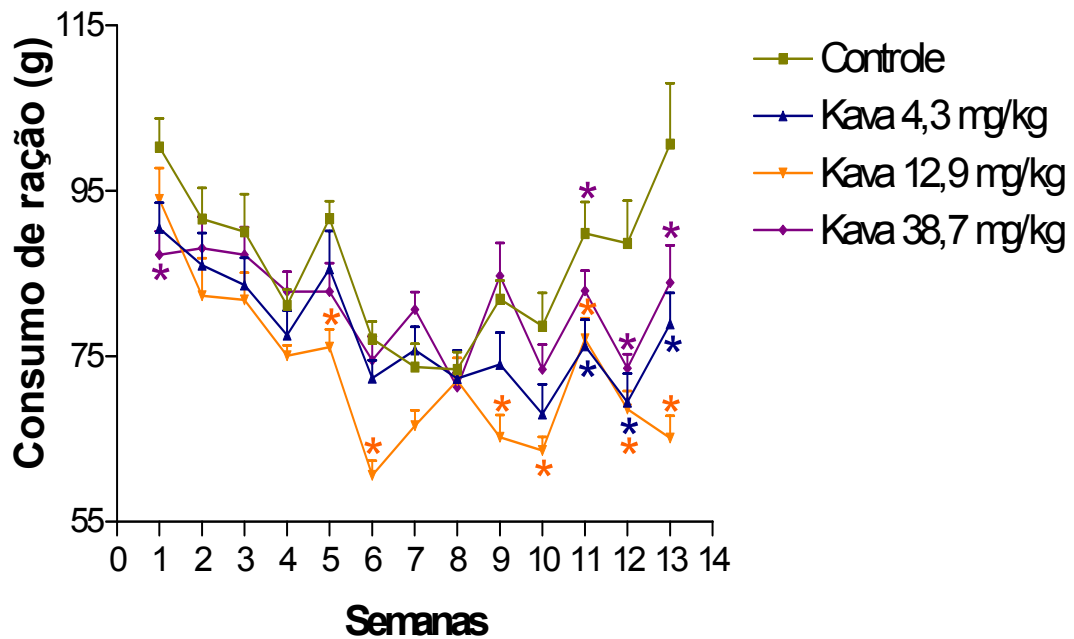
Na dose diária de 4,3 mg/kg ocorreu diferença significativamente menor no consumo médio de ração nos animais machos nas semanas 11 e 13 do experimento, e nas fêmeas, nas semanas 11, 12 e 13, quando comparados ao grupo controle (TABELA 4). Na dose de 12,9 mg/kg, o consumo dos machos foi semelhante ao grupo controle, enquanto que o das fêmeas foi significativamente menor nas semanas 5 e 6 (TABELA 3), e nas semanas 9, 10, 11, 12, 13 do experimento (TABELA 4). Na dose de 38,7 mg/kg houve menor consumo dos machos nas semanas 7 (TABELA 3) e 13 (TABELA 4) e das fêmeas na 1<sup>a</sup> (TABELA 3), 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semanas (TABELA 4).

O gráfico 3 mostra que os animais machos, com um consumo médio de ração entre 100 e 120 gramas ao longo das 13 semanas, apresentaram consumo médio menor em duas doses (4,3 mg/kg e 38,7 mg/kg), por três semanas (7<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup>).



**Gráfico 3:** Consumo de ração em gramas (g), aferido diariamente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Este foi significativamente menor que os controles na dose 4,3 mg/kg na 11ª e 13ª semana e com 12,9 mg/kg na 7ª e 13ª semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

Pode-se observar no gráfico 4 que as fêmeas tratadas tiveram uma diminuição significativa no consumo médio de ração em todas as doses, embora não em todas as semanas, diferença mais freqüente com a dose 12,9 mg/kg, observada em sete semanas, não atingindo os valores do início do experimento.



**Gráfico 4:** Consumo de ração em gramas (g), aferido diariamente, de ratos tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), com significativo menor consumo que os controles na dose 4,3 mg/kg, na 11ª, 12ª e 13ª semana; 12,9 mg/kg em todas, exceto na 1ª, 4ª, 7ª, e 8ª semana; 38,7 na 1ª, 12ª e 13ª semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

### 5.3 Peso corporal

Nas tabelas 5 e 6 está demonstrado o comportamento do peso dos animais machos e fêmeas, durante as 13 semanas do experimento.

**TABELA 5:** Evolução ponderal em gramas (g) (Média  $\pm$  Erro padrão), da 1<sup>a</sup> à 7<sup>a</sup> semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

		Semanas						
		1	2	3	4	5	6	7
<b>Machos</b>								
Controle		233,8 $\pm$ 5,3	253,8 $\pm$ 6,2	279,7 $\pm$ 6,2	294,5 $\pm$ 7,4	305,3 $\pm$ 7,2	316,5 $\pm$ 7,3	321,5 $\pm$ 8,6
4,3 mg/kg		233,5 $\pm$ 7,3	253,9 $\pm$ 8,1	277,0 $\pm$ 9,0	295,3 $\pm$ 10,4	301,8 $\pm$ 10,3	309,5 $\pm$ 10,4	318,7 $\pm$ 10,9
12,9 mg/kg		251,7 $\pm$ 12,8	270,5 $\pm$ 12,7	292,1 $\pm$ 12,4	312,3 $\pm$ 12,6	317,5 $\pm$ 11,6	326,2 $\pm$ 11,6	334,1 $\pm$ 11,9
38,7 mg/kg		240,0 $\pm$ 8,4	259,0 $\pm$ 9,2	282,2 $\pm$ 9,9	297,8 $\pm$ 9,9	303,5 $\pm$ 11,4	306,9 $\pm$ 11,4	316,8 $\pm$ 11,3
<b>Fêmeas</b>								
Controle		200,7 $\pm$ 6,3	219,1 $\pm$ 6,6	228,1 $\pm$ 7,0	233,1 $\pm$ 8,4	238,7 $\pm$ 7,1	238,7 $\pm$ 7,1	244,6 $\pm$ 9,5
4,3 mg/kg		184,3 $\pm$ 5,7	197,1 $\pm$ 5,5*	207,1 $\pm$ 7,9	211,3 $\pm$ 5,0	220,4 $\pm$ 6,5	219,9 $\pm$ 5,7	225,8 $\pm$ 6,0
12,9 mg/kg		192,5 $\pm$ 5,2	210,9 $\pm$ 5,5	219,6 $\pm$ 6,6	222,4 $\pm$ 5,9	227,5 $\pm$ 6,1	227,7 $\pm$ 6,2	223,0 $\pm$ 8,5
38,7 mg/kg		180,5 $\pm$ 6,7	195,3 $\pm$ 6,9*	207,7 $\pm$ 7,1	216,0 $\pm$ 7,2	224,2 $\pm$ 6,8	225,9 $\pm$ 6,7	224,7 $\pm$ 6,4

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

**TABELA 6:** Evolução ponderal em gramas (g) (Média  $\pm$  Erro padrão), da 8<sup>a</sup> à 13<sup>a</sup> semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

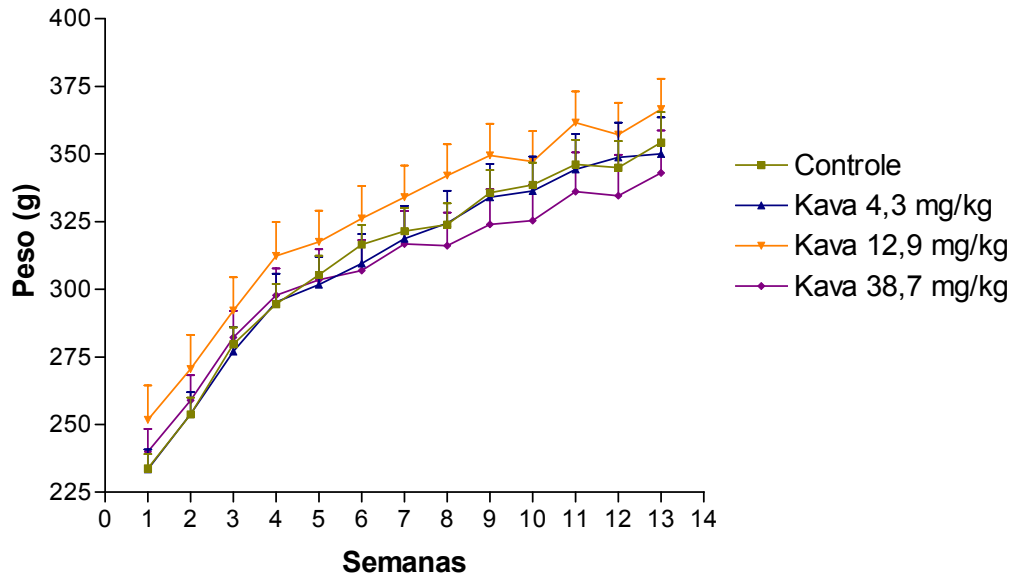
	Semanas					
	8	9	10	11	12	13
<b>Machos</b>						
Controle	323,9 $\pm$ 7,9	335,7 $\pm$ 8,4	338,6 $\pm$ 8,2	346,1 $\pm$ 9,1	345,0 $\pm$ 9,8	354,3 $\pm$ 11,2
4,3 mg/kg	324,4 $\pm$ 12,0	334,0 $\pm$ 12,4	336,3 $\pm$ 12,7	344,3 $\pm$ 13,1	348,7 $\pm$ 12,9	350,0 $\pm$ 13,5
12,9 mg/kg	342,0 $\pm$ 11,6	349,5 $\pm$ 11,6	347,2 $\pm$ 11,3	361,6 $\pm$ 11,5	357,2 $\pm$ 11,7	366,6 $\pm$ 11,2
38,7 mg/kg	316,1 $\pm$ 12,2	324,0 $\pm$ 13,0	325,4 $\pm$ 13,3	336,1 $\pm$ 14,5	334,6 $\pm$ 15,1	343,0 $\pm$ 15,7
<b>Fêmeas</b>						
Controle	244,3 $\pm$ 7,6	241,0 $\pm$ 6,6	243,8 $\pm$ 7,1	243,9 $\pm$ 7,7	245,5 $\pm$ 8,4	256,4 $\pm$ 10,5
4,3 mg/kg	224,1 $\pm$ 4,8	226,9 $\pm$ 5,8	223,9 $\pm$ 5,5	226,3 $\pm$ 5,5	227,7 $\pm$ 5,1	227,3 $\pm$ 5,4*
12,9 mg/kg	229,9 $\pm$ 7,6	234,6 $\pm$ 7,8	234,6 $\pm$ 8,0	233,4 $\pm$ 7,5	234,3 $\pm$ 8,1	244,1 $\pm$ 9,6
38,7 mg/kg	229,9 $\pm$ 7,0	228,4 $\pm$ 8,2	225,9 $\pm$ 6,6	233,5 $\pm$ 6,9	230,6 $\pm$ 5,8	239,1 $\pm$ 5,3

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

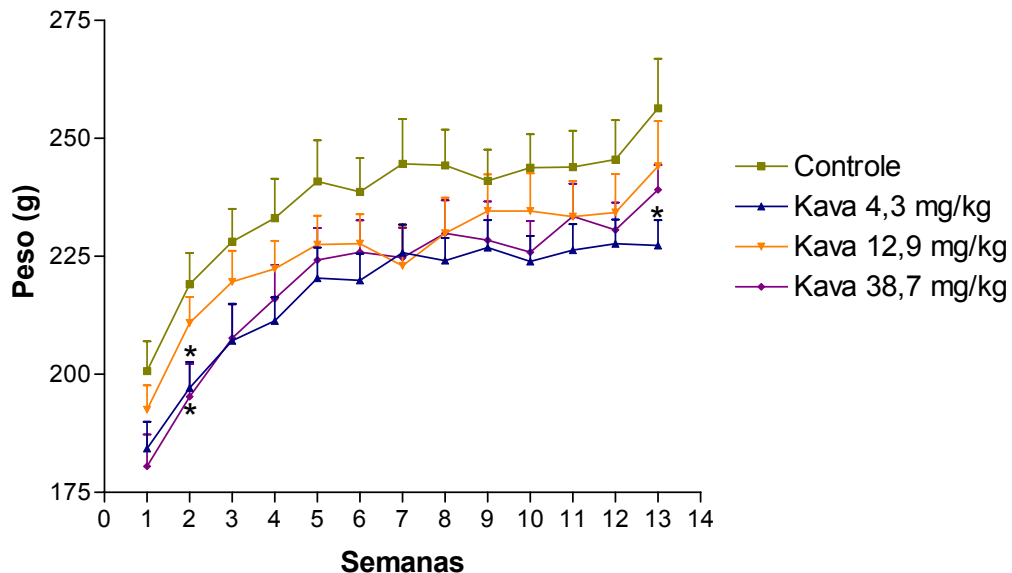
Em relação ao peso dos animais durante o experimento, nas três doses não houve diferença significativa entre os grupos tratado e controle. Entre as fêmeas também ocorreu esta semelhança, exceto na dose de 4,3 mg/kg, em que houve diferença significativamente menor da média de peso na segunda (TABELA 5) e 13<sup>a</sup> semanas (TABELA 6) e na dose de 38,7 mg/kg ocorreu essa diferença, na segunda semana de tratamento (TABELA 5).

O gráfico 5 mostra que houve aumento no peso médio nos machos tratados e nos controles, no decorrer das 13 semanas do experimento, sem diferença estatística entre os grupos; o gráfico 6 expressa o peso médio das fêmeas, que foi significativamente menor na dose 4,3 mg/kg na segunda e 13<sup>a</sup> semanas, bem como na dose 38,7 mg/kg, na segunda semana.





**Gráfico 5:** Peso médio em gramas (g), aferido semanalmente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), com semelhança estatística em todas as doses e ganho de peso de todos os grupos. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.



**Gráfico 6:** Peso em gramas (g), aferido semanalmente, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Houve ganho de peso, que variou para menos, com significância estatística, na dose 4,3 mg/kg na 2ª e 13ª semanas, como ocorreu com 38,7 mg/kg na 2ª semana. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

## 5.4 Temperatura retal

As tabelas 7 e 8 apresentam a temperatura retal média, em graus Celsius (°C), registrada em machos e fêmeas, ao longo das 13 semanas do experimento.

**TABELA 7:** Temperatura corporal em graus Celsius (°C) (Média ± Erro padrão), da 1ª à 7ª semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

Temperatura (° C) corporal semanal							
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Machos</b>							
Control e	38,3±0,1	38,4±0,1	38,0±0,1	37,5±0,2	38,0±0,1	37,4±0,2	37,7±0,2
4,3 mg/kg	38,1±0,2	38,2±0,1	37,6±0,1*	37,9±0,1	37,9±0,1	37,8±0,2	37,7±0,1
12,9 mg/kg	38,2±0,1	38,2±0,1	37,6±0,1*	37,9±0,1	37,9±0,1	37,7±0,2	37,5±0,1
38,7 mg/kg	38,3±0,1	38,0±0,1*	37,5±0,1*	38,1±0,1*	37,4±0,1*	37,6±0,2	37,3±0,2
<b>Fêmeas</b>							
Control e	38,8±0,1	38,8±0,1	38,6±0,2	38,7±0,1	38,5±0,1	38,2±0,1	37,9±0,2
4,3 mg/kg	38,8±0,2	38,8±0,2	38,4±0,2	38,2±0,2	38,3±0,1	38,3±0,2	37,9±0,2
12,9 mg/kg	39,0±0,1	38,9±0,1	38,4±0,2	38,6±0,1	38,1±0,2	38,4±0,2	37,9±0,2
38,7 mg/kg	38,9±0,1	38,6±0,1	38,4±0,2	38,7±0,1	38,2±0,2	38,4±0,1	38,1±0,1

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett, p<0,05).

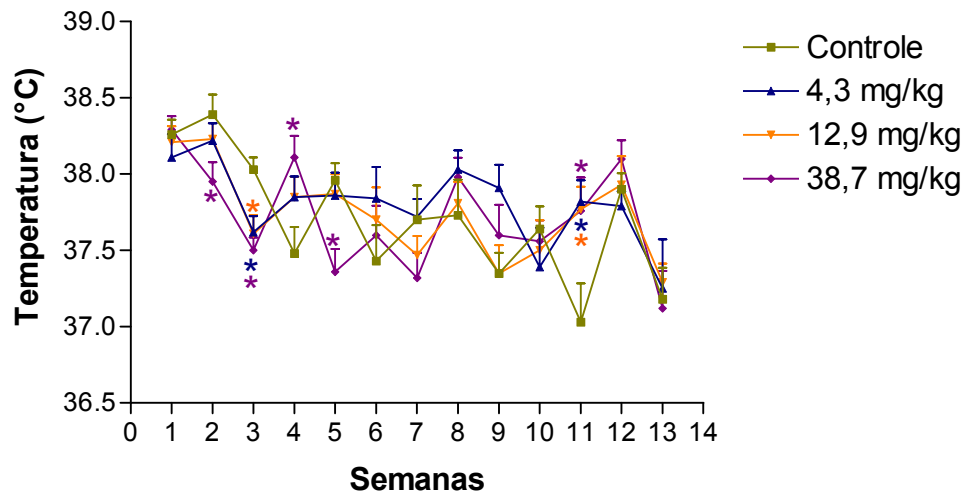
**TABELA 8:** Temperatura corporal em graus Celsius (°C) (Média ± Erro padrão), da 8<sup>a</sup> à 13<sup>a</sup> semana, de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

Temperatura (° C) corporal semanal						
	8	9	10	11	12	13
<b>Machos</b>						
Controle	37,7±0,2	37,4±0,1	37,6±0,1	37,0±0,3	37,9±0,1	37,2±0,2
4,3 mg/kg	38,0±0,1	37,9±0,2	37,4±0,3	37,8±0,1*	37,8±0,1	37,3±0,3
12,9 mg/kg	37,8±0,1	37,4±0,2	37,5±0,2	37,8±0,1*	37,9±0,2	37,3±0,1
38,7 mg/kg	38,0±0,1	37,6±0,2	37,6±0,1	37,8±0,2*	38,1±0,1	37,1±0,2
<b>Fêmeas</b>						
Controle	38,4±0,2	38,5±0,2	38,7±0,1	38,5±0,1	38,6±0,2	37,9±0,2
4,3 mg/kg	38,5±0,1	38,4±0,1	38,6±0,2	38,4±0,2	38,5±0,2	38,2±0,2
12,9 mg/kg	38,3±0,2	38,1±0,2	38,5±0,1	38,7±0,1	38,6±0,2	38,2±0,2
38,7 mg/kg	38,2±0,2	38,1±0,1	38,3±0,1	38,6±0,1	38,7±0,1	37,6±0,3

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett, p<0,05).

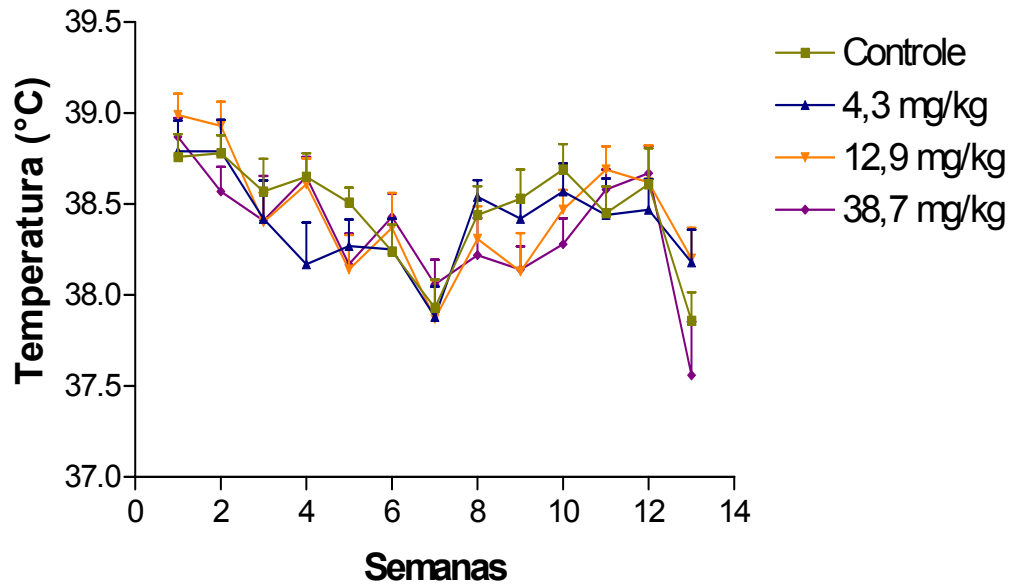
A temperatura dos machos tratados foi significativamente menor que a do grupo controle, tanto com 4,3 mg/kg, quanto com 12,9 mg/kg na 3<sup>a</sup> semana de tratamento (TABELA 7), e mais elevada na 11<sup>a</sup> semana (TABELA 8); com 38,7 mg/kg, foi menor na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas, sendo significativamente mais elevada na quarta e 11<sup>a</sup> semanas. Nas fêmeas tratadas, houve semelhança estatística com o grupo controle (TABELAS 7 e 8).

O gráfico 7 expressa os valores médios das temperaturas dos machos, aferidas durante o experimento. Observa-se que, nas três doses, houve alterações significativas para mais e para menos, sendo a dose 38,7 mg/kg a que provocou variações mais freqüentes, em cinco semanas do experimento.



**Gráfico 7:** Temperatura retal em graus Celsius (°C), aferida semanalmente, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett, p<0,05). Esta variou para menos, com significância estatística, nas doses 4,3 e 12,9 mg/kg na 3ª semana; com 38,7 mg/kg na 2ª, 3ª e 5ª semanas. Foi maior nas três doses na 11ª semana e também na 4ª semana, com a maior dose. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

No gráfico 8, que expressa os valores médios de temperatura em graus Celsius, das fêmeas, observa-se a semelhança estatística entre os grupos, com pequena variação.



**Gráfico 8:** Temperatura retal em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), aferida semanalmente, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas ( $n=10$  animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p<0,05$ ), sem diferenças estatísticas. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

## 5.5 Exames laboratoriais

### 5.5.1 Glicemia

A tabela 9 apresenta a glicemia, basal e quinzenal, em miligramas por decilitro (mg/dL), aferida a partir de amostras de sangue da cauda dos machos e fêmeas durante o experimento.

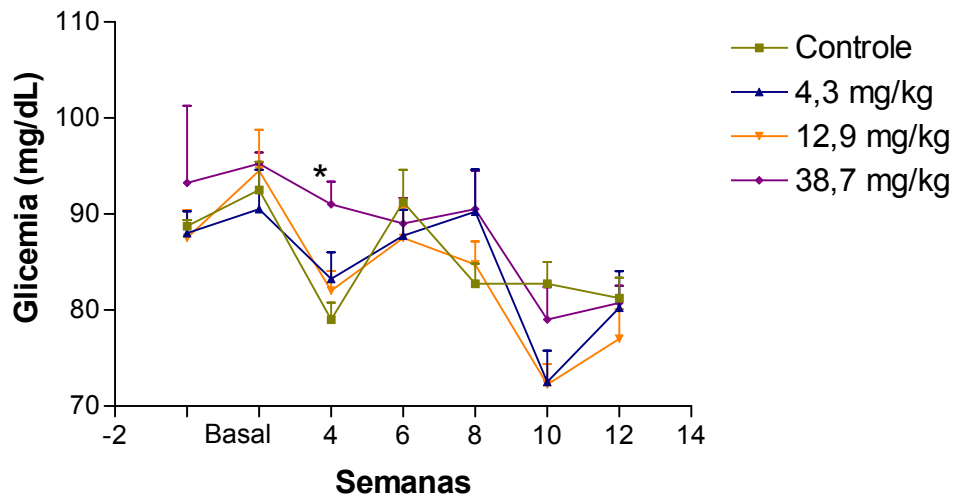
**TABELA 9:** Glicemia em mg/dL (Média  $\pm$  Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10) tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

	Semanas						
	Basal	2	4	6	8	10	12
<b>Machos</b>							
Controle	88,8 $\pm$ 0,63	92,5 $\pm$ 3,0	79,0 $\pm$ 3,6	91,2 $\pm$ 3,4	82,8 $\pm$ 2,1	82,8 $\pm$ 2,2	81,2 $\pm$ 2,1
4,3 mg/kg	88,0 $\pm$ 2,3	90,5 $\pm$ 4,1	83,2 $\pm$ 2,8	87,8 $\pm$ 2,7	90,2 $\pm$ 4,4	72,5 $\pm$ 3,3	80,2 $\pm$ 3,8
12,9 mg/kg	87,5 $\pm$ 2,9	94,5 $\pm$ 4,3	82,0 $\pm$ 2,1	87,5 $\pm$ 3,2	84,8 $\pm$ 2,4	72,2 $\pm$ 2,2	77,0 $\pm$ 3,1
38,7 mg/kg	93,2 $\pm$ 8,0	95,2 $\pm$ 1,2	91,0 $\pm$ 2,4*	89,0 $\pm$ 5,4	90,5 $\pm$ 4,0	79,0 $\pm$ 3,4	80,8 $\pm$ 1,8
<b>Fêmeas</b>							
Controle	98,5 $\pm$ 1,8	92,0 $\pm$ 3,6	87,2 $\pm$ 1,4	88,8 $\pm$ 2,1	88,8 $\pm$ 6,2	79,2 $\pm$ 2,0	80,2 $\pm$ 1,5
4,3 mg/kg	96,8 $\pm$ 2,6	98,8 $\pm$ 3,3	86,5 $\pm$ 2,2	85,2 $\pm$ 4,7	87,8 $\pm$ 4,3	84,0 $\pm$ 5,1	86,5 $\pm$ 2,0
12,9 mg/kg	101,2 $\pm$ 1,2	96,8 $\pm$ 1,3	85,8 $\pm$ 3,6	96,0 $\pm$ 4,0	91,7 $\pm$ 3,2	84,0 $\pm$ 2,5	87,7 $\pm$ 4,8
38,7 mg/kg	89,3 $\pm$ 7,1	93,5 $\pm$ 4,8	90,2 $\pm$ 2,5	89,0 $\pm$ 3,4	85,8 $\pm$ 2,6	80,0 $\pm$ 2,3	82,0 $\pm$ 3,63

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

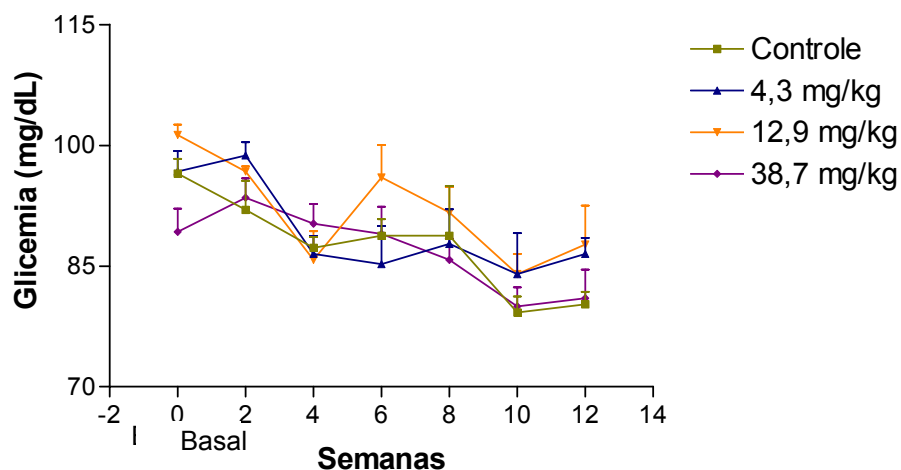
Com exceção dos machos na dose de 38,7 mg/kg, na quarta semana, quando estes apresentaram maior nível médio de glicemia que os controles (TABELA 9), não houve diferença significativa entre os grupos, nas três doses.

No gráfico 9, que expressa os valores médios das aferições da glicemia, a cada duas semanas, observa-se que nos machos tratados houve hiperglicemia significativa apenas na dose 38,7 mg/kg, na 4ª semana de tratamento. Percebe-se uma pequena tendência de decréscimo deste parâmetro no decorrer do experimento, sem significância estatística.



**Gráfico 9:** Glicemia caudal, em miligramas por decilitro (mg/dL), basal e aferida a cada duas semanas, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Com exceção da glicemia significativamente maior na dose 38,7 mg/kg, na 4ª semana, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

No gráfico 10, a glicemia média observada a cada quinze dias nas fêmeas tratadas não apresenta diferença entre os grupos, tendendo a um pequeno decréscimo, sem significância estatística.



**Gráfico 10:** Glicemia caudal, em miligramas por decilitro (mg/dL), basal e aferida a cada duas semanas, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), sem diferenças estatísticas. Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

### **5.5.2 Parâmetros bioquímicos**

As tabelas 10, 11 e 12 expressam os valores médios dos parâmetros bioquímicos avaliados no presente experimento. Para esses parâmetros, além da análise de variância e teste de Dunnett, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que não demonstraram diferença estatística entre os grupos tratados e controle, ocorrendo uma única exceção, na dose de 4,3 mg/kg, na qual os machos apresentaram ALT significativamente menor.



**TABELA 10:** Parâmetros bioquímicos (Média  $\pm$  Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster.

Grupos	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	ÁcidoÚrico (mg/dL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Fosfatase Alcalina (UI/L)
<b>Machos</b>									
Controle	117,3 $\pm$ 13,5	31,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,1	33,0 $\pm$ 2,6	25,3 $\pm$ 9,4	0,6 $\pm$ 0,2	141,3 $\pm$ 16,3	87,0 $\pm$ 9,3	204,0 $\pm$ 23,1
4,3 mg/kg	133,3 $\pm$ 12,0	31,3 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 0,1	48,3 $\pm$ 4,1	18,3 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 0,1	96,7 $\pm$ 2,4	54 $\pm$ 0,36*	119,0 $\pm$ 20,6
12,9 mg/kg	104,3 $\pm$ 5,5	32,0 $\pm$ 1,7	0,5 $\pm$ 0,0	36,0 $\pm$ 3,2	31,3 $\pm$ 1,8	0,6 $\pm$ 0,2	148,3 $\pm$ 17,7	65,0 $\pm$ 6,1	141,3 $\pm$ 46,8
38,7 mg/kg	104,7 $\pm$ 6,2	35,7 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 0,0	41,3 $\pm$ 2,6	37,7 $\pm$ 7,7	0,8 $\pm$ 0,1	144,0 $\pm$ 8,5	66,7 $\pm$ 4,2	94,0 $\pm$ 15,0
<b>Fêmeas</b>									
Controle	106,7 $\pm$ 3,7	29,7 $\pm$ 3,8	0,6 $\pm$ 0,0	60,7 $\pm$ 6,8	24,7 $\pm$ 2,4	0,8 $\pm$ 0,1	132,3 $\pm$ 8,4	70,3 $\pm$ 14,9	82,7 $\pm$ 12,9
4,3 mg/kg	120,3 $\pm$ 9,4	31,3 $\pm$ 1,8	0,6 $\pm$ 0,0	54,3 $\pm$ 7,9	39,3 $\pm$ 10,7	0,9 $\pm$ 0,2	171,7 $\pm$ 26,4	58,3 $\pm$ 7,2	87,7 $\pm$ 22,6
12,9 mg/kg	107,7 $\pm$ 7,0	34,0 $\pm$ 2,1	0,6 $\pm$ 0,0	52,3 $\pm$ 8,7	25,0 $\pm$ 4,0	1 $\pm$ 0,2	144,0 $\pm$ 7,6	66,7 $\pm$ 4,1	93,7 $\pm$ 26,3
38,7 mg/kg	112,3 $\pm$ 0,9	38,0 $\pm$ 2,3	0,5 $\pm$ 0,0	94,5 $\pm$ 17,5	30,5 $\pm$ 8,5	1,1 $\pm$ 0,2	196,7 $\pm$ 46,4	68,0 $\pm$ 9,8	77,3 $\pm$ 10,7

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Dunnett e Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ).

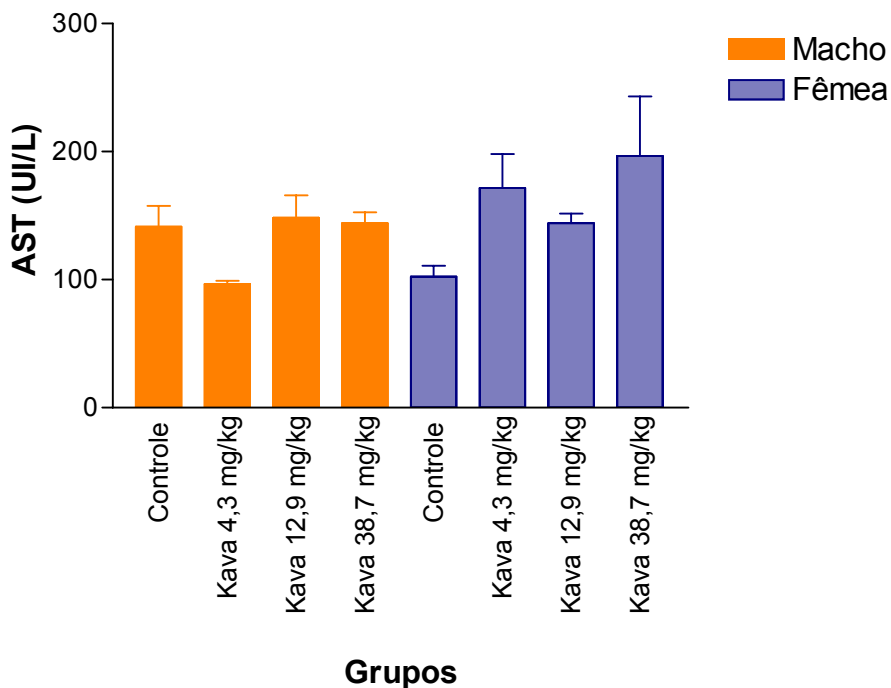
**TABELA 11:** Parâmetros bioquímicos (Média  $\pm$  Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster

Grupos	CK (UI/L)	DHL (UI/L)	Amilase (UI/L)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulinas (g/dL)	$\gamma$ GT (UI/L)
<b>Machos</b>							
Controle	1721 $\pm$ 467	1155 $\pm$ 144	666 $\pm$ 38,5	6,7 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,3
4,3 mg/kg	2653 $\pm$ 417	772 $\pm$ 130	680 $\pm$ 42,9	6,7 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0
12,9 mg/kg	1855 $\pm$ 393	914 $\pm$ 48	644 $\pm$ 54,7	6,4 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
37,9 mg/kg	2303 $\pm$ 106	823 $\pm$ 289	638,5 $\pm$ 5,5	6,4 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
<b>Fêmeas</b>							
Controle	1837 $\pm$ 58	889 $\pm$ 118	576,7 $\pm$ 79,2	7,1 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0
4,3 mg/kg	5097 $\pm$ 904	1305 $\pm$ 239	442,3 $\pm$ 30,9	6,9 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0
12,9 mg/kg	3764 $\pm$ 1126	1125 $\pm$ 294	511,0 $\pm$ 66,8	6,7 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0
38,7 mg/kg	4044 $\pm$ 1956	1689 $\pm$ 765	557,0 $\pm$ 126	6,9 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0

**TABELA 12:** Parâmetros bioquímicos (Média  $\pm$  Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster.

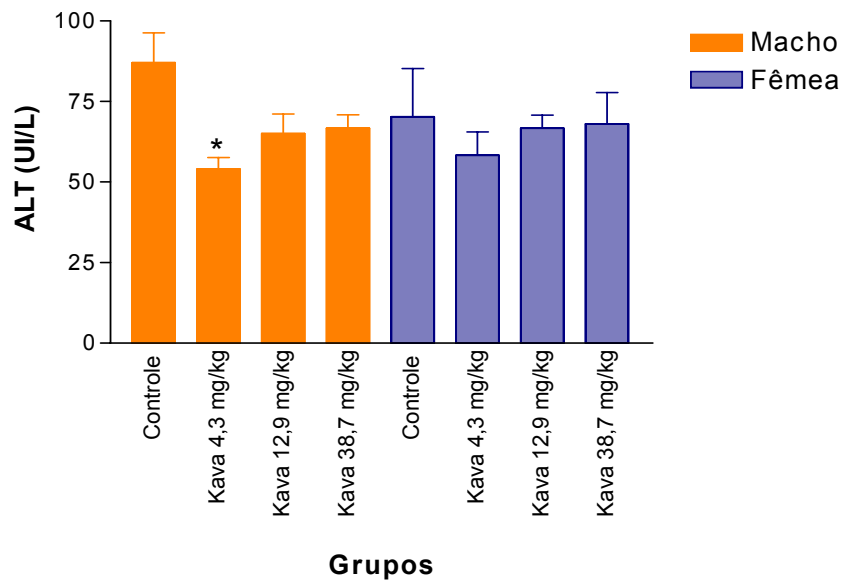
Grupos	Bilirrubina total (mg/dL)	Bilirrubina direta (mg/dL)	Bilirrubina indireta (mg/dL)	Ca <sup>+2</sup> (mEq/L)	Mg <sup>+2</sup> (mEq/L)	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)
<b>Machos</b>							
Controle	0,13 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	9,8 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,2	144,7 $\pm$ 2,7	6,4 $\pm$ 0,3
4,3 mg/kg	0,1 $\pm$ 0,0	0,05 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	10,9 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	145,3 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,4
12,9 mg/kg	0,10 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	10,8 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,0	143,3 $\pm$ 1,4	6,6 $\pm$ 0,4
37,9 mg/kg	0,13 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,03	10,1 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,1	143,5 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,5
<b>Fêmeas</b>							
Controle	0,13 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	10,8 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	144,3 $\pm$ 1,4	6,2 $\pm$ 0,4
4,3 mg/kg	0,10 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	10,3 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	139,7 $\pm$ 0,9	5,6 $\pm$ 0,5
12,9 mg/kg	0,13 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	9,7 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,1	142,3 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 0,5
38,7 mg/kg	0,15 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	10,3 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	144,0 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 0,0

Os gráficos 11 a 16 demonstram o comportamento dos parâmetros de avaliação de AST, ALT, FA, albumina,  $\gamma$ GT e bilirrubina total, sem diferenças significantes, com uma exceção, na dose de 4,3 mg/kg, quando a ALT dos machos foi menor. No gráfico 11 estão expressos os valores médios da AST, observada nos machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com *Piper methysticum* G. Foster.



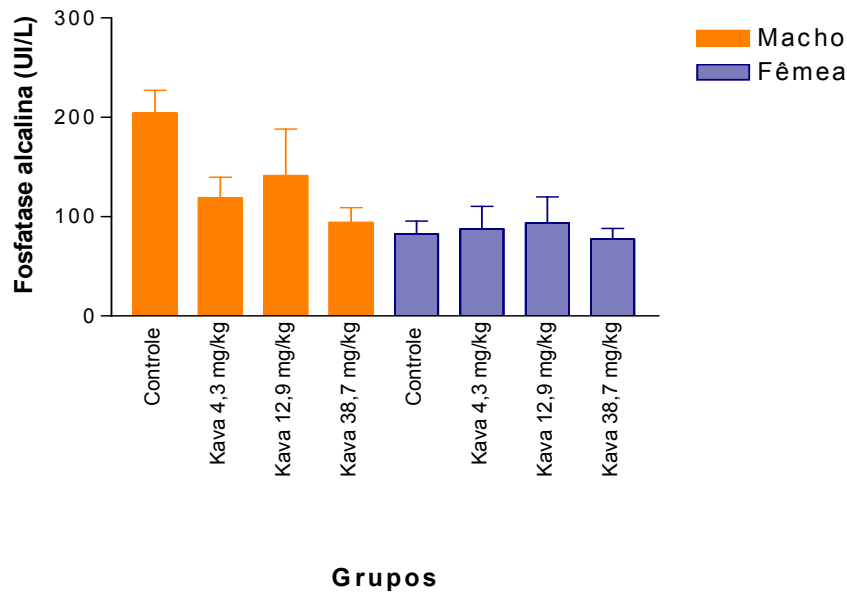
**Gráfico 11:** Aspartato aminotransferase (AST) em unidades internacionais por litro (UI/L) de ratos machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

No gráfico 12 estão expressos os valores médios de ALT, observados nos grupos tratados e controle, após as 13 semanas. A ALT foi menor, com significância estatística, apenas na dose de 4,3 mg/kg, nos machos.



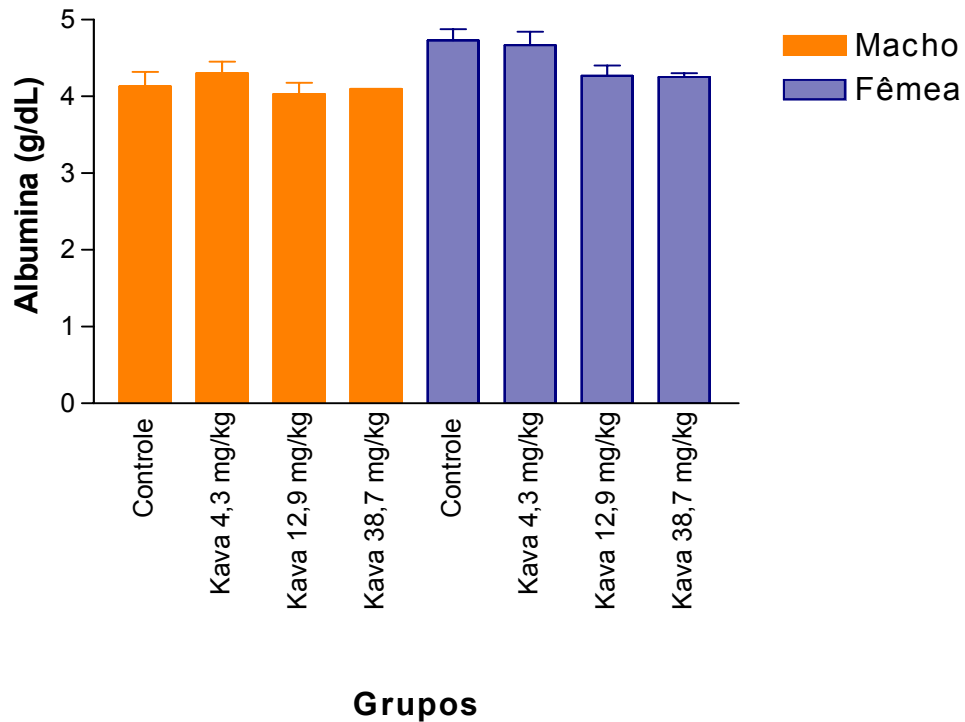
**Gráfico 12:** Alanino aminotransferase (ALT) em unidades internacionais por litro (UI/L) de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), semelhante em todos os grupos, exceto com 4,3 mg/kg, quando este parâmetro foi significativamente menor. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

O gráfico 13 demonstra a semelhança dos valores médios da FA, registrados nos grupos tratados e controle, após as 13 semanas.



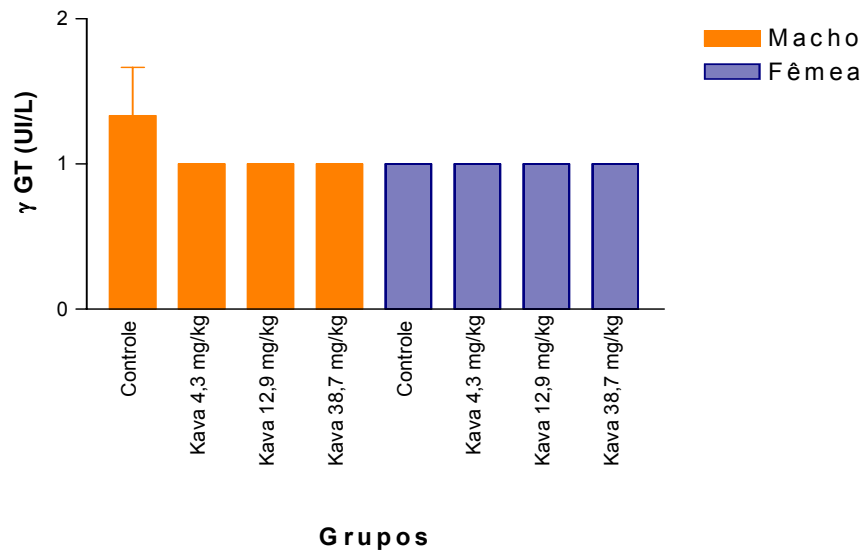
**Gráfico 13:** Fosfatase alcalina (FA), em unidades internacionais por litro (UI/L), de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), semelhante em todos os grupos. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

No gráfico 14, observa-se o comportamento semelhante dos valores médios da albumina sérica entre os animais tratados e o grupo controle.



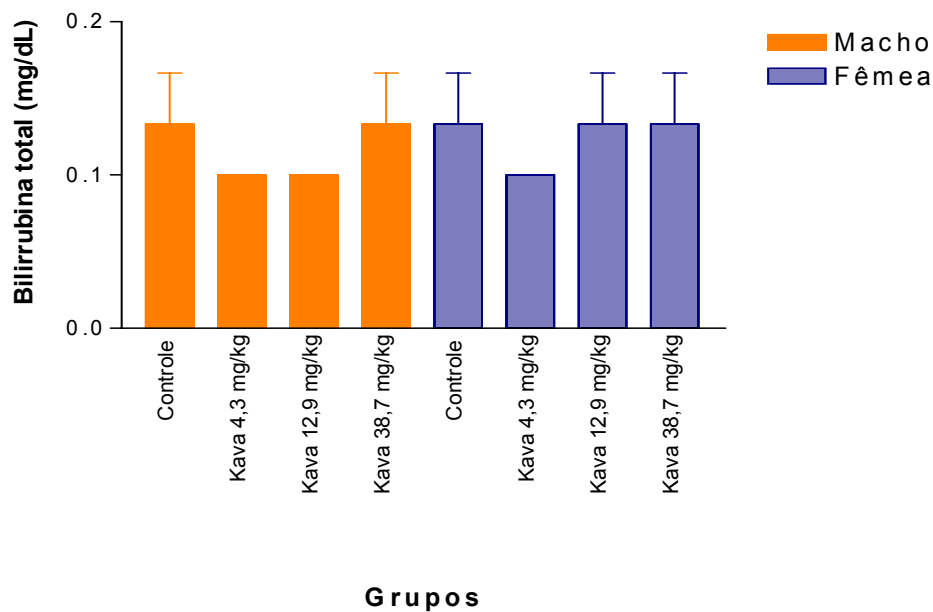
**Gráfico 14:** Albumina sérica em gramas por decilitro (g/dL) de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

No gráfico 15 observa-se o comportamento dos valores médios da  $\gamma$ GT dos grupos de animais após o tratamento com *Piper methysticum* G. Foster por 13 semanas, sem diferença estatística entre os grupos.



**Gráfico 15:** Gama glutamiltransferase ( $\gamma$ GT) em unidades internacionais por litro (UI/L) de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster (n= 5 animais por dose e por sexo; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

O gráfico 16 demonstra a semelhança dos valores médios da bilirrubina total dos animais, após o período de tratamento com a kava, sob a forma de extrato WS 1490, em diferentes doses.



**Gráfico 16:** Bilirrubina total, em gramas por decilitro (g/dL), de ratos machos e fêmeas após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster (n= 5 animais por dose

e por sexo; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

### 5.5.3 Parâmetros hematológicos

As tabelas 13 e 14 mostram os resultados dos parâmetros hematológicos dos grupos tratados e controle, submetidos à ANOVA e testes de Dunnett e Kruskal-Wallis, sem diferenças significativas entre os valores médios, exceto na contagem diferencial dos leucócitos, nas três doses: com 4,3 mg/kg, as fêmeas apresentaram neutrofilia significativa; na dose de 12,9 mg/kg os machos apresentaram neutrofilia e linfocitopenia e com 38,7 mg/kg, estes apresentaram eosinofilia em relação ao grupo controle.

**TABELA 13:** Parâmetros hematológicos (Média  $\pm$  Erro padrão) de ratos machos e fêmeas ( $n=10$ ), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster.

	Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM ( $\mu^3$ )	HCM ( $\mu\mu\text{g}$ )	CHCM (%)
<b>Machos</b>						
Controle	7,7 $\pm$ 1,7	14,0 $\pm$ 1,4	41,7 $\pm$ 4,2	54,5 $\pm$ 1,6	18,2 $\pm$ 0,5	33,5 $\pm$ 0,2
4,3 mg/kg	8,0 $\pm$ 0,4	14,8 $\pm$ 0,1	43,3 $\pm$ 1,3	54,3 $\pm$ 0,4	18,5 $\pm$ 0,6	34,1 $\pm$ 0,9
12,9 mg/kg	8,3 $\pm$ 0,3	15,3 $\pm$ 0,6	46,2 $\pm$ 2,6	55,4 $\pm$ 0,4	18,3 $\pm$ 0,5	33,1 $\pm$ 0,4
38,7 mg/kg	8,5 $\pm$ 0,1	15,2 $\pm$ 0,4	46,2 $\pm$ 0,6	54,5 $\pm$ 0,3	18,0 $\pm$ 0,4	32,9 $\pm$ 0,4
<b>Fêmeas</b>						
Controle	7,9 $\pm$ 0,3	14,8 $\pm$ 0,4	43,7 $\pm$ 0,9	55,7 $\pm$ 2,5	18,9 $\pm$ 1,1	33,9 $\pm$ 0,5
4,3 mg/kg	7,8 $\pm$ 0,1	14,6 $\pm$ 0,1	42,5 $\pm$ 1,2	55,2 $\pm$ 1,4	18,9 $\pm$ 0,1	34,3 $\pm$ 0,8
12,9 mg/kg	8,6 $\pm$ 0,2	15,9 $\pm$ 0,3	47,4 $\pm$ 1,5	55,4 $\pm$ 0,3	18,6 $\pm$ 0,2	33,6 $\pm$ 0,4
38,7 mg/kg	7,6 $\pm$ 0,1	14,4 $\pm$ 0,2	41,5 $\pm$ 0,3	54,9 $\pm$ 1,2	19,0 $\pm$ 0,4	34,7 $\pm$ 0,1

VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; CHCM=Concentração de hemoglobina corpuscular média.

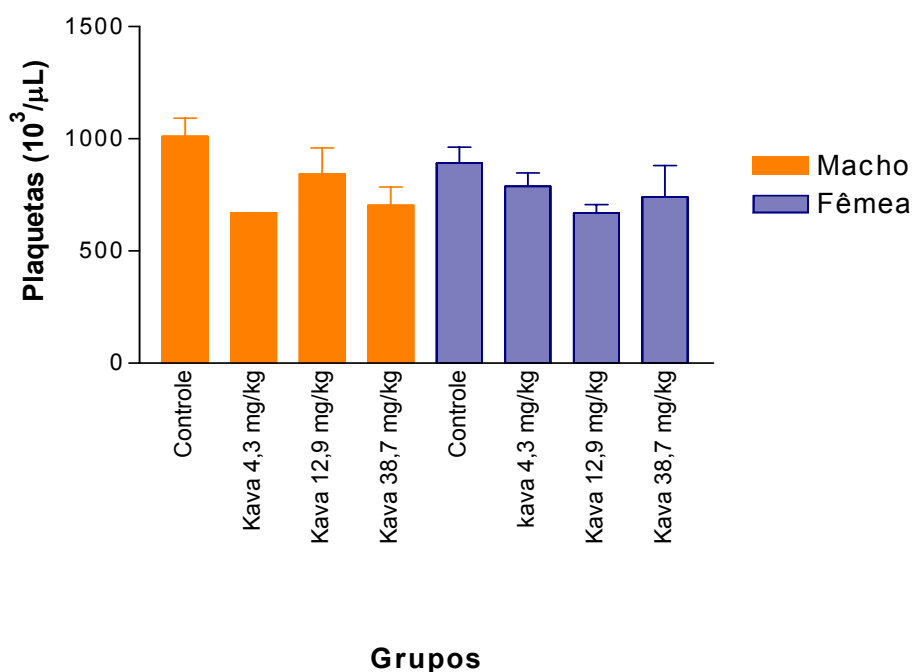


**TABELA 14:** Parâmetros hematológicos (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=10), após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster.

	Leucócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)
<b>Machos</b>						
Controle	5,2±0,6	24,7±1,4	1,3±0,3	70,0±1,5	4,0±1,0	1010±81
4,3 mg/kg	4,1±0,1	29,0±1,0	2,5±0,5	66,5±1,5	2,0±1,0	669±2
12,9 mg/kg	7,1±1,2	48,0±2,0*	1,7±0,3	47,7±1,2*	3,0±1,0	843±116
38,7 mg/kg	6,7±1,9	19,5±9,5	3,0±0,0*	74,5±8,5	4,5±2,5	703±83
<b>Fêmeas</b>						
Controle	3,6±0,5	29,0±0,6	2,0±1,0	66,3±0,3	2,7±0,3	892±71
4,3 mg/kg	4,3±0,6	43,0±2,0*	2,0±1,0	51,0±5,0	4,0±2,0	787±60
12,9 mg/kg	4,8±1,2	22,7±3,8	2,0±0,6	69,3±5,8	5,7±2,3	669±37
38,7 mg/kg	4,6±1,2	26,7±3,0	1,7±0,3	67,7±3,2	4,0±1,5	740±140

VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; CHCM=Concentração de hemoglobina corpuscular média. \* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, testes de Dunnett e Kruskal-Wallis, p<0,05).

O gráfico 17 mostra os valores médios obtidos por ocasião da aferição das plaquetas, sem diferenças significantes em relação ao grupo controle.



**Gráfico 17:** Valores médios das plaquetas dos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa em relação ao grupo controle (n=10 animais por dose; ANOVA, Dunnett, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Cada linha representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

## 5.6 Parâmetros de observação comportamental e motora

### 5.6.1 Campo aberto (*open field*)

#### ✓ Ambulação

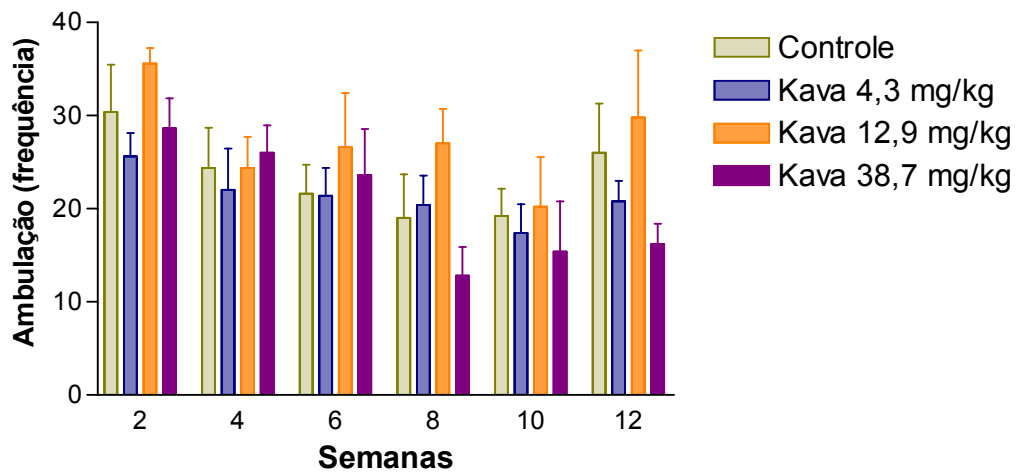
A tabela 15 apresenta os resultados obtidos da frequência de ambulações no teste de campo aberto. Houve semelhança estatística entre os animais tratados com as três doses, excetuando-se as fêmeas que receberam três vezes dose usual (12,9 mg/kg), que apresentaram ambulação média significativamente menor que o grupo controle na 8<sup>a</sup> semana.

**TABELA 15:** Frequência de ambulação no experimento de campo aberto (Média  $\pm$  Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

<b>SEMANAS</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Machos</b>						
Controle	30,4 $\pm$ 5,1	24,4 $\pm$ 4,3	21,6 $\pm$ 3,1	19,0 $\pm$ 4,7	19,2 $\pm$ 2,9	26,0 $\pm$ 5,3
4,3 mg/kg	25,6 $\pm$ 2,5	22,0 $\pm$ 4,5	21,4 $\pm$ 3,0	20,4 $\pm$ 3,1	17,4 $\pm$ 3,1	20,8 $\pm$ 2,2
12,9 mg/kg	35,6 $\pm$ 1,7	24,4 $\pm$ 3,3	26,6 $\pm$ 5,8	27,0 $\pm$ 3,7	20,2 $\pm$ 5,4	29,8 $\pm$ 7,2
38,7 mg/kg	28,6 $\pm$ 3,3	26,0 $\pm$ 2,9	23,6 $\pm$ 4,9	12,8 $\pm$ 3,1	15,4 $\pm$ 5,4	16,2 $\pm$ 2,2
<b>Fêmeas</b>						
Controle	36,6 $\pm$ 1,7	40,8 $\pm$ 5,6	27,4 $\pm$ 5,6	44,0 $\pm$ 8,2	35,2 $\pm$ 8,8	34,2 $\pm$ 3,8
4,3 mg/kg	36,4 $\pm$ 3,0	37,0 $\pm$ 7,2	27,2 $\pm$ 2,0	27,8 $\pm$ 4,6	33,4 $\pm$ 5,1	29,6 $\pm$ 5,3
12,9 mg/kg	33,8 $\pm$ 7,1	28,6 $\pm$ 5,3	24,6 $\pm$ 4,6	18,8 $\pm$ 5,9*	27,6 $\pm$ 7,9	24,0 $\pm$ 8,1
38,7 mg/kg	37,0 $\pm$ 3,1	40,6 $\pm$ 5,1	23,8 $\pm$ 1,8	27,6 $\pm$ 7,0	27,6 $\pm$ 5,8	28,2 $\pm$ 7,7

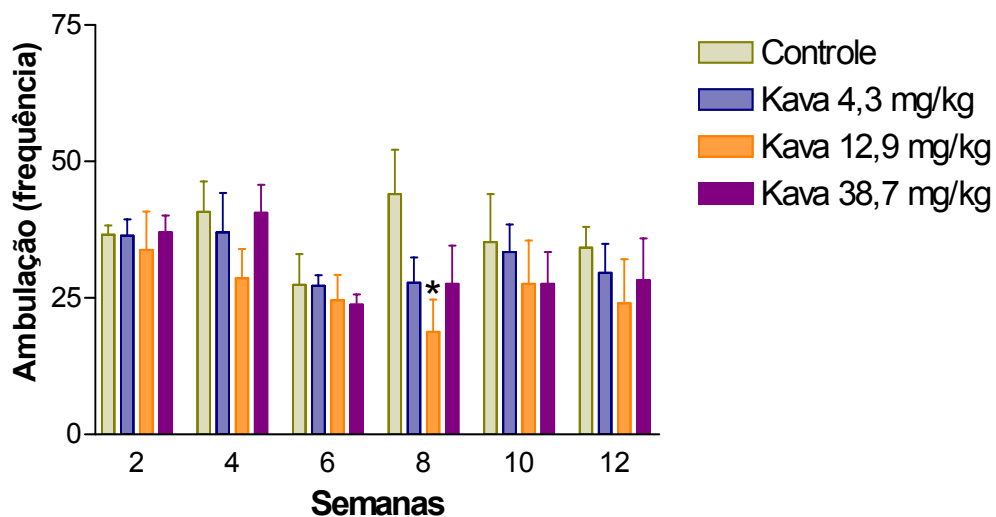
\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ).

O gráfico 18 representa a frequência da ambulação dos machos, sem diferenças estatísticas durante as 13 semanas do experimento.



**Gráfico 18:** Frequência de ambulação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

No gráfico 19, a ambulação das fêmeas mostra o mesmo comportamento dos machos, porém com redução significativa com relação ao grupo controle com a dose 12,9 mg/kg, na 8ª semana.



**Gráfico 19:** Frequência de ambulação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, em ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, com diferença significativa com relação ao grupo controle na 8ª semana, com a dose 12,9 mg/kg (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.

### ✓ Levantar

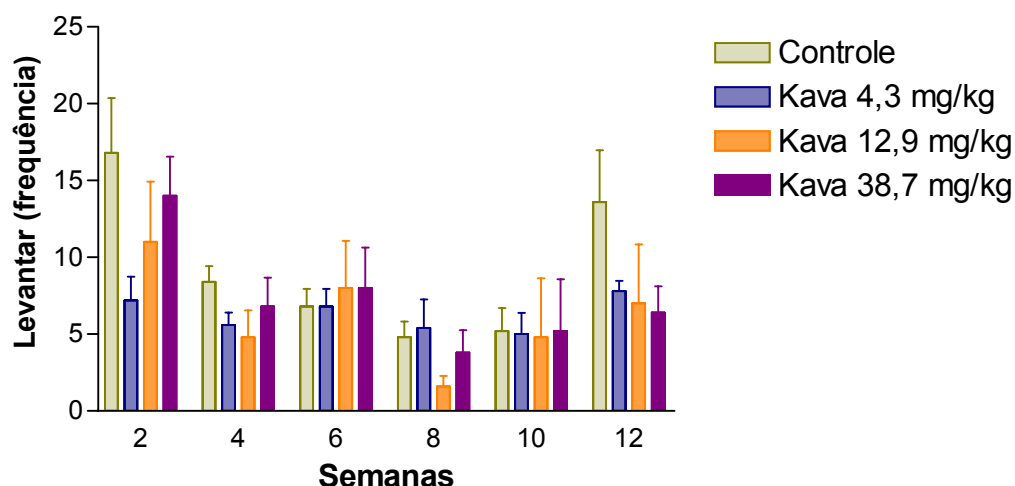
A tabela 16 apresenta os valores médios da frequência do comportamento levantar (*rearing*), nos animais tratados, que não se diferenciaram do grupo controle, exceto na dose 4,3 mg/kg, quando na 8ª semana, entre as fêmeas, esta foi significativamente menor.

**TABELA 16:** Frequência de execuções do comportamento levantar (*rearing*) (Média ± Erro padrão) no experimento de campo aberto, de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

SEMANAS	2	4	6	8	10	12
<b>Machos</b>						
Controle	16,8±3,6	8,4±2,3	6,8±1,2	4,8±1,0	5,2±1,5	13,6±3,4
4,3 mg/kg	7,2±1,5	5,6±0,8	6,8±1,2	5,4±1,9	5,0±1,4	7,8±0,7
12,9 mg/kg	11,0±3,9	4,8±1,7	8,0±3,1	1,6±0,7	4,8±3,8	7,0±3,8
38,7 mg/kg	14,0±2,5	6,8±1,9	8,0±2,6	3,8±1,5	5,2±3,4	6,4±1,7
<b>Fêmeas</b>						
Controle	11,2±2,4	7,2±2,1	3,2±1,5	11,6±2,2	9,6±4,2	9,0±3,9
4,3 mg/kg	12,8±2,4	9,4±2,2	8,0±2,6	3,6±0,9*	7,2±1,4	8,0±0,9
12,9 mg/kg	10,8±3,0	11,6±3,2	6,8±1,8	5,0±2,2	7,2±2,5	5,8±2,4
38,7 mg/kg	19,6±3,9	12,4±0,8	7,2±1,6	6,6±2,4	7,8±3,8	9,2±2,9

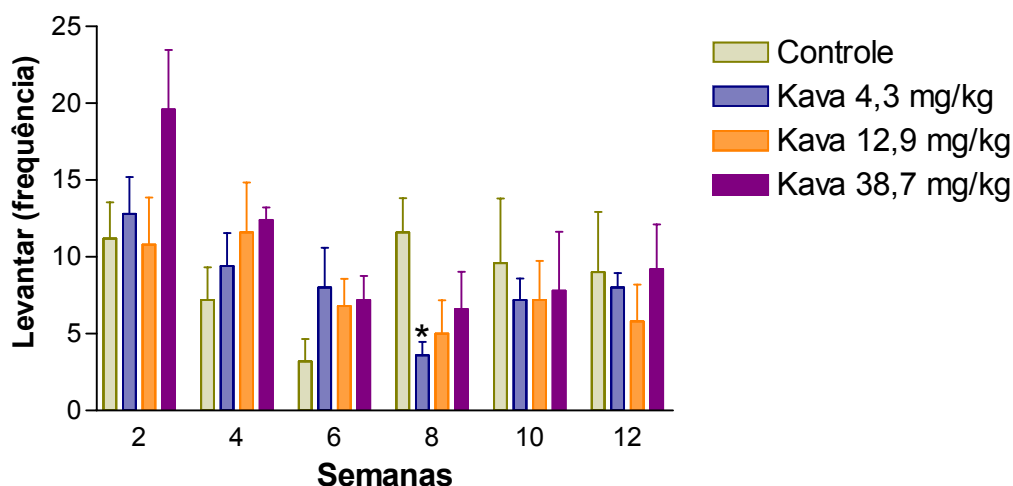
\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ).

O gráfico 20 mostra os valores médios do levantar (*rearing*), em machos, nos grupos controle e experimental, apresentando pequenas variações, sem diferenças estatísticas.



**Gráfico 20:** Frequência do comportamento levantar (*rearing*), avaliada a cada duas semanas, no experimento de campo aberto, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), sem diferença significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

O gráfico 21 mostra os valores médios da frequência do levantar (*rearing*) observados em fêmeas, com semelhança estatística, exceto na dose 4,3 mg/kg, quando a frequência foi significativamente menor no grupo tratado.



**Gráfico 21:** Frequência do comportamento levantar (*rearing*), avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), significativamente menor que o grupo controle na 8ª semana, com a dose 12,9 mg/kg. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.\* = Diferença significativa.

### ✓ Limpeza (*grooming*)

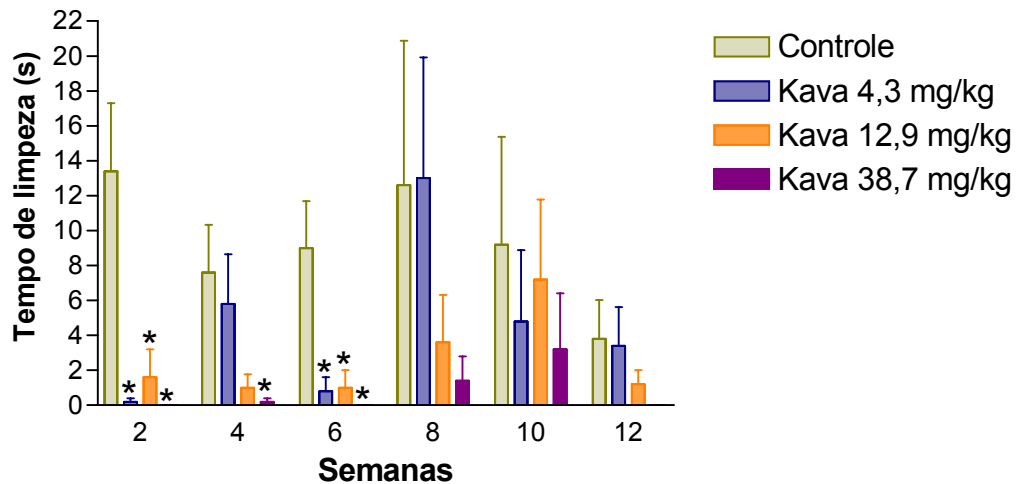
Os valores médios do tempo de execução do comportamento de limpeza (*grooming*) estão discriminados na tabela 17. Entre os machos, ocorreu diminuição desse tempo em todas as doses, na 2ª e 6ª semanas, sendo que, na dose de 38,7 mg/kg, isso também ocorreu na 4ª semana. Entre as fêmeas, não houve diferença estatística.

**TABELA 17:** Tempo de execução, em segundos, do comportamento de limpeza (*grooming*) no experimento de campo aberto (Média ± Erro padrão) de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

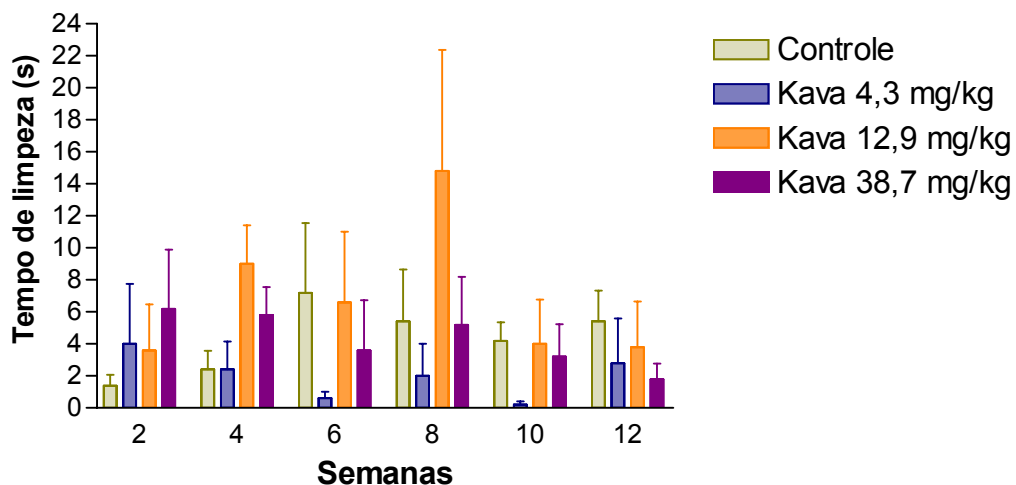
SEMANAS	2	4	6	8	10	12
<b>Machos</b>						
Controle	13,4±3,9	7,6±2,7	9,0±2,7	12,6±8,3	9,2±6,2	3,8±2,2
4,3 mg/kg	0,2±0,2*	5,8±2,8	0,8±0,8*	13,0±6,9	4,8±4,1	2,4±2,2
12,9 mg/kg	1,6±1,6*	1,0±0,8	1,0±1,0*	3,6±2,7	7,2±4,6	1,2±0,8
38,7 mg/kg	0,0±0,0*	0,2±0,2*	0,0±0,0*	1,4±1,4	3,2±3,2	0,0±0,0
<b>Fêmeas</b>						
Controle	1,4±0,7	2,4±1,2	7,2±4,3	5,4±3,2	4,2±1,2	5,4±1,9
4,3 mg/kg	4,0±3,8	2,4±1,7	0,6±0,4	2,0±2,0	0,2±0,2	2,8±2,8
12,9 mg/kg	3,6±2,9	9,0±2,4	6,6±4,4	14,8±7,6	4,0±2,8	3,8±2,8
38,7 mg/kg	6,2±3,7	5,8±1,7	3,6±3,1	5,2±3,0	3,2±2,0	1,8±1,0

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ).

O gráfico 22 mostra que entre os machos, nas três doses, houve diminuição significativa do tempo de execução comportamento de limpeza (*grooming*), na 2ª e 6ª semanas, além de na 4ª semana com a dose mais elevada; outras variações foram sem significância. O gráfico 23 demonstra que, entre as fêmeas, as variações foram sem diferença estatística.



**Gráfico 22:** Tempo de execução, em segundos (s), do comportamento de limpeza (*grooming*), avaliado a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas. Este foi significativamente menor com relação ao grupo controle na 2ª semana nas três doses; com 38,7 mg/kg na 4ª semana e também em todas as doses na 6ª semana (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. \* = Diferença significativa.



**Gráfico 23:** Tempo de execução, em segundos (s), do comportamento de limpeza (*grooming*), avaliado a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ), sem diferença significativa com relação ao grupo controle. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.



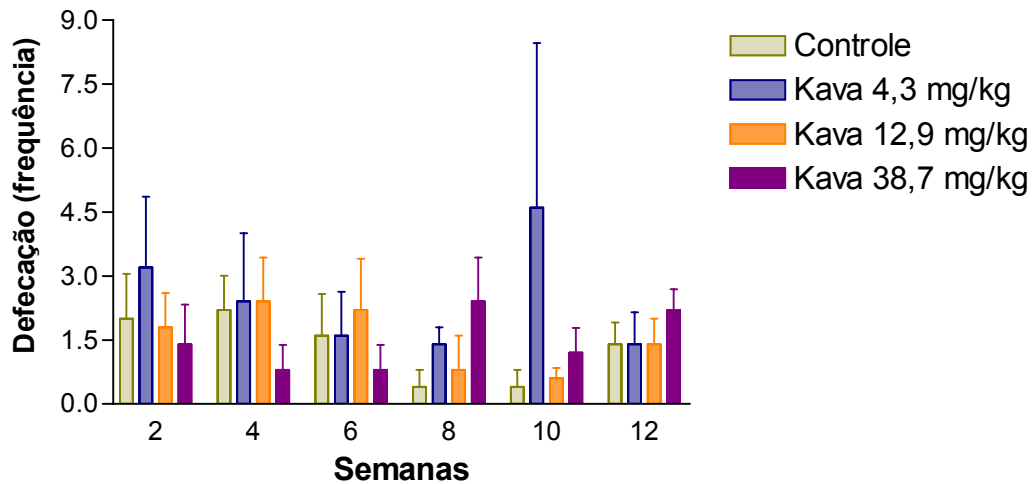
### ✓ Defecação

A tabela 18 e os gráficos 23 e 24 apresentam os valores médios da frequência de defecações observada a cada 2 semanas, sem evidência estatística de diferenças, mesmo com variações.

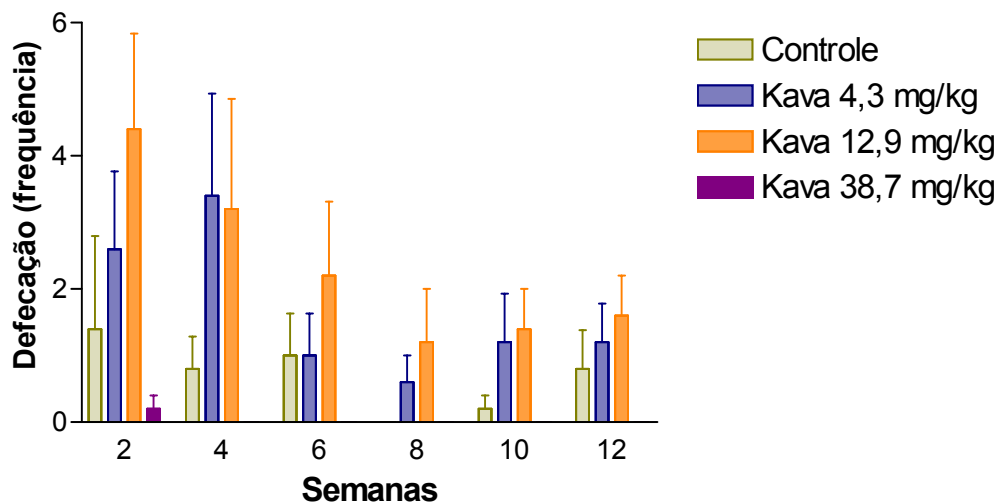
**TABELA 18:** Número de bolos fecais no experimento de campo aberto, em ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

<b>SEMANAS</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Machos</b>						
Controle	2,0±1,0	2,2±0,8	1,6±1,0	0,4±0,4	0,4±0,4	1,4±0,5
4,3 mg/kg	3,2±1,6	2,4±1,6	1,6±1,0	1,4±0,4	4,6±3,8	1,4±0,7
12,9 mg/kg	1,8±0,8	2,4±1,0	2,2±1,2	0,8±0,8	0,6±0,2	1,4±0,6
38,7 mg/kg	1,4±0,9	0,8±0,6	0,8±0,6	2,4±1,0	1,2±0,6	2,2±0,5
<b>Fêmeas</b>						
Controle	1,4±1,4	0,8±0,5	1,0±0,6	0,0±0,0	0,2±0,2	0,8±0,6
4,3 mg/kg	2,6±1,2	3,4±1,5	1,0±0,6	0,6±0,4	1,2±0,7	1,2±0,6
12,9 mg/kg	4,4±1,4	3,2±1,6	2,2±1,1	1,2±0,8	1,4±0,6	1,6±1,6
38,7 mg/kg	0,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

\* = Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ).



**Gráfico 24:** Frequência de defecação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.



**Gráfico 25:** Frequência de defecação, avaliada a cada duas semanas no experimento de campo aberto, de ratas tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas, sem diferença significativa com relação ao grupo controle (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

### 5.6.2 Rota-rod

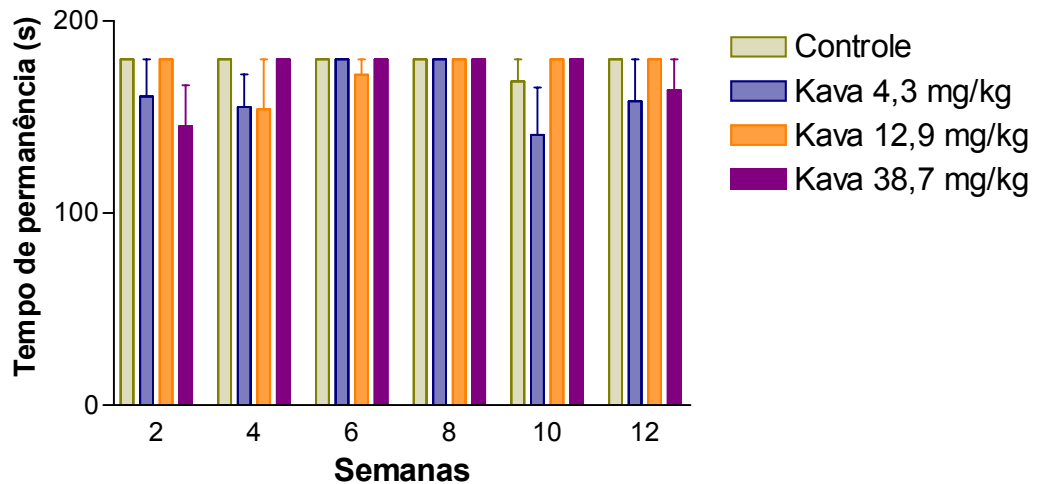
Na tabela 19 estão expressos os valores médios do tempo de permanência, em segundos, na barra giratória do aparelho *Rota-rod* (Ugo Basile®). Ocorreu

pequena variabilidade nos valores médios dos animais tratados, porém mantendo semelhança com o grupo controle.

**TABELA 19:** Tempo de permanência em segundos (s) na barra giratória do aparelho *Rota-rod*, de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

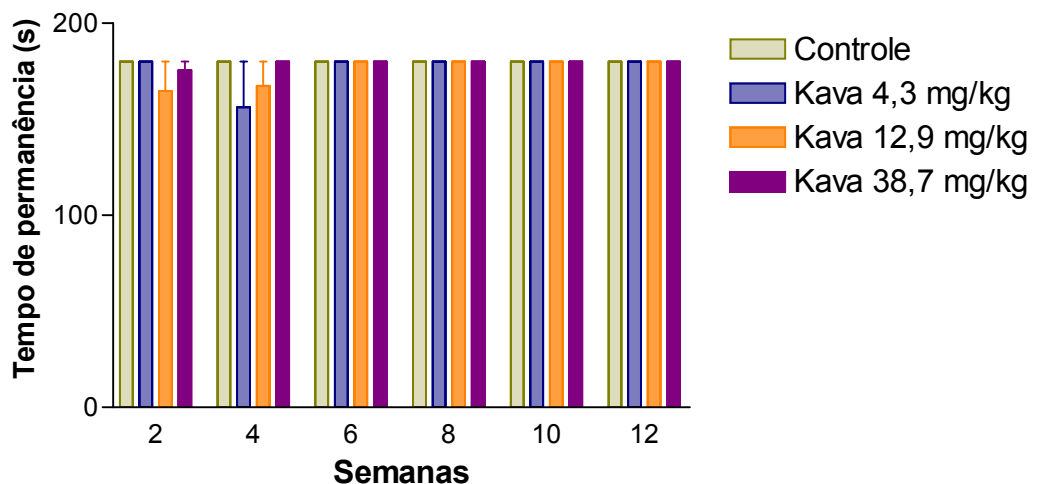
<b>SEMANAS</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Machos</b>						
Controle	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	168,6±11,4	180,0±0,0
4,3 mg/kg	160,8±19,2	155,2±17,1	180,0±0,0	180,0±0,0	140,8±24,6	158,2±21,8
12,9 mg/kg	180,0±0,0	154±26,0	172±8,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
38,7 mg/kg	145,2±21,46	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	164,0±16,0
<b>Fêmeas</b>						
Controle	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
4,3 mg/kg	180,0±0,0	156,2±23,8	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
12,9 mg/kg	164,8±15,2	167,4±12,6	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
38,7 mg/kg	175,6±4,4	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0

O gráfico 26 representa o comportamento dos animais machos, expresso em valores médios, com relação ao tempo de permanência no aparelho de *Rota-rod* (Ugo Basile®), com pequena variação no decorrer do experimento, sem diferença significativa.



**Gráfico 26:** Tempo de permanência, em segundos (s), avaliado a cada duas semanas, no aparelho de *Rota-rod*, de ratos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. Não houve diferença significativa.

O gráfico 27 representa o comportamento dos valores médios do tempo de permanência das fêmeas, registrados no teste *Rota-Rod*. Não houve variação por grupo, ao longo das observações quinzenais durante o experimento.



**Gráfico 27:** Tempo de permanência, em segundos (s), avaliado a cada duas semanas, no aparelho de *Rota-rod*, de ratas tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster, durante 13 semanas (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett,  $p < 0,05$ ). Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo. Não houve diferença significativa.

### 5.6.3 Labirinto em cruz elevado (*elevated plus maze*)

A tabela 20 apresenta a frequência média de entradas nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado (*plus maze*), dos animais tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* durante as 13 semanas, dos grupos controle e da droga referência (diazepam), controle positivo deste experimento. Demonstra também o tempo médio de permanência dos mesmos nos braços aberto e fechado do labirinto.

**TABELA 20:** Frequência de entradas e tempo de permanência (Média  $\pm$  Erro padrão), em segundos (s), no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), de ratos machos e fêmeas (n=5) tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas, e do grupo controle de referência, tratado com diazepam.

Braço	Dose	Machos		Fêmeas	
		Entrada	Tempo (s)	Entrada	Tempo (s)
Fechado	Controle	3,0 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 1,8	4,4 $\pm$ 0,1
	4,3 mg/kg	4,7 $\pm$ 2,7	3,8 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 2,0	4,2 $\pm$ 0,1
	12,9 mg/kg	4,0 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 0,1
	38,7 mg/kg	3,0 $\pm$ 1,5	3,5 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 1,2	4 $\pm$ 0,4
	Diazepam	4,4 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 0,5
Aberto	Controle	0,7 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
	4,3 mg/kg	1,3 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
	12,9 mg/kg	1,7 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	38,7 mg/kg	1,7 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,3
	Diazepam	2,6 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 1,3	0,6 $\pm$ 0,3

Quando comparados ao grupo controle, os grupos tratados apresentaram semelhança estatística, de acordo com ANOVA e testes de Dunnett e Kruskal-Wallis, apesar das variações descritas a seguir:

✓ **Grupo diazepam comparado ao grupo controle:**

Ao comparar o grupo que recebeu diazepam com o grupo controle, observou-se que no braço aberto do labirinto, os animais que receberam diazepam tiveram a frequência de entradas e o tempo de permanência maior que os controles. No braço fechado, aqueles que receberam diazepam tiveram uma frequência de entradas maior que os controles, embora o tempo de permanência tenha sido, em ambos os sexos, menor que os controles, comportamentos estes sem significância estatística.

✓ **Grupos diferentes doses do extrato da kava comparados ao grupo controle:**

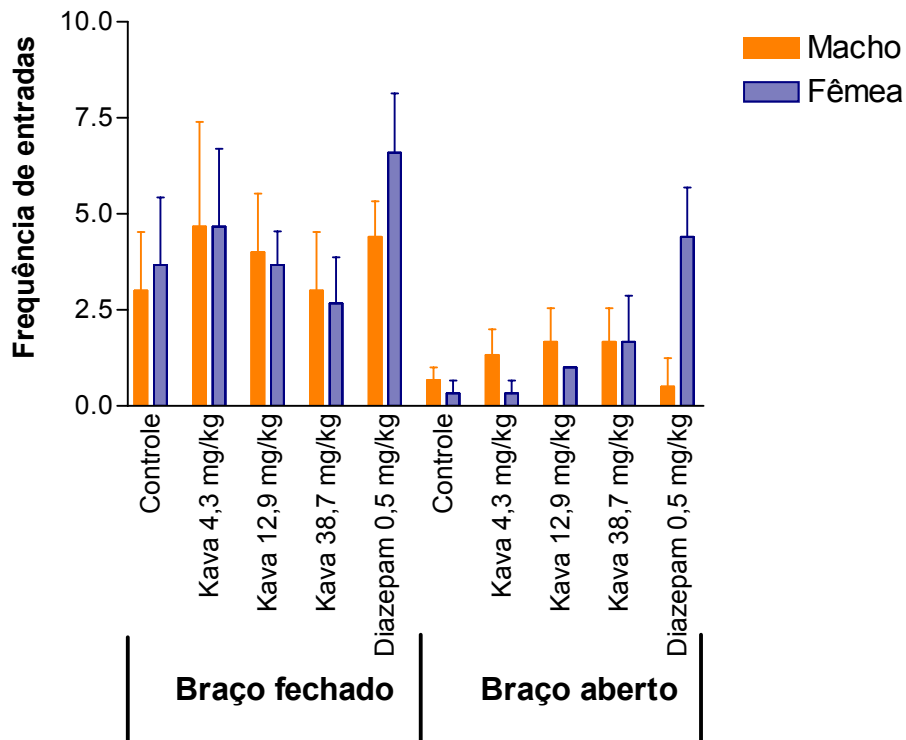
No braço aberto do labirinto, nas três doses, entre os machos, a frequência de entradas foi maior, ao contrário do tempo de permanência, que foi menor que os controles. Entre as fêmeas, a frequência de entradas na dose de 4,3 mg/kg foi semelhante aos controles e maior nas doses 4,3 e 38,7 mg/kg. O tempo de permanência das fêmeas neste braço foi semelhante aos controles nas doses 4,3 e 12,9 e maior na dose 38,7 mg/kg.

No braço fechado, observa-se que a frequência de entradas foi maior nas doses de 4,3 e 12,9 mg/kg e semelhante na dose de 38,7 mg/kg, entre os machos. A frequência de entradas das fêmeas foi maior na dose de 4,3 mg/kg, igual na dose de 12,9 mg/kg e menor na dose de 38,7 mg/kg. Quanto ao tempo de permanência neste braço, nas três doses, o das fêmeas foi menor que os controles e, nos machos, foi menor nas doses 4,3 mg/kg e 38,7 mg/kg e igual na dose de 12,9 mg/kg. Nenhuma dessas diferenças apresentou significância estatística.

✓ **Grupos diferentes doses do extrato da kava comparados ao grupo diazepam:**

No braço aberto do labirinto, todos os grupos tratados com a kava tiveram a frequência de entradas e o tempo de permanência menores que os tratados com diazepam. No braço fechado, entre os machos, somente na dose de 38,7 mg/kg houve menor frequência de entradas; entre as fêmeas, no entanto, a frequência de entrada nesse braço foi menor que o grupo diazepam. O tempo de permanência dos machos foi semelhante nos quatro grupos e um pouco maior nas fêmeas tratadas com kava. Essas diferenças também não mostraram significância estatística.

O gráfico 28 representa a frequência média de entradas nos braços fechado e aberto, no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), dos animais tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, durante as 13 semanas, dos tratados com a droga de referência e do grupo controle: a administração de diazepam induziu maior frequência média de entradas igualmente em machos e fêmeas no braço aberto; no braço fechado, dentre todos os grupos, a maior frequência média de entradas ocorreu em fêmeas nas quais se administrou diazepam e nos machos tratados com a dose de 4,3 mg/kg de kava. A administração do extrato de *Piper methysticum*, provocou aumento no número médio de entradas no braço aberto e uma diminuição no braço fechado, proporcional ao aumento da dose, sem significância estatística.

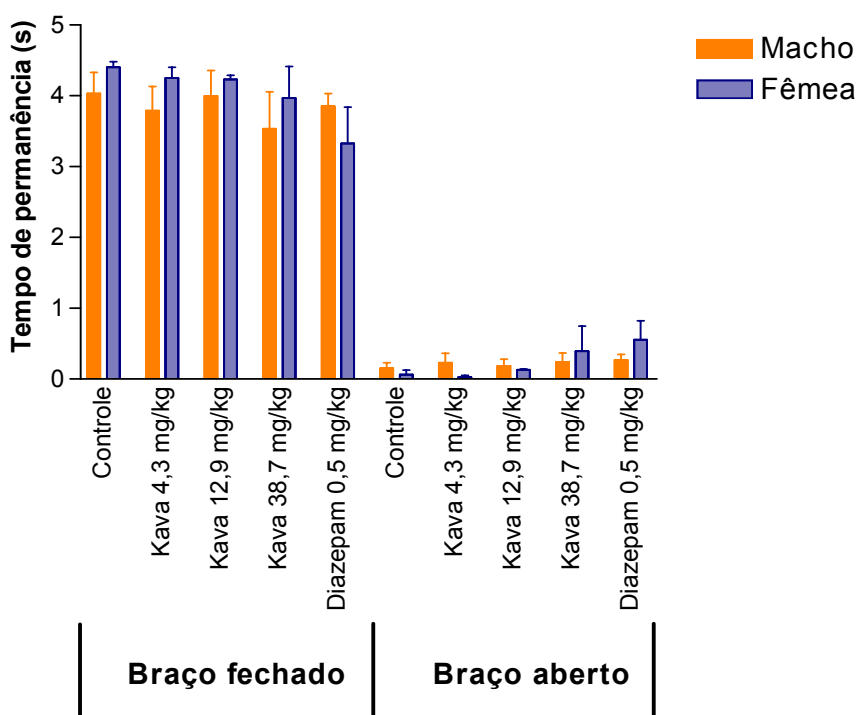


**Gráfico 28:** Frequência média de entradas nos braços fechado e aberto, no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), de ratos, machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* e do grupo controle de referência, tratado com 0,5 mg/kg de diazepam via oral (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre os grupos. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

O Gráfico 29 representa o tempo médio de permanência, em segundos, nos braços fechado e aberto, no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), dos animais tratados com diferentes doses de *Piper methysticum*, no decorrer das 13 semanas, dos tratados com a droga de referência e do grupo controle.

Na parte aberta do labirinto, os animais que receberam diazepam permaneceram mais tempo que todos os outros grupos. O tempo médio de permanência de todos os grupos foi maior no braço fechado que no braço aberto do labirinto. No braço aberto, o maior tempo de permanência correspondeu aos grupos das fêmeas que receberam diazepam e 38,7 mg/kg do extrato de kava, eventos sem significância estatística.





**Gráfico 29:** Tempo médio de permanência, em segundos, nos braços fechado e aberto, no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), de ratos, machos e fêmeas, após 13 semanas de tratamento com diferentes doses de *Piper methysticum* e do grupo controle de referência, tratado com 0,5 mg/kg de diazepam via oral (n= 5 animais por dose; ANOVA, Dunnett, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre os grupos. Cada coluna representa a média e erro padrão da média do respectivo grupo.

## 5.7 Avaliação macroscópica dos órgãos

Os aspectos macroscópicos de órgãos dos animais tratados com *Piper methysticum* foram semelhantes aos do grupo controle como se descreve a seguir.

### 5.7.1 Cavidade torácica

#### ✓ Pulmões e coração

Os pulmões estavam recobertos por pleura transparente, com vasos sinuosos e finos. Os grandes brônquios eram permeáveis e o parênquima, esponjoso, de tonalidade rósea, semelhantemente ao que se observou nos animais do grupo controle.

O coração, nos animais que receberam as diferentes doses da kava, encontrava-se, de modo semelhante ao grupo controle, dentro dos limites de normalidade anatômica, com epicárdio transparente e delicadamente vascularizado; vasos da base proporcionais às dimensões do órgão; cavidades atriais e ventriculares revestidas por endocárdio liso e brilhante, vazias ou ocupadas por coágulos sanguíneos *post-mortem*. As válvulas cardíacas tinham bordas livres.

#### ✓ **Esôfago**

Tubular e retilíneo, sem alterações aparentes.

### **5.7.2 Caverna retroperitoneal**

Rins envolvidos por cápsula semitransparente facilmente destacável do parênquima, apresentando, às secções seriadas, nítida delimitação da região cortical e medular. Nesta última zona, as pirâmides tinham vértices (papilas) voltados para os cálices. Os ureteres eram pérvios, representados por pequenos cotos. Não foram visualizadas lesões fibróticas, hemorrágicas ou áreas de enfarte.

### **5.7.3 Caverna abdominal**

O inventário da caverna abdominal não revelou alterações macroscópicas gastrointestinais, sendo o mesentério fino e vascularizado. Não havia coleções líquidas. O exame macroscópico dos espécimes de hepatectomia dos animais tratados e controle demonstrou órgãos com lobos anatômicos bem definidos, de bordas finas, envolvidos por cápsula de Glisson lisa e brilhante, facilmente destacável do parênquima, que exibia superfície externa lisa, brilhante e vinhosa. Os cortes seriados identificaram parênquima compacto, igualmente liso, brilhante e vinhoso, com consistência elástica, destacando-se vasos portais eqüidistantes, com

diâmetro luminal de até 1,5 mm, sendo os de maior dimensão localizados em topografia subcapsular.

#### 5.7.4 Peso dos órgãos

A tabela 21 apresenta a média do peso do fígado dos animais dos grupos tratados e controle; na tabela 22 consta a média do peso do coração e rins desses animais, sem diferença significativa entre esses pesos.

**TABELA 21:** Peso em gramas (g) (Média  $\pm$  Erro padrão), (n=3), do fígado de ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

Fígado				
Grupos	Controles	4,3 mg/kg (DU)	12,9 mg/kg (3DU)	38,7 mg/kg 9DU
Sexo				
Machos	7,74 $\pm$ 0,69	7,74 $\pm$ 0,69	9,23 $\pm$ 0,23	9,44 $\pm$ 1
Fêmeas	5,67 $\pm$ 0,19	5,31 $\pm$ 0,41	6,18 $\pm$ 0,43	5,91 $\pm$ 0,36

**TABELA 22:** Peso em gramas (g) (Média ± Erro padrão), (n=3), do coração e rins de ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas.

		<b>Coração</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Controles</b>	<b>4,3 mg/kg (DU)</b>	<b>12,9 mg/kg (3DU)</b>	<b>38,7 mg/kg 9DU</b>	
<b>Sexo</b>					
<b>Machos</b>	1,53±0,07	1,48±0,15	1,54±0,20	1,21±0,18	
<b>Fêmeas</b>	0,84±0,03	0,84±0,03	0,84±0,03	0,84±0,03	
		<b>Rins</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Controles n=3</b>	<b>4,3 mg/kg (DU) n=3</b>	<b>12,9 mg/kg (3DU) n=3</b>	<b>38,7 mg/kg 9DU n=3</b>	
<b>Sexo</b>					
<b>Machos</b>	2,21±0,12	2,21±0,12	2,21±0,12	2,21±0,12	
<b>Fêmeas</b>	1,59±0,07	1,59±0,07	1,59±0,07	1,59±0,07	

## 5.8 Análise histológica dos órgãos

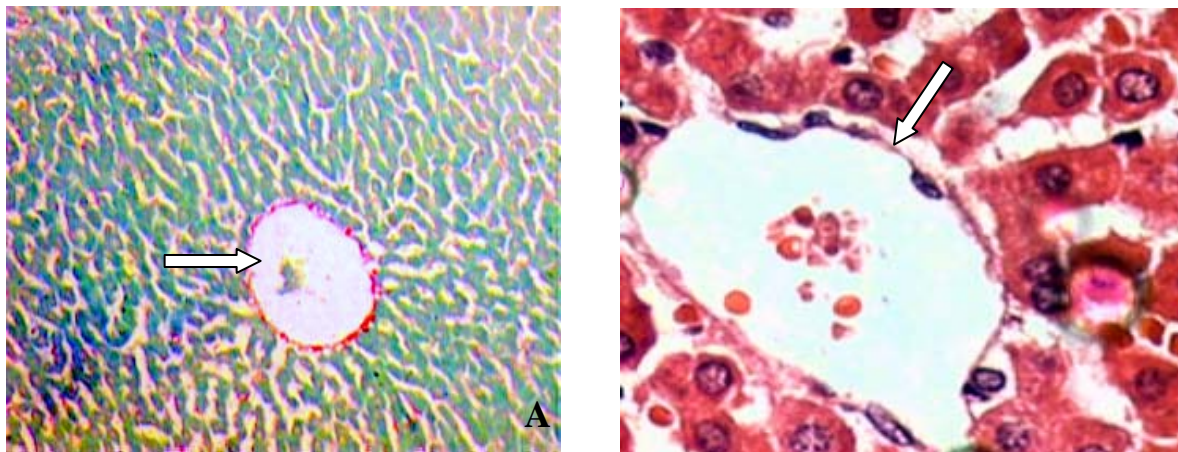
### 5.8.1 Coração, pulmões e rins

Ao exame microscópico, o coração, pulmões e rins dos animais tratados apresentaram-se semelhantes ao grupo controle, ou seja, dentro dos parâmetros da normalidade histológica.

### 5.8.2 Fígado

O estudo histológico do fígado dos animais tratados e do grupo controle revelou parênquima com arquitetura do tipo lobular, tendo veias hepáticas terminais de paredes finas e regularmente distribuídas (Figura 5). Tais aspectos, nos animais

tratados, associaram-se a alterações microvasculares e a reatividade das células de Kupffer (Quadro 6).



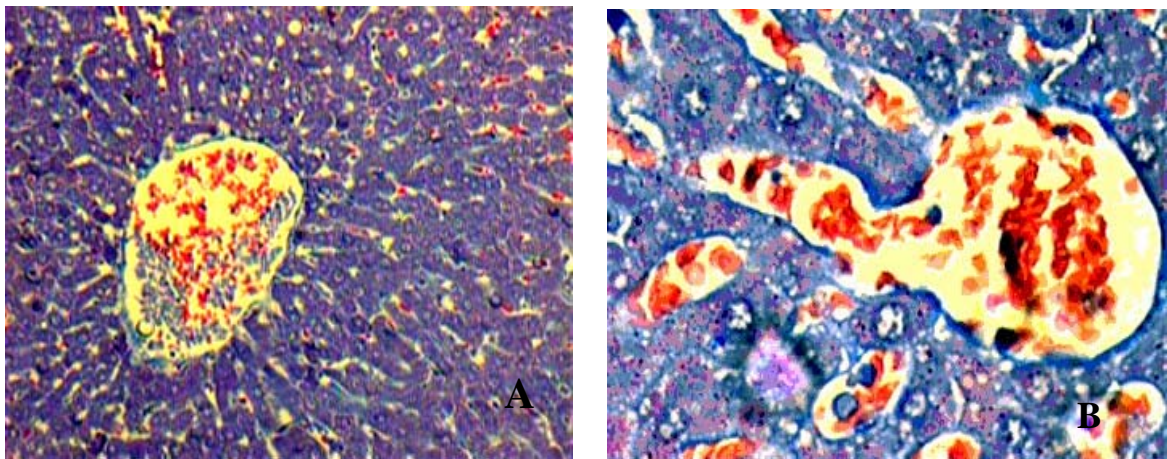
**Figura 5:** Aspecto histológico constante em animais dos grupos controle e submetido ao tratamento com a kava: arquitetura lobular hepática, com veia hepática terminal (setas) apresentando paredes finas (A: vermelho picrossirius - X 100; B: hematoxilina-eosina – X400).

Dose	Sexo	Animal	Arquitetura histológica padrão lobular	Alterações microvasculares hepáticas										Hiperplasia de células de Kupffer
				Congestão				Dilatação sinusoidal			Inflamação sinusoidal			
				Veia hepática terminal	Sinusóide									
					Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	
Controle	F	1	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	M	4	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		5	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		6	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4,3 mg/kg	F	7	S	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S
		8	S	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S
		9	S	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S
	M	10	S	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S
		11	S	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S
		12	S	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S
12,9 mg/kg	F	13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	M	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
38,7 mg/kg	F	19	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S	S
		20	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S	S
		21	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S	S
	M	22	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S	S
		23	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S	S
		24	S	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S	S

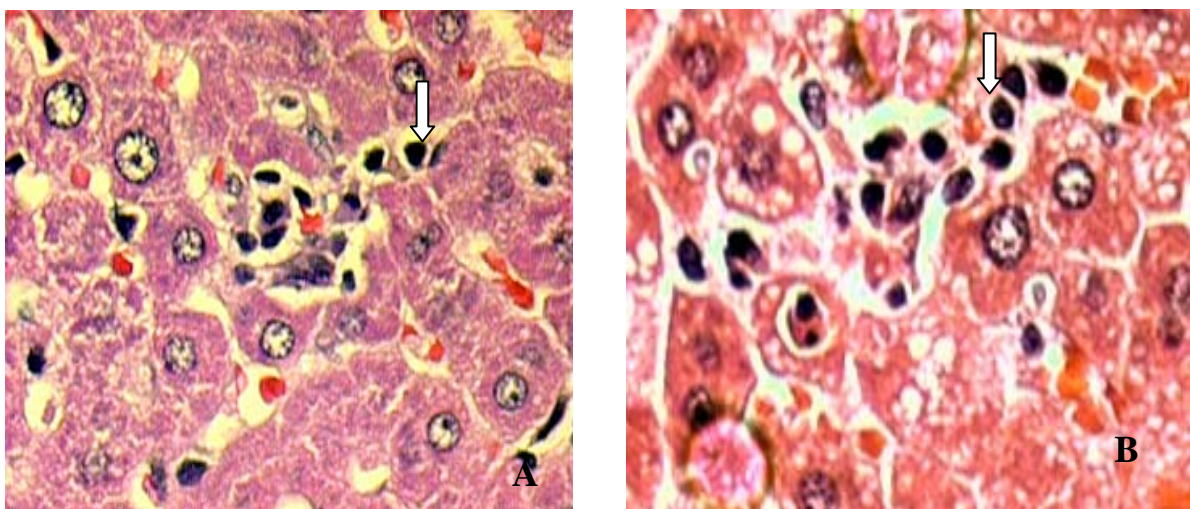
**Quadro 6:** Avaliação da arquitetura histológica hepática e de alterações microvasculares de ratos machos e fêmeas tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* G. Foster, durante 13 semanas, por grupo, sexo e unidade experimental.

F=fêmea; M=macho; S=sim; N=não; Z=zona do lóbulo hepático

Congestão da veia hepática terminal com repercussão em zona 3, onde também ocorreu dilatação da rede sinusoidal foram as únicas alterações histológicas notadas nos machos e fêmeas tratados com a dose de 4,3 mg/kg. Com a dose de 12,9 mg/kg, as modificações microvasculares comprometeram difusamente todas as zonas do ácino hepático, incluindo igualmente congestão e dilatação vênulo-sinusoidais, além de inflamação sinusoidal. Com a dose máxima utilizada, 38,7 mg/kg, o processo vascular congestivo e a inflamação sinusoidal atingiram as zonas 2 e 3. Essas alterações, em todos os grupos, foram acompanhadas por reatividade do sistema fagocítico mononuclear, representada ora por hipertrofia, ora por hiperplasia de células de Kupffer (Quadro 6; Figuras 6, 7, 8 e 9).

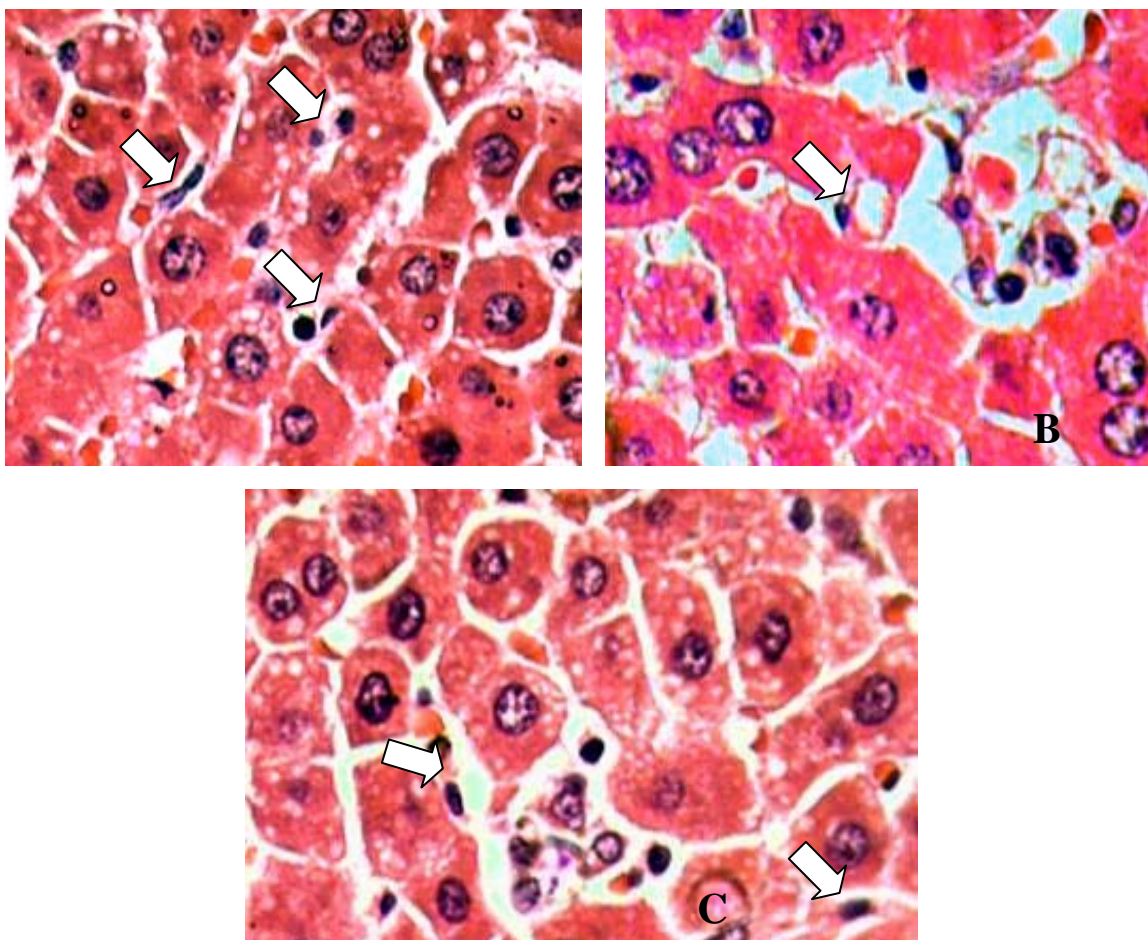


**Figura 6:** Congestão microvascular (A: dose 4,3 mg/kg – X100 ; B – dose 12,9 mg/kg – X400; tricrômico de Masson).



**Figura 7:** Linfócitos em lume de sinusóides (setas), em animais tratados com as doses de 12,9 mg/kg (A) e 38,7 mg/kg (B) – hematoxilina-eosina X400.





**Figura 8:** Células de Kupffer reativas em ratos tratados com as doses de 4,3 mg/kg (A), 12,9 mg/kg (B) e 38,7 mg/kg (C) de kava (hematoxilina-eosina X400).



**Figura 9:** Dilatação e inflamação sinusoidais, em animal tratado com a dose 12,9 mg/kg de kava (hematoxilina-eosina X400).



Considerando os atributos histológicos de forma dicotômica, construiu-se a matriz S de similaridade entre os grupos, para avaliar suas diferenças. Essa matriz demonstrou que os parâmetros histológicos dos grupos tratados com diferentes doses de *Piper methysticum* são diferentes dos apresentados pelo grupo controle.

Observou-se também que o grupo tratado com a dose diária de 4,3 mg/kg, comparado com o grupo ao qual foi administrada a dose de 38,7 mg/kg, tem similaridade 0,667. Esses dois grupos têm mais semelhanças entre si, do ponto de vista dos critérios histológicos, do que os grupos tratados com 4,3 e 12,9 mg/kg, que, quando comparados entre si, têm similaridade 0,364 (Figura 10).

$$S = \begin{matrix} & \begin{matrix} C & DU & 3 DU & 9 DU \end{matrix} \\ \begin{matrix} C \\ DU \\ 3 DU \\ 9 DU \end{matrix} & \begin{bmatrix} 1 & 0,000 & 0,000 & 0,000 \\ 0,000 & 1 & 0,364 & 0,667 \\ 0,000 & 0,364 & 1 & 0,545 \\ 0,000 & 0,667 & 0,545 & 1 \end{bmatrix} \end{matrix}$$

**Figura 10:** Matriz de similaridade: análise de parâmetros histológicos comparando grupos tratados com a kava, em diferentes doses, por 13 semanas e grupo controle. Os grupos tratados são diferentes do grupo controle, particularmente com a dose 12,9 mg/kg. C=controle; DU (dose usual)=4,3 mg/kg; 3DU (três vezes a dose usual) = 12,9 mg/kg; 9 DU (nove vezes a dose usual) = 38,7 mg/kg.

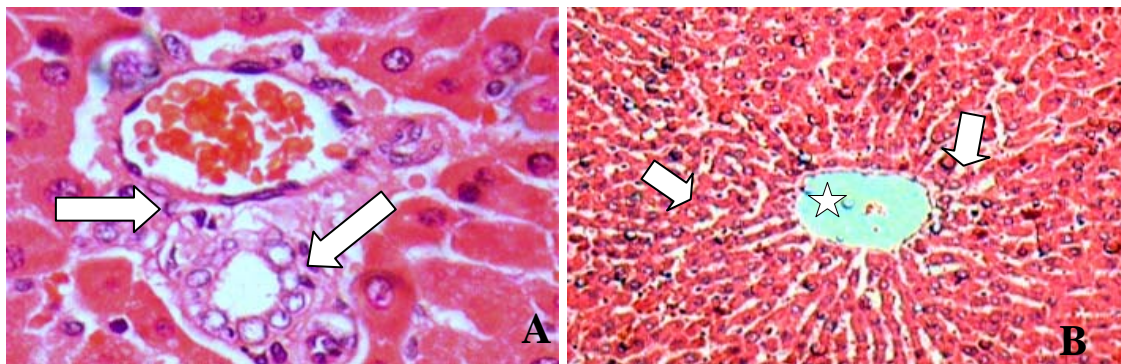
O teste de Cochran apresentou estatística 21,514 com valor-p igual a 0,000. Também segundo esse teste, os grupos tratados, no que se refere aos aspectos histológicos avaliados, são diferentes do grupo controle.

As tabelas 23, 24, 25 e 26 mostram os resultados da análise histológica, no que concerne à reação inflamatória portal e do parênquima hepático. Ao grupo controle, pela ausência de reação inflamatória portoparenquimatosa, atribuiu-se o escore zero, de acordo com Gayotto e Comitê SBP/SBH (2000), conforme expresso na tabela 23 e figura 11.

**TABELA 23:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa, do fígado de ratos machos e fêmeas do grupo controle.

Controle		Infiltrado inflamatório portal	Atividade parenquimatosa
		Escore (escala variável de 0 a 4)	
		Raros linfócitos portais	Hepatócitos normais, isomorfos
F	L1	0	0
	L2	0	0
	L3	0	0
M	L4	0	0
	L5	0	0
	L6	0	0

F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica



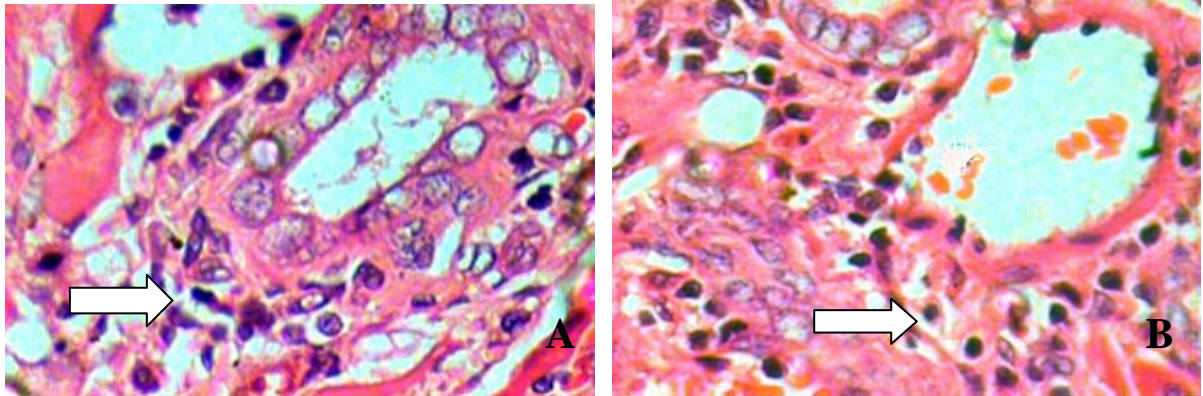
**Figura 11:** Aspectos histológicos do tecido hepático no grupo controle – espaço portal pequeno (seta longa), com tríade vâsculo-biliar disposta em matriz conjuntiva (A: X400) e travess hepatocelulares (seta curta) radialmente distribuídas em torno da veia hepática terminal (estrela), em B: X100). Hematoxilina-eosina.

Na dose diária usual de *Piper methysticum*, 4,3 mg/kg, tanto nas fêmeas quanto nos machos, o infiltrado inflamatório portal discreto, bem como as alterações parenquimatosas focais (degeneração hidrópica, retração acidófila individual e necrose lobular acompanhada de afluxo linfocitário) foram avaliadas como escore 1 (TABELA 24; Figuras 12 e 13).

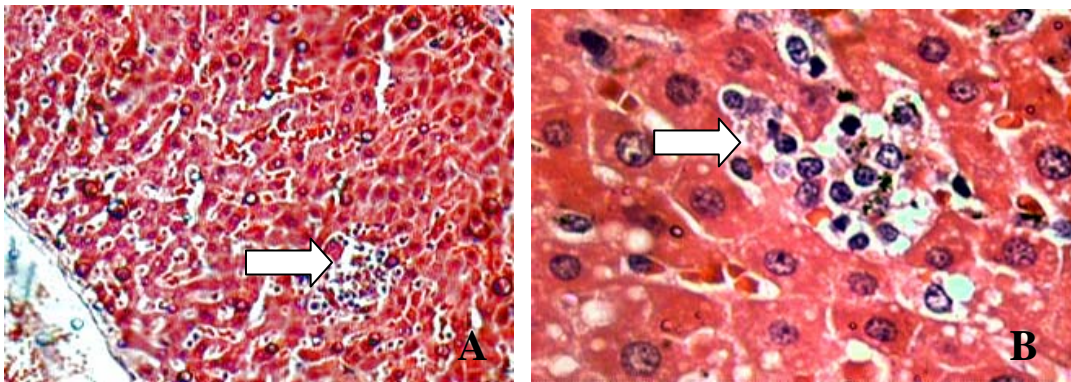
**TABELA 24:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos machos e fêmeas tratados diariamente com 4,3 mg/kg de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

4,3 mg/kg (DU)		Infiltrado inflamatório portal	Atividade parenquimatosa			
		Escore (escala variável de 0 a 4)				
		Número de linfócitos portais	Degeneração hidrópica. Retração acidófila individual	Necrose + agregado linfocitário		
		Aumento discreto		Focal	Multifocal	
F	L7	1	1	1	-	
	L8	1	1	1	-	
	L9	1	1	1	-	
M	L10	1	1	1	-	
	L11	1	1	1	-	
	L12	1	1	1	-	

DU=dose usual; F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica



**Figura 12:** Discreto exsudato linfocitário (setas) infiltra a matriz fibroconjuntiva de espaços portais, na intoxicação de ratos com a dose de 4,3 mg/kg (A-B: hematoxilina-eosina X400).



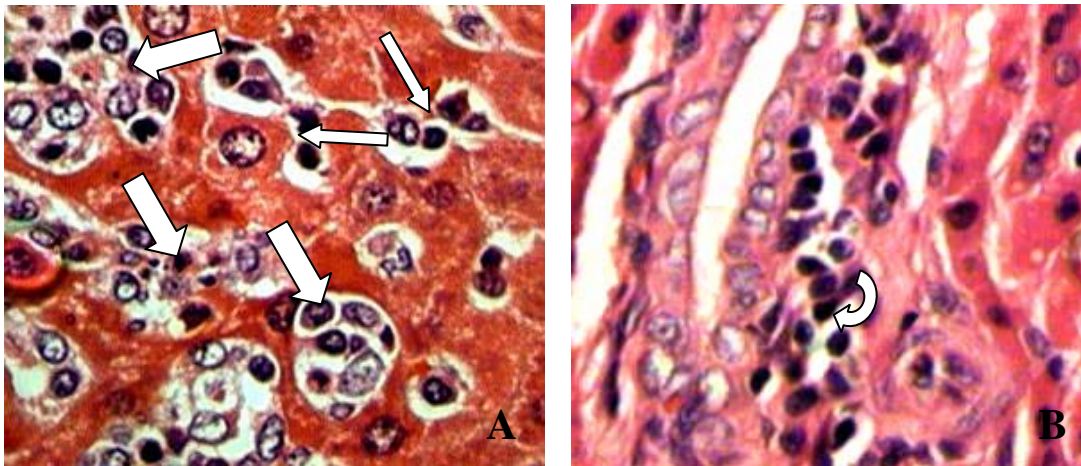
**Figura 13:** Necrose hepatocelular focal associada à exsudação celular linfoistocitária (seta), em zona 3, de animal tratado com a dose de 4,3 mg/kg (hematoxilina-eosina; A: X100; B: X400).

A tabela 25 e a figura 14 expressam os resultados encontrados na avaliação histológica dos animais submetidos a 12,9 mg/kg de *Piper methysticum*. O aumento do número de linfócitos portais foi discreto (escore 1), enquanto que a necrose associada à exsudação linfomonocitária teve caráter multifocal, correspondente ao escore 2. Degeneração hidrópica não constou desse grupo.

**TABELA 25:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos machos e fêmeas tratados diariamente com 12,9 mg/kg de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

12,9 mg/kg (3DU)		Infiltrado inflamatório portal	Atividade parenquimatosa		
			Escore (escala variável de 0 a 4)		
		Número de linfócitos portais	Degeneração hidrópica. Retração acidófila individual	Necrose + agregado linfoistiocitário	
				Aumento discreto	Focal
F	L13	1	0	0	2
	L14	1	0	0	2
	L15	1	0	0	2
M	L16	1	0	0	2
	L17	1	0	0	2
	L18	1	0	0	2

DU=dose usual; F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica



**Figura 14:** Múltiplos focos de necrose lobular acompanhados de exsudação linfomonocitária (seta larga) e inflamação sinusoidal (seta fina) - A: X400; portite linfocitária discreta (seta curva) - B: X100. Hematoxilina-eosina. Ratos tratados com 12,9 mg/kg de *Piper methysticum*.

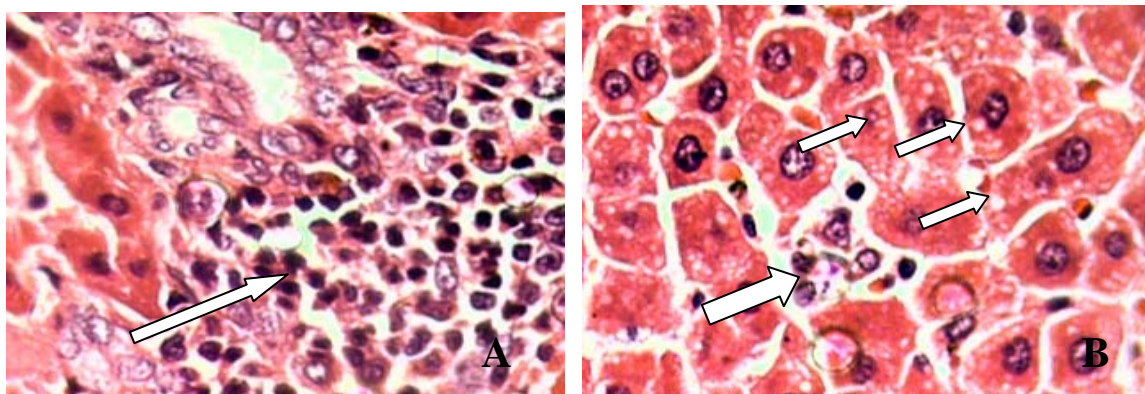
Na tabela 26 e figura 15, encontram-se os resultados do estudo histológico do fígado dos animais submetidos a 38,7 mg/kg de *Piper methysticum*. Nas fêmeas e machos, o aumento do número de linfócitos portais correspondeu, respectivamente, aos escores 1 e 2. Toda a população desse grupo apresentou sinais de degeneração hidrópica, retração acidófila individual e necrose de grupos hepatocitários, para os quais ocorreu afluxo linfoistiocitário (escore 2).

**TABELA 26:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos machos e fêmeas tratados com 38,7 mg/kg de *Piper methysticum* G. Foster durante 13 semanas.

38,7 mg/kg (9DU)		Infiltrado inflamatório portal		Atividade parenquimatosa		
		Escore (escala variável de 0 a 4)				
		Aumento do número de linfócitos portais		Degeneração hidrópica. Retração acidófila individual	Necrose + agregado linfoistiocitário	
		discreto	moderado		Focal	Multifocal
F	L19	1	-	2	-	2
	L20	1	-	2	-	2
	L21	1	-	2	-	2
M	L22	-	2	2	-	2
	L23	-	2	2	-	2
	L24	-	2	2	-	2

DU=dose usual; F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica

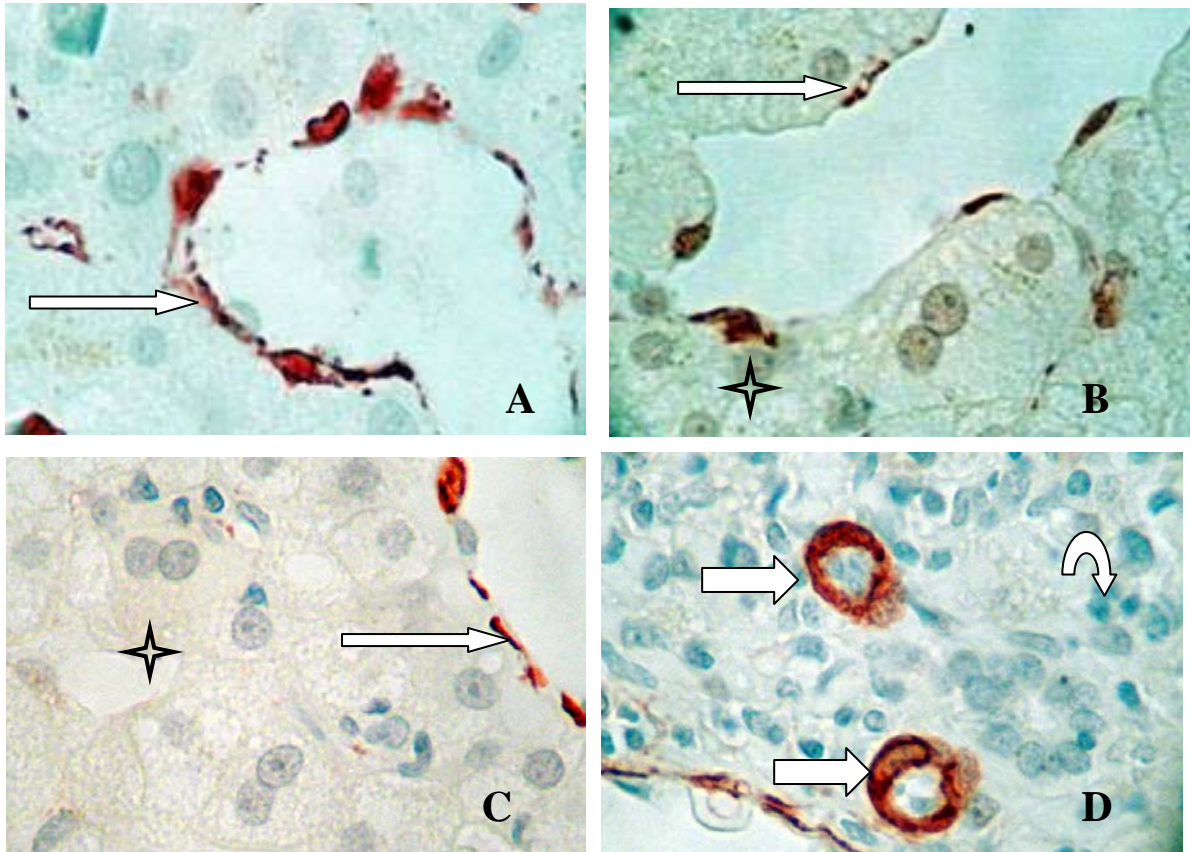




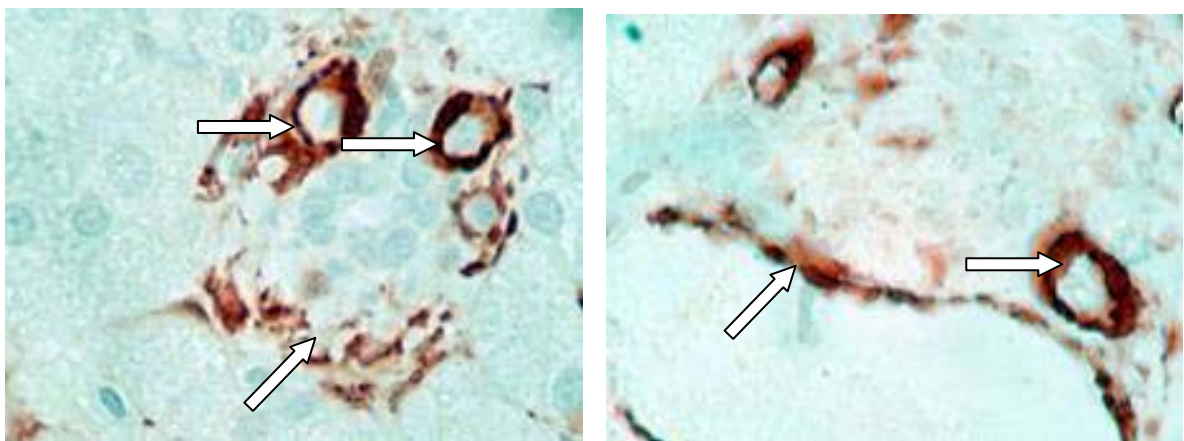
**Figura 15:** Reação tissular hepática associada à administração de 38,7 mg/kg de kava: inflamação portal (escore 2) predominantemente linfocitária (seta longa) e foco de necrose lobular com afluxo de células inflamatórias mononucleares (seta larga), além de sinais de degeneração hidrópica microvacuolar (seta fina e curta). Hematoxilina-eosina A-B X400.

### 5.9 Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica, com a utilização do anticorpo monoclonal  $\alpha$ -1-anti-actina, nas amostras de fígado dos diversos grupos de animais que apresentaram alterações histológicas, demonstrou aparecimento de uma fraca e pontual imunomarcagem em torno de raros sinusóides hepáticos, independente da topografia zonal. Controles internos e externos atestaram a fidedignidade das imunorreações. Nos animais estudados, leiomiócitos de paredes vasculares (VHT, veia porta e arteríola hepática) e células conjuntivas dos espaços portais, apresentaram marcação fortemente positiva, expressa por granulações castanho-douradas, citoplasmáticas. Em controles externos, correspondente a processo fibrogênico de fígado humano, foi possível se identificar a presença de células miofibroblásticas, de configuração estrelar ou de seus prolongamentos citoplasmáticos, localizados na periferia de sinusóides (ARAÚJO, 2002). Estes resultados sinalizam que, na amostra analisada, não se evidenciaram elementos, que possam sugerir a ocorrência de ativação miofibroblástica, necessária à produção de matriz conjuntiva, nos processos de fibrogênese hepática precoce, neste caso associada ao tratamento com a kava (Figuras 16, 17 e 18).

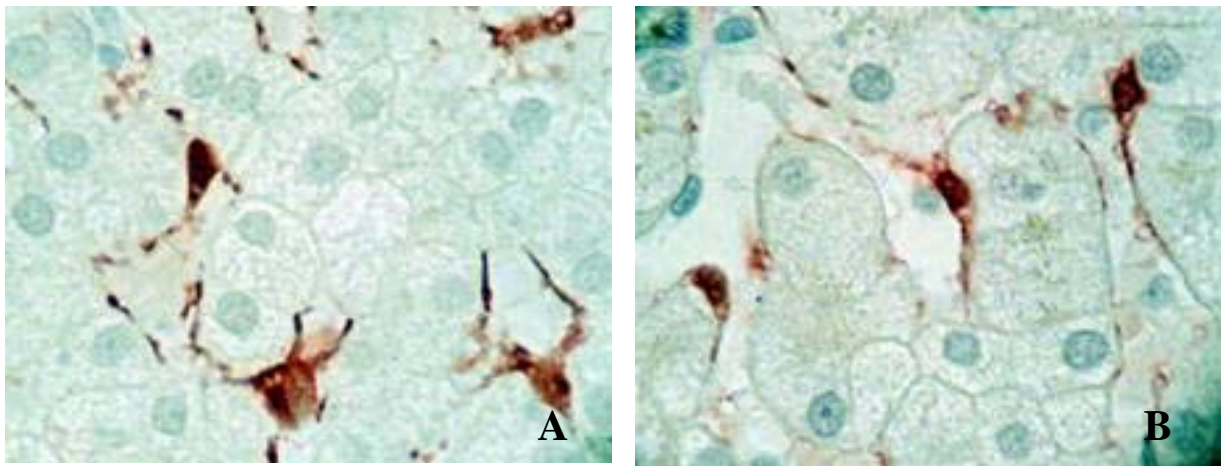


**Figura 16:** Expressão positiva para alfa-actina em leiomíócitos da parede de veia hepática terminal (A-C: seta fina) e de arteríolas hepáticas (seta larga), em contraste com a marcação negativa na zona 3 (estrela) e no espaço portal com inflamação (D: seta curva) perissinusoidal (A-D: X400 – dose 12,9 mg/kg).



**Figura 17:** Expressão da alfa-actina em espaço portal de animais do grupo 12,9 mg/kg, com destaque para a positividade da imunorreação em células musculares lisas de parede vascular arteriolar e venular, bem como de fibroblastos portais (seta). A-B X400.





**Figura 18:** Controle externo da expressão de alfa-actina anti-músculo liso: demonstração da ativa o da miofibroblastos ou células estelares, em processo de fibrogênese hepática humana, em topografia perissinusoidal.

## 5.10 Grupo sat elite

### 5.10.1 Observa es gerais

Não ocorreram óbitos durante os 45 dias de observa o do grupo sat elite. Quanto ao aspecto externo dos animais, neste período e imediatamente antes do sacrifício, não foram constatadas anormalidades na cor e distribui o dos p los, altera es oculares ou lesões aparentes.

### 5.10.2 Exames laboratoriais

#### ✓ Parâmetros bioquímicos

As tabelas 27 e 28 mostram a compara o dos resultados dos parâmetros bioquímicos entre os grupos experimental e sat elite.

**TABELA 27:** Parâmetros bioquímicos de ratos do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental.

Parâmetro Bioquímico	EXPERIMENTO				SATÉLITE		
	Grupo controle	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg
Glicemia (mg/dL)	117,3±13,5	133,3±12	104,3±5,5	104,7±6,2	123,6±7,8	131,0±15,7	133,3±18,0
Uréia (mg/dL)	31,7±0,7	31,3±0,9	32,0±1,7	35,7±0,9	53,8±4,8	52,7±2,8	50,3±2,0
Creatinina (mg/dL)	0,7±0,1	0,6±0,1	0,5±0,0	0,5±0,0	0,7±0,0	0,67±0,0	0,6±0,1
Colesterol (mg/dL)	33,0±2,6	48,3±4,1	36,0±3,2	41,3±2,6	65,4±1,2	62,0±4,7	53,3±10,4
Triglicerídeos (mg/dL)	25,3±9,4	18,3±1,7	31,3±1,8	37,7±7,7	103,4±5,9	103,3±7,2	114,7±12,0
Ácido úrico (mg/dL)	0,6±0,2	0,6±0,1	0,6±0,2	0,8±0,1	103,4±0,1	103,3±0,2	114,7±0,2
AST (UI/L)	141,3±16,3	96,7±2,4	148,3±17,7	144,0±8,5	192,2±12,4	134,0±3,5	185,3±37,9
ALT (UI/L)	87,0±9,3	54±0,36	65,0±6,1	66,7±4,2	77,4±4,8	71,0±4,7	73,3±11,0
γGT (UI/L)	1,3±0,3	1,0±0,0	1,03±0,04	1,00±0,0	1,3±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0
BT (mg/dL)	0,13±0,03	0,1±0,0	0,10±0,00	0,13±0,03	0,13±0,03	0,10±0,00	0,13±0,03
BD (mg/dL)	0,07±0,02	0,05±0,0	0,05±0,01	0,06±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,06±0,02
BI (mg/dL)	0,06±0,02	0,05±0,0	0,05±0,01	0,07±0,03	0,07±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02
FA (UI/L)	204,0±23,1	119,0±20,6	141,3±46,8	94,0±15,0	133,6±22,0	137,0±25,6	131,7±21,6
CK (UI/L)	1721±467	2653±417	1855±393	2303±106	9662±1858	4230,0±479	12317,0±5502
DHL (UI/L)	1155±144	772±130	914±48	823±289	1681±206	560,7±57,2	1250±508
Amilase (UI/L)	666±38,5	680±42,9	644±54,7	638,5±5,5	510,6±21,7	478,7±38,2	515,7±30,8
PT (g/dL)	6,7±0,3	6,7±0,2	6,4±0,2	6,4±0,1	6,7±0,2	6,4±0,1	6,5±0,1
Albumina (g/dL)	4,1±0,2	4,3±0,2	4±0,1	4,1±0,0	2,6±0,1	2,5±0,1	2,3±0,1
Globulina (g/dL)	2,5±0,2	2,4±0,1	2,4±0,0	2,2±0,0	4,2±0,2	2,97±1,1	4,1±0,2
Sódio (mEq/L)	144,7±2,7	145,3±0,3	143,3±1,4	143,5±0,5	141,8±0,5	142,7±1,0	141,7±1,5

ALT=Alanina aminotransferase; AST=Aspartato aminotransferase; γGT=Gama glutamiltransferase; BT=Bilirrubina total; BD=Bilirrubina direta; BI=Bilirrubina indireta; FA=Fosfatase alcalina; CK=creatinquinase; DHL=Desidrogenase láctica; PT=Proteínas totais.

**TABELA 28:** Parâmetros bioquímicos de ratas do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental.

Parâmetro Bioquímico	EXPERIMENTO				SATÉLITE		
	Grupo controle	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg
Glicemia (mg/dL)	106,7±3,7	120,3±9,4	107,7±7,0	112,3±0,9	122,0±0,0	144,5±11,5	118±0,0
Uréia (mg/dL)	29,7±3,8	31,3±1,8	34,0±2,1	38,0±2,3	52,0±0,0	48,5±0,5	40±0,0
Creatinina (mg/dL)	0,6±0,0	0,6±0,0	0,6±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,75±0,05	0,6±0,0
Colesterol (mg/dL)	60,7±6,8	54,3±7,9	52,3±8,7	94,5±17,5	68±0,0	58,0±7,0	48±0,0
Triglicerídeos (mg/dL)	24,7±2,4	39,3±10,7	25±4,0	30,5±8,5	77±0,0	133,5±29,5	73±0,0
Ácido úrico (mg/dL)	0,8±0,1	0,9±0,2	1±0,2	1,1±0,2	1,7±0,0	1,8±0,2	1,4±0,0
AST (UI/L)	141,3±16,3	171,7±26,4	144±7,6	196,7±46,4	180±0,0	201,0±49,0	129±0,0
ALT (UI/L)	87,0±9,3	58,3±7,2	66,7±4,1	68±9,8	65,0±0,0	84,5±4,5	52±0,0
γGT (UI/L)	1,0±0,0	1±0,0	1±0,0	1±0,0	1±0,0	1,3±0,3	1±0,0
BT (mg/dL)	0,13±0,03	0,1±0,0	0,13±0,03	0,13±0,03	0,13±0,03	0,1±0,0	0,10±0,0
BD (mg/dL)	0,06±0,01	0,05±0,01	0,06±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02	0,05±0,00	0,05±0,01
BI (mg/dL)	0,07±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02	0,05±0,01	0,06±0,02	0,05±0,00	0,05±0,01
FA (UI/L)	82,7±12,9	87,7±22,6	93,7±26,3	77,3±10,7	71±0,0	132,5±24,5	82±0,0
CK (UI/L)	1837±58	5097±904	3764±1126	4044±1956	4430±0,0	3510±20	5000±0,0
DHL (UI/L)	889±118	1305±239	1125±294	1689±765	1441±0,0	928±115	637±0,0
Amilase (UI/L)	576,7±79,2	442,3±30,9	511,0±66,8	557,0±126	343,0±0,0	396,0±34,0	294±0,0
PT (g/dL)	7,1±0,2	6,9±0,1	6,7±0,3	6,9±0,2	6,7±0,0	6,8±0,0	6,6±0,0
Albumina (g/dL)	4,7±0,1	4,7±0,2	4,3±0,1	4,2±0,1	2,7±0,0	3,0±0,1	2,7±0,0
Globulina (g/dL)	2,4±0,1	2,3±0,1	2,4±0,2	2,7±0,2	4,0±0,0	3,8±0,1	3,9±0,0
Sódio (mEq/L)	144,3±1,4	139,7±0,9	142,3±0,9	144±0,0	138±0,0	140,5±0,5	143±0,0

ALT=Alanina aminotransferase; AST=Aspartato aminotransferase; γGT=Gama glutamiltransferase; BT=Bilirrubina total; BD=Bilirrubina direta; BI=Bilirrubina indireta; FA=Fosfatase alcalina; CK=creatinquinase; DHL=Desidrogenase láctica; PT=Proteínas totais.

### ✓ Parâmetros hematológicos

As tabelas 29 e 30 mostram a comparação dos resultados dos parâmetros hematológicos entre os grupos experimental e satélite.

**TABELA 29:** Parâmetros hematológicos de ratos do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental.

Parâmetro hematológico	EXPERIMENTO			SATÉLITE		
	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,0±0,4	8,3±0,3	8,5±0,1	8,5±0,3	8,3±0,1	8,5±0,0
Hemoglobina (g/dL)	14,8±0,1	15,3±0,6	15,2±0,4	15,6±0,4	15,3±0,4	14,9±0,1
Hematócrito (%)	43,3±1,3	46,2±2,6	46,2±0,6	49,2±1,5	46,7±1,1	46,1±0,2
VCM ( $\mu^3$ )	54,3±0,4	55,4±0,4	54,5±0,3	58,3±0,7	55,0±2,0	54,5±0,06
HCM ( $\mu\mu\text{g}$ )	18,5±0,6	18,3±0,5	18,0±0,4	18,5±0,3	18,5±0,5	17,9±0,1
CHCM (%)	34,1±0,9	33,1±0,4	32,9±0,4	31,8±0,2	33,3±0,2	32,8±0,3
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	4,1±0,1	7,1±1,2	6,7±1,9	4,8±0,5	7,1±0,5	7,0±1,0
Neutrófilos (%)	29,0±1,0	48,0±2,0	19,5±9,5	29,8±2,8	47,3±0,9	16,7±6,2
Eosinófilos (%)	2,5±0,5	1,7±0,3	3,0±0,0	1,0±0,0	1,7±0,3	2,7±0,3
Linfócitos (%)	66,5±1,5	47,7±1,2	74,5±8,5	65,2±2,9	47,0±1,5	74,7±5,5
Monócitos (%)	2,0±1,0	5,0±3,0	7,0±4,5	4,0±1,0	3,7±0,9	4,0±1,2
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	669±2	843±116	703±83	867,6±56,11	865,3±87,2	674,7±43,4

VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; CHCM=Concentração de hemoglobina corpuscular média. \* = Diferença significativa (ANOVA; testes de Dunnett e Kruskal-Wallis).

**TABELA 30:** Parâmetros hematológicos de ratas do grupo satélite (Média ± Erro padrão), 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster durante 13 semanas, comparados por grupo e dose com o grupo experimental.

Parâmetro hematológico	EXPERIMENTO			SATÉLITE		
	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg	4,3 mg/kg	12,9 mg/kg	38,7 mg/kg
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	7,8±0,1	8,6±0,2	7,6±0,1	7,6±0,0	7,0±0,1	7,3±0,0
Hemoglobina (g/dL)	14,6±0,1	15,9±0,3	14,4±0,2	14,8±0,0	13,7±0,1	14,2±0,0
Hematócrito (%)	42,5±1,2	47,4±1,5	41,5±0,3	44,6±0,0	40,7±0,5	41,3±0,0
VCM ( $\mu^3$ )	55,2±1,4	55,4±0,3	54,9±1,2	59,1±0,0	58,1±0,2	56,0±0,0
HCM ( $\mu\mu\text{g}$ )	18,9±0,1	18,6±0,2	19±0,4	19,6±0,0	19,6±0,5	18,9±0,0
CHCM (%)	34,3±0,8	33,6±0,4	34,7±0,1	33,2±0,0	33,7±0,7	34,6±0,0
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	4,3±0,6	4,8±1,2	4,6±1,2	3,4±0,0	4,0±0,7	3,4±0,0
Neutrófilos (%)	43 ±2,0	22,7±3,8	26,7±3,0	28±0,0	20±7,0	26,0±0,0
Eosinófilos (%)	2,0±1,0	2,0±0,6	1,7±0,3	2±0,0	1,5±0,5	1,0±0,0
Linfócitos (%)	51±5	69,3±5,8	67,7±3,2	66±0,0	74±6	67±0,0
Monócitos (%)	4±2	5,7±2,3	4±1,5	4±0,0	4,5±0,5	5,0±0,0
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	787±60	669,0±37	740,0±140	750,0±0,0	652,5±158,5	757,0±0,0

VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; CHCM=Concentração de hemoglobina corpuscular média. \* = Diferença significativa (ANOVA; testes de Dunnett e Kruskal-Wallis).

### 5.10.3 Avaliação macroscópica dos órgãos

A avaliação macroscópica dos órgãos das cavidades torácica, abdominal e retroperitônio do grupo satélite, realizada conforme os mesmos parâmetros utilizados ao final das 13 semanas de experimento, não demonstrou alterações, tal como no grupo experimental.

#### **5.10.4 Análise histológica dos órgãos**

##### **✓ Coração, pulmões e rins**

O estudo histológico do coração, pulmões e rins dos animais do grupo satélite foi semelhante ao grupo controle e ao grupo sacrificado após 13 semanas do experimento.

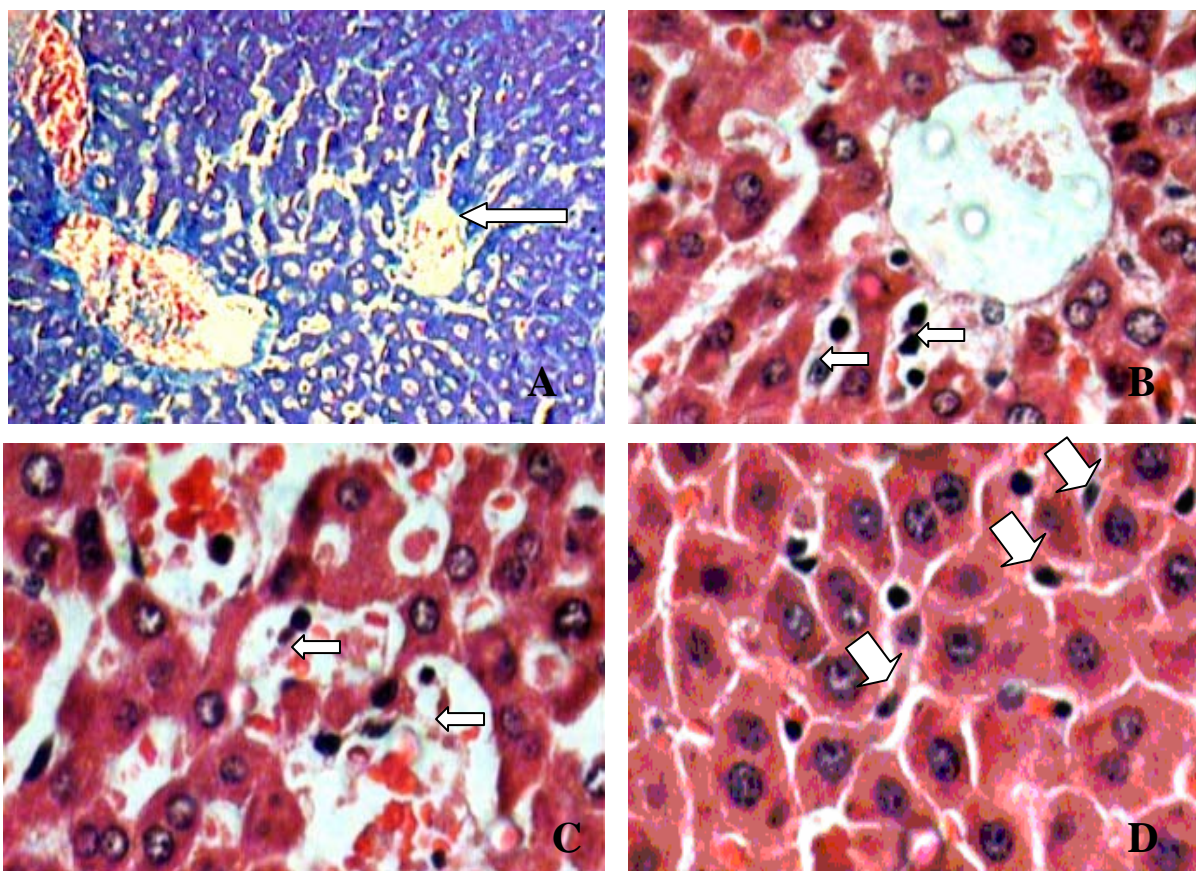
##### **✓ Fígado**

O estudo histológico do fígado de todos os animais do grupo satélite mostrou parênquima com arquitetura lobular e veias hepáticas terminais de paredes finas e regularmente distribuídas. Fenômenos vâsculo-congestivos venular e sinusoidal, acompanhados ou não de dilatação sinusoidal, comprometendo as zonas 2 e 3, foram eventos variáveis entre os animais machos e fêmeas, tratados com as doses de 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg. Tais alterações associaram-se a afluxo celular inflamatório sinusoidal, nas mesmas topografias, notadamente, nos animais submetidos às doses mais altas da kava, havendo ainda reatividade das células de Kupffer, como se detalha no Quadro 7 e Figura 19.

Dose	Sexo	Animal	Arquitetura histológica padrão lobular	Alterações microvasculares hepáticas										Hiperplasia de células de Kupffer
				Congestão				Dilatação sinusoidal			Inflamação sinusoidal			
				Veia hepática terminal	Sinusóide			Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	
					Z3	Z1	Z2							
Controle	F	L1	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		L2	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		L3	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	M	L4	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		L5	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		L6	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4,3 mg/kg	F	L32	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
		L33	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
		L36	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
	M	L34	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
		L39	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
		L40	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S
12,9 mg/kg	F	L30	S	S	N	N	N	N	N	N	S	S	S	S
		L31	S	S	N	N	N	N	N	N	S	S	S	S
		L41	S	S	N	N	N	N	N	N	S	S	S	S
	M	L35	S	N	N	N	S	N	N	S	S	S	S	S
		L37	S	N	N	N	S	N	N	S	S	S	S	S
		L38	S	N	N	N	S	N	N	S	S	S	S	S
38,7 mg/kg	F	L30	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S
		L31	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S
		L41	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S
	M	L35	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S
		L37	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S
		L38	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S

**Quadro 7:** Avaliação da arquitetura histológica hepática e de alterações microvasculares de ratos machos e fêmeas do grupo satélite, 45 dias após o término do tratamento com diferentes doses diárias de *Piper methysticum* G Foster durante 13 semanas.

F=fêmea M=macho L= lâmina histológica S=sim N=não Z=zona do lóbulo ou ácino hepático.



**Figura 19:** Alterações microvasculares em zona 3 do lóbulo hepático. A - dose de 12,9 mg/kg: congestão venular e dilatação sinusoidal (seta longa); B-C - dose 38,7 mg/kg: dilatação sinusoidal com linfócitos luminares (seta curta); D - dose 4,3 mg/kg: células de Kupffer reativas (seta larga). A: tricrômico de Masson X100; B-C-D: hematoxilina-eosina X 400.



No que concerne ao estudo da atividade inflamatória portoparenquimatosa, chamou atenção a persistência do infiltrado linfocitário portal e lobular, este conseqüentes a ocorrência de focos isolados de necrose, em todos os animais, independentemente da dose usada e do sexo dos mesmos, com demonstram as tabelas 30, 31 e 32 e a figura 20.

Na dose diária usual de *Piper methysticum*, 4,3 mg/kg, tanto nas fêmeas quanto nos machos, ainda se encontrou portite linfocitária discreta e alguns focos de necrose lobular associada a afluxo linfoistiocitário, cujo escore foi 1 (TABELA 31; Figura 20).

**TABELA 31:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos do grupo satélite dos animais tratados com 4,3 mg/kg mg/kg de *Piper methysticum* G. Foster.

4,3 mg/kg (DU)		Infiltrado inflamatório portal	Atividade parenquimatosa		
		Escore (escala variável de 0 a 4)			
		Número de linfócitos portais Aumento discreto	Degeneração hidrópica. Retração acidófila individual	Necrose + agregado linfoistiocitário	
				Focal	Multifocal
F	L25	1	1	1	-
	L27	1	1	1	-
	L26	1	1	1	-
M	L28	1	1	1	-
	L29	1	1	1	-
	L25	1	1	1	-

DU=dose usual; F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica.

A tabela 32 e a figura 20 expressam os resultados encontrados na avaliação histológica dos animais submetidos a 12,9 mg/kg de *Piper methysticum*, nos quais, 45 dias após a suspensão do uso do extrato, ainda se encontrou aumento discreto do número de linfócitos portais (escore 1), enquanto a necrose associada à

exsudação linfomonocitária de caráter multifocal, passou a ser focal (escore 1), sem degeneração hidrópica.

**TABELA 32:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos do grupo satélite dos animais tratados com 12,9 mg/kg mg/kg de *Piper methysticum* G. Foster.

12,9 mg/kg (3DU)		Infiltrado inflamatório portal	Atividade parenquimatosa			
		Escore (escala variável de 0 a 4)				
		Número de linfócitos portais	Degeneração hidrópica. Retração acidófila individual	Necrose + agregado linfoistiocitário		
		Aumento discreto		Focal	Multifocal	
F	L30	1	1	1	-	
	L31	1	1	1	-	
	L41	1	1	1	-	
M	L35	1	1	1	-	
	L37	1	1	1	-	
	L38	1	1	1	-	

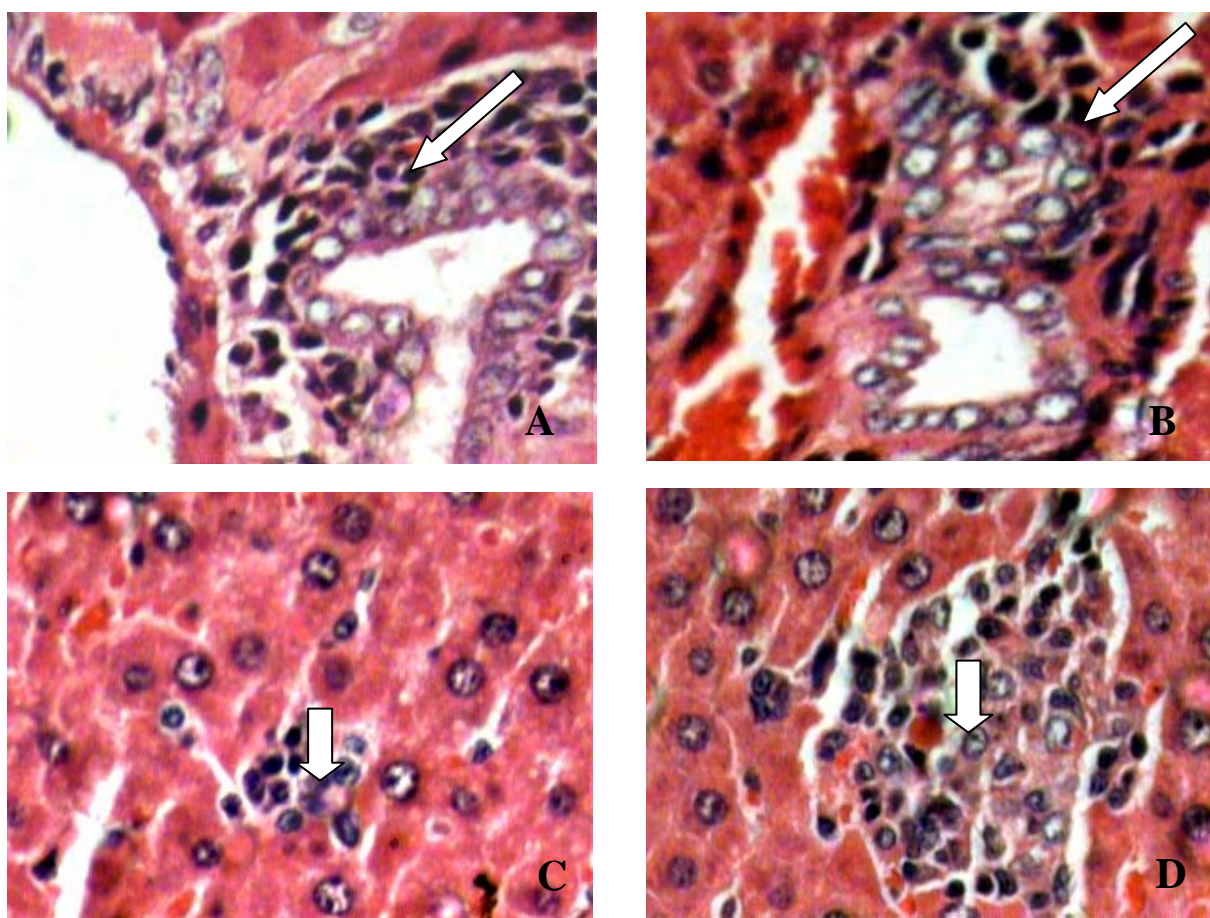
DU=dose usual; F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica

A tabela 33 e figura 20 mostram os resultados do estudo histológico do fígado dos animais do grupo satélite que foram submetidos a 38,7 mg/kg de *Piper methysticum*. Nas fêmeas, o escore que representa a inflamação portal se manteve 1. Nos machos em que o escore após as 13 semanas do experimento foi 2, passou a ser 1. Em toda a população desse grupo foram mais escassas a degeneração hidrópica e a retração acidófila individual. A necrose hepatocitária com afluxo linfoistiocitário passou de escore 2 para escore 1.

**TABELA 33:** Aspectos histológicos da reação inflamatória portal e atividade parenquimatosa do fígado de ratos do grupo satélite dos animais tratados com 38,7 mg/kg mg/kg de *Piper methysticum* G. Foster.

38,7 mg/kg (9DU)		Infiltrado inflamatório portal		Atividade parenquimatosa		
		Escore (escala variável de 0 a 4)				
		Aumento do número de linfócitos portais		Degeneração hidrópica. Retração acidófila individual	Necrose + agregado linfocitário	
		discreto	moderado		Focal	Multifocal
F	L32	1	-	1	1	-
	L33	1	-	1	1	-
	L36	1	-	1	1	-
M	L34	1	-	1	1	-
	L39	1	-	1	1	-
	L40	1	-	1	1	-

DU=dose usual; F=fêmea M=macho; L=Lâmina histológica



**Figura 20:** Portite linfocitária crônica, discreta (A: 4,3 mg/kg; B: 12,9 mg/kg – seta longa) e focos de necrose lobular associados à exsudação linfocitária (C: 4,3 mg/kg; D: 38,7 mg/kg – seta curta). A-B-C-D: hematoxilina-eosina X400.

## 6 DISCUSSÃO

Os efeitos potencialmente deletérios da kava (*Piper methysticum*) sobre o fígado são controvertidos e ensejam uma avaliação acurada dos eventos adversos relacionados ao seu uso.

Os mecanismos implicados na hepatotoxicidade da kava ou seus constituintes carecem de elucidação, embora várias teorias concorram para explicá-los. Entretanto, a partir da análise de casos clínicos, alguns autores admitem não existir uma relação de causa e efeito entre o uso dessa substância e a ocorrência de hepatite tóxica (ANKE; RAMZAN, 2004; DENHAM et al., 2002).

Essa polêmica é ainda sustentada pelo fato de não haver um padrão ouro para o diagnóstico da doença hepática induzida por drogas, mesmo assim, considera-se incontestável a dificuldade de se atribuir a uma droga específica a responsabilidade de uma injúria hepática. A incidência real de hepatotoxicidade, além de subestimada, é também difícil de ser determinada (BONKOVSKY et al., 2006; ERNST; PITTLER, 2003; NAVARRO; SENIOR, 2006).

Alguns aspectos relacionados ao metabolismo das drogas devem ser considerados, no intuito de ampliar o escopo de avaliação dos possíveis mecanismos patogénéticos associados à hepatotoxicidade da substância em tela. De acordo com Wilkinson (2005), as drogas são metabolizadas por vários processos compreendendo reações da fase I, quais sejam oxidação, redução e hidrólise, bem como as de fase II - glicuronidação, sulfonação, acetilação e metilação. Tais reações são responsáveis pela produção de metabólitos tóxicos, que tanto podem induzir uma resposta imune, como afetar diretamente a bioquímica celular (KAPLOVITZ, 2002). Além disso, as diferenças do organismo nas respostas às drogas são comuns. Na hepatopatia tóxica é provável que o risco individual seja determinado pela combinação de fatores ambientais e variações genéticas (KAPLOVITZ, 2002), bem como por doenças, que poderiam alterar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma dada substância (WILKINSON, 2005).

Na prática clínica, os estudos observacionais pós-comercialização têm permitido a avaliação de efeitos de medicamentos em um grande número de pacientes (HIATT, 2006). Na doença hepática induzida por drogas, fatores

relacionados às próprias drogas, ao hospedeiro e ao ambiente podem estar envolvidos (BONKOVSKY et al., 2006). As pesquisas experimentais têm, portanto, representado ferramenta importante na elucidação do papel das drogas, quando se suspeita que sejam indutoras de hepatopatia tóxica, tornando-se valiosas como modelo para inferir, em seres humanos, os seus possíveis efeitos adversos (BARROS; DAVINO, 2003).

Diante da polêmica relacionada à toxicidade hepática da kava, os relatos de Amorim et al. (2007) reforçaram a idéia de que investigações que possam contribuir para a elucidação desses efeitos, devam ser empreendidas. O presente estudo, enquadrado nesse contexto, constituiu-se de tratamento crônico de ratos Wistar, com um produto à base de kava, sob a forma de extrato WS 1490, que, embora tenha sido submetido a testes experimentais anteriormente, foi registrado no Brasil sob outra legislação, com padrões diferentes da atual.

Nesta pesquisa, independentemente das doses empregadas, não ocorreram óbitos dos animais, nem foram observadas alterações na cor e distribuição dos pelos, anormalidades oculares ou qualquer lesão externa dos mesmos, durante as 13 semanas do experimento, tal como descreveram Sorrentino et al. (2006), em trabalho similar. Nele, ratos Wistar foram avaliados após 3 e 6 meses de ingestão de uma dieta especial contendo kavalactonas, em concentrações de 7,3 mg/kg e 73 mg/kg. Essas doses são 1,7 e 16,9 vezes maior que a recomendada para o uso do extrato da kava em humanos, ou seja, 4,3 mg/kg, que corresponde a 3,01 mg/kg de kavalactonas no produto testado neste experimento. Os resultados de Sorrentino et al. (2006) foram os mesmos do experimento atual, que administrou doses correspondentes à usual bem como três e nove vezes essa dose, ou seja, 4,3 mg/kg, 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg, respectivamente.

Clayton et al. (2007) trataram ratos F344 - machos e fêmeas, com doses orais e diárias de extrato em pó da kava, contendo seis kavalactonas em concentrações variáveis de 0,125 a 2,0 g/kg, 5 dias por semana, durante 14 semanas. Esse tratamento, diferentemente do nosso experimento, induziu oito óbitos entre os animais: em uma fêmea que recebeu 1 g/kg e em três machos e quatro fêmeas submetidos a 2 g/kg. Tal evolução foi atribuída a alterações no sistema nervoso central e/ou depressão respiratória.

O produto testado neste trabalho, de acordo com informação da bula, apresenta uma DL<sub>50</sub> acima de 1500 mg/kg. Em ensaio de toxicidade aguda com

ratos Wistar no mesmo biotério que albergou esta pesquisa, os valores obtidos de DL<sub>50</sub> do produto testado para machos, 2355,84 mg/kg, com limite de confiança de 95% (2071,08 a 4523,85), permitiram enquadrá-lo como produto pouco tóxico, como são consideradas as substâncias com DL<sub>50</sub> maior que 2000 mg/kg (CARVALHO, 2005).

O fato de não terem ocorrido óbitos no presente estudo pode dever-se à concentração das doses diárias administradas, muito abaixo da DL<sub>50</sub>, segundo a bula do produto e da encontrada por Carvalho (2005). Em contraste, as doses diárias (1,0 g/kg e 2 g/kg) do extrato utilizado por Clayton et al. (2007), nos dois grupos em que ocorreram óbitos, aproximam-se da DL<sub>50</sub> de um produto comercializado, correspondendo a 232,5 vezes e 465 vezes a dose usual do extrato da kava estabelecida para seres humanos, qual seja, 4,3 mg/kg.

Êxito letal também tem sido descrito em humanos. Gow et al. (2003) relatou óbito de uma paciente após 3 meses de consumo, três vezes por dia, de preparado cujo rótulo informava a presença de 60 mg de kavalactonas, em associação com *Passiflora incarnata*, 50 mg e *Scutellaria lateriflora*, 100 mg. Embora a concentração de kavalactonas utilizada por essa paciente tenha sido mais baixa que a dose usual para humanos e bem menor que as outras duas doses administradas neste estudo, Gow et al. (2003) consideraram a kava responsável pela toxicidade, induzindo hepatite fulminante e óbito, apesar da realização de transplante hepático. Esses autores imputaram exclusivamente à kava a responsabilidade desse evento grave, uma vez que não identificaram a presença da *Scutellaria lateriflora* no produto consumido pela paciente, apesar da referência no rótulo como componente do mesmo. Consideraram que a *Passiflora incarnata* não estaria envolvida na causa da morte, com base na falta de referências que relacionassem tal fitoterápico com hepatite tóxica, exceto em um único relato, no qual o paciente fazia uso concomitante de outras substâncias (GOW et al., 2003).

Posteriormente, Thomsen et al. (2004) contestaram a hipótese de Gow et al. (2003) sobre a hepatotoxicidade induzida pela kava, levando ao óbito da paciente. Demonstraram, por cromatografia, a ausência tanto da *Passiflora incarnata* quanto da *Scutellaria lateriflora* em um lote do produto consumido pela paciente, sugerindo a possibilidade de ocorrer variações entre os lotes desses produtos botânicos. Afirmaram que a toxicidade grave poderia ter sido provocada

ou por contaminantes ou pelo uso simultâneo, pela paciente, de suplemento vitamínico e mineral contendo cromo, o qual tem sido implicado na gênese da hepatite tóxica (LANÇA et al., 2002).

No que concerne a anormalidades oculares, Schulze et al. (2003) relataram a ocorrência de conjuntivite como uma das reações adversas freqüentemente relacionadas ao uso da kava, diferentemente deste estudo, em que os animais não apresentaram esta condição.

Já no ensaio pré-clínico de toxicidade aguda realizado por Carvalho (2005), ocorreram lesões irreversíveis de córnea em três animais machos, na dose de 2250 mg/kg e em um, na dose de 2000 mg/kg, correspondendo a cerca de 523 e 465 vezes a dose diária usual do extrato de kava estabelecida para seres humanos, ou seja, 4,3 mg/kg. De acordo com Larini (1999) e Barros e Davino (2003), este tipo de evento ocorrendo dentro de sete dias durante realização de ensaio de toxicidade aguda, como ocorreu no trabalho de Carvalho (2005), expressa extrema toxicidade do produto naquela dose. Curiosamente, as fêmeas analisadas por Carvalho (2005) não manifestaram tais alterações oculares, embora a  $DL_{50}$  obtida, 1994,36 mg/kg, com limite de confiança de 95% (1676,19 a 2326,89), tenha caracterizado o produto como nocivo. Em conformidade com esses últimos resultados, Carvalho (2005), ao realizar ensaio subcrônico, em ratos Wistar, semelhante ao presente estudo também não constatou lesões oculares.

Vale ressaltar que, nesta pesquisa, as três doses do extrato da kava administradas diariamente aos animais (4,3 mg/kg, 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg) foram, provavelmente, insuficientes para provocar oculopatias, tal como descreveu Carvalho (2005), em seu ensaio sub-crônico.

Diferentemente do que ocorreu nesta pesquisa, Ruze (1990), quando avaliou consumidores de bebida contendo *Piper methysticum* das ilhas Tonga, encontrou alterações cutâneas e irritação ocular. Suss e Lehmann (1996) e Cairney et al. (2003) descreveram casos clínicos de dermatite associada à kava. Embora Norton e Ruze (1994) afirmem que a causa da dermatopatia induzida pela kava seja desconhecida, Grace (2005), descrevendo alterações cutâneas urticariformes, em dois consumidores contumazes de bebida contendo kava, considerou-as de natureza alérgica e significado clínico pouco claro. Sugeriu, então, assim como Jappe et al. (1998), que as kavalactonas poderiam estar implicadas no surgimento de fenômenos imuno-alérgicos, em algumas pessoas.



Como não houve nenhuma alteração no aspecto externo dos animais da presente pesquisa, pode-se supor que a ausência de reações alérgicas cutâneas deveu-se, provavelmente, ou à baixa toxicidade do extrato de kava, nas condições deste estudo, ou a fatores inerentes ao estado imunitário dos animais, impossíveis de avaliar pelo desenho deste trabalho.

Ao se comparar o consumo de água dos animais tratados com o grupo controle, durante as 13 semanas do experimento, verificou-se que o uso do extrato WS 1490 contendo kava induziu menor consumo médio de água nas três doses: com 4,3 mg/kg em machos e fêmeas somente em três semanas, correspondendo a 23,1% do tempo total do experimento; com 12,9 mg/kg, nos machos e fêmeas em quatro e em dez semanas, respectivamente 30,7 e 76,9% do tempo; com 38,7 mg/kg, o consumo dos machos aumentou em uma semana, enquanto o das fêmeas diminuiu em três, correspondendo respectivamente a 7,7 e 23,1 % do tempo, como visto nas tabelas 1 e 2.

Clayton et al. (2007) não encontraram diferenças na ingestão de água entre animais tratados e controles, durante seu experimento. Pinto et al. (2005), ao administrarem extrato de kava a ratas grávidas, nas doses de 5 mg/kg, 35 mg/kg e 50 mg/kg, diariamente, do sexto ao 15º dia de gestação, não observaram alterações no consumo de água. Chama-se atenção para o fato de que, as duas menores doses foram respectivamente, próximas da usual do extrato WS 1490 (4,3 mg/kg) e nove vezes esta dose (38,7 mg/kg), como se empregou em dois grupos deste trabalho.

Carvalho (2005) também observou que o tratamento subcrônico com doses de kava semelhantes às deste estudo, não interferiu na ingestão hídrica pelos animais tratados durante o período observado, que foi de quatro semanas.

As diferenças aqui registradas foram mais acentuadas no grupo das fêmeas, tratadas com 12,9 mg/kg, as quais apresentaram depleção do consumo de água por um tempo mais prolongado. Isso também ocorreu nas três últimas semanas com machos. Esse grupo teve comportamento, nas quatro primeiras semanas, semelhante aos animais de Carvalho (2005), que restringiu as observações por apenas quatro semanas. É importante notar a diferença do tempo de administração do extrato da kava: 10 dias no trabalho de Pinto et al. (2005) e 13 semanas neste, além de, naquele, tratar-se de ratas grávidas. Esses fatores podem ter influenciado nos resultados, visto que, a gravidez, tanto em humanos como em animais, induz a

alterações fisiológicas, incluindo as hormonais, capazes de influenciar tanto a farmacocinética, quanto a farmacodinâmica das drogas, segundo Anger e Piquette-Miller (2008).

O consumo de ração dos animais tratados, neste estudo, sofreu oscilações ao longo da experiência, quando comparado ao grupo controle. Nas doses diárias de 4,3 mg/kg e 38,7 mg/kg, as fêmeas apresentaram um menor consumo durante três semanas, enquanto que nos machos essa alteração foi verificada somente em duas.

Semelhantemente, fêmeas do grupo 12,9 mg/kg tiveram redução de consumo alimentar por um período de sete semanas, diferindo dos machos, que não alteraram seu ritmo alimentar nessa dose, como demonstrado nas tabelas 3 e 4.

Estes resultados, com exceção dos machos do grupo 12,9 mg/kg, diferem dos de Pinto et al. (2005), que não relataram modificações deste parâmetro em relação ao grupo controle. Também divergem dos de Clayton et al. (2007), pois estes não encontraram diferenças no consumo de ração em nenhum dos grupos do seu experimento. Como esses autores trabalharam com ratos F344, pode-se supor que a diferença de linhagem entre os animais dos dois experimentos possa ter interferido nos resultados, pois, para aqueles animais, doses de até 2 g/kg foram administradas, sem, no entanto, haver diferenças no consumo de ração.

Entretanto, na comparação deste estudo com o de Pinto et al. (2005), deve-se ressaltar que, apesar dos animais serem também Wistar, tratavam-se de fêmeas, grávidas. É possível que alterações fisiológicas, associadas ao *status* endócrino desses animais, possam ter favorecido a manutenção do estado de apetência, a despeito do uso da kava, uma vez que, em ratas, no período gestacional, há geralmente um aumento da ingestão alimentar, de acordo com Ladyman (2008).

Chama-se atenção para o fato de que as fêmeas desta pesquisa que tiveram menor consumo de ração (grupo 12,9 mg/kg), correspondente a 53,9% do tempo do experimento, não apresentaram alteração da curva ponderal, assim como os demais animais, não havendo, desta forma, diferença significativa nas três doses, comparada ao grupo controle, como expresso nas tabelas 5 e 6. Essa evolução ponderal foi concordante com a observada por DiSilvestro et al. (2007), cujo experimento com ratos machos ratos Sprague-Dawley alimentados com ração acrescida de extrato acetônico ou etanólico da kava, em diferentes concentrações, não demonstrou diferença no comportamento do peso corporal destes em relação ao grupo controle. Igualmente o estudo subcrônico de Carvalho (2005) superpõe-se

aos resultados deste experimento, divergindo, porém, dos resultados de Clayton et al. (2007). Esses autores observaram que, nos ratos F344 submetidos ao tratamento com a kava, houve decréscimo do peso corporal ao final de 14 semanas, embora essa alteração só tenha ocorrido nos animais que receberam as doses mais elevadas (2g/kg e 1g/kg). O decréscimo de peso, contudo, não parece ter sido resultante de alterações da ingestão alimentar, pois esta, durante aquele experimento, não foi diferente entre os grupos tratado e controle.

No experimento de Pinto et al. (2005), as doses de kava foram distintas das utilizadas neste trabalho e as ratas, em estado gestacional, apresentaram ganho ponderal, que de acordo com Douglas et al. (2007), representa um evento natural da gestação. Sorrentino et al. (2006), administrando kava por um período de três e seis meses, constatou não ter havido alterações do peso corporal, o que demonstra que a kava não interfere neste parâmetro, nem em intervalos de tempo maiores ou mesmo em ratas grávidas.

A semelhança da evolução ponderal dos ratos detectada neste trabalho e em concordância com esses outros autores (DiSILVESTRO et al., 2007; PINTO et al., 2005; SORRENTINO al., 2006), demonstra que a kava, na forma de extrato, nas doses e tempo administrados, não influenciou no crescimento, tendência natural do desenvolvimento corporal dos ratos confinados, de acordo com Silva et al. (2007). Segundo esses autores, ratos em cativeiro - sedentários ou com atividade física – não apresentam alterações na curva ponderal, obtida sem diferenciação de massas gorda e magra.

Os resultados mostraram que a temperatura retal dos animais variou entre os machos de  $37,4 \pm 0,1$  a  $38,3 \pm 0,1$  e entre as fêmeas de  $37,9 \pm 0,2$  a  $39,0 \pm 0,1$ ; nas doses de 4,3 mg/kg e 12,9 mg/kg, entre os machos, ocorreram variações estatisticamente significantes para menos e para mais, ambos em apenas uma semana, conforme expresso nas tabelas 7 e 8. Já com 38,7 mg/kg, a temperatura foi menor em três semanas, ou seja, durante 23% do tempo do experimento e maior em duas (15,4%), correspondendo no total a 38,4% do tempo de tratamento. Ocorreu, portanto, uma provável interferência do extrato no sistema de termorregulação desse grupo de animais, embora sem outras repercussões.

Na avaliação das fêmeas, no entanto, em todas as doses houve semelhança estatística com o grupo controle, demonstrando que, nelas, em todo o período de tratamento, a relação metabolismo/regulação manteve-se preservada, semelhante

ao experimento subcrônico de Carvalho (2005), no qual a kava não interferiu sobre esse parâmetro.

A glicemia, aferida no sangue da cauda dos animais, no primeiro dia do experimento e em seguida, quinzenalmente, foi semelhante à do grupo controle, com exceção do grupo dos machos tratados com a dose de 38,7 mg/kg, que, na quarta semana, apresentou níveis séricos elevados, como se observa na tabela 9. Excetuando-se esta particularidade, os resultados foram semelhantes aos de Sorrentino et al. (2006). Diferentemente, Clayton et al. (2007) demonstraram a ocorrência de hipoglicemia, em ratos F344 machos e fêmeas, tratados com kava nas doses de 1g/kg e 2g/kg. Em ensaio subcrônico, Carvalho (2005) encontrou variações de hiperglicemia ou hipoglicemia, com o mesmo tipo de extrato de kava e doses semelhantes às desta pesquisa, em ratos Wistar machos, quando os comparou com o grupo controle.

Dentro desse contexto, há discordâncias nos relatos da literatura, como também nas justificativas para as alterações glicêmicas pelos diversos autores. Os resultados obtidos nesta pesquisa não equacionam completamente o problema, uma vez que, mesmo de forma eventual, encontraram-se níveis elevados da glicose sérica, quando se utilizou a maior dose (38,7 mg/kg).

De acordo com Rother (2007), a hiperglicemia crônica ocorre no diabetes mellitus, condição de incapacidade das células endócrinas pancreáticas em manter adequada a secreção de insulina, hormônio regulador do metabolismo da glicose. Essa alteração bioquímica também pode ser transitória, como freqüentemente ocorre na prática clínica, provocada pela produção de catecolaminas, cortisol, glucagon e hormônio do crescimento, que podem estar associados a situações de estresse orgânico.

No presente trabalho, o único registro de hiperglicemia associada à dose mais elevada do extrato de kava teve um caráter eventual e transitório, sem repercussões e se tornando semelhante aos controles na aferição realizada duas semanas após.

Na presente pesquisa, outros parâmetros bioquímicos avaliados, incluindo testes de função hepática, não demonstraram diferença em relação aos controles, exceto para ALT, significativamente menor nos machos do grupo que recebeu a dose de 4,3 mg/kg, conforme as tabelas 10, 11 e 12.

Sorrentino et al. (2006) também detectaram alterações bioquímicas após o tratamento com a kava, excetuando-se elevações mínimas de AST, ALT e colesterol, no grupo de animais que recebeu 73 mg/kg. De acordo com esses autores, estes níveis, apesar de mais elevados que os do grupo controle, ainda mantinham-se dentro da normalidade.

Estes resultados também foram concordantes com os de Singh e Devkota (2003), que ao testarem em ratos o extrato aquoso da kava, não observaram anormalidades na atividade de AST, ALT, FA e DHL, nem na formação de malondialdeído (MDA), indicador de estresse oxidativo, cujo aumento indica alterações na peroxidação lipídica. Nesse trabalho foram administradas, aos animais, doses de 200 e 500 mg/kg do preparado aquoso, semelhante ao uso tradicional e durante período mais curto, por duas e quatro semanas, sem ocorrer indicativo bioquímico de toxicidade hepática, fato similar ao desta pesquisa.

Embora de desenho diferente, os resultados encontrados neste trabalho também são concordantes com os de Gastpar e Klimm (2003), que avaliaram, em estudo duplo-cego, randomizado e controlado com placebo, pacientes aos quais administraram 150 mg ao dia do extrato WS® 1490 da kava, durante 4 semanas, aferindo-se em seguida AST, ALT,  $\gamma$ GT e FA.

Após o tratamento, não encontraram diferenças significantes entre os grupos tratados com o extrato e com placebo, nem entre os resultados basais e pós-tratamento dos grupos, demonstrando, como neste estudo, a ausência de alterações bioquímicas sugestivas de aparecimento de doença hepática, traduzida pela normalidade das enzimas avaliadas.

Na descrição de casos clínicos, no entanto, Stickel et al. (2003) mostraram a ocorrência de elevação acentuada na atividade das enzimas hepáticas, em pacientes em uso de kava. Em muitos casos, a ALT atingiu níveis maiores que 2000 UI/L.

Sendo a doença hepática freqüentemente silenciosa, do ponto de vista clínico, às vezes até alcançar estágios avançados, exames laboratoriais são necessários para identificar e caracterizar o dano em curso, afirma Dufour (2000). Como o fígado tem várias funções bioquímicas, de síntese e excreção, diversos testes bioquímicos são usados no diagnóstico e manejo das hepatopatias.

É importante salientar que, segundo Kew (2000) e Giannini (2005), a denominação de testes de função hepática, comumente usada na literatura, refere-

se a exames que avaliam primariamente a integridade hepatocítica, mais do que propriamente a função do fígado. Além disso, alguns desses testes podem refletir problemas de outra origem, por exemplo, a hemólise, que eleva os níveis de bilirrubina, ou doença óssea, que compromete a FA (DUFOUR, 2000).

Sabe-se que o aumento da atividade plasmática da ALT e AST resulta, principalmente, da liberação dessas enzimas do citosol dos hepatócitos para a corrente sanguínea. A ALT, encontrada primariamente no fígado e rins e em pequenas quantidades no coração e músculo esquelético, é o indicador mais sensível e específico de lesão hepática - causa mais freqüente e importante do aumento de sua atividade (DUFOUR, 2000; SHERMAN, 1991).

Uma vez que houve semelhança estatística ao se comparar os animais tratados ao grupo controle e, na dose de 4,3 mg/kg, em machos, a ALT ter sido significativamente menor, pode-se afirmar que não houve indicativo de hepatotoxicidade, sob o ponto de vista bioquímico.

Níveis baixos de ALT podem ser encontrados normalmente no sangue (DUFOUR, 2000), mas autores consideram que a redução significativa da atividade das enzimas ALT, AST, FA e DHL, sugerem uma potencial hepatoproteção da kava (SINGH; DEVKOTA, 2003).

A AST também é um indicador importante de agressão hepática, sendo esta uma causa comum de aumento da sua atividade, embora vários outros fatores possam interferir, pois esta enzima é afetada por condições como a injúria muscular. Nas hepatopatias, a AST freqüentemente é mais baixa que a ALT, exceto na etiologia enólica, quando esse comportamento se inverte (DUFOUR, 2000). Elevações enzimáticas muito acentuadas refletem laboratorialmente necrose hepatocelular associada à hepatite tóxica pela kava, sendo, em alguns casos, tão devastadora a ponto de necessitar de transplante hepático (STICKEL et al., 2003). Entretanto, de acordo com Denham et al. (2002) e Anke e Ramzan (2004), as discussões sobre alterações bioquímicas e ingestão de kava sugerem que outros fatores possam estar implicados no desencadeamento de toxicidade hepática grave.

Desde as primeiras publicações relacionando a hepatotoxicidade ao consumo da kava, como a de Mathews et al. (1988), que descreveram a elevação da  $\gamma$ GT em aborígenes seus consumidores contumazes, a maioria dos relatos de caso publicados têm chamado atenção para as alterações enzimáticas dentro desse contexto clínico. Embora a injúria hepática se manifeste predominantemente com um

padrão hepatocelular, demonstrada pela elevação da atividade da ALT e AST, pode se fazer presente com características mais marcantes de colestase, quando se alteram os níveis de bilirrubina e a atividade da  $\gamma$ GT e FA (GIANNINI et al., 2005).

Dentre as enzimas hepáticas, a  $\gamma$ GT, de alta sensibilidade, aumenta sua atividade em 85 a 90% dos pacientes com alguma forma de hepatite aguda, embora haja razões diversas para a sua elevação. Relaciona-se diretamente à ingestão de bebidas alcoólicas, ao IMC elevado, ao uso de alguns medicamentos e até mesmo ao hábito de fumar. Indivíduos com diabetes, hipertiroidismo, artrite reumatóide e doença pulmonar obstrutiva crônica têm freqüentemente  $\gamma$ GT elevada, embora não se conheçam bem as razões. O infarto agudo do miocárdio também pode promover aumento da atividade desta enzima (DUFOR, 2000).

Com relação à FA, sua síntese é aumentada nas colestases intra-hepáticas e extra-hepáticas, ocorrendo maior liberação a partir das membranas celulares. Sua atividade eleva-se também nas doenças ósseas e quando ocorrem tumores que a produzem (DUFOR, 2000).

De acordo com Blendis (2005), é fato conhecido, que o uso da kava está associado à elevação dos níveis de atividade da  $\gamma$ GT, havendo concordância entre autores de que esse evento pode ser transitório (CLOUATRE, 2004; CLOUGH et al., 2003).

Quanto à  $\gamma$ GT e FA, houve discordância entre os resultados da presente pesquisa, quando comparados ao estudo transversal de Clough et al. (2003). Esses autores avaliaram 98 indivíduos de uma comunidade aborígine, dos quais 62 eram ou tinham sido usuários da kava, consumindo-a habitualmente sob a forma de preparado aquoso com a kava em pó, disponível em pacotes de 75 g, contendo aproximadamente 8 g de kavalactonas.

Dentre estes, 23 haviam interrompido o uso há pelo menos um ano antes do estudo; dez há um ou dois meses; 15 há uma ou duas semanas e 14 deles haviam consumido a kava nas 24 horas anteriores à coleta de dados. Estes indivíduos foram comparados ao grupo controle, constituído por 36 não consumidores de kava.

Dentre os consumidores de kava, 48% demonstraram aumento de  $\gamma$ GT e 37% tinham elevação da FA, sem correlação da elevação dessas enzimas com o tempo de uso, porém uma maior quantidade do preparado consumida por semana foi associada à elevação da FA. No grupo com consumo mais recente de kava ocorreu elevação da  $\gamma$ GT e FA, sem alterações na ALT, proteínas totais, albumina

ou bilirrubinas. Os resultados desses últimos parâmetros foram, semelhantes aos do presente estudo, apesar da divergência em relação à  $\gamma$ GT e FA.

Ressalte-se que a elevação daquelas duas enzimas ocorreu indiferentemente nos indivíduos consumidores ou não de grandes quantidades de álcool concomitante à kava (CLOUGH et al., 2003).

Há risco de interações farmacocinéticas ou farmacodinâmicas entre a kava e o álcool, *in vivo*, de acordo com Anke et al. (2006). Apesar disso, esses resultados levaram os autores a concluir que era improvável que o álcool fosse fator de confundimento quanto aos efeitos hepáticos do uso da kava, pois o consumo deste era uma constante em todos os grupos, embora em quantidades variáveis (CLOUGH et al., 2003).

Entretanto, é importante destacar que, nos grupos estudados por Clough et al. (2003), as elevações da atividade de  $\gamma$ GT e FA foram associadas ao uso mais recente da kava, independente da quantidade de álcool consumida. Além disso, a alteração naquelas enzimas não se acompanharam de elevação da ALT. Os autores sugeriram, então, que esses achados não deram suporte à hipótese de que a kava fosse capaz de provocar dano hepático grave.

No presente estudo, o comportamento semelhante entre os grupos tratados e controle, no que concerne à  $\gamma$ GT e FA, pode ter sido devido, pois, à ausência de outros fatores, os quais, como a ingestão de álcool, em maior ou menor grau, poderiam contribuir para a toxicidade hepática da kava.

Diferentemente do presente trabalho, Clough (2003), referiu elevação de  $\gamma$ GT em estudo populacional envolvendo 6800 indivíduos de comunidades aborígenes; também Clayton et al. (2007) encontraram, em ratos F344, submetidos a diferentes doses diárias de extrato de kava, aumento na atividade da  $\gamma$ GT nos machos que receberam 2 g/kg e nas fêmeas que receberam 1 e 2 g/kg.

Neste estudo, não ocorreram elevações na bilirrubina total e suas frações, semelhante ao que foi encontrado nas avaliações de Clough et al. (2003) e Sorrentino et al. (2006). De acordo com Dufour (2000), o aumento desses parâmetros pode ter outras causas, todavia, elevações principalmente da bilirrubina conjugada, são fortemente relacionadas à doença hepática ou de ductos biliares.

Russmann et al. (2003) sugeriram que hiperbilirrubinemia pode ocorrer com o uso de extratos comerciais da kava. Em diversos relatos de hepatotoxicidade relacionada à kava, são informadas alterações, às vezes acentuadas, dos níveis de



bilirrubina sérica, como demonstram Stickel et al. (2003). A ausência de hiperbilirrubinemia, neste estudo, sugere, pois, que nessas circunstâncias, o extrato não provocou agressão hepática suficiente para alterar esse parâmetro.

Dasgupta (2003) afirma ser freqüente a elevação das enzimas hepáticas em pessoas que estão fazendo uso de kava, o que expressa toxicidade em muitos casos. A ausência de alterações dessas enzimas, nesta pesquisa, portanto, sugere que o extrato utilizado não provocou doença hepática tóxica nos animais avaliados, estritamente deste ponto de vista.

Em contraste, Brown et al. (2007) avaliaram, em residentes no Havaí, os efeitos hepáticos do consumo de bebidas contendo kava, preparadas do modo tradicional, comparando-os a não consumidores dessas bebidas e encontraram elevação de  $\gamma$ GT em 65% dos que as consumiam. Além disso, 23% dos usuários de kava apresentavam concomitantemente elevação de FA.

É importante destacar que esses autores procederam o rastreamento para exclusão de hepatites virais e hemocromatose. No entanto, na população avaliada, 26% dos indivíduos do grupo controle apresentavam elevação de  $\gamma$ GT. Embora esse referido percentual tenha sido menor que os que faziam uso da kava, isto sugere que, provavelmente, outros fatores promoveram a elevação da atividade daquela enzima, mesmo em indivíduos abstinentes de bebidas contendo essa substância. Esses eventos também foram indicativos de que, possivelmente, a população estudada tinha precedentemente taxas enzimáticas mais elevadas por outros fatores, apresentando então um aumento ainda mais acentuado na atividade dessa enzima ao consumir a kava (BROWN et al., 2007). Na população animal do presente estudo, a ausência de outros fatores indutores de elevação da  $\gamma$ GT ou a real incapacidade tóxica do extrato administrado podem ser responsáveis pela semelhança entre os grupos.

Como no presente trabalho, as fêmeas estudadas por Pinto et al. (2005) não mostraram alterações nas enzimas hepáticas ALT e FA. Esse resultado pode ter sido influenciado pelo pouco tempo de utilização da kava, uma vez que a hepatotoxicidade tem sido relacionada com uso crônico dessa substância. Sugere-se, inclusive, que o período provavelmente mais seguro de administração dessa substância seja de 1 a 8 semanas, com a recomendação de não se exceder três meses de tratamento (LEHRL, 2004; MALSCH; KIESER, 2001; WITTE et al., 2005). Note-se, porém, que apesar da administração de doses 8,1 e 11,6 vezes a dose

diária usual de extratos de kava recomendada (4,3 mg/kg), o período de administração de 10 dias foi bem mais curto que o deste estudo, que compreendeu 13 semanas.

Na maioria dos relatos sobre o uso da kava, há referência de elevações da ALT, como descrito por Strahl et al. (1998), que chamou atenção para hepatite aguda recorrente em duas mulheres, com história de uso de produto botânico à base de kava. Nessas pacientes não havia outras causas que justificassem o quadro bioquímico, e a suspensão do seu uso resultou em declínio enzimático sérico. Esse evento clínico foi consistente com agressão hepatocítica, confirmada por biopsia hepática e considerada pelos autores como induzida pela kava.

Evolução diferente do presente trabalho ocorreu no caso descrito por Escher et al. (2001), em que um indivíduo de 50 anos tomava diariamente, durante dois meses, três a quatro cápsulas do extrato da kava, correspondente a 210 e 280 mg de kavalactonas. Ocorreu, neste caso, elevação de AST e ALT, de 60 a 70 vezes o valor de referência. A ingestão de 280 mg de kavalactonas - equivalente, no preparado utilizado por este paciente, a 400 mg do extrato, ou seja, 5,7 mg/kg - ultrapassou a dose diária usual de 4,3 mg/kg.

As evidências de hepatotoxicidade grave foram patentes, culminando com transplante hepático, mesmo com período de tratamento inferior a três meses. Em adição, esta foi demonstrada pelas elevações de FA,  $\gamma$ GT, DHL e bilirrubina total (3,4; 19,7; 4,7 e 11,1 vezes o valor de referência, respectivamente).

Clough et al. (2003) e Russmann et al. (2003) não são favoráveis à hipótese de hepatotoxicidade induzida pela kava por si só. Acreditam que a elevação na atividade da  $\gamma$ GT, na ocorrência de ALT e AST normais ou minimamente alteradas, como encontrado em consumidores da kava da Nova Caledônia, seja sobretudo um reflexo da indução de enzimas CYP450, do que propriamente um sinal de lesão hepática.

Proteínas totais e frações (albumina e globulinas) dos animais tratados também foram semelhantes às dos controles, divergindo do trabalho de Clayton et al. (2007), no qual proteínas totais e albumina, em ambos os sexos e na dose mais alta, foram mais elevadas.

A albumina é a mais abundante proteína plasmática produzida pelos hepatócitos. Sua produção depende do aporte de aminoácidos, da pressão oncótica do plasma, dos níveis de citocinas inibitórias - particularmente a interleucina 6 (IL-6)

- e do número de hepatócitos íntegros (DUFOR, 2000). Assim, redução do seu nível sérico pode estar associada com a perda de massa hepática funcionante, embora a hipoalbuminemia possa ter outras causas, como a síndrome nefrótica, enteropatias perdedoras de proteínas e desnutrição (GIANNINI et al., 2005). Nesta pesquisa, os níveis proteicos de todos os animais sugerem que o extrato não alterou a função de síntese, a despeito do tratamento com a kava.

A atividade da DHL foi semelhante entre os animais tratados e o grupo controle, assim como ocorreu no trabalho de Singh e Devkota (2003). Do mesmo modo, a CK foi semelhante à do grupo controle desta pesquisa. A DHL, freqüentemente elevada na hepatite tóxica (DUFOR, 2000), representa indicador de isquemia tecidual, podendo atingir concentrações muito elevadas (GIANNINI, 2005). A avaliação da CK reveste-se de importância, sobretudo nas elevações de ALT, quando associadas à história clínica de exercícios físicos. Em situações particulares de atividade muscular, a elevação concomitante das referidas enzimas, pode ser utilizada no diagnóstico diferencial entre necrose hepatocitária e alteração metabólica muscular (DUFOR, 2000).

Os animais tratados neste experimento não apresentaram alterações do potássio, cálcio e magnésio, principais cátions intracelulares. O sódio, cátion mais abundante do meio extracelular, também teve o mesmo comportamento. Tais resultados sobrepõem-se aos encontrados no estudo subcrônico de Carvalho (2005). Esses elementos participam de importantes processos responsáveis pela manutenção da homeostase, sendo o sódio relacionado à distribuição da água em todo o organismo. É de se supor, pois, que esses processos tenham permanecido íntegros, durante todo o experimento, apesar do uso da kava.

No presente estudo, a semelhança estatística nos parâmetros bioquímicos entre ratos tratados com diferentes doses do extrato WS 1490 da kava e o grupo controle demonstra que, nas doses e no período utilizado, este foi inócuo, notadamente no que se refere à avaliação hepática.

Não houve alteração dos níveis de colesterol total e triglicerídeos em todos os animais estudados, como também demonstrado no estudo subcrônico de Carvalho (2005). Há também acordo com os relatos de Clayton et al. (2007), nas doses mais baixas de kava (0,125 e 0,25 g/kg), apesar dessas doses terem sido 29 e 58 vezes mais elevadas que a dose usual (4,3 mg/kg). Entretanto, os animais tratados com a dose de 0,5 g/kg ou mais apresentaram níveis mais elevados de

colesterol que os controles. Essa dose correspondeu a 116,2 vezes a dose usual e 12,9 vezes a maior dose da presente pesquisa (38,7 mg/kg). A discrepância em relação ao presente estudo, portando, pode estar relacionada a elevadas doses. Sorrentino et al. (2006) observaram elevações mínimas do colesterol no grupo de animais que recebeu a maior dose de kava, ou seja, 73 mg/kg, mesmo assim esses níveis bioquímicos ainda estavam dentro dos valores de referência. Clough et al. (2003), analisando consumidores freqüentes da kava em comunidades aborígenes, observaram que o colesterol era mais elevado, enquanto os níveis de triglicérides mantinham-se normais, como nos animais desta pesquisa.

O metabolismo do colesterol depende da integridade do hepatócito, que assegura a homeostase do metabolismo lipídico. Quando há prejuízo na função hepática, como por exemplo, na hepatite crônica, cirrose ou câncer de fígado, esse metabolismo pode ser alterado (JIANG et al., 2007). De acordo com Varghese et al. (2007), nas hepatopatias crônicas o comprometimento do metabolismo lipídico pode ser devido a fatores como a síntese hepática diminuída, *clearance* reduzido de lipoproteínas complexas e regurgitação do conteúdo biliar para o intravascular, promovendo redução dos níveis séricos de colesterol.

Norton e Ruze (1994) consideram que os extratos de kava podem interferir no metabolismo do colesterol. Clayton et al. (2007) sugerem que a elevação do colesterol associada ao uso do extrato da kava em doses altas pode ser conseqüente à hipertrofia hepática, causada por indução de enzimas microssomais. Ressalte-se que Dietlein e Schröder-Bernhardi (2003), revisando base de dados sobre as doses dos extratos de kava, prescritas como alternativa a antidepressivos, observaram que, em 75,6% dos casos, estas eram maiores que as recomendadas. Tal fato pode, portanto, induzir esse tipo de resposta, em pacientes que fazem uso de altas doses de kava.

Dentro desse contexto, pode-se supor que, neste trabalho, não houve sinais indicativos de hipertrofia hepática, nos animais submetidos ao tratamento pela kava, nem da função de síntese hepática do colesterol ou dos outros fatores responsáveis por esse metabolismo.

Nesta pesquisa, assim como na de Sorrentino et al. (2006), o extrato de kava administrado aos animais não alterou os parâmetros hematológicos avaliados, excetuando-se a contagem diferencial dos leucócitos, nas três doses, conforme demonstrado nas tabelas 13 e 14.

Os neutrófilos, granulócitos típicos dos fenômenos da inflamação, encontram-se aumentados nas situações de resposta inflamatória aguda. Neste caso, neutrofilia ocorreu com 4,3 mg/kg em fêmeas. Na dose de 12,9 mg/kg os machos apresentaram neutrofilia e linfocitopenia, havendo eosinofilia na dose de 38,7 mg/kg. Mathews et al. (1988) já descreviam linfocitopenia em aborígenes com consumo abusivo da kava. Clough et al. (2003a) também a encontraram em comunidades aborígenes, onde o decréscimo era inversamente proporcional à quantidade de bebida à base de kava consumida.

Na linhagem linfocitária, a recirculação é contínua, portanto, um aumento ou uma diminuição no número de linfócitos não necessariamente reflete alteração na linfopoiese. Linfocitopenia pode ser encontrada na cirrose hepática (CARVALHO; PARISE, 2006; COLLAZO; SOTTO, 1985) ou ser resultante da administração de drogas citotóxicas (RUIZ et al., 1993). Como no presente trabalho a depleção linfocitária só ocorreu nos machos com a dose 12,9 mg/kg, excluídos outros fatores que pudessem provocar esta diminuição, é de se supor que este evento, somente nesta dose e neste grupo, seja uma reação à kava.

Os eosinófilos são células importantes no processo de fagocitose, assim como em reações inflamatórias, principalmente de natureza alérgica (KAY et al., 1997). Eosinofilia ocorrente na dose de 38,7 mg/kg, nos machos desta pesquisa, divergiu dos resultados de Carvalho (2005) e Sorrentino et al. (2006).

As plaquetas dos animais tratados neste estudo foram semelhantes ao grupo controle, assim como no ensaio subcrônico de Carvalho (2005). Este resultado, porém, diferiu do encontrado por Mathews et al. (1988), que observaram aumento do volume dessas células. A contagem de plaquetas é um dos indicadores de função hepática que denota a progressão da doença hepática crônica para cirrose (DUFOR, 2000). O fígado é local de síntese de fatores que participam na cascata de reações promotoras da coagulação. A plaquetopenia representa um dos distúrbios na doença hepática crônica, a qual se associa a uma maior frequência de sangramentos nos seus portadores (BLONSKI et al., 2007). Segundo Afdhal e Hesteban (2007), a redução do número de plaquetas tem fisiopatologia complexa e multifatorial, aumentando o risco de sangramentos e de suas complicações na hepatopatia, sobretudo crônica, razão da sua importância clínica.

É procedente, portanto, com base nos resultados deste estudo, afirmar que, assim como no experimento de Carvalho (2005), Sorrentino et al. (2006) e

DiSilvestro et al. (2007), a kava não provocou alterações hepáticas que comprometessem a contagem de plaquetas.

Os testes de avaliação comportamental e motora, neste estudo, demonstraram algumas diferenças entre os animais tratados e o grupo controle, conforme as tabelas 15 a 20.

No teste de campo aberto, a frequência de ambulação, na dose três vezes a usual, entre as fêmeas, foi menor que o grupo controle, na oitava semana do experimento. Este resultado foi semelhante ao de Carvalho (2005), exceto quando observou, na quarta semana, um aumento significativo na frequência de ambulação das fêmeas com a dose 38,7 mg/kg.

No comportamento levantar (*rearing*), unicamente na dose 4,3 mg/kg, as fêmeas mostraram frequência menor que a do grupo controle, na oitava semana, enquanto Carvalho (2005) observou semelhança entre os grupos durante todo o experimento.

O tempo de execução do comportamento de limpeza (*grooming*) foi menor em todas as doses entre machos, na segunda e sexta semanas e com 38,7 mg/kg, também na quarta semana, como mostra a tabela 17. Carvalho (2005) observou que o tempo de limpeza foi maior nos machos, nas três doses testadas. Também divergiu deste trabalho quanto à maior frequência de defecações nas três doses.

Já Garret et al. (2003), administrando a camundongos BALB/cByJ via peritoneal, diferentes doses de kava ou diazepam e flumazenil - reconhecido antagonista do diazepam, observaram que a locomoção dos animais foi significativamente reduzida pela kava, proporcionalmente às doses empregadas. Este fato poderia estar relacionado com as doses empregadas, mas também com a via de administração, pois se sabe que vários fatores podem interferir na absorção intestinal das substâncias, até mesmo os veículos incluídos na sua formulação, embora os utilizados na pesquisa de Garret et al. (2003), não tenham provocado efeitos quando o volume injetado não ultrapassava 0,1 ml/10 g de peso corporal.

O teste de campo aberto é usado há várias décadas com o objetivo de avaliar a atividade locomotora de roedores, embora seja difícil comparar um estudo com outro, devido às diferenças entre os protocolos (STANFORD, 2007). Broadhurst (1960) modificou esse teste e demonstrou que o movimento dentro do campo aberto era determinado pela capacidade exploratória dos animais. Esse autor afirma que não há correlação entre a ambulação do animal no campo aberto e sua atividade

dentro da gaiola, pois a emocionalidade e a atividade motora podem se confundir, sendo o comportamento influenciado ou não por alguma droga que se pretenda testar. O animal, permanecendo na região central da arena, é considerado menos ansioso que aquele que se movimenta espontaneamente e vai à periferia da mesma (STANFORD, 2007).

O tempo de permanência dos animais na barra giratória do aparelho *Rota-rod* (Ugo Basile®) foi o mesmo em todos os grupos (TABELA 19), assim como os machos do estudo subcrônico de Carvalho (2005), enquanto as fêmeas demonstraram um tempo diminuído na quarta semana.

No teste do labirinto em cruz elevado (*plus maze*), a aferição da frequência de entradas dos animais nos braços aberto e fechado e o tempo de permanência nesses braços mostrou, apesar de algumas diferenças de comportamento, semelhança estatística entre os tratados com a kava e o grupo controle, o mesmo ocorrendo ao se comparar a droga referência com o grupo controle.

Rex et al. (2002) obtiveram resultados diferentes, constatando a eficácia do extrato LI150 da kava, administrado via oral em ratos Wistar, submetendo-os ao labirinto em cruz elevado e os comparando a um grupo controle, com diazepam como controle positivo. Nesse mesmo teste, Garret et al. (2003) observaram que o extrato etanólico da kava e o diazepam provocaram efeito ansiolítico, tendo sido ambos administrados via intraperitoneal. Os animais tratados com diazepam tiveram o tempo de latência diminuído a partir da dose 0,05 mg/kg, considerada capaz de provocar esse efeito em 50% dos animais ( $ED_{50}$ ). O aumento no tempo de permanência nos braços do labirinto foi obtido com 0,13 mg/kg. Esses eventos ocorreram com significância estatística na dose de diazepam correspondente a 1 mg/kg. A resposta ansiolítica à kava foi obtida com doses bem maiores que o diazepam: 52 mg/kg e 88 mg/kg, respectivamente para o tempo de latência e tempo de permanência. A resposta máxima nesses dois parâmetros ocorreu com 133 mg/kg.

O labirinto em cruz elevado é um teste de comportamento que reflete o estado de ansiedade dos roedores (GARRET et al., 2003). Nele, o diazepam ou outra droga ansiolítica, como por exemplo, clordiazepóxido, é utilizado como controle positivo. A atividade ansiolítica de um composto é, então, comprovada quando há uma diminuição significativa no tempo de latência para entrar nos braços abertos e um aumento no tempo total despendido nesses braços. Além disso, o aumento da

freqüência de entradas nesses braços é considerado um importante indicador do efeito ansiolítico de uma substância, de acordo com Pellow et al. (1985).

A realização desse teste, segundo Garret et al. (2003), é fundamental porque, apesar do amplo uso da kava como tranqüilizante, há poucos ensaios experimentais bem desenhados que tenham avaliado essa sua propriedade. Nisso, concordam com Rex et al. (2002), que também consideram poucos os dados disponíveis em nível experimental quanto à avaliação do efeito ansiolítico da kava. Acrescentam também que, além de haver poucos estudos, a maioria pode ser criticada em diversos aspectos metodológicos, o que compromete a sua interpretação. No entanto, afirmam que os resultados da avaliação nos camundongos BALB/cByJ embasam a assertiva que a kava é ansiolítica, porém muito menos potente que o diazepam (GARRET et al., 2003).

Algumas considerações sobre o desenho dos experimentos de Rex et al. (2002) e Garret et al. (2003) podem embasar essa discrepância entre os resultados. As doses de kava utilizadas por Rex et al. (2002) de 120, 180 e 240 mg/kg de kava e de 15 mg/kg de diazepam, foram bem maiores que as deste estudo - 4,3 mg/kg, 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg de kava e 0,5 mg/kg de diazepam. Em ambos, a administração foi por via oral. Segundo esses autores, a concentração de diazepam do seu estudo foi alta, porque no rato, tanto a absorção intestinal, como a metabolização podem ser lentas. O intervalo de tempo entre a administração das substâncias e o início do teste, de 60 minutos, também foi maior que o deste estudo, que foi de 30 minutos, permitindo provavelmente uma maior absorção. Ademais, o diazepam pode induzir excitabilidade e os animais reagirem de modo mais ansioso. Adicione-se a isto o fato de o efeito ansiolítico do diazepam, por via oral, é menor que por via intraperitoneal.

Quanto ao estudo de Garret et al. (2003), as doses de diazepam variaram de 0,0316 mg/kg a 5 mg/kg e as de kava de 32 mg/kg a 316 mg/kg, sendo peritoneal a via de administração, o que excluiu as variações da absorção intestinal. Além disso, o efeito ansiolítico de substâncias com essa propriedade, em ratos, é mais visível quando da administração aguda, o que, no presente estudo, só ocorreu com diazepam. Todos esses fatores podem, portanto, ter tido interferência nos resultados deste trabalho, divergentes dos de Rex et al. (2002) e Garret et al. (2003).

A avaliação macroscópica nesta pesquisa de órgãos - pulmões, rins e coração, dos animais tratados com *Piper methysticum*, comparada à do grupo controle, demonstrou resultado concordante com o estudo de Sorrentino et al.



(2006). Em ambos os trabalhos, não foram encontradas quaisquer alterações organolépticas ou de peso desses órgãos. Já Clayton et al. (2007) encontraram um aumento na média de peso nos rins dos animais tratados com a kava. Não consideraram esse evento significativo do ponto de vista toxicológico, pois não houve, nesses órgãos, alterações histopatológicas correlacionadas a esse aumento.

No presente estudo, à macroscopia, o fígado dos animais tratados foi semelhante à do grupo controle, resultado concordante com os de Sorrentino et al. (2006) e divergente dos encontrados por Clayton et al. (2007). Esses últimos autores observaram hipertrofia hepática ao final do seu estudo, evidenciada pelo aumento do peso do fígado, nos animais dos dois sexos, diretamente proporcional à dose de kava utilizada. Eles ponderaram que tal hipertrofia hepática deveu-se à resposta adaptativa, considerada fisiológica, pois, durante o processo de metabolização de várias substâncias de diversas classes farmacológicas, pode ocorrer hepatomegalia variando de 10 a 50% em relação ao peso basal, sem representar toxicidade. Foi considerada uma resposta benigna, de natureza adaptativa, à indução dos sistemas enzimáticos que metabolizam as drogas (CLAYTON et al., 2007).

As doses do extrato da kava utilizadas neste estudo devem ter sido insuficientes para induzir hepatomegalia, uma vez que foram muito menores que as praticadas por Clayton et al. (2007), cuja menor correspondeu a 29,06 vezes a menor e 3,22 vezes a maior dose do presente estudo.

Em todas as doses, os aspectos histológicos do coração, pulmões e rins dos animais tratados eram similares ao grupo controle, assim como os do experimento de Sorrentino et al. (2006). Estes encontraram apenas mínimas alterações inflamatórias ou degenerativas focais, nos diversos grupos. No aparelho respiratório, principalmente, a frequência e extensão do processo inflamatório foi o mesmo entre os grupos, tanto com três como com seis meses de administração da substância. Também nos rins ocorreu infiltrado inflamatório mínimo no tecido conjuntivo ou nos glomérulos, sem diferenças do grupo controle. Com base nesses resultados, os autores consideraram que as kavalactonas não provocaram dano nesses órgãos, da mesma forma que não houve injúria tecidual nos animais tratados e controles deste estudo.

Os resultados da avaliação microscópica das amostras de fígado dos animais demonstraram divergência entre os grupos tratados e controle, em diversos aspectos histológicos. Em toda a população animal estudada, o parênquima

manteve sua arquitetura lobular, com distribuição regular das veias hepáticas terminais, que conservaram paredes finas. Nos animais tratados, entretanto, observaram-se alterações microvasculares e reatividade das células de Kupffer. Nas três doses, foi comum a congestão na veia hepática terminal, sendo, entretanto, a dose 12,9 mg/kg a que produziu maiores repercussões, nas três zonas do ácino hepático, as quais ainda incluíram dilatação e inflamação sinusoidais. Com a menor dose, ou seja, 4,3 mg/kg, somente a zona 3 foi afetada por congestão e dilatação sinusoidais, sem a presença de inflamação. A maior dose, 38,7 mg/kg, poupou a zona 1 do processo vâsculo-congestivo, restringindo, ademais, a inflamação sinusoidal à zona 3. A reatividade de células de Kupffer foi uma constante nas três doses empregadas de kava.

A matriz de similaridade confirmou o comportamento dessa resposta histológica, assim como a peculiaridade da dose de 12,9 mg/kg, visto que, nesta, houve maior dessemelhança. Observou-se também que esta foi a dose em que ocorreu, no grupo das fêmeas, menor consumo de água em dez semanas, correspondente a 76,9% do tempo do experimento, além de redução de consumo alimentar, por um período de sete semanas, 53,9% desse tempo, embora não haja relação entre os aspectos histológicos e a alteração do consumo de água e alimento.

Quanto à reação inflamatória portoparenquimatosa, as pontuações atribuídas variaram de zero a dois, numa escala com escore variável de zero a quatro (GAYOTTO; COMITÉ SBP/SBH, 2000). Ao grupo controle, sem reação inflamatória lobular e portal, atribuiu-se o escore zero. Com 4,3 mg/kg, machos e fêmeas receberam escore 1, correspondente a discreto exsudato linfocitário infiltrando a matriz fibroconjuntiva de espaços portais. No seio do lóbulo, notaram-se sinais focais de degeneração hidrópica, retração acidófila individual e/ou focos de necrose hepatocelular, associados a exsudação linfomonocitária (escore 1). Em todos os demais animais, o lóbulo também foi sede de alterações hepatocitolíticas e inflamatórias. Na dose de 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg, a hepatocitolise foi avaliada como escore 2, sendo representadas por pequenas lesões multifocais comprometendo hepatócitos, que foram acompanhadas de exsudação notadamente linfocitária. Sob a administração da maior dose, os animais também mostraram degeneração hidrópica e necrose individual de hepatócitos, igualmente avaliadas com escore 2.

Todos os animais apresentaram inflamação portal avaliada como escore 1, com exceção dos machos que receberam a maior dose. Neste caso, a portite linfocitária foi maior, classificada como escore 2.

Na literatura especializada, são poucos os estudos histológicos dos casos de hepatotoxicidade causada por ervas. Por conseguinte, a histopatologia da agressão ao fígado, nem sempre analisada, às vezes é desconhecida e tem aparência indistinguível de outras formas de doença hepática, de acordo com Humberston et al. (2003). Até mesmo quando se realiza biopsia hepática para estudo histológico nos casos de hepatite crônica em humanos, a gravidade da lesão pode variar de um local para outro, particularmente quando o fragmento é pequeno, afirma Silva (2003). Ademais, há relatos de distintas respostas histológicas ao uso da kava, tornando complexa sua avaliação.

Stickel et al. (2003), avaliando 29 casos de hepatite provavelmente induzida pela kava, demonstraram que a lesão hepática mais freqüente foi a necrose de hepatócitos, observada em 55% dos pacientes; 24,1% desenvolveram hepatite colestática e apenas um paciente teve hepatite lobular. Em dois casos de hepatite recorrente associada ao uso de kava, relatados por Strahl et al. (1998), a biopsia mostrou lesões agudas necrotizantes. Os sinais de hepatite não mais se manifestaram após a suspensão do uso do produto.

No caso descrito por Escher et al. (2001), a biopsia hepática demonstrou necrose hepatocelular extensa e grave, com infiltrado inflamatório lobular e portal, com infiltração de linfócitos e eosinófilos.

A biopsia hepática da paciente cuja insuficiência hepática relacionada ao uso da kava foi descrita por Campo et al. (2002) também demonstrou extensa necrose centrolobular e infiltrado inflamatório misto. Semelhantemente, Gow et al. (2003) descreveram achado de hepatite aguda grave, inespecífica, com necrose pan-acinar e colapso de lóbulos hepáticos, que evoluiu para necrose hepática maciça, quadro distinto dos achados histológicos desta pesquisa, em que somente ocorreu necrose focal ou multifocal.

Na descrição de Russman et al. (2001), em que uma paciente de 33 anos fez uso, por três semanas, de cápsulas contendo kava, o achado histológico foi infiltração portal, necrose em ponte, destruição interlobular de ductos biliares e colestase canalicular, além de infiltração por linfócitos, eosinófilos e macrófagos ativados, envolvendo ductos biliares interlobulares. Nesse caso, o produto

consumido pela paciente era idêntico ao administrado aos animais deste estudo e também na dose usual. Entretanto, como foi comprovado que a paciente tinha deficiência de CYP2D6, esses autores, além de considerarem a kava como responsável pela hepatotoxicidade, sugeriram que essa deficiência seja fator de risco para essa reação adversa, o que já é consenso entre outros autores (CLAYTON et al., 2007).

Já na histologia descrita por Kraft et al. (2001), no relato de caso de uma mulher de 60 anos, com insuficiência hepática aguda imputada à kava, demonstrouse extensa necrose hepatocelular e colestase intra-hepática, necessitando de transplante hepático. Semelhantemente, o caso de hepatite fulminante descrito por Humberston et al. (2003) teve o mesmo quadro histológico. A paciente ingeria diariamente cápsulas contendo 200 mg do extrato de kava, durante quatro meses, após o que evoluiu com insuficiência hepática, culminando com transplante. A análise histológica do espécime explantado revelou necrose hepatocitária difusa, com distribuição preoportunamente em zona 3, acompanhada de extenso infiltrado de linfócitos, histiócitos e eosinófilos, além de hemorragia e colapso maciço da rede de reticulina, embora houvesse manutenção das tríades portais. Proporcionalmente, a dose utilizada nesse relato, foi inferior à usual estabelecida para humanos, ou seja, 4,3 mg/kg, quando o extrato é padronizado com 70 mg de kavalactonas, como o usado neste estudo. No entanto, essa evolução para insuficiência hepática aguda, diferentemente do comportamento observado na amostra animal do presente estudo, pode estar relacionada com a ingestão adicional de múltiplas substâncias, a saber: extrato de kava, extrato de camomila, magnésio, erva-de-São-João, vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e C. Ademais, no rastreamento de substâncias realizado na urina dessa paciente, constatou-se ainda a presença de ranitidina, ibuprofeno e cafeína. Também o tempo de uso foi maior que o recomendado atualmente, de até três meses (LEHRL, 2004; MALSCH; KIESER, 2001; WITTE et al., 2005), o que pode ter contribuído para o desencadeamento da hepatite tóxica grave. Entretanto, esses autores consideraram possível que a toxicidade provavelmente provocada pela kava tenha sido, nesse caso, potencializada pela erva-de-São-João, cujo efeito de indução do CYP450 é conhecido, sendo o mesmo responsável pela interação entre essas duas substâncias (CORDEIRO et al., 2005; SING, 2005). Além disso, advogam que, como as vitaminas e as outras substâncias das quais a paciente fazia uso não eram citadas em relatos de hepatotoxicidade, esta ocorreu por causa da

kava. Os níveis de bilirrubina total eram muito elevados (15 mg/dL, com bilirrubina direta de 6,3 mg/dL); estes, somados a AST maior que 3500 UI/L e ALT maior que 4400 UI/L, denotaram o importante grau de necrose hepatocítica, o que não ocorreu no presente estudo.

Segundo Humberston et al. (2003), apesar de doses do extrato de kava acima de 330 mg ao dia já terem sido testadas e não terem desencadeado efeitos adversos, três ou quatro pacientes que realizaram transplante hepático, na Alemanha, faziam uso de doses diárias maiores que 240 mg. Essa dose, correspondente a 3,4 mg/kg, representa o limite superior usado em vários ensaios clínicos com a kava, sendo, entretanto, ainda inferior à menor dose administrada nos animais deste estudo. Mesmo assim, essa dose menor, bem como as demais, foram capazes de produzir lesões hepáticas portolobulares focais ou multifocais, sem nenhuma expressão bioquímica e clínica.

Achados histológicos de menor gravidade foram descritos por Pinto et al. (2005), que referem necrose coagulativa perivenular, colestase e dissociação grave dos hepatócitos apenas em nove animais da amostra de 72 fêmeas de ratos Wistar, tratadas com diferentes doses de *Piper methysticum*. Esses achados não tiveram significância estatística nem houve alterações concomitantes das enzimas avaliadas (ALT e FA). Saliente-se que o curto período de administração da kava, nesse estudo, pode ter sido insuficiente para provocar alterações semelhantes às encontradas nesta pesquisa, apesar do tempo de tratamento ter sido dentro do recomendado na literatura (LEHRL, 2004; MALSCH; KIESER, 2001; WITTE et al., 2005). Destaquem-se ainda as diferenças farmacocinéticas que podem ocorrer na gestação, capazes de influenciar esses resultados.

Diferentemente deste trabalho, Sorrentino et al. (2006) referem que não encontraram alterações histológicas nos animais do seu experimento, apesar de terem administrado a kava tanto por três como por seis meses, período este maior que o explicitado como seguro.

Também DiSilvestro et al. (2007) relatam que não encontraram sinais de injúria hepática na análise histológica dos ratos alimentados com extratos da kava, em diferentes doses, nem mesmo nos que receberam as doses mais elevadas. Além disso, nos grupos que receberam a kava associada à galactosamina, administrada com vistas a produzir hepatite experimental, a kava não contribuiu para aumentar a lesão hepática induzida pela galactosamina. Por essa razão, esses autores

consideram que as evidências relacionadas à hepatite tóxica resultante do uso da kava são parcas. Saliente-se, porém, que os extratos adicionados à ração desses animais, foi preparado exclusivamente a partir das raízes da planta, com uma concentração residual muito baixa de etanol ou acetona. Não continha pipermetistina, alcalóide encontrado nas partes aéreas da planta, cuja presença pode ter implicações toxicológicas (DRAGULL et al., 2003). Segundo Nerurkar et al. (2004), *in vitro*, em células HepG2, a pipermetistina é capaz de causar morte celular, provavelmente por alterar a função mitocondrial.

Ressalte-se que Côté et al. (2004) observaram que os preparados comerciais de extrato de kava em acetona, etanol ou metanol, apresentam diferenças significantes no conteúdo percentual das principais kavalactonas, o que pode ocasionar mudanças na atividade biológica. Por conseguinte, sugeriram que variações nos efeitos da kava podem ser resultado das diferenças entre preparações.

O extrato WS1490 administrado aos animais da presente pesquisa foi proveniente de um preparado comercial, cuja monografia informa que o mesmo é obtido a partir da raiz da kava, contendo kavaína, dihidrokavaína, metisticina, dihidrometisticina, iangonina e dimetoxiangonina. Carvalho (2005) realizou estudo cromatográfico em camada delgada analítica de três lotes do produto usado neste ensaio, não constatando variabilidade entre eles. Contudo, como não foi realizado o estudo discriminatório da sua composição, não se sabe se o lote do extrato utilizado continha algum tipo de adulterante, que possa ter influenciado nos resultados.

É importante ressaltar que, na prática clínica, os indivíduos que fazem uso de preparados comerciais podem deparar-se com variações nos lotes dos extratos. Muitas vezes, não há como se certificar da pureza e qualidade do produto. Segundo Teschke et al. (2003), embora o cálculo da incidência de hepatotoxicidade seja de risco extremamente baixo (0,008 casos por milhão de doses diárias), não se pode desconsiderar os relatos de caso publicados, sugerindo a associação do uso da kava com hepatite tóxica. A complexidade de se estabelecer uma relação causa-efeito é reconhecida e gera controvérsias, de acordo com Denham et al. (2002), Schmidt (2006) e Teschke et al. (2003), pois na listagem de casos inéditos estudada por Stickel et al. (2003), em apenas um caso houve re-exposição à kava e se estabeleceu o diagnóstico de certeza da relação causa-efeito.

Os resultados dos testes bioquímicos, neste estudo, indicaram que o extrato não provocou toxicidade nos animais tratados. Entretanto, ao se ampliar a avaliação, introduzindo o estudo histológico, observou-se a ocorrência de lesões hepáticas nos animais avaliados. Os achados no fígado puderam ser incluídos no espectro da doença hepática induzida por drogas, visto que, além dos fenômenos vasculo-congestivos venular e sinusoidal, acompanhados ou não de dilatação sinusoidal, afluxo inflamatório luminal e reatividade de células de Kupffer, também abrangeram a necrose hepatocelular focal, na dose de 4,3 mg/kg e multifocal, com 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg. É importante ressaltar que, alterações microvasculares hepáticas, notadamente a dilatação sinusoidal acompanhada de inflamação, tem sido associada à injúria induzida por droga, em estudos de natureza histológica (ARAÚJO et al., 1990), tal como o atual e com respaldo posterior em análises ultraestruturais (ARAÚJO et al., 1993).

Observaram-se ainda que as alterações histológicas, no presente ensaio, não tiveram correlação com os valores enzimáticos. Além disso, a matriz de similaridade mostrou que a dose 12,9 mg/kg apresentava mais diferenças que a dose 38,7 mg/kg, ou seja, não houve uma correspondência crescente da dose com essas alterações. Esse fato demonstrou que o extrato foi capaz, apesar da ausência de indicativos bioquímicos de toxicidade hepática, de desencadear um processo reacional no fígado, mais acentuado com 12,9 mg/kg.

Essa constatação estabelece, no entanto, uma questão essencial, que transcende o trabalho experimental: como pressupor, na prática clínica, uma lesão hepática, associada ao uso do extrato de kava, mediante um comportamento inalterado da atividade de enzimas hepáticas, como ocorreu neste estudo.

A biopsia do fígado faz parte do arsenal de recursos utilizados na avaliação das doenças hepáticas e é indicada para seu diagnóstico e estadiamento (FIRPI et al., 2005). Segundo Bravo et al. (2001), esta propicia um diagnóstico acurado em 90% dos casos de anormalidades inexplicáveis nos testes de função hepática. Pode ser realizada mesmo com enzimas normais, no diagnóstico de tumores hepáticos, no fígado transplantado e na febre de origem desconhecida. Dentre outras causas que justificam a sua realização, encontra-se a avaliação de resultados anormais de testes bioquímicos hepáticos, após investigação inconclusiva.

Há uma tendência atual de utilizarem-se exames de imagens e testes sorológicos - substituindo a biopsia hepática - como passos no diagnóstico das

doenças hepáticas (SIEGEL et al., 2005). Além disso, a biopsia só faz parte do repertório de exames na suspeita de doença hepática induzida por drogas quando da alteração dos denominados testes de função hepática, na suspeita em paciente com hepatopatia crônica prévia e na manifestação de toxicidade de caráter crônico, menos comum (MADDREY, 2003). Essa tendência pode, portanto, ser invocada na prática clínica, diante de situação semelhante à do presente caso: sem anormalidades bioquímicas, não haveria justificativas para realização de biopsia hepática para estudo histológico, exceto nas situações listadas por Bravo et al. (2001).

Nas amostras de fígado com alterações histológicas, realizaram-se exames imunoistoquímicos objetivando detectar alterações fibrogênicas precoces associadas ao uso de extrato de kava. A fibrogênese é o processo em que ocorre o aumento da quantidade de matriz extracelular, ocasionado por fatores inflamatórios, degenerativos ou neoplásicos, interferindo na remodelagem contínua do tecido conjuntivo (ANDRADE, 2005).

Não se constatou expressão do antígeno alfa-actina anti-músculo liso, em topografia perissinusoidal. O anticorpo monoclonal empregado reage com a fração alfa dos microfilamentos da actina do músculo liso; tem grande sensibilidade e especificidade para neoplasias de células musculares lisas, tendo grande sensibilidade e especificidade para neoplasias de células musculares lisas, expressando-se ainda em rbdomiosarcomas e em células com diferenciação mioepitelial, de acordo com Barra (2006).

No trabalho de Clayton et al. (2007), além dos outros parâmetros, foi avaliada por métodos imunoistoquímicos, a expressão do CYP450 em ratos F344, após as 14 semanas de exposição ao extrato de kava, em diferentes doses. Esses autores observaram que o extrato foi capaz de provocar alterações na expressão de CYP2D1 (homólogo à humana CYP2D6) e CYP1A2, 2B1 e 3A1, considerando que esses achados podem, juntamente com outros estudos, melhorar a compreensão da patogênese da falência hepática induzida pela kava.

A técnica imunoistoquímica é considerada um método complementar de extrema importância e utilidade, de acordo com Barra (2006), pois além de auxiliar no estabelecimento do diagnóstico histogenético, orientando o tratamento em diversas situações clínicas, é capaz de fornecer elementos que subsidiam o prognóstico de algumas condições.



Para Pinzani e Rombouts (2004), a doença hepática crônica cursa com fibrose, conseqüente a diversos processos etiológicos. Quando é secundária à agressão tóxica, estabelece-se preferencialmente nas áreas perivenulares (zona 3), alterando progressivamente a angioarquitetura hepática. A resposta fibrogênica precoce decorre de estimulação das células de Ito perissinusoidais, com alterações fenotípicas das mesmas, transformação miofibroblástica e produção de componentes da matriz conjuntiva (ARAÚJO et al., 1997).

Nas amostras de fígado estudadas, a expressão da alfa-actina de músculo liso foi considerada negativa, a despeito da positividade dos controles teciduais internos e externos das imunorreações. Tal resultado já era previsto, uma vez que não se demonstrou deposição colagênica perissinusoidal, nem alterações vasculo-matriciais dos espaços portais ao exame histológico com colorações vermelho picrossirius e tricrômico de Masson. Assim, comprovou-se a ausência de ativação das células perissinusoidais ou estrelares, necessárias ao desencadeamento da produção dos componentes da matriz conjuntiva no espaço de Disse.

É possível que nas condições do presente experimento e tempo correspondente ao referido na literatura como seguro, o extrato WS 1490 seja efetivamente incapaz de provocar alterações enzimáticas, tanto na dose usual como com três e nove vezes essa dose. Outros estudos, a partir desse período e dose, poderão fornecer novas perspectivas. No entanto, no desenho atualmente utilizado, os achados histológicos sugerem que a kava foi capaz de provocar agressão hepática, apesar da falta de correlação com os resultados bioquímicos e sem expressão imunoistoquímica do anticorpo empregado.

Não foram encontradas referências com estudo imunoistoquímico da expressão alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML) em fígados de ratos Wistar tratados com a kava para fins de comparação com este estudo.

Quanto ao grupo satélite, observado por 45 dias após a suspensão do extrato, não ocorreram diferenças na avaliação hematológica e bioquímica, ao se comparar os resultados com o grupo controle e com os animais tratados, à exceção de alguns parâmetros destes últimos, que se diferenciaram dos controles ao final do experimento. A neutrofilia, linfocitopenia e eosinofilia, observadas após as 13 semanas de tratamento, não se fizeram presentes no grupo satélite. O mesmo ocorreu com os parâmetros bioquímicos, pois a ALT, que no grupo experimental foi

significativamente menor entre os machos na dose de 4,3 mg/kg, mostrou-se semelhante ao grupo controle.

Com relação à macroscopia e microscopia dos pulmões, rins e coração, os aspectos foram semelhantes aos do grupo controle, assim como dos grupos tratados ao final das 13 semanas.

Quanto ao fígado, também não foram demonstradas modificações macroscópicas, após esse período de observação. O estudo histológico revelou preservação da arquitetura lobular, da mesma forma que ocorreu em todos os animais estudados. Todos os animais da dose de 4,3 mg/kg e as fêmeas da dose 38,7 mg/kg apresentaram lesões hepáticas discretas – escore 1, a semelhança do grupo sacrificado ao final das 13 semanas, com as mesmas doses. No entanto, nas doses de 12,9 mg/kg e 38,7 mg/kg, chamou atenção a persistência de fenômenos congestivos microvasculares, acompanhados de inflamação sinusoidal e reatividade das células de Kupffer, nas zonas 2 e 3. A necrose lobular com inflamação e a portite linfocitária mostraram-se semiquantitativamente reduzidas, com mudança do escore 2 para escore 1.

Clough et al. (2003) consideraram que as alterações nos testes de função hepática na vigência da hepatite tóxica relacionada à kava, com lesões de grau moderado, parecem evoluir para a reversão. Em contrapartida, Sorrentino et al. (2006), analisando animais após a suspensão da kava por três meses, não detectaram diferenças em nenhum dos parâmetros hematológico, bioquímico, macroscópico e histológico avaliados.

Algumas questões são relevantes quanto à avaliação histológica realizada. Devido à evolução grave dos casos de hepatite tóxica relacionada à kava, culminando às vezes com transplante hepático, a histologia comparativa geralmente não é realizada na prática clínica, como observado em Brauer et al. (2003), Campo et al. (2002), Escher et al. (2001), Gow et al. (2003), Kraft et al. (2001) e Stickel et al. (2003). Às vezes, o estudo histológico nem mesmo é realizado, como nos casos de Chanwai (2003) e Strahl et al. (1998). Além disso, em nível experimental, DiSilvestro et al. (2007), Pinto et al. (2005), e Singh e Devkota (2003) referiram observações imediatamente após o tratamento com a kava, sem no entanto, realizar avaliações nos animais após algum tempo de suspensão de uso, tal como fizeram Carvalho (2005), Sorrentino et al. (2006) e como foi feito neste estudo.

Essas circunstâncias, portanto, tornaram mais difícil a comparação de resultados. Ademais, DiSilvestro et al. (2007) reconheceram a dificuldade de se comparar estudos de hepatotoxicidade animal e humana, pois nesta última há exposição a inúmeros fatores não reprodutíveis nos estudos com animais, além de variarem sobremaneira entre as pessoas. Esses autores afirmam que a hepatotoxicidade pela kava pode dever-se apenas à coincidência ou pelo uso de preparados a partir das folhas da planta ou a interações com outros fatores. Há quem julgue que os efeitos adversos relatados em muitos casos não podem ser atribuídos à kava (DENHAM et al., 2002).

Diante dos resultados do presente experimento, constatou-se que a kava, administrada a ratos Wistar durante 13 semanas, sob a forma de extrato WS1490, determinou algumas alterações no consumo de água e alimento e eventualmente na glicemia e contagem diferencial dos leucócitos. Mínimas modificações nos testes de avaliação comportamental e motora também pareceram ocorrer pelo uso do extrato. Inferiu-se ainda que os resultados desta pesquisa dão suporte à assertiva de que a kava pode ter ação hepatotóxica. Apesar de não ter havido alteração dos testes bioquímicos, entre eles os parâmetros de avaliação hepática, esse fitoterápico foi capaz de provocar lesões histológicas hepatocelulares e microvasculares nos animais tratados. Após 45 dias de suspensão do seu uso, demonstrou-se algum grau de reversão dessas lesões, apesar da manutenção do aspecto reacional do fígado.

## 7 CONCLUSÕES

1. A administração do extrato WS 1490 de kava, a ratos Wistar, em diferentes doses e por 13 semanas alterou, de forma irregular, alguns parâmetros como o consumo de água e ração, além de variações ocasionais nas análises hematológicas, sem repercussões clínicas.

2. Não foi demonstrada atividade ansiolítica no teste de labirinto em cruz elevado, ocorrendo variações eventuais no teste de campo aberto.

3. O extrato não provocou repercussões macroscópicas e histológicas sobre o coração, pulmões e rins dos animais, nem modificou a arquitetura lobular hepática, entretanto, induziu, no fígado, alterações microvasculares, sem elevar as enzimas hepáticas.

4. No fígado, a necrose focal e multifocal observada, associada a fenômenos vásculo-congestivos e inflamação sinusoidal, dá suporte à hipótese de que a kava, nestas condições experimentais, induziu alterações tóxicas, sobretudo com 12,9 mg/kg, sem, todavia, alterar a bioquímica hepática ou promover alterações fibrogênicas perissinusoidais, detectáveis pela coloração do vermelho picrossirius e pelo método imunoistoquímico.

5. Esses resultados sugerem, portanto, que o uso desse extrato é questionável, mesmo em indivíduos saudáveis, devendo ser proscrito em pessoas com hepatopatia previamente conhecida, não somente pela discutível atividade ansiolítica, como pela possibilidade de provocar alterações teciduais no fígado, que podem ser a base para o surgimento de hepatite tóxica.

## REFERÊNCIAS

ABEBE, W. An overview of herbal supplement utilization with particular emphasis on possible interactions with dental drugs and oral manifestations. **J Dent Hyg**, v. 77, n. 1, p. 37-46, Winter 2003.

ABEBE, W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. **J Clin Pharm Ther**, v. 27, n. 6, p. 391-401, Dez. 2002.

AFDHAL, N. H.; ESTEBAN, R. Introduction: thrombocytopenia in chronic liver disease – treatment implications and novel approaches. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 26 Supl: 1-4, Nov. 2007.

AKHONDZADEH, S.; MALEKI, J. Herbal Medicines In The Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. **Iran J Psychiatry**, v. 1, p. 1-11, 2006.

ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcalóides de *Cissapelos sympodialis* Eichl.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 1994, 102p.

ALMEIDA, J. C.; GRIMSLEY, E. W. Coma from the Health Food Store : Interaction between Kava and Alprazolam. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n. 11, p. 940-941, 1 Dec 1996.

ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; FATURI, B. C.; CATALLANI, B.; LEITE, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 361-364, 2004.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, JUNIOR, L. J. Q.; POLARI, R. M.; FILHO, J. M. B.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev Bras Farm**, v.80, n.3/4, p.72-76, Jul./Dez. 1999.

AMORIM, M. F. D.; AMORIM, W. P. D.; DUQUES, P.; AMORIM, P. D.; VASCONCELOS, J. R. Flutamide-induced hepatotoxicity during treatment of acne – A case report. [Hepatotoxicidade pela flutamida em paciente sob tratamento para acne – Relato de caso]. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 4, p. 381-384, 2005.

AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, AL. L.; PALOMARO, T. V.; JÚNIOR, N. B. J. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster), an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Rev Bras Farm**, v. 17, n. 3, p. 451-457, jul./set. 2007.

ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 6, p. 514-520, nov./dez. 2005.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.

ANGER, G. J.; PIQUETTE-MILLER, M. Pharmacokinetic studies in pregnant women. **Clin Pharmacol Ther**, v. 83, n. 1, p. 184-187, jan 2008.

ANKE, J.; FU, S.; RAMZAN, I. Kavalactones fail to inhibit alcohol dehydrogenase in vitro. **Phytomedicine**, v. 13, p. 192-195, 2006.

ANKE, J.; RAMZAN, I. Kava Hepatotoxicity: Are we any closer to the truth? **Planta Med**, Mar, v. 70, n. 3, p. 193-196, 2004.

ANKE, J.; RAMZAN, I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with Kava (*Piper methysticum* G Forst. f.). **J Ethnopharmacol**, n. 3, p. 153-160, 2004a.

ARAÚJO, C. C.; THOMAS, G.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Efeitos farmacológicos do extrato hidroalcolico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, São Paulo. Resumo 6.61. **Associação Brasileira de Divulgação Científica**, 1991.

ARAÚJO, M. S. T. **Modifications microvasculaires du foie (sinusoïde et veine hépatique terminale chez les drogués à l'heroïne). Étude anatomo-pathologique, ultrastructurale et immunohistochimique. Evaluation morphométrique des lésions vasculaires, cellulaires et matricielles.** Tese (Doutorado em Anatomia Patológica). Lyon, L'Université Claude Bernard – Lyon I, 1992, 153p.

ARAÚJO, M. S. T.; GERARD, F.; CHOSSEGROS, P.; GUERRET, S.; BARLET, P.; ADELEINE, P.; GRIMAUD, J. A. Cellular and matrix changes in drug abuser liver sinusoids: a semiquantitative and morphometric ultrastructural study. **Virchows Archiv**, p. 145-152, 1993.

ARAÚJO, M. S. T.; GERARD, F.; CHOSSEGROS, P.; PORTO, L. C.; BARLET, P.; GRIMAUD, J. A. Vascular hepatotoxicity related to heroin addiction. **Virchows Archiv**, p. 497-503, 1990.

ARAÚJO, M. S. T.; GUERRET, S.; GERARD, F.; CHOSSEGROS, P.; CHEVALLIER, M.; GRIMAUD, J. A. Quantitative studies on liver fibrosis and alpha-smooth muscle actin expression in heroin abusers. **Cell Mol Biol**, v. 43, n. 4, p. 589-596, 1997.

ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Gingko, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Cinical Obstetrics and Gynecology**, v. 44, n. 4, p. 824-835, 2001.

AVORN, J. Dangerous Deception – Hiding the Evidence of Adverse Drug Effects. **N Engl J Med**, v. 355, n. 21, p. 2169-2171, Nov 23 2006.

BACKHAUSS, C.; KRIEGLSTEIN, J. Extract of kava (*Piper methysticum*) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents. **Eur J Pharmacol**, v. 215, n. 2-3, p. 265-269, May 14, 1992.

BARRA, M. B. O uso da imunistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, v. 50. n. 2, p. 173-184, abr./jun. 2006.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S, **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Ed Ateneu, 2003, p. 59-67.

BEAUBRUN, G.; GRAY, G. E. A Review of Herbal Medicines for Psychiatric Disorders. **Psychiatric Services**, v. 51, p. 1130-1134, 2000.

BEN YAHIA, M.; MAVIER, P.; MÉTREAU, J. M.; ZAFRANI, E. S.; FABRE, M.; GATINEAU-SAILLANT, G.; DHUMEAUX, D.; MALLAT, A. Hépatite chronique active et cirrhose induites par la germandrée petit-chêne. Trois cas. [Chronic active hepatitis and cirrhosis induced by wild germander. Three cases]. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 17, n. 12, p. 959-962, 1993.

BILIA, A. R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Kava–kava and anxiety: growing knowledge about the efficacy and safety, **Life Sci**, v. 70, p. 2581–2597, 2002.

BILIA, A. R.; SCALISE, L.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F. Analysis of kavalactones from *Piper Methysticum*. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 203-204, 2004.

BLENDIS, L. Chaos in Hepatology: do we know what our patients are taking? [Letter]. **Gastroenterol**, v. 128, n. 1, p. 240, Jan 2005.

BLONSKI, W.; SIROPAIDES, T.; REDDY, K. R. Coagulopathy in liver disease. **Curr Treat Options Gastroenterol**, v. 10, n. 6, p. 464-473, Dez. 2007.

BONKOVSKY, H. L.; JONE, D. P.; LABRECQUE, D. R.; SHEDLOFSKY, S. I. Drug-induced liver injury. In: BOYER, T. D.; WRIGHT, T. L.; MANNS, M. P. **Zakim and Boyer's Hepatology – a text book of liver disease** 5<sup>th</sup> ed. Canada: Ed. Saunders Elsevier. p. 503-550, v. 1, section IV, chap 26, 2006, 1516p.

BOONEN, G.; HABERLEIN, H. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA binding site. **Planta Med.**, v. 64, n. 6, p. 504-506, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacovigilância – Alertas, Alerta SNVS/Anvisa/Ufarm nº 14, de 20 dezembro de 2001**. Disponível em <<http://anvisa.gov.br>>. Acesso em: 23 nov. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação – Resoluções**. Disponível em <<http://anvisa.gov.br>>. Acesso em: 23 nov. 2003a.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 578 de 23 de fevereiro de 2006**. Dispõe sobre Cancelamento de registro a pedido. D.O.U. - Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 1 mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 48, de 16 de março de 2004**. Disponível em <<http://anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, Brasília, DF, 2006a.

BRAUER, R. B. et al. Acute liver failure after administration of herbal tranquilizer kava-kava (*Piper methysticum*). **J Clin Psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 216-218, Fev. 2003.

BRAVO, A. A.; SHETH, S. G.; CHOPRA, S. Liver Biopsy. **N Engl J Med**, v. 344, n. 7, 15 fev. 2001.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENCK, H. J. ed. **Experiments in Personality**. London: Routledge and Kegan Paul, p. 31-61, vol 1, 1960.

BROWN, A. C.; ONOPA, J.; HOLCK, P.; KAUFUSI, P.; KABASAWA, D.; CRAIG, W. J.; DRAGULL, K.; LEVINE, A. M.; BAKER, J. D. Traditional kava beverage consumption and liver function tests in a predominantly Tongan population in Hawaii. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 45, n. 5, p. 549-556, jun-ago 2007.

CAIRNEY, S.; CLOUGH, A. R.; MARUFF, P.; MARUFF, P.; COLLIE, A.; CURRIE, B. J.; CURRIE, J. Saccade and Cognitive Function in Chronic Kava Users. **Neuropsychopharmacol**, v. 28, p. 389-396, 2003.

CAIRNEY, S.; MARUFF, P.; CLOUGH, A. R.; COLLIE, A.; CURRIE, J.; CURRIE, B. J. Saccade and cognitive impairment associated with kava intoxication. **Hum Psychopharmacol**, v. 18, n. 7, p. 525-533, Oct 2003a.

CAMPO, J. V. et al. Kava-induced fulminant hepatic failure. [Letter]. **J Am Acad of Child & Adolesc Psych**, v. 41, n. 6, p. 631-632, Jun. 2002.



CAÑIGUERAL, S. Acceso a la documentación científica actual referente a plantas medicinales, **Boletín A. E. F. I.**, 3ª época, v. 16, p. 21-23, 1989.

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

CARLINI, E. A. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espineira santa) e outras. Brasília, DF. **CEME/AFIP**, 1988. 87p.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA FILHO, A. R.; SILVEIRA FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Effects of teas prepared from leaves on laboratory. **J Ethnopharmacol**, v. 17, p. 37-64. 1986.

CARVALHO, A. C. B. **Avaliação legal da publicidade de produtos naturais e investigação toxicológica dos produtos anunciados**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica). João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 2005, 246p.

CARVALHO, A. C. B.; ARAÚJO, D. D.; FERNANDES, M. G.; MELO, A. F. M.; MEDEIROS, I. A.; DINIZ, M. F. F. M. Avaliação da adequação da publicidade de produtos naturais anunciada na Paraíba. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 26, n. 1, p. 55-62, 2005.

CARVALHO, L.; PARISE, E. R. Evaluation of nutritional status of nonhospitalized patients with liver cirrhosis. **Arq Gastroenterol**, v. 43, n. 4, p. 269-274, Out./Dez. 2006.

CHANWAI, L. G. Kava toxicity. **Emergency Medicine**, v. 12, p. 142-145, 2000.

CLAYTON, N. P.; YOSHIZAWA, K.; KISSLING, G. E.; BURKA, L. T.; CHAN, P.; NYSKA, A. Immunohistochemical analysis of expressions of hepatic cytochrome P450 in F344 rats following oral treatment with kava extract. **Exp Toxicol Pathol**, v. 58, n. 4, p. 223–236, Jan 2007.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 85-96, 15 abril, 2004.

CLOUGH, A. Enough! or to much. What is “excessive” kava use in Arnhem Land. **Drug Alcohol Rev**, v. 22, n. 1, p. 43-51, Mar 2003.

CLOUGH, A. R.; JACUPS, S. P.; WANG, Z.; BURNS, C. B.; BAILIE, R. S.; CAIRNEY, A. C.; GUYULA, T.; MCDONALD, S. P.; CURRIE, B. J. Health effects of kava use in an eastern Arnhem Land Aboriginal community. **Int Med Journal**, v. 33, p. 336-340, 2003a.

CLOUGH, A. R.; BAILIE, R. S.; CURRIE, B. Liver function test abnormalities in users of aqueous kava extracts. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 41, n. 6, p. 821-829, 2003.

CLOUGH, A. R.; ROWLEY, K; O'DEA, K. Kava use, dyslipidaemia and biomarkers of dietary quality in Aboriginal people in Arnhem Land in the Northern Territory (NT), Australia. **Eur J of Clin Nutr**, v. 58, p.1090-1093, 2004.

Colestase. Disponível em:

<http://library.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER020.html>. Acesso em 8 de janeiro de 2008.

COLLAZO, L; SOTTO, A. Linfocitos T y B en afecciones hepáticas / T and B lymphocytes in hepatic diseases. **Acta gastroenterol Latinoam**, v. 15, n. 1, p. 7-12, 1985.

COMAR, K. M.; KIRBY, D. F. Herbal Remedies in Gastroenterology. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, n. 6, p. 457-468, Jul 2005.

CONNOR, K. M.; DAVIDSON, J. R. A placebo-controlled study of Kava kava in generalized anxiety disorder. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 17, n. 4, p. 185-188, Jul 2002.

CONNOR, K. M.; PAYNE, V.; DAVIDSON, J. R. Kava in generalized anxiety disorder: three placebo-controlled trials. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 21, n. 5, p. 249-253, Set. 2006.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Rev Bras Farm**, v. 13 n. 3, p. 272-278, 2005.

CÔRTEZ, S. F. **Ação espasmolítica de warifteína. Um alcalóide bisbenzilisoquinolínico isolado do *Cissapelos sympodialis* Eichl.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa, Centro de Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, 1992, 108p.

CÔTÉ, C. S.; KOR, C.; COHEN, J.; AUCLARI, K. Composition and biological activity of traditional and commercial kava extracts. **Biol Biophy Res Comm**, v. 322, p. 147-152, 2004

CUPP, M. J. Herbal Remedies: Adverse Effects and Drug Interactions. **Am Fam Phys**, v. 59, n. 5, p. 1239-1245, Mar. 1999.

DASGUPTA, A. Review of Abnormal Laboratory Test Results and Toxic Effects Due to Use of Herbal Medicines. **Am J Clin Pathol**, v. 120, n. 1, p. 127-137, 2003.

De SMET, P. A. G. M. Drug Therapy: herbal remedies. **N Engl J Med**, v. 347, n. 25, p. 2046-2056, 19 Dez. 2002.

DEF 2005/06 – DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. Melo, J. M. S. (Ed). Produção JBM – **Jornal Brasileiro de Medicina**, 34 ed. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 2005.

DEF 2006/07 – DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. Melo, J. M. S. (Ed). Produção JBM – **Jornal Brasileiro de Medicina**, 35 ed. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 2006, 898p.

DENHAM, A.; McINTYRE, M.; WHITEHOUSE, J. Kava--the unfolding story: report on a work-in-progress. **J Altern Complement Med**, v. 8, n. 3, p. 237-263, Jun. 2002.

DENNEHY, C. E.; TSOUROUNIS, C.; MILLER, A. E. Evaluation of herbal dietary supplements marketed on the internet for recreational use. **Ann Pharmacother**, v. 39, n. 10, p. 1634-1639, Out. 2005.

DER MARDEROSIAN, A. H.; LIBERTI, L. E. Natural Product Medicine. G. F. Stickey Co. (Philadelphia). **Appendix A: Natural Products Information - Where to look**, 1988.

DIETLEIN, G.; SCHRÖDER-BERNHARD, D. Doctors' prescription behaviour regarding dosage recommendations for preparations of kava extracts. **Pharmacoepidemiol and Drug Safety**, v. 12, n. 5, p. 417-421, Mar. 2003.

DINH, L. D.; SIMMEN, U.; BUETER, K. B.; BUETER, B.; LUNDSTROM, K.; SCHAFFNER, W. Interaction of various Piper methysticum cultivars with CNS receptors in vitro. **Planta Med**; v. 67, n. 4, p. 306-311, Jun. 2001.

DINIZ, M. F. F. M. **Ensaio toxicológico pré-clínico com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl (menispermaceae)**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa, Centro de Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, 2000. 143p.

DiSILVESTRO, R. A.; ZHANG, W.; DiSILVESTRO, D. J. Kava feeding in rats does not cause liver injury nor enhance galactosamine-induced hepatitis. **Food and Chem Toxicol**, v. 45, p. 1293-1300, 2007.

DONADIO, V. et al. Myoglobinuria after ingestion of extracts of guarana, Ginkgo biloba e kava [Letter]. **Neurol Sci**, v. 21, p. 24, 2000.

DOUGLAS, A. J.; JOHNSTONE, L. E.; LENG, G. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. **Physiol Behav**, v. 91, n. 4, p. 352-365, 14 abr. 2007.

DOURAKIS, S. P.; PAPANIKOLAOU, I. S.; TZEMANAKIS, E. N.; HADZIYANNIS, S. J. Acute hepatitis associated with herb (*Teucrium capitatum* L.) administration. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 6, p. 693-695, Jun. 2002.

DRAGULL, K.; YOSHIDA, W. Y.; TANG, C. S. Piperidine alkaloids from *Piper methysticum*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 2, p. 193-198, 2003.

DUFOUR, J. F.; St-PIERRE, M. V. Phytotherapeutika in Gastroenterologie und Hepatologie. [Phytotherapeutic drugs in gastroenterology and hepatology]. **Ther Umsch**, v. 59, n. 6, p. 313-316, Jun. 2002. [abstract].

DUFOUR, R. Laboratory Guidelines for Screening, Diagnosis, and Monitoring of Hepatic Injury. In: DUFOUR, R.; Guidelines Comittee. **NACB Laboratory Medicine Practice Guidelines**, Washington DC, 2000, 58p.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A route on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Scientif Edit**, v. 16, n. 3, 1957.

ERNST, E. A re-evaluation of kava. **Br J Clin Pharmacol**, v. 64, n. 4, p. 415-417, 2007.

ERNST, E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. **Brit Journ of Derm**, v. 143, n. 5, p. 923, Nov. 2000.

ERNST, E. Herbal medicines put into context. **BMJ**, v. 327, p. 881-882, 2003.

ERNST, E. Safety concerns about kava [Letter]. **Lancet**, v. 359, p. 1865, 25 May 2002.

ERNST, E.; PITTLER, M H. Systematic review: hepatotoxic events associated with herbal medicinal products. **Alim Pharm Ther**, v. 18, n. 5, p. 451-471, 2003.

ESCHER, M.; DESMEULES, J.; GIOSTRA, E.; MENTHA, G. Hepatitis associated with Kava, a herbal remedy for anxiety. **BMJ**, p. 322-139, 20 Jan, 2001.

FELTENSTEIN, M. W.; LAMBDIN, L. C.; GANZERA, M.; RANJITH, H.; DHARMARATNE, W.; NANAYAKKARA, N. P.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic properties of *Piper methysticum* extract samples and fractions in the chick social-separation-stress procedure. **Phytother Res**, v. 17, n. 3, p. 210-216, Mar. 2003.

FIRPI, R. J.; SOLDEVILA-PICO, C.; ABDELMALEK, M. F., MORELLI, G.; JUDAH, J.; NELSON, D.R. Short recovery time after percutaneous liver biopsy: should we change our current practices? **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 9, p. 926-929, Sep. 2005.

FOO, H.; LEMON, J. Acute effects of kava, alone or in combination with alcohol, on subjective measures of impairment and intoxication and on cognitive performance. **Drug Alcohol Rev**, v. 16, p. 147-155, 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Kava-containing dietary supplements may be associated with severe liver injury. **Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. Food and Drug Administration, Dietary Supplements**, 25 Mar. 2002.

FUGH-BERMAN, A.; ERNST, E. Herb-drug interactions: Review and assessment of report reliability. **British J of Clin Pharmacol**, v. 52, n. 5, p. 587-595, Nov. 2001.

GAGNIER, J. J.; DEMELO, J.; BOON, H.; ROCHON, P.; BOMBARDIER, C. Quality of reporting of randomized controlled trials of herbal medicine interventions. **Am J Med**, v. 119, n. 9, p. 800.e1-e11, Set. 2006.

GARNER, L. F.; KLINGER, J. D. Some Visual effects caused by the beverage Kava. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 3, p. 307-311, July 1985.

GARRET, K. M.; BASMADJIAN, G.; KHAN, I. A.; SHANELBERG, B. T.; SEALE, T. W. Extracts of kava (*Piper methysticum*) induce acute anxiolytic-like behavioral changes in mice. **Psychopharmacol**, v. 170, p. 33-41, 2003.

GASTPAR, M.; KLIMM, H. D. Treatment of anxiety, tension and restlessness states with Kava special extract WS® 1490 in general practice: A randomized placebo-controlled double-blind multicenter trial. **Phytomedicine**, v. 10, p. 631-639, 2003.

GAYOTTO, L. C. C.; Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. **Gastroenterol Endosc Dig**, v. 19, n. 3, p. 137-140, 2000.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SABARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**, v. 1, p. 172-173, Fev. 2005.

GLEITZ, J.; BEILE, A.; WILKENS, P.; AMERI, A.; PETERS, T. Antithrombotic action of the kavapyrone (+)-kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets. **Planta Med**, v. 63, n. 1, p. 27-30, 1997.

GLEITZ, J.; BEILE, A.; Y PETERS, T. (+/-)-Kavain inhibits veratridine-activated voltage-dependent Na(+)-channels in synaptosomes prepared from rat cerebral cortex. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 9, p. 1133-1138, 1995.

GOW, P. J.; CONNELLY, N. J.; HILL, R. L.; CROWLEY, P.; ANGUS, P. W. Fatal fulminant hepatic failure induced by a natural therapy containing kava. **MJA**, v. 178, n. 9, p. 442-443, 2003.

GRACE, R. Kava-induced urticária. [Letter]. **J Am Acad Dermatol**, p. 906, nov. 2005.

GRUNZE, H.; LANGOSCH, J.; SCHIRRMACHER, K.; BINGMANN, D.; JÖRG VON WEGERER, J. V.; WALDEN, J. Kava pyrones exert effects on neuronal transmission and transmembraneous cation currents similar to established mood stabilizers - a review. **Prog in Neuro-Psychoph & Biolog Psych**, v. 25, n. 8, p. 1555-1570, Nov. 2001.

GRUNZE, H.; WALDER, J. Kawain limits excitation in CA 1 pyramidal neurons of rats by modulating ionic currents and attenuating excitatory synaptic transmission. [Letter]. **Human Psychopharmacol: Clin and Experimental**, v. 14, n. 1, p. 63-66, 1999.

HALLER, C. A.; ANDERSON, I. B.; KIM, S. Y.; BLANC, P. D. An evaluation of selected herbal reference texts and comparison to published reports of adverse herbal events. **Adverse Drug React Toxicol Rev**, v. 21, n. 3, p. 143-150, 2002.

HARTLEB, M.; BIERNAT, L.; KOCHER, A. Drug-induced liver damage – a three years study of patients from one gastroenterological department. **Med Sci Monit**, v. 8, n. 4, p. 292-296, 2002.

HERBERG, K. W. Effect of Kava-Special Extract WS 1490 combined with ethyl alcohol on safety-relevant performance parameters. **Blutalkohol**, v. 30, n. 2, p. 96-105, Mar. 1993. [abstract]

HIATT, W. R. Observational Studies of Drug Safety – Aprotinin and the Absence of Transparency. **N Engl J Med**, v. 355, n. 21, p. 2171-2173, 23 Nov. 2006.

Histologia normal do fígado (Zonas 1, 2 e 3). Disponível em <<http://medlib.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER003.html>>. Acesso em: 10 abr. 2004.

HOELZL, J.; JURETZEK, W.; SCHNEIDER, G.; STAHL-BISKUP, E. Kava-Kava rhizome, (Kavakavawurzelstock). In: HANSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHNEIDER, G. (Hrsg). Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Drogen P-Z, v. 6, Springer, Berlin 201-221 1994 *apud* TESCHKE, R.; GAUS, W.; LOEW, D. Kava extracts: safety and risks including rare hepatotoxicity. **Phytomedicine**, v. 10, p. 440-446, 2003.

HOLM, E. Studies on the profile of the neurophysiological effects of D,L-Kavaina: Cerebral sites of action and sleep-Wakefulness-Rhythm in animals. **Arzneim Forsch**, v. 41, p. 673-683, 1991. [abstract]

HORN, J. R.; HANSTEN, P. D.; CHAN, L. N. Proposal for a new tool to evaluate drug interaction cases. **Ann Pharmacother**, v. 41, n. 4, p. 674-680, 27 abr. 2007.

HUMBERSTON, C. L.; AKHTAR, J.; KRENZELOK, E. P. Acute hepatitis induced by kava kava. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 41, n. 2, p. 109-113, 2003

JACOBS, B. P.; BENT, S.; TICE, J. A.; BLACKWELL, T.; CUMMINGS, S. R. An internet-based randomized, placebo-controlled trial of kava and valerian for anxiety and insomnia. **Medicine** (Baltimore), v. 84, n. 4, p.197-207, 2005.

JAMIESON, D. D.; DUFFIELD, P. H. Positive interaction of ethanol and kava resin in mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 17, n. 7, p. 509-514, Jul. 1990.

JAPPE, U.; FRANKE, I.; REINHOLD, D.; GOLLNICK, H. P. M. Sebotoxic drug reaction resulting from kava-kava extract therapy: A new entity? **J Am Acad Dermatol**, v. 38, n. 1, p. 104-106, 1998.

JIANG, J. T.; XU, N.; ZHANG, X. Y.; WU, C. P. Lipids changes in liver cancer. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 8, n. 6, p. 398-409, Jun. 2007.

JOHNSON, B.M.; QIU, S. X.; ZHANG, S.; ZHANG, F.; BURDETTE, J. E. ; YU, L.; BOLTON, J. L.; VAN BREEMEN, R. B. Identification of novel electrophilic metabolites of piper methysticum Forst (Kava). **Chem Res Toxicol**, v.16, n. 6, p. 733-740, Jun 2003.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. In: **Applied Multivariate Statistical Analysis**. Third Edition, New Jersey: Prentice Hall, 1992, New Jersey, USA, 642p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10. ed. 2004, 540p

JUSSOFIE, A.; SCHMIZ, A.; HIEMKE, C. Kavapirone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. **Psychopharmacol**, v. 116, n. 4, p. 469-474, 1994.

KAPLOWITZ, N. Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury. **Semin Liver Dis**, v. 22, n.2, p. 137-144, Mai 2002.

KAPLOWITZ, N. Causality assessment versus guilt-by-association in drug hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 308-310, Jan. 2001.

KAPLOWITZ, N; DELEVE, L. D. In: **Drug induced Liver Disease**, New York: Marcel Dekker, Inc., 2003, p. 1-13, 724p.

KAY, A. B. et al. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 113, n. 1-3, p. 196-199, 1997.

KELEDJIAN, J. et al. Uptake into mouse brain of four compounds present in the psychoactive beverage kava. **J Pharm Sci**, v. 77, p. 1003-1006, 1988.

KEW, M. C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. **Lancet**, v. 355, p. 591-592, 19 fev. 2000.

KRAFT, M.; SPAHN, T. W.; MENZEL, J.; SENNINGER, N.; DIETL, K. H.; HERBST, H.; DOMSCHKE, W.; LERCH, M. M. Fulminant liver failure after administration of the herbal antidepressant Kava-Kava. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 126, n.36, p. 970-972, 7 Sept. 2001. [abstract]

LADYMAN, S. R. Leptin resistance during pregnancy in the rat. **J. Neuroendocrinol**, v. 20, n. 2, p. 269-277, 22 nov 2008.

LANÇA, S.; ALVES, A.; VIEIRA, A. I.; BARATA, J.; FREITAS, J.; CARVALHO, A. Chromium-induced toxic hepatitis. **Eur J Intern Med**, v. 13, n. 8, p. 518-520, dez. 2002.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, LOURIVAL. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, p. 43-58, 1999. 114p.

LARREY, D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. **Semin Liver Dis**, v. 22, n. 2, p. 145-155, 2002.

LEBOT, V.; LEVESQUE, J. The origin and distribution of kava (*Piper methysticum* Frost. f. and *Piper wichmanii* C. DC., Piperaceae) a phytochemical approach. **Allertonia** 5: 223-281, 1989.

LEBOT, V.; MERLIN, M.; LINDSTROM, M. Kava: The Pacific Drug. **New Haven and London: Yale University Press**, 1992.

LEE, W. N. Drug-induced hepatotoxicity. **N Engl J Med**, v. 349, p. 474-485, 2003.

LEHRL, S. Clinical efficacy of kava extract WSR 1490 in sleep disturbances associated with anxiety disorders. Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **J Affect Dis**, v. 78, p. 101-110, 2004.

LEKEHAL, M; PESSAYRE, D; LEREAU, J. M.; MOULIS, C.; FOURASTE, I.; FAU, D. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A Depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 24, n. 1, p. 212-2188, Jul. 1996.

LÜDE, S.; TÖROK, M.; DIETERLE, S.; JÄGGI, R.; BÜTER, K. B.; KRÄHENBÜHL, S. Hepatocellular toxicity of kava leaf and root extracts. **Phytomedicine**, v. 15, p. 120-131, 2008.

MADDREY, W. C. Clinicopathological Patterns of Drug-Induced Liver Disease. In: \_\_\_\_\_ KAPLOWITZ, N.; DELEVE, L. D. **Drug induced Liver Disease**. New York: Marcel Dekker, Inc: 227-239, 2003. 724p.



MAGURA, E. I.; KOPANITSA, M. V.; GLEITZ, J.; PETERS, T.; KRISHTAL, O. A. Kava extract ingredients, (+)-methysticin and ( $\pm$ )-kavain inhibit voltage-operated Na<sup>+</sup>-channels in rat CA1 hippocampal neurons. **Neurosc**, v. 81, n. 2, p. 345-351, 1997.

MALSCH, U.; KIESER, M. Efficacy of kava-kava in the treatment of non-psychotic anxiety, following pretreatment with benzodiazepines. **Psychopharmacol**, v. 157, n. 3, p. 277-283, 2001.

MARCUS, D. M.; GROLLMAN, A. P. Botanical medicines – the need for new regulations. **N Engl J Med**, v. 347, n. 25, p. 2073-2076, 19 dez. 2002.

MARTIN, H. B.; MCCALLUM, M.; STOFER, W. D.; EICHINGER, M. R. Kavain Attenuates Vascular Contractility Through Inhibition of Calcium Channels. **Planta med**, v. 68, p. 784-789, 2002.

MATHEWS, J. D.; RILEY, M. D.; FEJO, L.; MUNOZ, E.; MILNS, N. R.; GARDNER, I. D.; POWERS, J. R.; GANYGULPA, E.; GUNUNUWAWUY, B. J. Effects of the heavy usage of kava on physical health: summary of a pilot survey in an aboriginal community. **Med J Aust**, v. 148, n. 11, p. 548-555, 6 jun. 1988.

MATHEWS, J. M.; ETHERIDGE, A. S.; BLACK, S. R. Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. **Drug Metab Dispos**, v. 30, n.11, p. 1153-1157, Nov. 2002.

MESEGUER, E.; TABOADA, R.; SÁNCHEZ, V.; MENA, M. A.; CAMPOS, V.; YÉBENES, J. G. Life-threatening parkinsonism induced by kava-kava. **Mov Disorders**, v. 17, n. 1, p. 195-196, 2002.

MICHALANY, J. In: **Técnica histológica em anatomia patológica**: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3. ed. São Paulo: Michalany, 1998. 295p.

MILLER, L. G. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Arch Intern Med**, v. 158, n. 20, p. 2200-2211, 9 Nov. 1998.

MILLS, E.; SINGH, R.; ROSS, C.; ERNST, E.; WILSON, K. Impact of Federal Safety Advisories on Health Food Store Advice. **J Gen Intern Med**, v. 19, p. 269–272, 2004.

MILLS, E. et al. Sale of kava extract in some health food stores. **CMAJ**, v. 168, p. 1158-1159, 2003.

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. **J Ethnopharmacol**, v. 62, p. 57-61, 1998.

MOULDS, R. F. W.; MALANI, J. Kava, herbal panacea or liver poison? **MJA**, v. 178, p. 451-453, 2003.

MUSCH, E.; CHRISAFIDOU, A.; MALEK, M. Acute hepatitis due to kava-kava and St John's Wort: an immune-mediated mechanism? **Dtsch Med Wochenschr**, v. 131, n. 21, p. 214-217, 26 Maio 2006. [abstract]

NARANJO, C. A.; BUSTO, U.; SELLERS, E. M.; SANDOR, P.; RUIZ, I.; ROBERTS, E. A.; JANECEK, E.; DOMECCQ, C.; GREENBLATT, D. J. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. **Clin Pharmacol Ther**, v. 30, p. 239-245, 1981.

NAVARRO, V. J.; SENIOR, J. R. Drug-related Hepatotoxicity. **N Engl J Med**, v. 354, n. 1, p. 731-739, 16 Fev. 2006.

Necrose hepática extensa (superdosagem de acetaminofen). Disponível em <<http://medlib.med.utah.edu/WebPath/LIVEHTML/LIVER003.html>>. Acesso em: 10 abr. 2004.

NERURKAR, P. V.; DRAGULL, K.; TANG, C. S. In vitro toxicity of kava alkaloid, pipermethystine, in HepG2 cells compared to kavalactones. **Toxicol Sci**, v. 79, p. 106-111, 2004.

NORTON, S. A.; RUZE, P. Kava dermatopathy. **J Am Acad Dermatol**, v. 31, n. 1, p. 89-97, July 1994.

NOWAKOWSKA, E.; OSTROWICZ, A.; CHODERA, A. Kava-kava preparations--alternative anxiolytics. **Pol Merkuriusz Lek**, n. 4, v. 21, p. 179-180a, Mar. 1998. [abstract].

OLIVEIRA, J. C. S.; SISTO, F. F. Construção de uma escala de ansiedade para pacientes de ambulatório: um estudo exploratório. **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 6, n. 1, p. 45-57, 2004.

PAUWELS, A.; THIERMAN-DUFFAUD, D.; AZANOWSKY, J. M.; LOISEAU, D.; BOUR, M.; LEVY, V. G. Hépatite aiguë à la Germandrée petit-chêne. Hépatotoxicité d'une plante médicinale. Deux observations. [Acute hepatitis caused by wild germander. Hepatotoxicity of herbal remedies. Two cases]. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 16, n. 1, p. 92-95, 1992.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosc Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PINTO, V. M.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, R. A. MELLO, J. R. B.; BREYER, A. S.; OLIVEIRA, M. E. M. Avaliação do uso de Piper methysticum quanto ao desenvolvimento de hepatotoxicidade em ratos Wistar. **Veterinária em foco**, v. 3, n. 1, p. 17-28, maio/dez. 2005.

PINZANI, M.; ROMBOUTS, K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. **Dig Liver Dis**, v. 36, p. 231-242, 2004.

*Piper methysticum* ou kava. Disponível em  
<[http://www.erowid.org/plants/show\\_image.php?i=kava/piper\\_methysticum1.jpg](http://www.erowid.org/plants/show_image.php?i=kava/piper_methysticum1.jpg)>.  
Acesso em: 8 jan. 2008.

PITTLER, M. H.; ERNST, E. Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis. **J Clin Psychopharmacol**, v. 20, p. 84–89, 2000.

PITTLER, M. H.; ERNST, E. Kava extract for treating anxiety. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, CD003383, 2003.

PITTLER, M. H.; ERNST, E. Systematic review: hepatotoxic events associated with herbal medicinal products. **Alim Pharm Therap**, v. 18, n. 5, p. 451-471, Sept. 2003a.

RAUCY, J. L. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 5, p. 533-539, Mai 2003.

REX, A.; MORGENSTER, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of Kava-Kava in the elevated plus maze test – a comparison with diazepam. **Prog Neuro-Psychopharmacol&Biol Psych**, v. 26, p. 855-860, 2002.

ROTHER, K. I. Focus on Research: Diabetes Treatment - Bridging the Divide, **N Engl J Med**, v. 356, n. 15, p. 1499-1501, 12 Apr. 2007.

RUIZ, M. A.; JOSÉ, V.; SOUZA, C. A. Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. **Rev Saúde Pública**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 1993.

RUSSMANN, S.; BARGUIL, Y.; CABALION, P.; KRITSANIDA, M.; DUHET, D.; LAUTERBURG, B. H. Hepatic injury due to traditional aqueous extracts of kava root in New Caledonia. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 9, p. 1033-1036, Sept. 2003.

RUSSMANN, S.; BARGUIL, Y.; CABALION, P.; RENTSCH, K.; WENK, M. Tradicional aqueous kava extracts inhibit cytochrome P450 1A2 in humans: Protective effect against environmental carcinogens? [Letter]. **Clin Pharmacol & Ther**, v. 77, n. 5, p. 453-454, May 2005.

RUSSMANN, S.; LAUTERBURG, B. H.; HELBLING, A. Kava hepatotoxicity. [Letter]. **Ann Int Med**, v. 135, p. 68-69, 2001.

RUSSO MW, GALANKO JA, SHRESTHA, R. Liver transplantation for acute liver failure from drug-induced liver injury in the United States. **Liver Transpl**. v. 8, p. 1018-1023, 2004.

RUZE, P. Kava-induced dermopathy: a niacin deficiency? **Lancet**, v. 335, n. 8703, p. 1442-1445, 16 Jun. 1990.

SANTOS, R. T. M.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C. T.; NONOGAKI, S.; PINTO, G. A. **Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização “in situ”**. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. (Ed.). Manual de Imuno-Histoquímica. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, p. 237-259, 1999, 270p.

SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: a systematic review. **Phytother Res**, v. 21, n. 8, p. 703-716, Aug. 2007.

SCHELOSKY L.; RAFFAUF, C.; JENDROSKA, K.; POEWE, W. Kava and dopamine antagonism. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 58, n. 5, p. 639-640, 1995.

SCHMIDT, M. Is kava really hepatotoxic? Disponível em:  
<<http://www.taxtyranny.ca/images/HTML/KavaKava/Articles/KavaReview.pdf>>  
Acesso em: 1 fev. 2008.

SCHULZ, V.; HAENSEL, R.; TYLER, V. E. Eds. **Rational Phytotherapy**, 3. ed. Berlin: Springer, 1998.

SCHULZE, J.; RAASCH, W.; SIEGERS, C. P. Toxicity of kava pyrones, drug safety and precautions-a case study. **Phytomedicine**, v. 10, p. 68-73, Suppl 4, 2003.

SEITZ, U.; SCHÜLE, A.; GLEITZ, J. [3H]-monoamine uptake inhibition properties of kava pyrones. **Planta Med**, v. 63, n. 6, p. 548-549, dez. 1997.

SHEN, W. The metabolism of psychoactive drugs: A review of enzymatic biotransformation and inhibition. **Biol Psych**, v. 41, n. 7, p. 814-826, 1997.

SHERMAN, K. E. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. **Arch Intern Med**, v. 151, n. 2, p. 260-2655, fev. 1991.

SIBON, I.; ROSIER, E.; ORGOGOZO, J. M. Meningismus after taking kava-kava. **Rev Neurol**, v. 158, n. 12, p. 1205-1296, 2002.

SIEGEL, C. A.; SILAS, A. M.; SURIWINATA, A. A.; VAN LEEUWEN, D. J. Liver biopsy 2005: When and how? **Cleavel Clin J Med**, v. 72, n. 3, p. 199-224, 2005.

SILVA, D. A. S.; MELO, L. A.; OLIVEIRA, A. C. C. O. Efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos. **Motriz**, v. 13, n. 1, p. 43-50, jan./mar. 2007.

SILVA, L. C. Hepatite crônica – aspectos gerais e prevalência. In: SILVA, L. C. **Hepatites agudas e crônicas**. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, p. 274-277, 2003. 424p.

SIMÉONI, P., LEBOT, V. Identification of factors determining kava lactone content and chemotype in kava (*Piper methysticum* Forst. f.). **Biochem Syst and Ecol**, v. 30, p. 413-424, 2002.

SINGH, Y. N. "Kava: an overview." **J of Ethnopharmacol**, v. 37, p. 13-45, 1992.

SINGH, Y. N. Potencial for interaction of kava and St John's wort with drugs. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 108-113, 2005.

SINGH, Y. N.; DEVKOTA, A. K. Aqueous kava extracts do not affect liver function tests in rats. **Planta Med**, v. 69, n. 6, p. 496-499, Jun 2003.

SORRENTINO, L.; CAPASSO, A.; SCHMIDT, M. Safety of ethanolic kava extract: Results of a study of chronic toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 13, p. 542-549, 2006.

SOUZA, A. F. M et al. Fígado e drogas. In: DANI, R. **Gastroenterologia essencial**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 700-724, 1006p.

SOUZA, A. F. M. Hepatopatias por drogas – aspectos clínicos no Brasil. In: vários colaboradores. **Curso de hepatologia clínica / Amaury Coutinho**, Recife: Sociedade Brasileira de Hepatologia, Ed. Universitária da UFPE, 2003, p.103-114, 308p.

SPINELLA, M. Herbal Medicines and Epilepsy: the potential for benefit and adverse effects. **Epilepsy Behav**, v. 2, n. 6, p. 524-532, Dez. 2001.

STANFORD, S. C. The Open Field Test: reinventing the wheel. **Journal of Psychopharmacol**, v. 21, n. 2, p. 134-135, 2007.

STEDMAN, C. Herbal hepatotoxicity. **Semin Liver Dis**, v. 22, p. 195-296, 2002.

STEINER, G. G. The correlation between cancer incidence and kava consumption. **Hawaii Med J**, v. 59, n. 11, p. 420-422, nov. 2000.

STEVINSON, C.; HUNTLEY, A.; ERNST, E. A Systematic Review of the Safety of Kava Extract in the Treatment of Anxiety. **Drug Saf**, v.25, v.4, p. 251-261, 2002.

STICKEL, F. Slimming at all costs: Herbalife® - induced liver injury. **J Hepatol**, v. 47, p. 444-446, 2007.

STICKEL, F.; BAUMÜLLER, H. M.;SEITZ, K.; VASILAKIS, D.; SEITZ, G.; SEITZ, H. K.; SCHUPPAN, D. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum rhizoma*). **Journal of Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 62-67, July 2003.

STICKEL, F.; PATSENKER, E.; SCHUPPAN, D. Herbal Hepatotoxicity. **J Hepatol**, v. 43, n. 5, p. 901-910, Nov. 2005.

STICKEL, F.; SCHUPPMAN, D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, p. 293–304, 2007.

STRADER, D. B.; SEEF, L. B. Hepatotoxicity of herbal preparations. In: BOYER, T. D.; WRIGHT, T. L.; MANNS, M. P. **Zakin and Boyer`s Hepatology – a textbook of liver disease**. 5. ed. Canada: Saunders Elsevier Eds, v. 1, p. 551-560, section IV, chap 27, 2006. 1516p.

STRAHL, S.; EHRET, V.; DAHM, H. H.; MAIER, K. P. Necrotizing hepatitis after taking herbal remedies. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 123, n. 47, p. 1410-1414, 1998. [abstract].

SUSS, R.; LEHMANN, P. Hematogenous contact eczema cause by phytogetic drugs exemplified by kava root extract. **Hautarzt**, v. 47, n. 6, p. 459-546, Jun. 1996. [abstract].

TESCHKE, R.; GAUS, W.; LOEW, D. Kava extracts: safety and risks including rare hepatotoxicity. **Phytomedicine**, v. 10, p. 440-446, 2003.

THOMSEN, M.; VITETTA, L.; SCHMIDT, M.; SALI, A. Fatal fulminant hepatic failure induced by a natural therapy containing kava. **MJA**, v. 180, n. 4, p. 198-199, 2004.

TURNER, J. W. The Water of Life: Kava Ritual and the Logic of Sacrifice. **Ethnol**, v. 25, n. 3, p. 203-214, 1986.

UEBELHACK, R.; FRANKE, L.; SCHEWE, H. J. Inhibition of platelet MAO-B by kava pyrone-enriched extract from *Piper methysticum* Forster (kava-kava). **Pharmacopsych**, v. 31, n. 5, p. 187-192, Sept. 1998.

UNGER, M.; HOLZGRABE, U.; JACOBSEN, W.; CUMMINS, C.; BENET, L. Z. Inhibition of cytochrome P450 3A4 by extracts and kavalactones of *Piper methysticum* (Kava-Kava). **Planta Med**, v. 68, n. 12, p. 1055-1058, Dez. 2002.

VARGHESE, J. S. et al. Lipoprotein profile in cirrhosis of liver. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, p. 521-522, 2007.

WALDEN, J.; VON WEGERER, J.; WINTER, U.; BERGER, M.; GRUNZE, H. Effects of kawain and dihydromethysticin on field potential changes in the hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych**, v. 21, n. 4, p. 697-706, 1997.

WHEATLEY, D. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **J Psychopharmacol**, n. 4, p. 414-421, 2005.

WHITTON, P. A.; LAU, A.; SALISBURY, A.; WHITEHOUSE, J.; S. EVANS, C. S. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 673-679, Oct. 2003.

WILKINSON, G. R. Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. **N Engl J Med**, v. 352, n. 26, May, p.2211-2221, 2005.

WILLET, K. L.; ROTH, R. A.; WALKER, L. Workshop Overview: Hepatotoxicity Assessment for Botanical Dietary Supplements. **Toxicol Sciences**, v. 79, p. 4-9, 2004.

WITTE, S.; LOEW, D., GAUS, W. Meta-Analysis of the Efficacy of the Acetonic Kava-Kava Extract WS 1490 in Patients with Non-Psychotic Anxiety Disorders. **Phytother Res**, v. 19, n. 3, p. 183-188, Mar. 2005.

WOOLTORTON, E. Herbal kava: reports of liver toxicity. **CMAJ**, v. 166, n. 6, p. 777, 2002.

WU, D.; YU, L.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L.; RAMSEWAK, R. S. Cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds with antioxidant activities from *Piper methysticum* (kava kava) roots. **Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 41-47, 2002.

YAMADA M, KOHNO T, ASAKAWA Y. Isolation and synthesis of TNF-alpha release inhibitors from Fijian kava (*Piper methysticum*). **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 309-317, May 2003.

ZHOU, S-F.; XUE, C. C.; YU, X-Q.; WANG, G. Metabolic Activation of Herbal and Dietary Constituents and Its Clinical and Toxicological Implications: An Update. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 526-553, 2007.

ZOU, L.; HARKEY, M. R.; HENDERSON, G. L. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. **Life Sci**, v. 71, n. 13, p. 1579-1589, Aug. 2002.

**ANEXO I**



## APÊNDICE 1

Toxicidade crônica - *Piper methysticum* (Kava)

Fichas de Hepatectomia: Avaliação Macroscópica - Código: (.....)

<b>Vivesseção de animais - Data: / /</b> <b>Grupo controle ( ) experimental ( )</b> <b>Macho ( ) Fêmea ( )</b> <b>Animal nº _____ Dose _____</b> <b>Macroscopia</b>
---

-----

**Espécimen de Hepatectomia - Código: (.....)**

Superfície externa (Cápsula de Glisson)						
Aspecto					Aderência	
Lisa	Rugosa	Brilhante	Opalescente.	Transparente	Destacável fácil	Não destacável fácil
Cor da superfície externa						
vermelha	vinhosa	pálida	pardacenta	amarelada	ferruginosa.	
Superfície de corte, cor:			Consistência do órgão:			
Castanha			Elástica		Firme	
Vinhosa			Endurecida		Amolecida	
Esverdeada						
Amarelada			<b>Vascularização:</b>		(medir vaso de maior diâmetro/mm)	
Ferruginosa			Visualização de vasos portais			
Detalhes macroscópicos /Topografia:			Outros detalhes macroscópicos/Topografia:			
Áreas esbranquiçadas de aparente fibrose			LD:			
Áreas de necrose			LM:			
Preservação da arquitetura lobular						
Esboço de nódulo			LE:			
Nódulo isolado			<b>Peso do fígado (em g):</b>			
Nodulada						
Se tem nódulo (medir mm)						

Responsável: M<sup>a</sup> de Fátima Duques de Amorim

## APÊNDICE 2

### Fichas de Avaliação Macroscópica: Pulmões, Rins e Coração- Código:

<p style="text-align: center;"> <b>Vivesseção de animais - Data: / /</b>  <b>Grupo controle ( ) experimental ( )</b>  <b>Macho ( ) Fêmea ( )</b>  <b>Animal n<sup>o</sup> _____ Dose _____</b>  <b>Macroscopia</b> </p>
---

### Pulmões - Código: (.....)

Superfície externa					
Pleura				Permeabilidade brônquica	
Lisa	Rugosa	Opalescente	Transparente	Normal	Alterada
Aspecto do parênquima pulmonar					
Esponjosidade	Distribuição da árvore bronquial	Áreas de fibrose	Hemorragias	Enfartes	

### Rins

Superfície externa e de corte			
	fibrose,	hemorragia	enfartes
Região cortical	RD ( ) RE ( )	RD ( ) RE ( )	RD ( ) RE ( )
Região medular	RD ( ) RE ( )	RD ( ) RE ( )	RD ( ) RE ( )
Sistema pielocalicial	RD ( ) RE ( )	RD ( ) RE ( )	RD ( ) RE ( )
<b>Observações</b>	RD: RE:		

### Coração

Superfície externa e de corte			
Pericárdio			
Fino ( )	Rugoso ( )	Transparente ( )	Opalescente ( )
Endocárdio			
Liso ( )	Brilhante ( )	Erosões ( )	
Átrios		Ventrículos	
Conteúdo:	Aspecto:	Conteúdo:	Aspecto:
Válvulas cardíacas			
Anatômicas ( )		Fusionadas ( )	

**Observações:**

# 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](#)