

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANDRÉA ELIAS DIANNA VIEIRA

AVALIAÇÃO GASTROTÓXICA E PRÉ-CLÍNICA (SUBCRÔNICA) DE
BENZALDEÍDO SEMICARBAZONA EM ROEDORES

Belo Horizonte – MG

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉA ELIAS DIANNA VIEIRA

AVALIAÇÃO GASTROTÓXICA E PRÉ-CLÍNICA (SUBCRÔNICA) DE
BENZALDEÍDO SEMICARBAZONA EM ROEDORES

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho – FAFAR – UFMG

Co-orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati – FAFAR – UFMG

Belo Horizonte – MG

2010

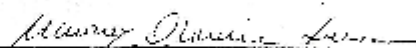
FOLHA DE APROVAÇÃO

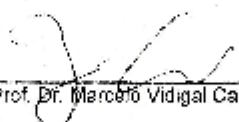
ANDRÉA ELIAS DIANNA VIEIRA

"Avaliação gastrotóxica e pré-clínica (subcrônica) de Benzaldeído Semicarbazona em roedores"

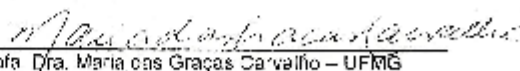
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dra. Marlene de Oliveira Sousa - UFMG


Prof. Dr. Marcelo Vidigal Calhaz - UFMG


Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati - UFMG


Prof. Dra. Maria das Graças Carvalho - UFMG

Belo Horizonte, 30 de abril de 2010

Dedico o grau de mestre

À minha mãe, à minha irmã e ao Kelson que sempre me estimularam a dar esse grande passo. Com sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação, eles sempre estiveram ao meu lado encorajando-me nas horas difíceis e aplaudindo meus momentos de glória.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Alberto Tagliati por sua motivação, apoio, inspiração e incansável ajuda conduzindo-me na busca da ampliação dos conhecimentos que possibilitaram a conclusão dessa Dissertação.

Ao Prof. Eliezer J. Barreiro e a todos componentes do INCT – INOFAR pelo investimento e pela credibilidade depositada em meu trabalho.

À Prof^a. Heloísa Beraldo e ao seu doutorando - Rafael Vieira - pela síntese da substância e por todos os comentários sem os quais não teria sido possível aprimorar os experimentos.

Ao Prof. Miguel e às Prof^{as}. Ângela e Vanessa pelos ensinamentos referentes às análises estatísticas. Ao Danilo pela simpatia e ajuda, tanto na interpretação dos resultados quanto na realização das análises nos programas estatísticos.

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali pelas análises histopatológicas.

À Prof^a. Fabíola e sua equipe pelas análises bioquímicas e hematológicas.

Ao Prof. Márcio Coelho e às Prof^{as}. Maria das Graças Carvalho, Luci Maria Sant'Ana Dusse e Marinez de Oliveira Souza por serem tão receptivos aos meus comentários e dúvidas.

À veterinária Adelaide pelos ensinamentos relacionados ao trato dos animais. Ao Batista pela dedicação e presteza. Aos funcionários da FAFAR pelo compromisso com o seu trabalho.

Aos estagiários Carolina Maldonado Galassi e Marcus Vinícius Santos cujo trabalho e dedicação foram essenciais para a realização dos experimentos.

À Fabiana de Almeida pelas técnicas ensinadas e pelos conselhos. Aos amigos do laboratório: Leandro Schiavo, Imaculada Conceição, Rogério Bilheiro, Leonardo, Gláucia, Raquel Madalosso pela ajuda e pela companhia.

Aos animais experimentais cuja vida não foi em vão.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

Aos meus pais pela vida e à minha irmã pelo incentivo.

Ao Kelson que, mesmo distante, concedeu-me apoio incondicional.

Aos meus amigos que me apoiaram durante essa jornada, sempre dispostos a compartilhar os sorrisos, a alegria e o ombro amigo nos momentos de dificuldade.

E, por último, porém não menos importante, agradeço a Deus por todas as dádivas concedidas.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

RESUMO

Semicarbazonas são compostos originados por meio da condensação da semicarbazida com aldeído ou cetona. Apresentam baixo custo de produção e possuem ampla gama de atividades farmacológicas já descritas em animais. Benzaldeído semicarbazona (BS) é um membro da família das semicarbazonas que apresenta atividade anticonvulsivante marcante nos modelos animais. Outras importantes atividades demonstradas para essa substância foram as atividades antiinflamatória e nociceptiva, notadamente neuralgias. Devido ao potencial de utilização de BS em modelos inflamatórios, foi realizado um estudo de gastrotoxicidade no modelo de lesão por etanol nas doses de 100, 200 ou 300 mg/kg, uma vez que um dos possíveis efeitos colaterais que acometem usuários dessa classe de fármacos são os distúrbios gástricos. Somado a isso, foi realizada a avaliação da toxicidade subcrônica (90 dias) do fármaco em ratos Wistar com aplicação de doses repetidas de BS por via per os. Quanto ao estudo de gastrotoxicidade, BS demonstrou proteção gástrica em todas as doses utilizadas. É possível inferir dois mecanismos de ação para a gastroproteção observada: 1) poderia ser devido à capacidade de BS captar radicais livres provenientes da administração do etanol absoluto; 2) seria devido à inibição de histidina descarboxilase, enzima essencial para a formação de histamina. Já com relação ao estudo pré-clínico, os tecidos mais afetados foram o hepático e o ósseo. Para o tecido hepático, essas alterações podem ser observadas tanto na alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros bioquímicos, bem como no aumento da massa do fígado nos animais nos quais foram administrados as doses de 200 ou 300 mg/kg; e na avaliação histopatológica que demonstrou alterações no fígado em todas as doses utilizadas. Já para o tecido ósseo, foram observadas alterações macroscópicas, essas podem indicar que BS induz osteomalácia que é um efeito adverso comum a pacientes que utilizam anticonvulsivantes por tempo prolongado. Outra possível explicação para as deformidades ósseas encontradas é a formação de semicarbazida que, de acordo com a literatura, provoca diminuição da densidade óssea e, conseqüentemente, sua fragilidade. Esses resultados demonstram que BS não é um fármaco adequado ao uso como anticonvulsivante e/ou para o tratamento da neuralgia do uma vez que a dose tóxica (300 mg/kg) foi próxima da dose terapêutica para ratos (100 mg/kg).

Palavras-chave: Benzaldeído semicarbazona (BS), anticonvulsivante, gastrotoxicidade, toxicidade pré-clínica, ratos.

ABSTRACT

Semicarbazones are compounds formed by a condensation reaction between a ketone or aldehyde and semicarbazide. They present low cost of synthesis and a wide range of pharmacological activities. Benzaldehyde semicarbazone (BS) belong to semicarbazone's group and its anticonvulsivant activity is well established. Another important activity of BS include anti-inflammatory and in nociception, primordially neuralgias. Given the fact that BS could be used as an anti-inflammatory and one of the major side effects of this class of drugs are the gastrointestinal disorders, we performed one gastrototoxicity investigation using the model of induced lesion by ethanol in rats. The doses used in this test were 100, 200 and 300 mg/kg. In addition, studies evaluating the subchronic (90 days) toxicity of BS in Wistar rats were performed. The animals received daily oral doses (*gavage*). The results of the gastrototoxicity test showed that BS was protector of the gastric mucosa in all doses. It was also possible to imply two mechanism of action: 1) due to the radical scavenger action of BS in the radicals produced by the ethanol administration; 2) due to the inhibition of histidine descarboxylase, an important enzyme that produces histamine. As for the results of subchronic study, the most affected tissues were the hepatic and bone. For the evaluation of hepatic tissue damage we observed statistically alterations ($p < 0,05$) of some biochemical parameters, increase of the liver mass in the doses of 200 and 300 mg/kg and alterations in the histopathological evaluation for all evaluated doses. The bone tissue alterations were macroscopically observed and indicate that BS could induce osteomalácia that is and common adverse effect in patients that use anticonvulsivats chronically. Another possible explanation could be due to the metabolite of BS - semicarbazide. According to the literature, semicarbazide could cause diminution of bone mineral density with consequent bone fragility. These results showed that BS cannot be used as a drug for the treatment of epilepsy and trigeminal neuralgia due to the proximity of the toxic dose (300 mg/kg) and the therapeutical dose (100 mg/kg).

Keywords: Benzaldehyde semicarbazone (BS), anticonvulsivant, gastrototoxicity, pré-clinical toxicity, rats.

LISTA DE FIGURAS

1	Reação química de síntese de benzaldeído semicarbazona.....	18
2	Diâmetro das lesões gástricas do índice de ulceração (I.U.), induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 ou 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%)	40
3	Medida do pH no conteúdo gástrico após administração <i>p.o.</i> de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto	41
4	Medida do volume do conteúdo gástrico (mL) do conteúdo gástrico após administração <i>p.o.</i> de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto.....	41
5	Diâmetros das lesões gástricas tipo I, induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto.....	42
6	Diâmetro das lesões gástricas tipo II, induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto.....	42
7	Diâmetro das lesões gástricas tipo III, induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> da suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto.....	43
8	Foto de ratas Wistar fêmeas tratadas com (a) controle (b) BS 300 mg/kg	44
9	Avaliação do consumo de água por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica.....	45
10	Avaliação do consumo de ração por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica.....	45
11	Avaliação da massa corporal de ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica.....	46

12 Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com veículo (Tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%)	47
13 Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de 100 mg/kg de BS	47
14 Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de 200 mg/kg de BS	48
15 Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de 300 mg/kg de BS	48
16 Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de satélite de 300 mg/kg de BS.....	49
17 Massa do fígado (em gramas de órgão por kg de animal) após administração <i>p.o.</i> em ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica .	51
18 Massa do rim e supra renal (em gramas de órgão por kg de animal) após administração <i>p.o.</i> em ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica	51
19 Massa do baço (em gramas de órgão por kg de animal) após administração <i>p.o.</i> em ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica .	52
20 Benzaldeído semicarbazona e seus metabólitos de degradação	61
21 Localização das enzimas hepáticas	64
22 Esquema do metabolismo, regulação e transporte de vitamina D	67

LISTA DE TABELAS

1 Classificação das convulsões e fármacos anticonvulsivantes de escolha de acordo com seu subtipo.....	15
2 Probabilidade de aumento dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas em associação com o uso de drogas anticonvulsivantes.	17
3 Fatores envolvidos na lesão gástrica induzida por etanol.....	24
4 Efeitos da administração da suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (tween 80 a 5%) na intensidade de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto	40
5 Efeitos na massa dos órgãos (em gramas de órgão por quilograma de animal) após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar.	50
6 Efeitos nos parâmetros hematológicos (série vermelha) após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar	53
7 Efeitos nos parâmetros hematológicos após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar.....	54
8 Efeitos nos parâmetros hematológicos após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar.....	55
9 Efeitos nos parâmetros bioquímicos após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar.....	57
10 Efeitos nos parâmetros bioquímicos após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar.....	58
11 Efeitos nos parâmetros bioquímicos após a administração <i>per os</i> de BS durante 90 dias em ratos Wistar.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	<i>Audiogenic seizures</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BS	Benzaldeído semicarbazona
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CK	Creatino quinase
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
FAL	Fosfatase alcalina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Hematoxilina-eosina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GGT	Gama glutamiltransferase
GSH	Glutathione
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
I.U.	Índice de ulceração
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect</i>
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
NOAEL	<i>No observed adverse effect</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
RDW	Índice de distribuição de normalidade
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNC	Sistema nervoso central
WAR	<i>Wistar audiogenic rats</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epilepsia: considerações gerais e tratamento	14
<u>1.1.1 Os anticonvulsivantes</u>	15
<u>1.1.2 Semicarbazonas</u>	18
<u>1.1.3 Neuralgia do Trigêmio: considerações gerais e tratamento</u>	20
<u>1.1.4 A irritação gástrica como um efeito adverso aos fármacos</u>	22
1.2 Aspectos toxicológicos - Considerações sobre toxicologia pré- clínica	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Droga	30
3.2 Preparo das suspensões	30
3.3 Animais	31
3.4 Avaliação da irritação gástrica	31
<u>3.4.1 Animais</u>	31
<u>3.4.2 Tratamento</u>	32
<u>3.4.3 Modelo farmacológico</u>	32
<u>3.4.4 Avaliação das lesões gástricas</u>	33
<u>3.4.5 Volume e pH gástricos</u>	34
3.5 Avaliação da toxicidade	34
<u>3.5.1 Estudo toxicológico sub-crônico</u>	34
3.6 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação da irritação gástrica	39
4.2 Estudo toxicológico sub-crônico	43
<u>4.2.1 Sinais observados</u>	43

<u>4.2.2 Avaliação da massa corporal e do consumo de água e ração</u>	44
<u>4.2.3 Avaliação histopatológica</u>	46
<u>4.2.4 Avaliação da massa dos órgãos</u>	49
<u>4.2.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos</u>	52
<u>4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos</u>	56
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO A	83
ANEXO B	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia: considerações gerais e tratamento

Convulsão é uma ocorrência paroxística devida a descargas anormais, excessivas e hipersincrônicas de um agregado de neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC). De acordo com a distribuição das descargas, essa atividade anormal do SNC pode ter várias manifestações (SCHARFMAN, 2007). Certas mudanças patológicas nas células cerebrais causam atividade anormal, que se manifesta de outras maneiras, como contrações repetidas e espasmódicas dos músculos de partes distintas do corpo, anomalias sensoriais e psicológicas (ELGER, 2005).

O significado da palavra convulsão tem que ser cuidadosamente distinguido daquele de epilepsia. Epilepsia descreve uma afecção na qual uma pessoa apresenta convulsões recorrentes devido a um processo subjacente crônico (LOWENSTEIN, 1998). Aproximadamente 5% da população mundial tiveram um acesso em algum momento de suas vidas, porém, o diagnóstico é reservado somente àqueles que possuem pelo menos dois acessos não provocados (DEEKER, 2002). Portanto, a epilepsia não é uma desordem isolada, mas um grupo de desordens que leva a crises convulsivas repetidas.

Em todos os países, a epilepsia representa importante problema de saúde pública, pois trata da afecção neurológica mais comum (McCORRY *et al.*, 2004). Estima-se que cerca de 50 milhões de habitantes no mundo são afligidos por essa doença (WHO, 2008; BIALER, WHITE, 2010). Além disso, pacientes portadores dessa disfunção ainda tem de conviver com a recorrência de suas crises, as repetidas incapacidades causadas e com o preconceito de alguns membros menos esclarecidos da sociedade que ainda acreditam que a epilepsia trata de um castigo divino ou mesmo uma doença transmissível.

A opção de tratamento da epilepsia é constituída de estimulação vagal, dieta cetogênica, tratamento cirúrgico e, principalmente, farmacoterapia com medicamentos anticonvulsivantes (WIEBE *et al.*, 2001; KARCESKI *et al.*, 2001; PRIVITERA *et al.*, 1999).

1.1.1 Anticonvulsivantes

Considerando como base a experiência clínica, existem fortes evidências de que diferentes anticonvulsivantes podem ser efetivos em diferentes tipos de síndromes epiléticas (McCORRY *et al.*, 2004). Portanto, é importante determinar o tipo de convulsão que o paciente sofreu para definir a terapia apropriada à pessoa. Em 1981, a *International League Against Epilepsy* (ILAE) publicou uma versão da classificação internacional de convulsões epiléticas que ainda hoje é um sistema de classificação útil. Dessa forma, são assim divididas:

TABELA 1 - Classificação das convulsões e fármacos anticonvulsivantes de escolha de acordo com seu subtipo

Tipo de convulsão	Subtipo de convulsão	Tratamento(s) de escolha
Convulsões parciais	Simplex	Ácido valpróico
	Complexas	Carbamazepina
	Com generalização secundária	Fenitoína
Convulsões primariamente generalizadas	Ausência (pequeno mal)	Etoxisuximida
		Ácido valpróico
	Tônico-clônicas (grande mal)	Ácido valpróico
		Carbamazepina
	Atônicas	Fenitoína
	Mioclônicas	Ácido valpróico

Fonte: Harrison, 1998 (adaptado)

Para minimizar os efeitos tóxicos, é conveniente iniciar o tratamento com um único fármaco. No entanto, é comum a associação de fármacos no tratamento da epilepsia pois há um grande número de pacientes que não respondem à monoterapia. O

sinergismo farmacodinâmico é o responsável pelo aumento da atividade antiepiléptica na terapia combinada (KLAUS, 2004).

Não há indicação de que o uso de uma associação de fármacos antiepiléticos seja mais eficaz que outra. No entanto, uma forma racional de combiná-las é utilizar fármacos com mecanismos de ação diferentes, se os mesmos já forem elucidados. Infelizmente, esses mecanismos são parcialmente conhecidos e não universalmente aceitos (McCORRY *et al.*, 2004).

De forma simplificada, é possível descrever alguns dos mecanismos de ação de anticonvulsivantes já conhecidos:

- ✓ por exacerbar o efeito inibitório de ácido gama-aminobutírico (GABA), ou por facilitar a abertura dos canais de cloreto mediada por GABA (fenobarbital e benzodiazepínicos) ou por inibir a enzima GABA-transaminase responsável pela inativação de GABA (gabapentina e ácido valpróico);
- ✓ por bloquear os canais de sódio e conseqüentemente reduzir a excitabilidade elétrica das membranas celulares (carbamazepina, lamotrigina e fenitoína);
- ✓ por diminuir o influxo de íons de cálcio via subunidades voltagem dependentes (etossuximida e zonisamida) (CZAPINSKI *et al.*, 2005; McNAMARA, 2003).

Estudos recentes em países desenvolvidos e em desenvolvimento mostraram que aproximadamente 70% das crianças e adultos diagnosticados com epilepsia podem ser eficientemente tratados com anticonvulsivantes. No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes podem não responder à terapia medicamentosa (WHO, 2008). Os mecanismos responsáveis pela resistência clínica não são conhecidos, mas pode incluir a insensibilidade do sítio de ação do fármaco, falha do fármaco em alcançar algumas regiões do cérebro, desenvolvimento de tolerância ou presença de proteínas fármaco-resistentes (STABLES *et al.*, 2002). Isso demonstra a importância do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a epilepsia.

Outro fator importante que incita a busca de novos medicamentos para o tratamento dessa afecção é o grande número de efeitos adversos graves causados pela farmacoterapia atual.

O anticonvulsivante ideal suprimiria todas as convulsões sem causar quaisquer efeitos indesejados. Infelizmente, os fármacos utilizados atualmente não controlam a atividade convulsiva em alguns pacientes e também freqüentemente causam efeitos indesejados cuja gravidade varia desde um comprometimento mínimo do SNC até a morte por anemia aplásica ou insuficiência hepática (Tabela 2).

TABELA 2 - Probabilidade de aumento dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas em associação com o uso de drogas anticonvulsivantes

Droga	Baixo risco	Elevado risco
Ácido Valpróico		X
Carbamazepina		X
Clonazepam	X	
Diazepam	X	
Felbamato		X
Fenitoína		X
Fenobarbital		X
Hidrato de cloral	X	
Lamotrigina		X
Mefenitoína	X	
Oxycarbazepina		X
Primidona	X	
Vigabatrina		X

Fonte: MURRAY, HADZIC, 2008

Os fármacos mais utilizados na clínica são os denominados anticonvulsivantes tradicionais (fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e ácido valpróico) e os mesmos apresentam farmacocinética complexa e inúmeras interações medicamentosas relacionadas principalmente aos mecanismos farmacocinéticos de indução ou inibição das enzimas do citocromo P450 (CYP) (BIALER, WHITE, 2010; PERUCCA, JOHANNESSEN, 2003).

Posteriormente, outros medicamentos foram desenvolvidos, incluindo os fármacos de segunda geração como lamotrigina, felbamato, oxcarbazepina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina, zonisamida e leviracetam (LAROCHE, HELMERS, 2004; VAJDA, 2000). Esses fármacos possuem farmacocinética mais simples e, relativamente, menos interações medicamentosas, mas, apesar disso, a evidência que suporta o uso dessas novas substâncias é esparsa (McCORRY *et al.*, 2004).

Nesse contexto, surgiu o interesse para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos anticonvulsivantes: as semicarbazonas. Estas possuem marcante atividade anticonvulsivante em modelos de convulsão induzidas por eletrochoque ou por pentilenotetrazol (PANDEYA *et al.*, 2000, DIMMOCK, BAKER, 1994). Assim como muitos outros fármacos usados na clínica, esses compostos apresentam os requisitos estruturais necessários à atividade anticonvulsivante, mas não contém a função dicarboximida (COM(R)CO), a qual pode contribuir para o aparecimento de efeitos neurotóxicos (DIMMOCK *et al.*, 1993).

1.1.2 Semicarbazonas

Semicarbazonas, de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), são compostos originados por meio da condensação da semicarbazida com um aldeído ou uma cetona (**Figura 1**).

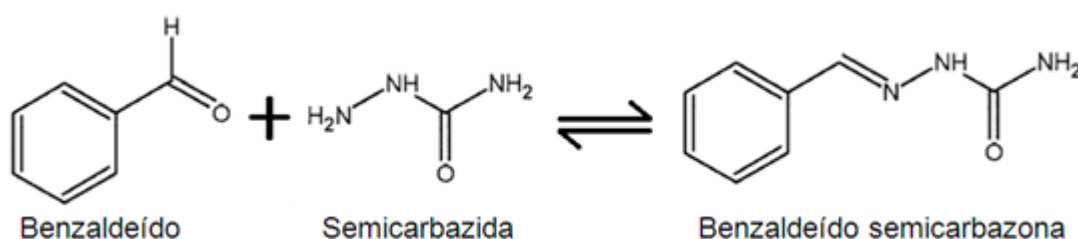


Figura 1 - Reação química de síntese de benzaldeído semicarbazona

Essa classe de compostos apresenta baixo custo e atividade anticonvulsivante já descrita na literatura (BERALDO *et al.*, 2002; DIMMOCK, BAKER, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Estudos associam também as semicarbazonas às atividades antineoplásica (ASÍS *et al.*, 1996), antihipertensiva (WARREN *et al.*, 1977), antibacteriana (SRIRAM *et al.*, 2004), antinociceptiva e antiinflamatória (ROCHA *et al.*, 2006). A desvantagem desses compostos é a baixa solubilidade em água (BERALDO *et al.*, 2002).

A atividade anticonvulsivante de semicarbazonas pode estar associada ao aumento da concentração do GABA em algumas regiões do SNC (THIRUMURUGAN *et al.*, 2006) e/ou à diminuição de glutamato no fluido cérebro espinhal, reduzindo a liberação espontânea desse aminoácido no cerebelo (MATTEI *et al.*, 1999). No entanto, estudos realizados por Ilyin (2005) demonstraram que um dos membros da família das semicarbazonas, o 4-[4-florofenoxi]benzaldeído semicarbazona, atua como um bloqueador dos canais de sódio.

Benzaldeído semicarbazona (BS), cuja estrutura molecular pode ser visualizada na Figura 1, é um membro da família das semicarbazonas que apresenta atividade anticonvulsivante marcante nos modelos animais realizados em laboratório. Apesar de seu mecanismo de ação ainda não ter sido completamente elucidado, essa molécula foi testada para atividade anticonvulsivante no modelo genético audiogênico, AS (*audiogenic seizures*), no qual uma colônia de ratos WAR (*wistar audiogenic rats*), geneticamente modificada, é selecionada para apresentar crises convulsivas quando submetida a um som de alta intensidade (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

BS também foi testada pelo laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFMG para modelos de dor (alodínia térmica e mecânica, edema de pata, migração celular, formação de tecido fibrovascular e nocicepção induzida por formaldeído) (ROCHA *et al.*, 2006). Os resultados demonstraram seu efeito antiinflamatório e geraram um depósito de patente sob o número PI 0705589-7 A2.

Portanto, BS é um fármaco promissor no tratamento de condições patológicas tanto humanas quanto veterinárias.

Os anticonvulsivantes usados na farmacoterapia atual não são somente usados para a epilepsia. De fato, muitos fármacos dessa classe são também utilizados em profilaxias de dores crônicas, notadamente neuralgias, cujos antiinflamatórios não apresentam eficácia analgésica satisfatória. Estudos com a molécula de BS estão sendo desenvolvidos para modelos de dor neuropática pelo laboratório de Farmacologia da UFMG apresentando resultados promissores para o tratamento desta afecção.

1.1.3 Neuralgia do Trigêmio: considerações gerais e tratamento

A Neuralgia do Trigêmio é a mais conhecida e debilitante forma de neuralgia facial (GRAFF-RADFORD, 2009). Também conhecida como doença de Fortherghill, Tic Doloroso Facial ou Prosopalgia Dolorosa (DE SIMONE *et al.*, 2008; LEITÃO, FIGUEIREDO, 1985) é caracterizada como uma forte dor descrita como “latejante”, “queimação” ou “choque elétrico”, paroxística e de curta duração, desde alguns segundos até minutos, com severidade e frequência bastante variáveis (DIENER *et al.*, 2009). Esse quadro patológico ocorre com maior incidência em mulheres, aproximadamente na sexta década de vida (EBOLI *et al.*, 2009), apresentando etiologia bastante variável.

A crise dolorosa é deflagrada em muitos casos quando o paciente toca ou manipula determinadas áreas da face, situadas ipsilateralmente à dor, geralmente ao redor do nariz e próximas aos lábios, denominadas zonas-de-gatilho (GALASSI *et al.*, 1985). Os ataques estimulam freqüentemente respostas como salivação, ruborização da face, lacrimejamento, ou mesmo, rinorréia (EBOLI *et al.*, 2009).

A neuralgia trigeminal é uma afecção com mecanismos fisiopatológicos não inteiramente esclarecidos (DE SIMONE *et al.*, 2008). Ainda não foi definido um único fator etiológico que, absolutamente possa ser responsável por seu surgimento. Muitas afecções têm sido destacadas, dentre estas a compressão intracraniana do nervo trigêmio por vasos periféricos, geralmente artérias. Outras causas incluem infecções viróticas, lesões tumorais, escleroses múltiplas, aneurismas e comprometimento alveolar pós-extração dentária (BASIC-KES *et al.*, 2009; GRAFF-RADFORD, 2009; ZAKRZEWSKA, 2002).

Segundo TÜRP & GOBETTI (1996) o mecanismo que estaria próximo do que realmente ocorreria seria a conjunção de processos degenerativos do envelhecimento associados à compressão vascular, agindo durante vários anos sobre a raiz posterior do nervo trigêmio.

A literatura reporta as mais variadas formas de tratamento da neuralgia do trigêmio, desde procedimentos clínicos não invasivos como a terapia medicamentosa, acupuntura e eletro-mioestimulação até procedimentos cirúrgicos como a microdescompressão vascular e termocoagulação com radiofrequência (CANAVARO, BONICAZI, 2006; ZAKRZEWSKA, 2002).

A opção de tratamento inicial é geralmente a farmacoterapia com medicamentos anticonvulsivantes. Os principais fármacos empregados no tratamento são a carbamazepina e a hidantoína. Ambas funcionam temporariamente e, freqüentemente, levam ao desenvolvimento de tolerância. A hidantoína atua eficazmente sobre o processo doloroso em 40% dos casos e a carbamazepina, em cerca de 90% (BROGGI *et al.*, 2008; CANAVARO, BONICAZI, 2006; LOESER, 1985).

1.1.4 A irritação gástrica como um efeito adverso aos fármacos

A adesão ao tratamento de pacientes com epilepsia e neuralgia do trigêmio é importante devido à necessidade de uso prolongado, acompanhado por efeitos indesejáveis decorrentes do uso do medicamento e, freqüentemente, devido à associação de muitos fármacos. Nesse contexto, as reações adversas tornam-se um grande problema de saúde pública, pois, além de diminuir o bem estar do paciente, também comprometem a continuidade da farmacoterapia. Por isso, a pesquisa é primordial para identificar, compreender, prever e, finalmente, reduzir a probabilidade desse evento.

Um dos efeitos adversos mais comuns decorrentes do uso de medicamentos são os sintomas gastrointestinais. Pesquisas feitas em hospitais demonstram que cerca de 20 a 40% de todos os efeitos adversos causados por fármacos afetam o trato gastrointestinal (ZENTLER-MUNRO, NORTHFIELD, 1979).

A irritação gástrica é um provável efeito adverso presente nos pacientes que ingerem os seguintes anticonvulsivantes: carbamazepina, ácido valpróico, etossuximida, gabapentina e felbamato (LOWENSTEIN, 1998). Além do efeito anticonvulsivante, BS também apresenta atividade antiinflamatória (ROCHA *et al.*, 2006). Sabe-se que a irritação gástrica atinge cerca de 15 a 30% dos pacientes que usam regularmente fármacos antiinflamatórios (CELLOTI, LAUFER, 2001). Portanto, o estudo da gastrototoxicidade é relevante no desenvolvimento dessa classe de medicamentos.

A úlcera péptica é doença de etiologia pluricausal e complexa, sendo que o conhecimento fisiopatológico dessa permanece não completamente elucidado. Essa condição patológica já foi considerada um distúrbio heterogêneo que resultava de um desequilíbrio entre fatores agressivos, tais como o ácido clorídrico e a pepsina, e certos fatores protetores, tais como o fluxo sanguíneo da mucosa. Apesar de esse

conceito não ter sido descartado completamente, foi relegado ao ácido um papel secundário (GLAVIN, SZABO, 1992; GRAHAM, 2000; LEE, 2000).

No entanto, a exposição do tecido acometido ao ácido parece ser essencial para o desenvolvimento dos sintomas clínicos na maioria dos casos dessas doenças. O controle da acidez gástrica é, portanto, fundamental no tratamento desses distúrbios, embora essa abordagem possa não tratar o processo fisiopatológico fundamental (HOOGERWERF, PASRICHA, 2001).

Fato que corrobora com a afirmação anterior é que a maioria dos fármacos antiulcerogênicos possui como alvo o bloqueio ou a neutralização da secreção ácida apesar de muitos pacientes que sofrem dessa condição patológica secretarem ácido clorídrico e pepsina em níveis normais ou abaixo do normal (GLAVIN, SZABO, 1992).

A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos fatores centrais (neurais) e periféricos (endócrino e parácrino). Cada fator refere a um evento fisiológico final comum – a secreção de prótons (H^+) pelas células parietais, as quais estão localizadas no corpo e no fundo gástrico. Os fatores neuronais (acetilcolina), parácrinos (histamina) e endócrinos (gastrina) desempenham papéis importantes na regulação da secreção ácida (HOOGERWERF, PASRICHA, 2001).

Os modelos experimentais de indução de irritações e lesões gástricas atuam por diferentes mecanismos ulceratogênicos e representam o primeiro passo para determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de substâncias (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2000).

Um dos modelos utilizados para a avaliação do potencial de irritação gástrica de uma substância é o de lesão induzida por etanol. O mesmo se baseia na administração de um volume fixo, geralmente variando de 0,5 a 2,0 mL, de álcool etílico puro após a administração da substância a ser testada. A quantidade de lesões hemorrágicas estriadas dependerá do volume de agente lesionante administrado e da ação da substância que poderá aumentar, diminuir ou mesmo não alterar o dano que o etanol causa à mucosa gástrica.

A Tabela 3 demonstra que esse modelo multifatorial é bastante representativo devido à inclusão de vários aspectos que são extrapolados para a avaliação da irritação gástrica humana.

TABELA 3 - Fatores envolvidos na lesão gástrica induzida por etanol

Diminuição da produção de muco gástrico
Diminuição da motilidade gástrica
Diminuição de produção da glutathione (GSH) endógeno
Diminuição da produção de prostaglandinas
Diminuição do fluxo de sangue na mucosa gástrica
Aumento da liberação de histamina
Aumento do efluxo de sódio e potássio
Aumento do influxo de cálcio
Aumento da geração de radicais livres
Aumento da produção de leucotrienos
Aumento da isquemia
Aumento da permeabilidade vascular da mucosa gástrica
Aumento da liberação de 5-hidroxitriptamina

Fonte: Glavin, Szabo, 1992

O modelo de lesão gástrica induzida por etanol inicia-se pela destruição da camada de proteção de muco e bicarbonato presentes na mucosa criando, dessa forma, uma alteração no mecanismo de defesa e aumentando a permeabilidade ao ácido (TWEDT, MAGNE, 1992; MacMATH, 1990). Devido ao aumento da entrada de H^+ , há uma sucessão de eventos que culminam na lesão direta da mucosa, seguida pela destruição da submucosa (LIPTAK, 2002).

Exames histopatológicos também comprovam que o etanol causa dano e aumento da permeabilidade dos vasos, devido à ruptura da parede vascular (SZABO, 1987). Como consequência a esse dano, há extravasamento sanguíneo e diminuição da pressão dos vasos (TRIER *et al.*, 1986). Na tentativa de contornar esses efeitos, ocorre a vasoconstrição intensa e progressiva das vênulas murais até as vênulas maiores (GUTH, HALL, 1966).

Devido à injúria do tecido, há uma intensa perturbação dos mastócitos presentes na mucosa que liberam mediadores químicos inflamatórios sendo, um deles, a histamina. Ocorre, então, dilatação marcante das arteríolas murais até artérias de maior calibre, aumentando a pressão capilar e levando a estasia no fluxo sanguíneo gástrico e formação de áreas hiperêmicas largas e visíveis, além de edema (GONZÁLES *et al.*, 2001, OATES, HAKKINEN, 1988; TAN *et al.*, 2002). As lesões histopatológicas evidenciadas são: congestão, edema, hemorragia, erosão e necrose (LA CASA *et al.*, 2000; REPETTO, LLESUY, 2002).

Apesar de ocorrer dano marcante na microcirculação da mucosa, é improvável que esse processo seja somente devido à isquemia. Outra hipótese é o aumento de radicais livres derivados de oxigênio e a diminuição da eficácia do sistema defensivo antioxidativo (MacMATH, 1990).

O etanol é capaz de diminuir os níveis de compostos sulfidrílicos na mucosa gástrica, dentre estes, o GSH (MacMATH, 1990). Boyd (1991) observou que há níveis muito elevados de GSH na mucosa gástrica de diferentes espécies de roedores. GSH, também conhecido por glutathione, é o antioxidante hidrossolúvel não protéico mais importante nos sistemas vivos (PERRICONE *et al.*, 2009) e tem por mecanismo de ação interceptar os radicais livres (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Dessa forma, o etanol é capaz de diminuir o mecanismo de proteção endógena aos radicais livres.

As lesões gástricas induzidas por etanol são também associadas à produção excessiva de radicais livres, que atacam constituintes celulares essenciais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (LA CASA *et al.*, 2000). Portanto, o aumento do conteúdo de peróxidos lipídicos e radicais livres derivados de oxigênio resulta em alterações significativas em nível celular e causa danos às membranas, morte celular, esfoliação e erosão epitelial (BIRDANE *et al.*, 2007).

1.2 Aspectos toxicológicos - Considerações sobre toxicologia pré-clínica

Toda substância, segundo a Toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição (doses únicas ou múltiplas) e vias pela qual é administrada (respiratória, oral, dérmica) (EATON, KLASSEN, 1996).

Ao iniciar os estudos de um novo produto ou substância é necessário comprovar sua eficácia terapêutica, a chamada prova-de-conceito. Após essa etapa, se o produto ou a substância apresentarem atividade farmacológica, o mesmo será submetido aos testes de toxicidade. Caso apresentarem segurança adequada, os estudos relativos à eficácia terão continuidade. É exigido pelas agências regulatórias de todo o mundo que todo produto ou substância deve necessariamente passar pelos testes de segurança preestabelecidos (OLSON *et al.*, 2000).

Para ser comercializado, o produto inovador precisa obter antes a aprovação das autoridades sanitárias dos países onde será comercializado. As principais agências regulatórias do mundo são FDA (*Food and Drug Administration*), OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), EMEA (*European Medicines Agency*) e WHO (*World Health Organization*).

A FDA é uma autoridade regulatória americana que exige as seguintes etapas de testes para aprovar um produto inovador:

- ✓ Testes pré-clínicos, realizados em laboratório e animais, com duração de três a seis anos;
- ✓ Testes clínicos de fase I, realizados em grupos de 20 a 80 voluntários saudáveis, com duração de um a dois anos;
- ✓ Testes clínicos de fase II, realizados com 100 a 300 pacientes voluntários, com duração de dois a três anos; e
- ✓ Testes clínicos de fase III, realizados com 1.000 a 5.000 pacientes voluntários, com duração três a quatro anos (FDA, 2010).

Após a fase III, o produto recebe a aprovação da FDA para comercialização e passa à Fase IV, de acompanhamento clínico na totalidade da população que irá consumir o medicamento. Essa fase tem duração de um a dois anos. Somente assim o produto receberá a aprovação definitiva.

Os principais objetivos da avaliação da segurança nos ensaios pré-clínicos incluem a caracterização dos efeitos tóxicos considerando o órgão alvo, dose dependência, tempo de exposição, reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem (FDA, 2010).

Há um conjunto de testes pré-clínicos a serem realizados antes do início dos testes clínicos, sendo estes: estudos de toxicidade aguda, sub-aguda, subcrônica, crônica, mutagênese e carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (EATON, KLASSEN, 1996; OGA, 2003).

Esse conjunto de testes definido deve ser realizado para cada nova substância a ser utilizada. Entretanto, dependendo do uso da substância, do efeito tóxico produzido por estruturas análogas à sua estrutura química, bem como efeito tóxico produzido pela substância em si, pode definir quais os testes que devem ser realizados em situações específicas (EMEA, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por regulamentar o registro de novos medicamentos. A RDC 136 de 29 de maio de 2003 estabelece que a empresa deverá apresentar relatório de ensaios pré-clínicos de toxicidade aguda, sub-aguda e crônica, toxicidade reprodutiva, atividade mutagênica e potencial oncogênico quando da solicitação do registro de novo medicamento.

Atualmente, a BS encontra-se nos testes pré-clínicos e seus resultados preliminares demonstram um bom prospecto para a continuidade do estudo dessa substância. A toxicidade aguda e subaguda dos compostos benzaldeído semicarbazona já foram testadas no Laboratório de Toxicologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, sendo objeto de uma dissertação de mestrado. BS apresentou perfil de toxicidade (segurança) adequado para a continuação dos estudos e seu efeito farmacológico já foi comprovado (RODRIGUES, 2006).

Portanto, o presente trabalho é uma complementação e continuação dos estudos já realizados no mesmo laboratório. Através destes, será possível obter subsídios científicos da toxicidade pré-clínica de BS, contribuindo para a avaliação da segurança desse novo fármaco que poderá vir a ser um novo medicamento inovador.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a segurança de BS para uso como antiinflamatório ou anticonvulsivante através dos testes de gastrototoxicidade e a toxicidade pré-clínica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade gastrotóxica de BS;
- b) Avaliar a toxicidade subcrônica de BS;
- c) Inferir propostas de mecanismos de ação de toxicidade com base nos resultados obtidos nos itens a e b.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Droga

Benzaldeído semicarbazona (BS) foi sintetizada e cedida pelos Professores Heloísa de Oliveira Beraldo e Rubén Dario Sinisterra Millan do Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da UFMG.

BS foi caracterizada por ponto de ebulição (216-217 °C) por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C . (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

3.2 Preparo das suspensões

As suspensões foram preparadas imediatamente antes da administração das doses. A administração foi feita por gavagem em todos os testes respeitando o limite de 2 mL/100 g de massa corporal do animal para o veículo aquoso (OECD 1998). As suspensões foram agitadas vigorosamente antes de cada administração. O cálculo da dose foi preconizado em miligramas de substância teste por quilogramas (mg/kg) de massa corporal dos animais.

Devido à insolubilidade de BS em água, o veículo utilizado foi composto de 1,0% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Brasil) e de 0,13% de tween 80 (Synth, Brasil) diluídos em água destilada, tomando-se o cuidado de não usar uma dose excessiva desses componentes para não potencializar os possíveis efeitos neurotóxicos da droga em estudo (CAVALETTI *et al.*, 2000; AUTHIER *et al.*, 2002).

Grupos teste e controle receberam o mesmo veículo, para que assim as diferenças entre os efeitos observados entre os mesmos fossem atribuídos somente ao uso da droga.

DMSO é capaz de diminuir a incidência de injúria à mucosa gástrica em pacientes com gastrite aguda (SANTOS *et al.*, 2003). Por isso, no teste de gastrotoxicidade, foi utilizada tween 80 a 5%, uma vez que o uso do DMSO como controle negativo poderia diminuir a incidência de lesões em todos os grupos e prejudicaria a análise dos resultados.

3.3 Animais

Os protocolos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob os protocolos nº 025/08 e 208/09 (Anexos A e B, respectivamente).

3.4 Avaliação da irritação gástrica

3.4.1 Animais

Para os ensaios de gastrotoxicidade foram utilizados 30 (trinta) ratos machos da linhagem Wistar, com massa corporal de 220 a 250 g, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos nas seguintes condições ambientais: ciclo claro-escuro de 12 horas (7:00 – 19:00), temperatura de 23 ± 2 °C e umidade de 50 a 60% em gabinete Vidy®. Foram alimentados com ração comercial em *pellet*, do tipo purina da marca Nuvilab® e água potável *ad libitum*. Durante as 24 horas anteriores ao início do experimento os animais foram mantidos em gaiolas de contenção, sem maravalha e somente com água potável e leite

condensado (proporção de 2:1), a fim de evitar o acúmulo de ração, fezes ou maravalha no estômago, o que dificultaria a leitura da irritação (JORGE, 2004).

3.4.2 Tratamento

Os 30 animais foram aleatoriamente subdivididos em 5 grupos contendo 6 animais em cada grupo e climatizados 3 (três) dias antes de iniciar o experimento. Os tratamentos recebidos foram: grupo 1 → solução controle negativo (tween 80 a 5%); grupo 2 → suspensão de sucralfato 500 mg/kg; grupo 3 → suspensão de BS 100 mg/kg; grupo 4 → suspensão de BS 200 mg/kg; grupo 5 → suspensão de BS 300 mg/kg. O volume administrado por gavagem (1 mL) foi o mesmo para todos os animais. O pH dessas soluções foram de 7.

O sucralfato, por ser um agente que constitui uma barreira protetora contra a agressão do ácido gástrico e da pepsina, foi escolhido como controle positivo. Este consiste em octassulfato de sacarose ao qual foi adicionado hidróxido de alumínio. Em ambiente ácido ($\text{pH} < 4$), o mesmo sofre amplo encadenamento cruzado e polimerização para produzir um gel viscoso e pegajoso que adere firmemente às células epiteliais e ainda mais firmemente ao fundo da úlcera por até 6 (seis) horas após uma única dose (HOOGERWERF, PASRICHA, 2001). A solução de tween 80 a 5% foi o controle negativo.

3.4.3 Modelo farmacológico

Foi utilizado o modelo de indução de lesões gástricas agudas por etanol absoluto, para se avaliar a presença ou ausência de efeito gastrotóxico do produto em estudo, administrado por via *per os* em ratos (ALVAREZ *et al.*, 1999; SEITO *et al.*, 2002; TAN *et al.*, 2002). Foi administrado, *p.o.*, 1 mL de etanol absoluto 60 minutos após a administração do produto ou do sucralfato ou da solução controle. Os animais foram

eutanasiados 60 minutos após aplicação do etanol, em câmara de CO₂, e tiveram seus estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e imergidos em solução salina para preservação.

3.4.4 Avaliação das lesões gástricas

A avaliação das lesões hemorrágicas foi realizada macroscopicamente com auxílio de microscópio estereoscópio (LA CASA *et al.*, 1999; PERERA *et al.*, 2001). Após a retirada do estômago, a mucosa foi lavada suavemente com solução salina e fixada com auxílio de alfinetes sobre a plataforma de isopor para leitura. As lesões foram, então, classificadas de acordo com Szelenyi e Thiemer (1978) por meio da severidade do dano à mucosa, sendo: tipo I (hiperemia e/ou petéquia); tipo II (hemorragia com erosão moderada); tipo III (hemorragia com lesões extensas e severas).

Após classificação das lesões, foi realizada a medida, em mm, do maior diâmetro de todas as lesões, utilizando paquímetro digital da marca Vonder®. As leituras foram realizadas pelo mesmo analista, sendo que este não teve conhecimento do tratamento recebido pelos animais. Após a avaliação das lesões, os estômagos foram conservados em solução salina de formalina a 10%.

O índice de ulceração (I.U.) foi calculado realizando uma média ponderada da extensão das lesões para cada tratamento (MAKOVEC *et al.*, 1999; SZELENYI, THIEMER, 1978):

$$I.U. = \frac{[(\text{lesões tipo III}) \times 3] + [(\text{lesões tipo II}) \times 2] + [(\text{lesões tipo I}) \times 1]}{n}$$

n

Onde,

lesões tipo III → somatória dos valores do maior diâmetro das lesões tipo III

lesões tipo II → somatória dos valores do maior diâmetro das lesões tipo II

lesões tipo I → somatória dos valores do maior diâmetro das lesões tipo I

n → número de animais por grupo

A porcentagem de proteção foi calculada utilizando a média ponderada do índice de ulceração (I.U.) de cada tratamento, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de proteção do tratamento} = 100 - \left\{ \frac{\text{I.U. do tratamento} \times 100}{\text{I.U. do controle negativo}} \right\}$$

3.4.5 Volume e pH gástricos

Após a retirada dos estômagos, foi realizada uma pequena incisão próxima ao piloro para a extração do conteúdo gástrico e posterior medida de volume. O pH medido foi utilizado nas fitas indicadoras Merck[®] imediatamente após a abertura dos órgãos (JORGE, 2004).

3.5 Avaliação da toxicidade

3.5.1 Estudo toxicológico sub-crônico

Esse estudo teve como objetivo avaliar as propriedades tóxicas de BS resultantes de uma exposição de doses repetidas em um período de 90 dias. Foram seguidas as diretrizes do guia OECD 408 (1998).

A toxicidade subcrônica fornece informações adicionais sobre órgãos-alvo e sobre efeitos cumulativos. Os dados assim obtidos fornecerão estimativas do nível de exposição sem efeito, que servirá de base para o estabelecimento de um regime de doses para futuras pesquisas de toxicidade. As doses descendentes foram escolhidas com o objetivo de demonstrar a menor dose onde não se observam efeitos adversos (NOAEL) e onde se observam efeitos mínimos (LOAEL).

3.5.1.1 Animais

Foram utilizados 100 (cem) ratos Wistar (50 machos e 50 fêmeas) com peso de 200 a 220 g e com idade entre 8 a 9 semanas, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos nas seguintes condições ambientais: ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 - 19:00), temperatura de 23 ± 2 °C e umidade de 50 a 60%, em gabinete Alesco[®]. Foi fornecida ração em pellet da marca Nuvilab[®] e água filtrada *ad libitum*, durante os 90 (noventa) dias de administração, sendo que a ração foi retirada 12 horas antes do sacrifício dos animais.

3.5.1.2 Tratamento

Esta avaliação foi feita a partir do protocolo de doses repetidas nº. 408 da OECD (1998). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e climatizados 14 (quatorze) dias antes de iniciar o experimento. A divisão dos seis grupos foi da seguinte forma: grupo controle (com 10 animais machos e 10 fêmeas em cada grupo), três grupos testes (com 10 animais machos e 10 fêmeas em cada grupo), os quais receberam as doses de BS de 100, 200 ou 300 mg/kg, e dois grupos satélites (com 5 animais machos e 5 fêmeas em cada grupo) para a verificação da reversibilidade de possíveis danos observados, pois, após os 90 dias de teste, esses animais são submetidos a mais 30 dias de avaliação sem receber o fármaco. Esse período é denominado basal, no qual, semanalmente, foram avaliados o consumo de água, ração e massa corporal dos animais. Foram mantidos 2 animais por gaiola

que receberam *p.o.* doses diárias das soluções em estudo e controle durante 90 (noventa) dias (OLSON *et al.*, 2000; PTRITCHARD *et al.*, 2003).

Considerando as variações da massa corporal, os animais foram pesados semanalmente, para que assim pudesse ser realizado o constante ajuste de dose (mg/kg de massa corporal). Foram administradas três doses de BS (100, 200 e 300 mg/kg) e a solução controle (DMSO a 1% e Tween 80 a 0,13%). O grupo satélite controle recebeu a solução controle e o grupo satélite 300 recebeu a dose de 300 mg/kg.

3.5.1.3 Evolução ponderal e parâmetros comportamentais

Diariamente foram avaliados o comportamento geral dos animais (10:00 às 12:00 horas e 17:00 às 19:00 horas) e o aparecimento de efeitos anormais como agitação, surgimento de lesões, alteração respiratória, diarreia, sonolência, regurgitamento durante a administração das soluções, pelos arrepiados e observando se os mesmos foram reversíveis (com registro de duração) ou não. O consumo de água e ração, por gaiola, foi computado semanalmente, assim como a massa corporal para o ajuste das doses. Após os 90 (noventa) dias de tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), e aproximadamente 5 mL de sangue foram coletados por punção direta da veia cava abdominal (HONDA *et al.*, 2007).

As amostras de sangue foram divididas em duas alíquotas: uma em tudo de ensaio sem aditivo e outra em microtubo tipo ependorff de 2 mL contendo EDTA (ácido etileno diamino tetracético) para exames de bioquímica sérica e hematológicos, respectivamente, enquanto que os órgãos foram pesados e autopsiados através de exame macroscópico e histopatológico (HILALY *et al.*, 2004; KANJANAPOTHI *et al.*, 2004; PALMEIRO *et al.*, 2003).

3.5.1.4 Análises laboratoriais

As análises bioquímicas foram realizadas a partir do soro dos animais, após centrifugação durante 10 minutos a 2500 rpm. Foram utilizados conjunto de reagentes padronizados da Synermed® e o aparelho Cobas Mira® para as leituras espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: ácido úrico – AUR, pelo método enzimático (Uricase Azure D2); Albumina – ALB, Verde de Bromocresol (colorimétrico de ponto final); Alanina aminotransferase – ALT/TGP, enzimático UV; Amilase – AMI, método colorimétrico (Hendrassik e Grof modificado); Bilirrubina total e Bilirrubina direta – Bb total e Bd D, método colorimétrico (Jendrassik e Grof modificado); Cálcio – Ca, método colorimétrico (Arsenazo III); Cloretos – Cl, método colorimétrico; Colesterol total – COL, Enzimático de Trinder (enzimático de ponto final); Creatinina – CRE, cinético; Creatinina quinase – CK, método enzimático UV; Fosfatase Alcalina – FAL, enzimático UV; Glicose – GLI, Glicose oxidase (enzimático colorimétrico de ponto final), sendo dosada imediatamente após a coleta; Fósforo – P, colorimétrico/catalisado (Fosfomolibdato/PVP); Gama glutamil transferase – GGT, Método enzimático (Szasz modificado); Proteínas totais – PROT, Biureto (colorimétrico de ponto final), Triglicérides – TRI, Método enzimático (N-sulfopropil); Uréia – URE, Urease colorimétrico (enzimático colorimétrico de ponto final). Todas as análises foram realizadas utilizando soros controles para a validação do procedimento analítico.

As análises hematológicas foram realizadas a partir do sangue total, coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA. Foi realizado o hemograma completo (hemoglobina – HB, hematócrito – HT, contagem de hemácias – HEM, contagem global de leucócitos – GL LEU e contagem de plaquetas – C PLAQ) no aparelho automatizado Abacus Junior Vet® (Escola de Veterinária – UFMG). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada manualmente, em esfregaço corado pelo May-Grunwald Giemsa.

Para a análise histopatológica foram retiradas as seguintes vísceras: coração, pulmões, estômago, intestino delgado, fígado, baço, pâncreas, supra-renais, rins, cérebro, útero e ovários ou testículo e epidídimos. Após a retirada dos órgãos, os mesmos foram pesados e submetidos ao exame macroscópico para identificação de possíveis áreas sugestivas de alteração patológica. Findo esse processo, foram coletados fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de cada órgão, caso fosse identificado uma alteração macroscópica, esta área foi selecionada para o corte e incluída para posterior avaliação microscópica. Todos esses fragmentos foram conservados em solução de formalina a 10 % tamponada e após a inclusão dos fragmentos dos órgãos em parafina, esses foram cortados com 5 μ m e corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) para exame histopatológico.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando-se o teste paramétrico de análise de variância, seguida pelos testes *T Student* e *Student-Newman-Keuls*, através do programa informatizado SAS, para avaliar se há diferença significativa entre os grupos. Foi considerado o nível de significância de 5%. Para a análise dos resultados que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (SAMPAIO, 2002).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da irritação gástrica

De acordo com a Tabela 4 e com a Figura 5, entre todas as doses testadas, apenas BS na dose de 200 mg/kg apresentou aumento na extensão das lesões menos intensas (tipo I) e todas as outras doses de BS e de sucralfato, que é um medicamento referência com eficácia comprovada, foram estatisticamente iguais as do grupo controle ($p < 0,05$). Porém, analisando a mesma tabela as lesões moderadas e as mais intensas (tipo II e III, respectivamente) e nas figuras 6 e 7, observa-se que BS em todas as doses foi capaz de promover redução da extensão das lesões, sendo estatisticamente diferentes do grupo controle e estatisticamente iguais ao sucralfato.

Com relação ao pH e ao volume gástrico, verificou-se na Tabela 4 e nos gráficos (figuras 3 e 4, respectivamente) que todos os grupos apresentaram valores estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

O índice de ulceração (I.U.) é a média ponderada da somatória do maior diâmetro de todas as três intensidades de lesões e esse foi menor em todos os grupos que receberam BS e sucralfato como pode ser observado na Tabela 4 e Figura 2.

TABELA 4 - Efeitos da administração da suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (tween 80 a 5%) na intensidade de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto

Tratamento	Medidas das lesões gástricas (mm)			I.U. (mm)	Proteção (%)	pH*	Volume gástrico (mL)
	Tipo						
	I	II	III				
Controle	33,13 ± 9,45 ^b	41,25 ± 12,34 ^a	62,28 ± 16,57 ^a	352,89 ± 19,92 ^a	-	5,43 ± 0,98	3,24 ± 0,73
Sucralfato 500 mg/kg	40,23 ± 9,85 ^b	17,67 ± 16,88 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	88,16 ± 13,56 ^b	75,02	5,14 ± 1,07	3,36 ± 0,56
BS 100 mg/kg	47,03 ± 17,09 ^b	13,56 ± 9,53 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	91,86 ± 8,68 ^b	73,97	5,63 ± 2,24	3,36 ± 1,35
BS 200 mg/kg	60,72 ± 13,54 ^a	13,05 ± 4,92 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	101,29 ± 5,98 ^b	71,30	5,57 ± 0,79	3,33 ± 0,36
BS 300 mg/kg	41,35 ± 6,98 ^b	7,90 ± 11,40 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	66,68 ± 8,78 ^b	81,10	7,00 ± 1,53	4,30 ± 1,90

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$) ($n=6$). * variável com distribuição não normal, avaliada pelo teste de *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$). As medidas (em mm) representam a soma do maior diâmetro das lesões.

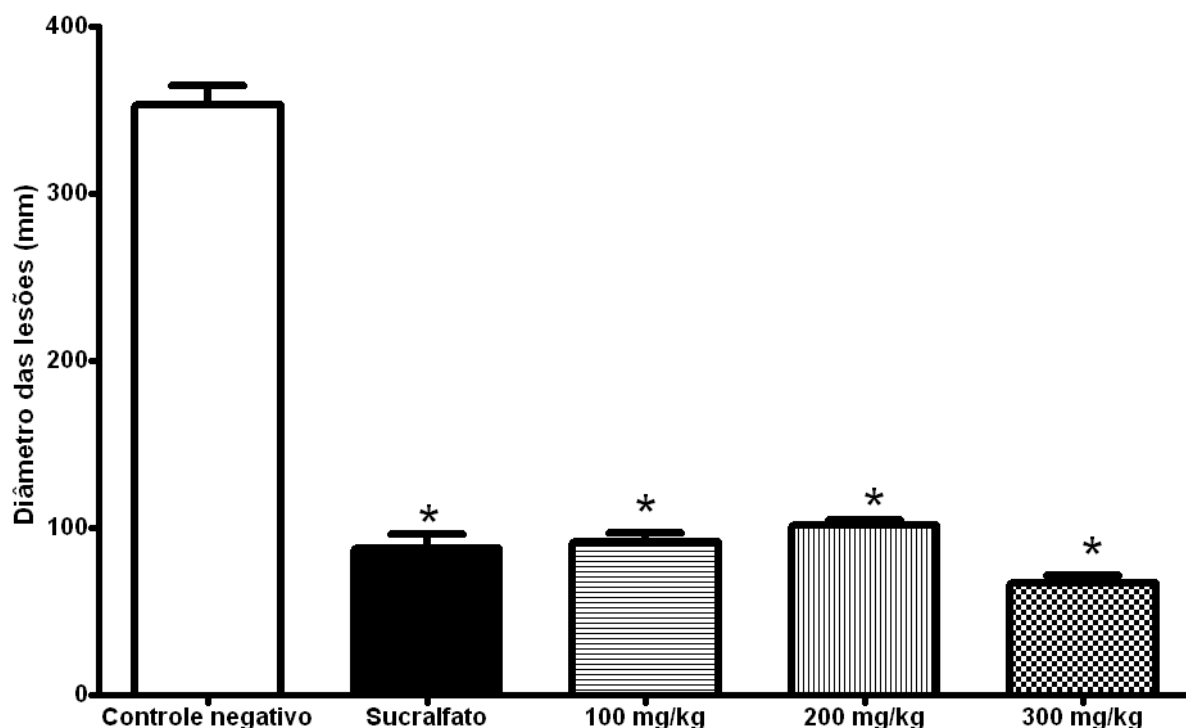


Figura 2 – Diâmetro das lesões gástricas do índice de ulceração (I.U.), induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 ou 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%). As doses são expressas em mg/kg. *significativamente diferente do grupo controle – teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

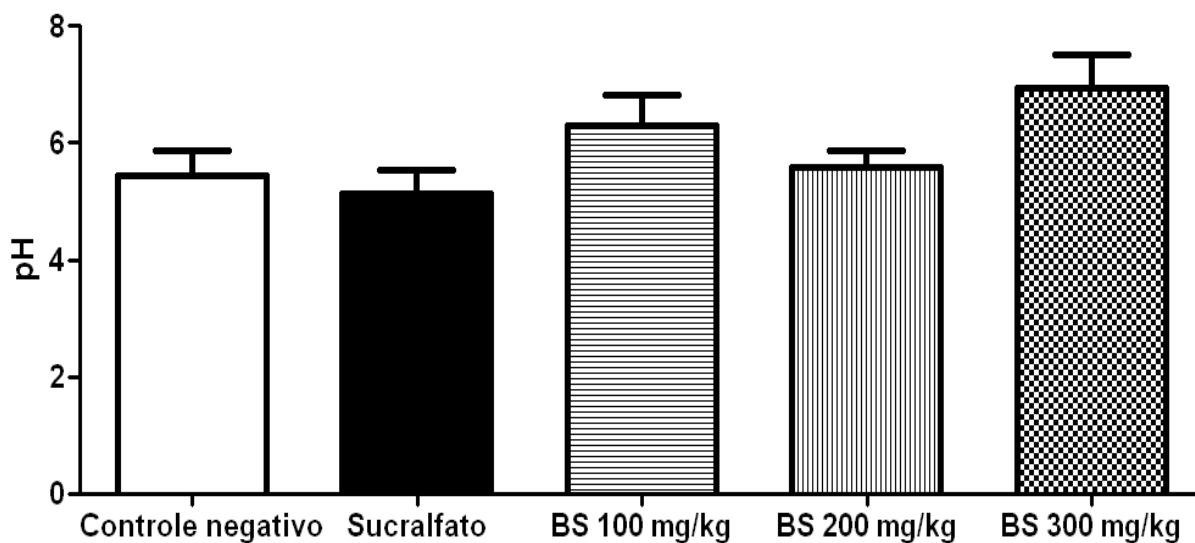


Figura 3 – Medida do pH no conteúdo gástrico após administração *p.o.* de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto. As doses são expressas em mg/kg. Variável não paramétrica – teste *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$).

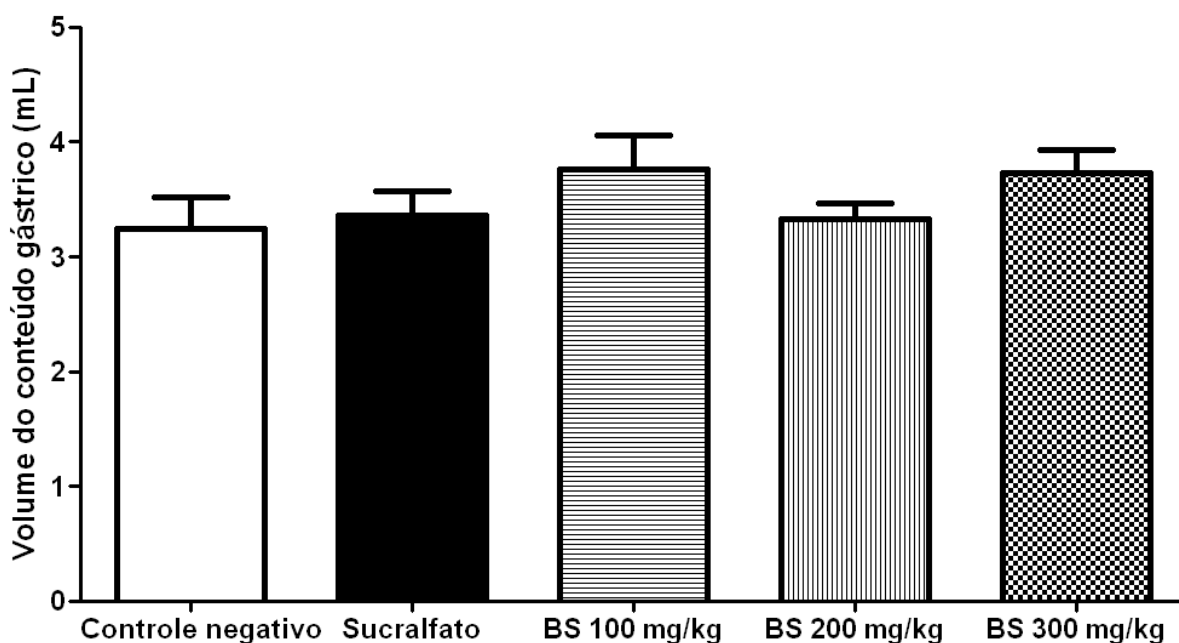


Figura 4 – Medida do volume do conteúdo gástrico (mL) do conteúdo gástrico após administração *p.o.* de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto. As doses são expressas em mg/kg. Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

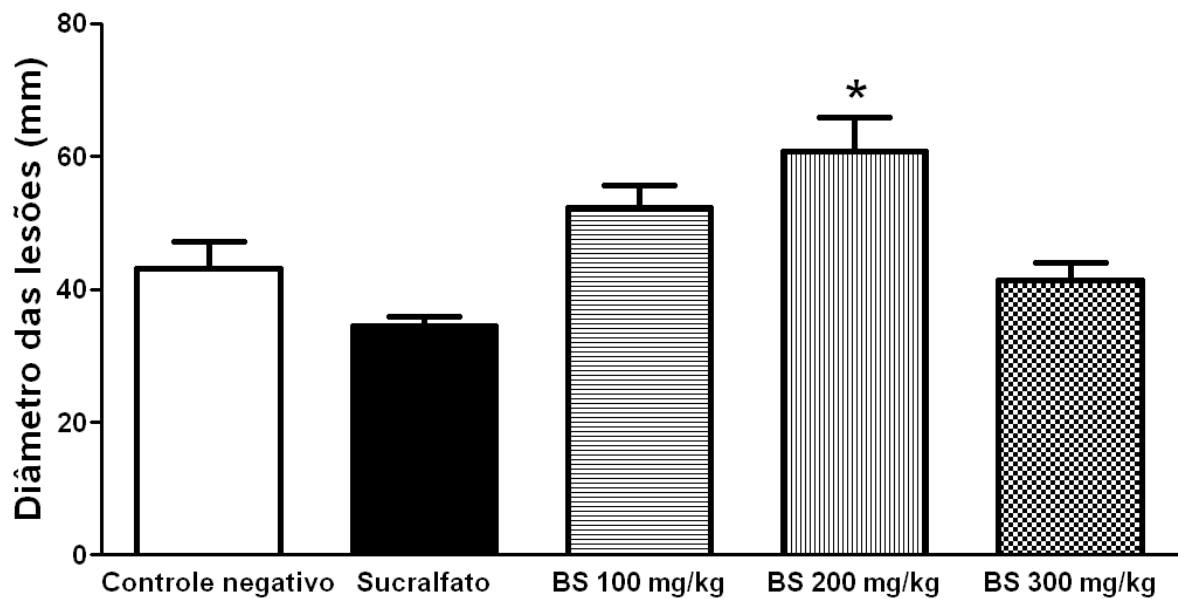


Figura 5 – Diâmetros das lesões gástricas tipo I, induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%). As doses são expressas em mg/kg. *significativamente diferente do grupo controle – teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

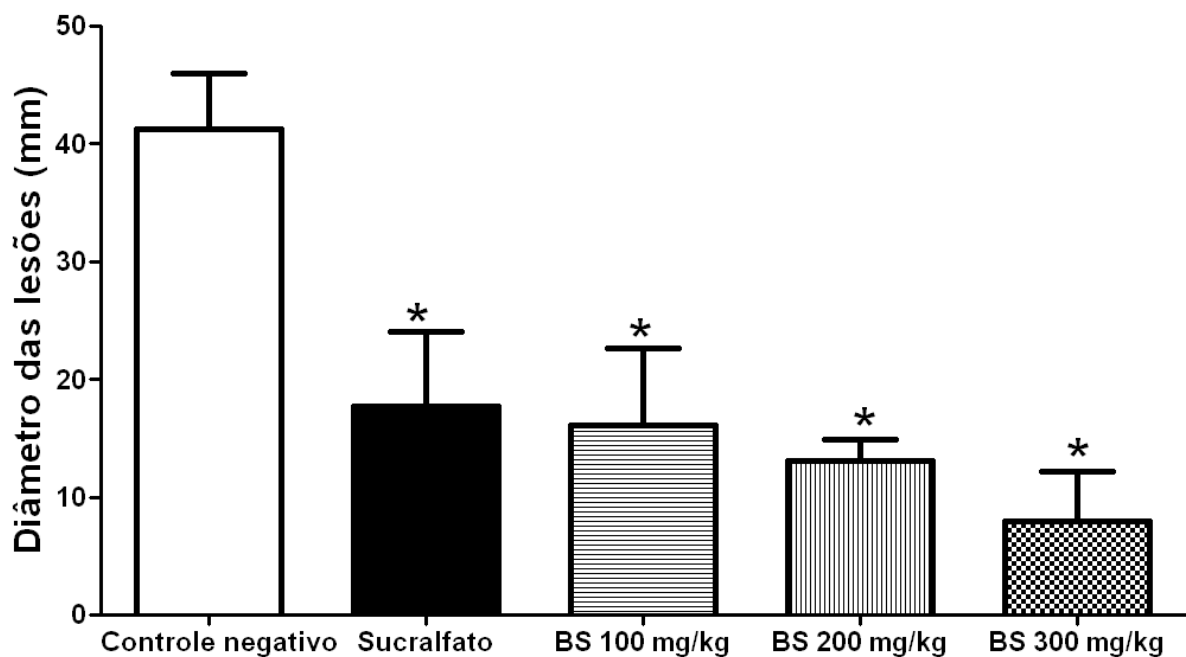


Figura 6 – Diâmetro das lesões gástricas tipo II, induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%). As doses são expressas em mg/kg. *significativamente diferente do grupo controle – teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

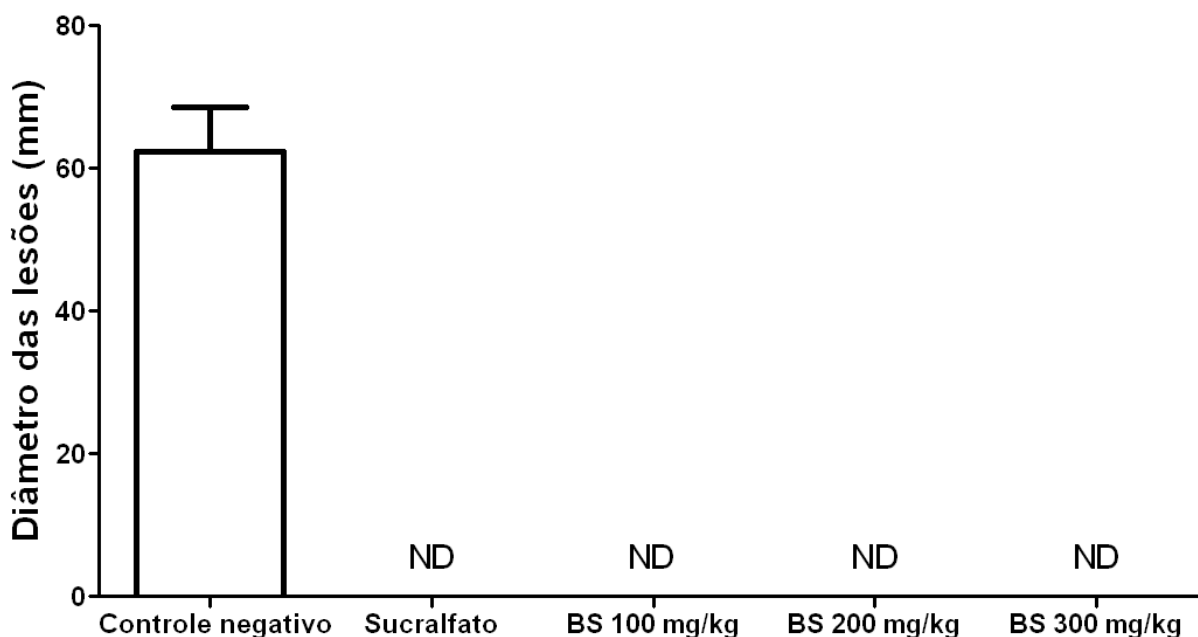


Figura 7 – Diâmetro das lesões gástricas tipo III, induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* da suspensão de BS em diferentes doses (100, 200 e 300 mg/kg), medicamento de referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle negativo (Tween 80 a 5%) e posterior administração de etanol absoluto. As doses são expressas em mg/kg. ND – não detectado.

4.2 Estudo toxicológico subcrônico

4.2.1 Sinais observados

Durante o experimento, não houve morte de nenhum animal ou sinais de alterações comportamentais. Não foram observadas anormalidades nas fezes dos animais. No entanto, duas fêmeas que receberam a dose de 300 mg/kg de BS apresentaram alterações no pêlo (63º dia) e na pata dianteira (**Figura 8**). Os outros animais que receberam a dose de 300 mg/kg de BS não apresentaram nenhuma anormalidade.

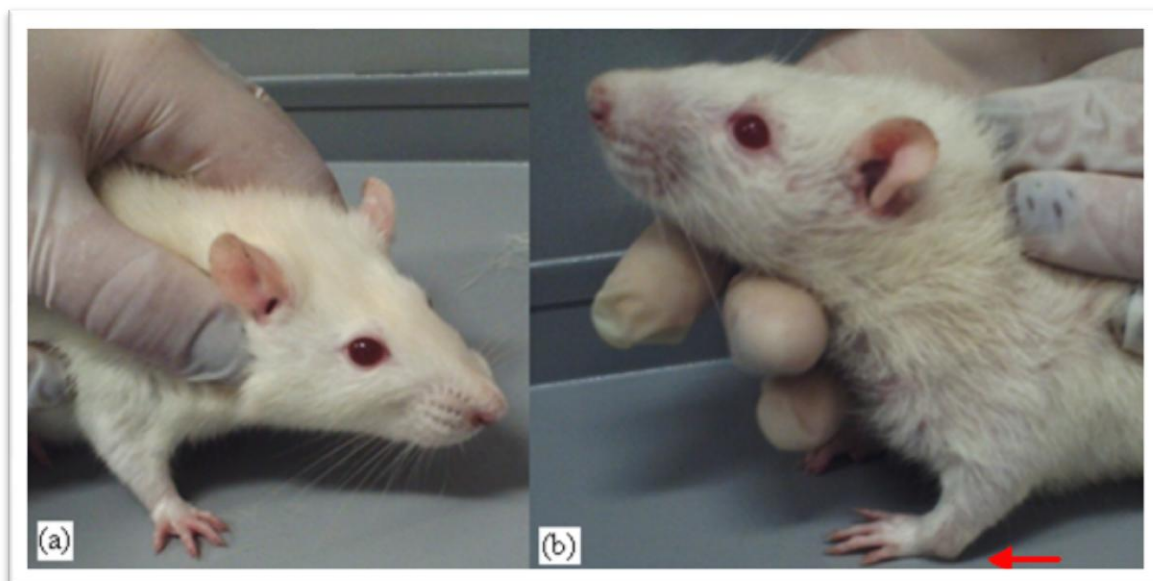


Figura 8 – Foto de ratas Wistar fêmeas tratadas com (a) controle (b) BS 300 mg/kg. A seta aponta a deformação óssea encontrada na pata dianteira da fêmea tratada.

4.2.2 Avaliação da massa corporal e do consumo de água e de ração

Não houve diferença estatisticamente significativa no consumo de água e de ração dos animais (figuras **09** e **10**), entretanto, a massa dos animais que receberam a dose de 300 mg/kg de BS, independentemente do sexo, foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle (**Figura 11**) .

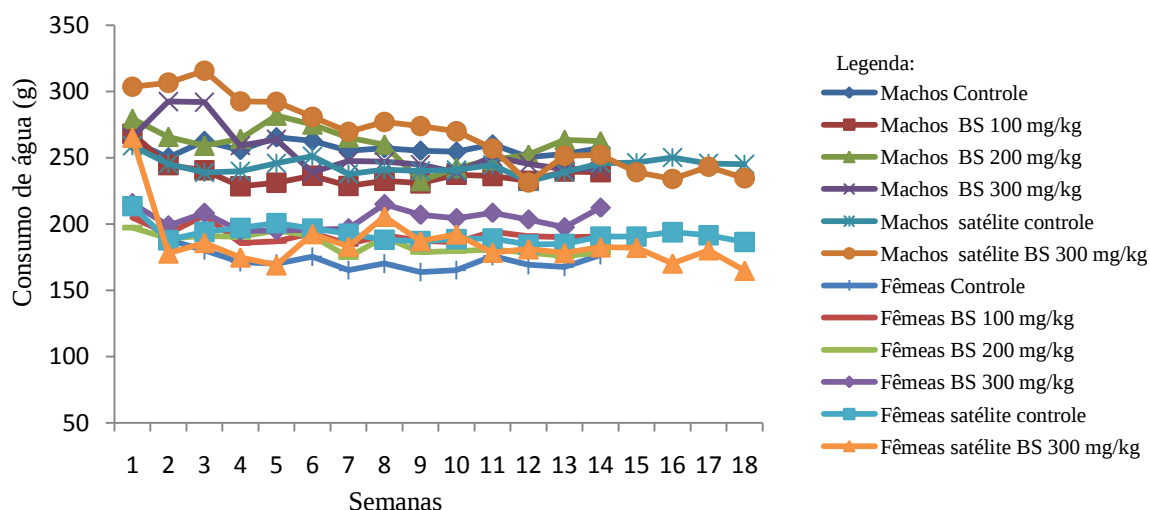


Figura 9 – Avaliação do consumo de água por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica. Os grupos teste receberam a dose de 100, 200 e 300 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Cada ponto representa a média de 10 animais (5 animais para os grupos satélites). Semanas 1 e 2 foram de climatização. Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

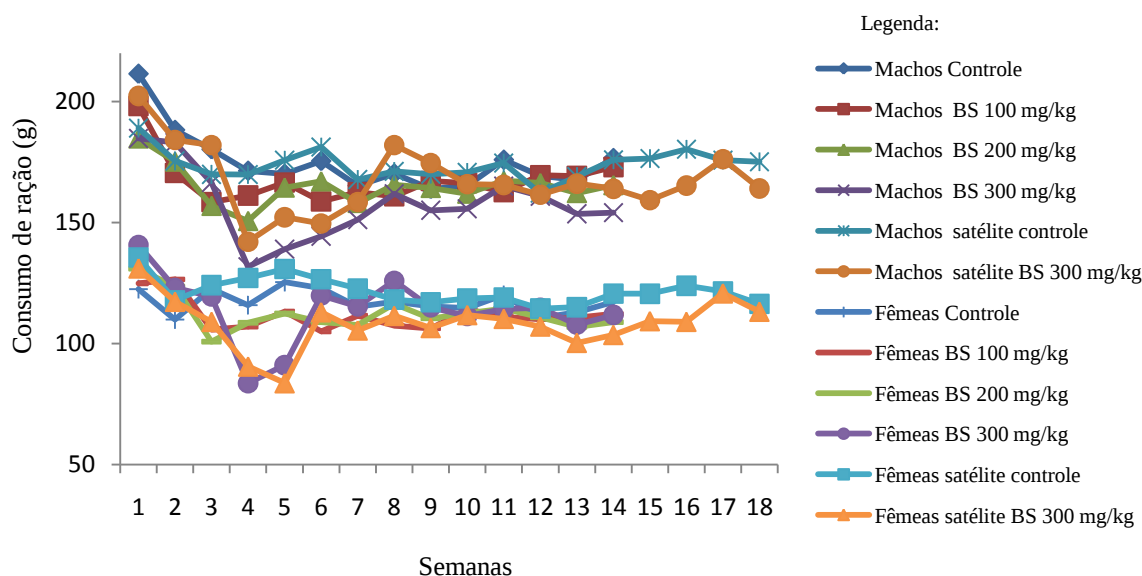


Figura 10 – Avaliação do consumo de ração por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica. Os grupos teste receberam a dose de 100, 200 e 300 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Cada ponto representa a média de 10 animais (5 animais para os grupos satélites). Semanas 1 e 2 foram de climatização. Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

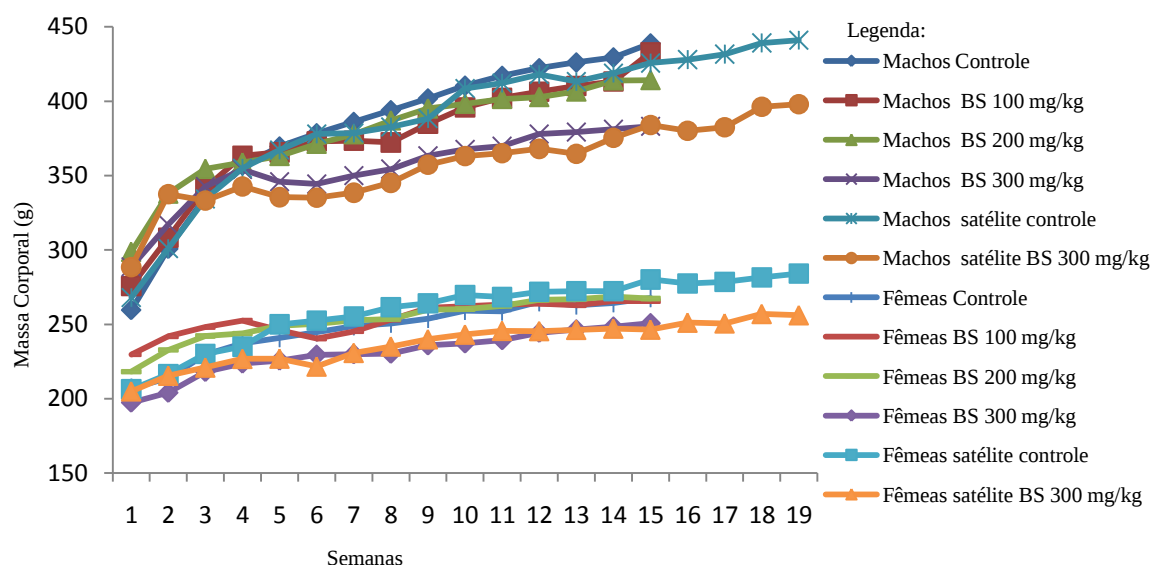


Figura 11 – Avaliação da massa corporal de ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica. Os grupos teste receberam a dose de 100, 200 ou 300 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Cada ponto representa a média de 10 animais (5 animais para os grupos satélites). Semanas 1 e 2 foram de climatização. Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

4.2.3 Avaliação histopatológica

Não houve alteração macroscópica bem como não foram encontradas alterações histopatológicas nos seguintes órgãos: coração, pulmões, estômago, intestino delgado, baço, pâncreas, supra-renais, rins, cérebro, útero e ovários ou testículo e epidídimos.

Entretanto, foram observadas alterações histopatológicas no fígado de todos os animais que receberam BS (figuras 13, 14 e 15) quando comparadas com o fígado dos ratos que receberam o controle (**Figura 12**). Essas alterações foram encontradas independentemente da dose e essa não foi reversível 30 dias após a interrupção da administração (**Figura 16**).

Foram observados hepatócitos com núcleo picnótico, ou seja, houve retração e adensamento do núcleo, com perda da individualidade dos grânulos de cromatina.

Além disso, houve eosinofilia do citoplasma, ou seja, ocorreu leve perda da basofilia que lhe é característica devido ao aumento da afinidade pelo corante eosina. Essas transformações nucleares e citoplasmáticas são alterações características de uma necrose de coagulação.

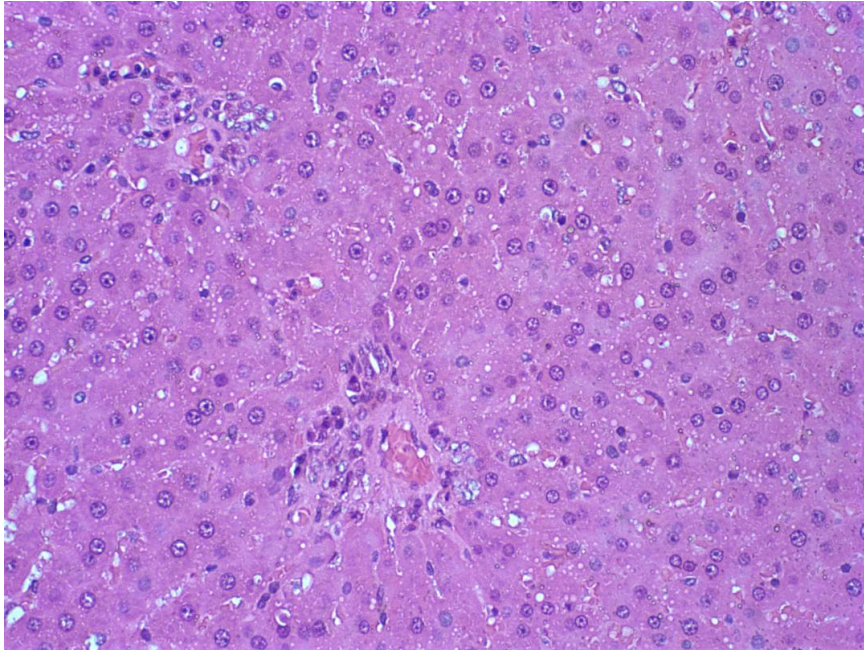


Figura 12 - Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com veículo (Tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Aumento de 40X, coloração HE.

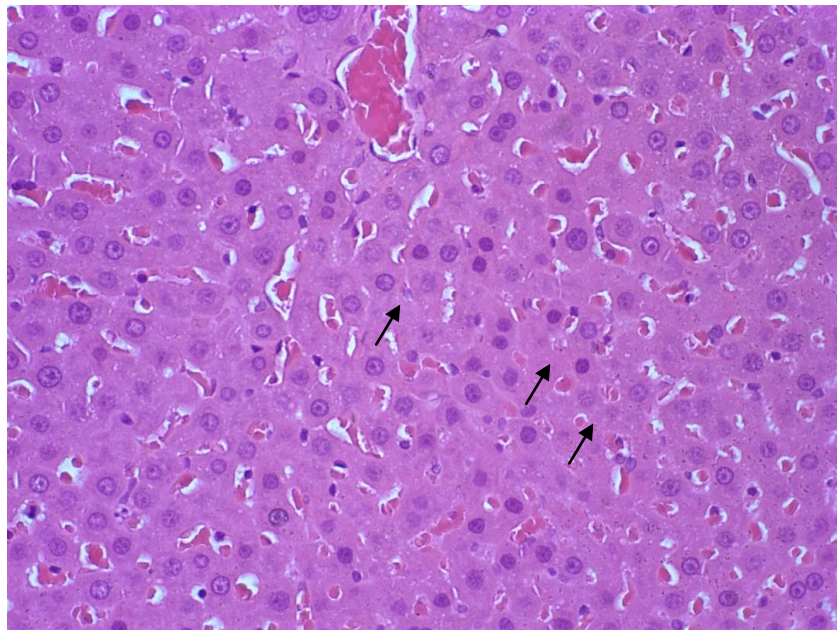


Figura 13 - Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de 100 mg/kg de BS. Aumento de 40X, coloração HE. As setas pretas apontam para os hepatócitos com núcleo picnótico e citoplasma acidófilo.

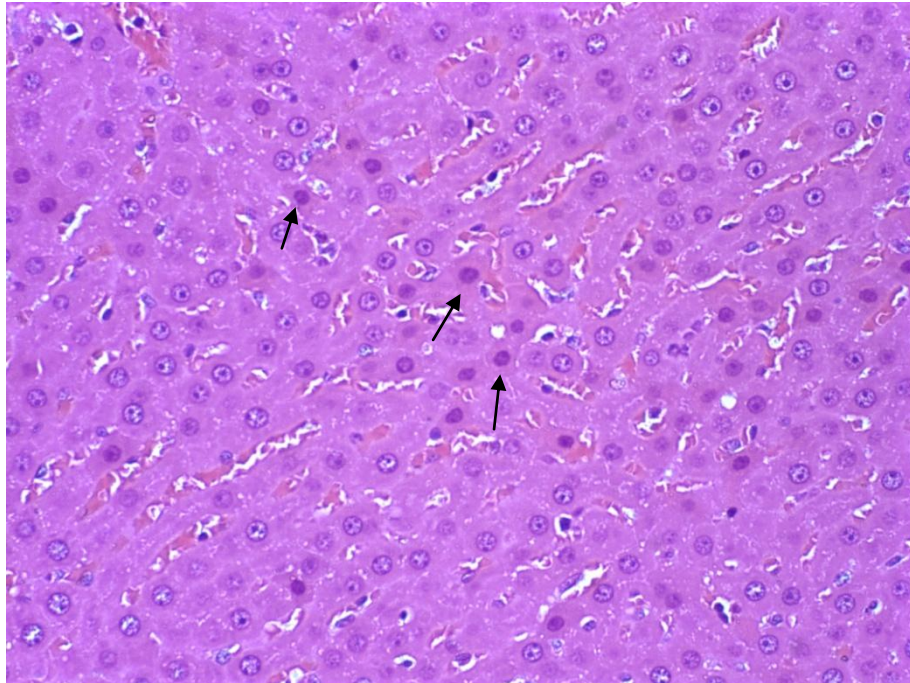


Figura 14 - Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de 200 mg/kg de BS. Aumento de 40X, coloração HE. As setas pretas apontam para os hepatócitos com núcleo picnótico e citoplasma acidófilo.

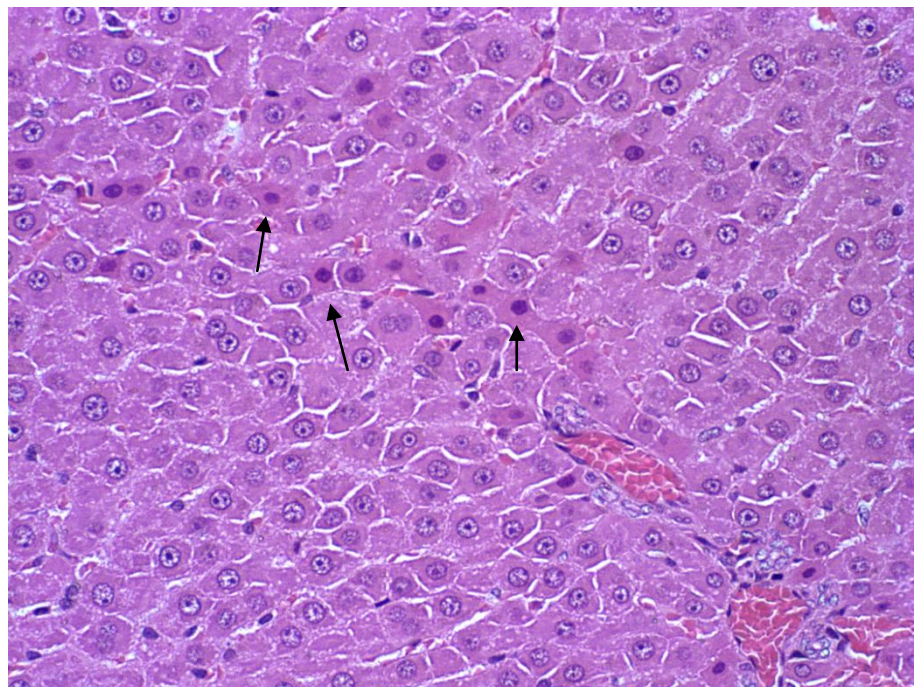


Figura 15 - Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de 300 mg/kg de BS. Aumento de 40X, coloração HE. As setas pretas apontam para os hepatócitos com núcleo picnótico e citoplasma acidófilo.

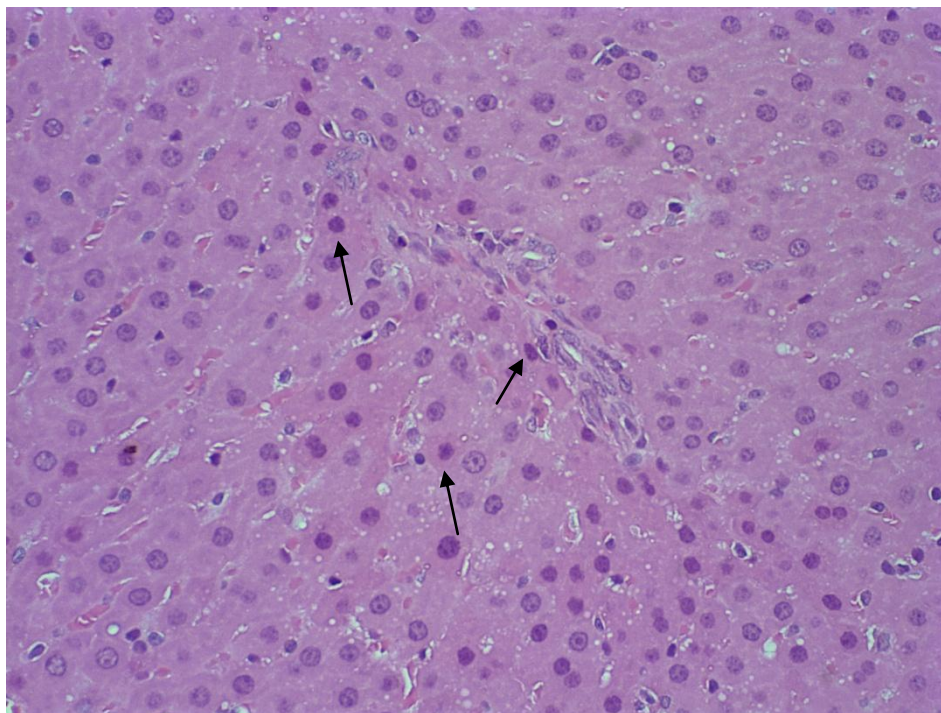


Figura 16 - Fotomicrografia de fígado de ratos Wistar tratados com a dose de satélite de 300 mg/kg de BS. Aumento de 40X, coloração HE. As setas pretas apontam para os hepatócitos com núcleo picnótico e citoplasma acidófilo.

4.2.4 Avaliação da massa dos órgãos

Como pode ser observado na Tabela 5, após a administração de BS houve um efeito na massa dos órgãos com alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos seguintes órgãos: fígado, baço e rins e supra renal.

Como pode ser observado na Tabela 5, houve aumento da massa do fígado (**Figura 17**) e do rim e da supra-renal (**Figura 18**) para os machos e fêmeas nos quais as doses de 200 ou 300 mg/kg de BS foram administradas. Para o baço (**Figura 19**), houve diminuição de sua massa nos machos e fêmeas nas doses de 200 ou 300 mg/kg.

A avaliação dos grupos satélites mostrou que esses efeitos foram reversíveis para o fígado e baço, porém, irreversíveis para o rim.

TABELA 5 - Efeitos na massa dos órgãos (em gramas de órgão por quilograma de animal) após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	Coração	Pulmão	Rim e Supra-Renal	Baço	Fígado***	Aparelho Reprodutor	Cérebro e Cerebelo***	Estômago***
Controle	Macho	3,38 ± 0,41 ^b	4,79 ± 0,42 ^b	7,78 ± 0,85 ^{aA}	2,77 ± 0,39 ^{bA}	25,54 ± 1,92 ^{aC}	14,27 ± 1,58	4,57 ± 0,37 ^{bB}	5,08 ± 0,64
	Fêmea	3,85 ± 0,33 ^a	6,85 ± 0,81 ^a	8,63 ± 0,52 ^{bA}	3,62 ± 0,59 ^{aA}	27,95 ± 2,20 ^{aC}	3,66 ± 1,02	7,80 ± 0,45 ^{aA}	5,96 ± 0,68
100 mg/kg	Macho	3,64 ± 0,31 ^b	5,54 ± 0,79 ^b	7,97 ± 1,12 ^{aAB}	2,84 ± 0,26 ^{bA}	29,78 ± 2,92 ^{aB}	14,95 ± 1,73	5,04 ± 0,65 ^{bB}	5,80 ± 0,57
	Fêmea	3,61 ± 0,20 ^a	6,73 ± 0,63 ^a	8,74 ± 0,81 ^{bAB}	3,38 ± 0,41 ^{aA}	31,38 ± 3,26 ^{aBC}	2,92 ± 0,51	7,61 ± 0,31 ^{aA}	5,49 ± 0,72
200 mg/kg	Macho	3,34 ± 0,33 ^b	4,68 ± 0,46 ^b	8,78 ± 0,67 ^{aBC}	2,48 ± 0,54 ^{bB}	34,08 ± 4,82 ^{aA}	14,27 ± 1,28	5,08 ± 0,28 ^{bB}	5,26 ± 0,80
	Fêmea	3,78 ± 0,52 ^a	6,70 ± 0,97 ^a	9,18 ± 0,77 ^{bBC}	2,74 ± 0,43 ^{aB}	36,32 ± 2,46 ^{aA}	2,77 ± 0,71	7,47 ± 0,95 ^{aA}	5,49 ± 0,96
300 mg/kg	Macho	3,44 ± 0,27 ^b	5,11 ± 0,59 ^b	8,98 ± 0,54 ^{aC}	2,11 ± 0,31 ^{bB}	31,60 ± 1,76 ^{bAB}	14,72 ± 2,39	5,32 ± 0,27 ^{bB}	4,93 ± 0,48
	Fêmea	3,69 ± 0,40 ^a	6,25 ± 0,68 ^a	9,05 ± 0,55 ^{bC}	2,90 ± 0,51 ^{aB}	37,91 ± 3,37 ^{aA}	2,71 ± 0,71	7,02 ± 1,30 ^{aA}	4,99 ± 1,24
Satélite Controle	Macho	3,61 ± 0,56	4,92 ± 0,34	7,78 ± 0,46	2,98 ± 0,44	27,09 ± 2,33	15,42 ± 1,06	4,81 ± 0,48	5,22 ± 0,66
	Fêmea	3,53 ± 0,19	6,09 ± 0,64	8,40 ± 0,60	3,44 ± 0,38	27,53 ± 1,20	4,07 ± 1,55	6,66 ± 0,35	5,83 ± 0,54
Satélite 300 mg/kg	Macho	3,80 ± 0,11	5,56 ± 0,66	8,68 ± 0,16 ^s	2,11 ± 0,51	29,14 ± 1,69	13,60 ± 0,86	4,94 ± 0,34	4,91 ± 0,39
	Fêmea	4,01 ± 0,19	6,28 ± 0,66	9,21 ± 0,92 ^s	3,21 ± 0,97	29,59 ± 1,68	3,12 ± 0,92	7,89 ± 0,65	5,65 ± 0,63

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. ^ssignificativamente diferente do grupo satélite controle. *** variável com interação sexo x dose.

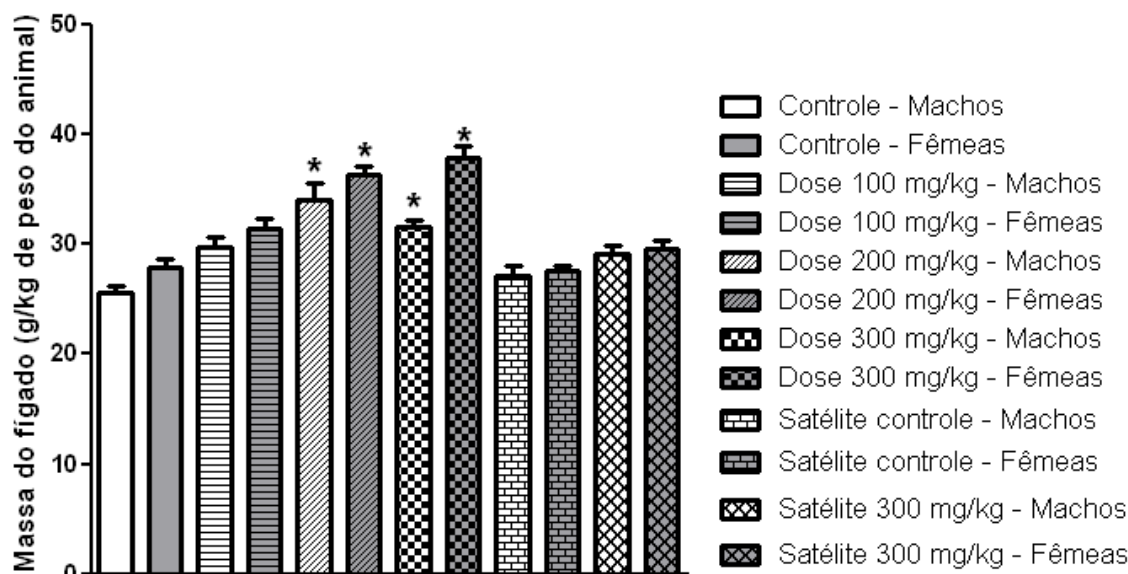


Figura 17 – Massa do fígado (em gramas de órgão por kg de animal) após administração *p.o.* em ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica. O grupo teste recebeu a dose de 100, 200 ou 300 mg/kg de BS e o grupo controle recebeu o veículo (tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Cada grupo é constituído da média de 10 animais (5 animais para os grupos satélites). *significativamente diferente do grupo controle – teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

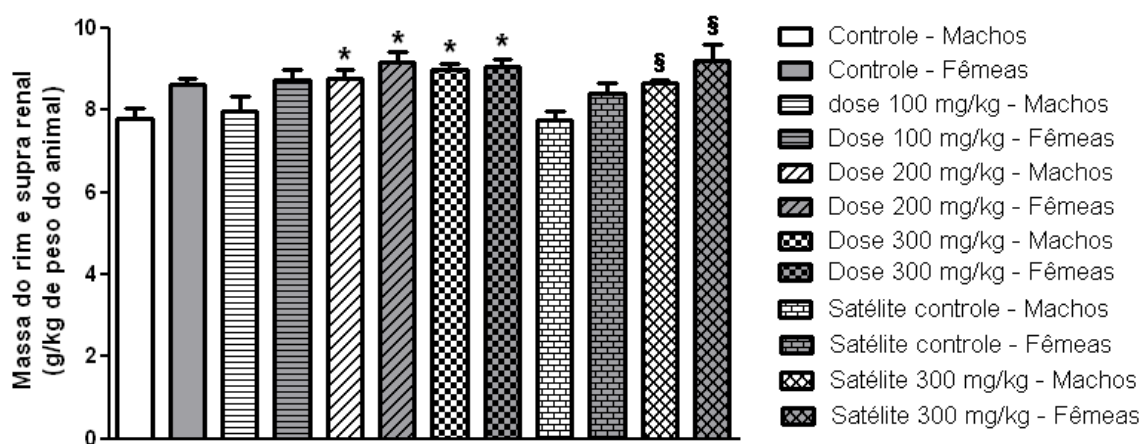


Figura 18 – Massa do rim e supra renal (em gramas de órgão por kg de animal) após administração *p.o.* em ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica. Os grupos teste receberam a dose de 100, 200 ou 300 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Cada grupo é constituído da média de 10 animais (5 animais para os grupos satélites). *significativamente diferente do grupo controle \$significativamente diferente do grupo satélite controle – teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

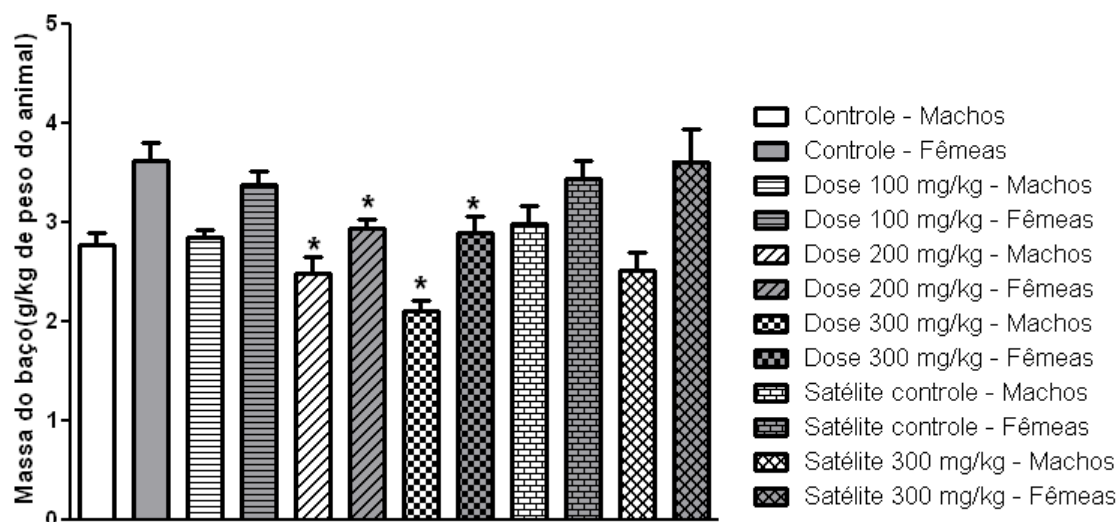


Figura 19 – Massa do baço (em gramas de órgão por kg de animal) após administração *p.o.* em ratos Wistar durante 90 dias (120 dias para os grupos satélites) no teste de toxicidade subcrônica. Os grupos teste receberam a dose de 100, 200 ou 300 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (tween 80 a 0,13% e DMSO a 0,1%). Cada grupo é constituído da média de 10 animais (5 animais para os grupos satélites). *significativamente diferente do grupo controle – teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

4.2.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Como pode ser observado na Tabela 6, houve alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o hematócrito de machos nos quais foi administrada a dose de BS de 100 ou 200 mg/kg e para as fêmeas essa alteração ocorreu nas doses de 200 ou 300 mg/kg. Na avaliação do grupo satélite de 300 mg/kg constatou-se que essa alteração não foi reversível.

A Tabela 7 demonstra que houve alteração estatisticamente significativa no RDW, MCHC e MCV de machos e fêmeas que receberam as doses de 200 ou 300 mg/kg de BS. Na avaliação do grupo satélite constatou-se que todas essas alterações foram reversíveis.

TABELA 6 - Efeitos nos parâmetros hematológicos (série vermelha) após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina g/dL	Hematócrito*** (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)
Controle	Macho	10,35 ± 0,39 ^a	16,27 ± 0,67 ^a	50,76 ± 3,51 ^{bA}	1050,67 ± 346,91
	Fêmea†	8,11 ± 0,99 ^b	14,91 ± 1,38 ^b	42,29 ± 2,81 ^{aB}	794,71 ± 208,85
100 mg/kg	Macho	10,12 ± 0,66 ^a	15,97 ± 0,90 ^a	44,45 ± 2,83 ^{aB}	1133,70 ± 265,16
	Fêmea	9,18 ± 0,63 ^b	15,64 ± 0,72 ^b	41,10 ± 2,39 ^{aB}	1089,75 ± 247,14
200 mg/kg	Macho	10,02 ± 1,70 ^a	16,68 ± 1,42 ^a	48,80 ± 1,99 ^{bA}	1069,38 ± 265,08
	Fêmea†	8,58 ± 1,11 ^a	15,50 ± 0,76 ^b	47,20 ± 4,65 ^{aA}	1029,10 ± 188,36
300 mg/kg	Macho	10,35 ± 0,57 ^b	16,72 ± 0,84 ^a	45,50 ± 3,01 ^{bB}	932,40 ± 154,61
	Fêmea	8,67 ± 0,70 ^a	14,81 ± 1,04 ^b	49,10 ± 2,88 ^{aA}	977,80 ± 207,35
Satélite Controle	Macho	10,38 ± 0,94	16,42 ± 0,70	48,32 ± 1,90	858,20 ± 131,89
	Fêmea	9,73 ± 0,43	16,48 ± 0,28	47,58 ± 2,27	988,00 ± 114,43
Satélite 300 mg/kg	Macho	10,92 ± 0,33	17,06 ± 0,44	45,60 ± 1,30 ^s	960,80 ± 94,68
	Fêmea	9,43 ± 0,32	15,76 ± 0,57	43,80 ± 2,17 ^s	1070,40 ± 394,83

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). † n=9/grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. ^ssignificativamente diferente do grupo satélite controle. *** variável com interação sexo x dose.

TABELA 7 - Efeitos nos parâmetros hematológicos após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	Global de leucócitos (x10 ³ /mm)	Linfócitos (x10 ³ /mm)	Linfócitos (%)	Monócitos (x10 ³ /mm)	Monócitos (%)	Granulócitos** (x10 ³ /mm)	Granulócitos** (%)
Controle	Macho	9,83 ± 2,12 ^a	5,31 ± 1,89	66,89 ± 9,37 ^b	0,29 ± 0,18	3,78 ± 2,05	2,23 ± 0,64	29,33 ± 8,31
	Fêmea†	7,61 ± 1,46 ^b	4,42 ± 1,43	69,57 ± 7,35 ^a	0,29 ± 0,10	5,57 ± 2,57	1,35 ± 0,36	24,86 ± 6,44
100 mg/kg	Macho	9,75 ± 3,01 ^a	6,13 ± 2,04	62,90 ± 7,39 ^b	0,40 ± 0,25	4,20 ± 2,15	2,21 ± 1,23	32,90 ± 6,24
	Fêmea	7,19 ± 1,83 ^b	4,86 ± 1,60	66,75 ± 4,83 ^a	0,37 ± 0,10	5,25 ± 1,58	1,96 ± 0,33	28,00 ± 4,84
200 mg/kg	Macho	9,95 ± 1,61 ^a	6,20 ± 1,95	67,40 ± 8,09 ^b	0,43 ± 0,27	4,40 ± 2,72	2,83 ± 0,97	28,20 ± 7,24
	Fêmea†	7,90 ± 1,96 ^b	5,66 ± 1,63	71,80 ± 8,05 ^a	0,35 ± 0,20	4,30 ± 2,26	1,90 ± 0,76	24,50 ± 8,64
300 mg/kg	Macho	9,31 ± 2,09 ^a	6,04 ± 1,88	64,00 ± 7,02 ^b	0,45 ± 0,22	4,80 ± 2,30	2,83 ± 0,55	31,20 ± 6,96
	Fêmea	10,04 ± 2,70 ^b	6,47 ± 2,35	69,60 ± 5,70 ^a	0,32 ± 0,21	3,20 ± 2,04	2,89 ± 0,65	27,90 ± 4,84
Satélite Controle	Macho	8,84 ± 2,16	4,63 ± 2,00	54,40 ± 10,69 ^b	0,42 ± 0,24	4,80 ± 2,17	2,25 ± 0,57	32,60 ± 6,40
	Fêmea	7,70 ± 0,51	4,21 ± 0,36	74,20 ± 6,53 ^a	0,24 ± 0,19	4,00 ± 2,92	1,95 ± 0,39	22,00 ± 5,96
Satélite 300 mg/kg	Macho	9,69 ± 2,03	6,55 ± 1,87	66,80 ± 8,35	0,40 ± 0,30	3,80 ± 2,28	2,75 ± 0,67	29,40 ± 9,56
	Fêmea	7,82 ± 2,06	5,21 ± 1,14	68,40 ± 4,83	0,23 ± 0,11	3,00 ± 1,41	2,26 ± 0,88	29,00 ± 5,43

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). † n=9/grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. ** variável com distribuição não normal avaliada pelo teste de *Kruskal-Wallis* (p<0,05).

TABELA 8 - Efeitos nos parâmetros hematológicos após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	MCV	MCH	MCHC	RDW
Controle	Macho	48,63 ± 4,08 ^{bA}	15,66 ± 0,35 ^b	32,47 ± 2,31 ^B	14,56 ± 0,29 ^{aB}
	Fêmea†	50,54 ± 3,45 ^{aA}	17,36 ± 0,86 ^a	34,49 ± 0,83 ^B	14,34 ± 0,66 ^{bB}
100 mg/kg	Macho	47,20 ± 1,14 ^{bA}	15,74 ± 0,50 ^b	33,23 ± 1,22 ^B	14,26 ± 0,39 ^{aB}
	Fêmea	49,63 ± 0,92 ^{aA}	16,80 ± 0,43 ^a	33,84 ± 0,73 ^B	13,39 ± 0,44 ^{bB}
200 mg/kg	Macho	44,30 ± 1,25 ^{bB}	15,83 ± 0,58 ^b	35,99 ± 0,74 ^A	16,04 ± 0,82 ^{aA}
	Fêmea†	47,40 ± 1,78 ^{aB}	18,26 ± 1,93 ^a	37,63 ± 0,90 ^A	15,44 ± 0,37 ^{bA}
300 mg/kg	Macho	45,20 ± 1,87 ^{bB}	16,06 ± 0,48 ^b	36,17 ± 0,65 ^A	15,68 ± 0,59 ^{aA}
	Fêmea	47,60 ± 1,07 ^{aB}	17,09 ± 0,41 ^a	36,02 ± 1,07 ^A	15,81 ± 0,47 ^{bA}
Satélite Controle	Macho	45,00 ± 1,22	15,94 ± 0,89	35,42 ± 1,31	15,18 ± 0,81
	Fêmea	49,80 ± 2,17	16,98 ± 0,53	33,76 ± 0,88	14,28 ± 0,34
Satélite 300 mg/kg	Macho	45,40 ± 2,30	15,52 ± 0,29	35,28 ± 0,54	15,74 ± 0,95
	Fêmea	47,80 ± 1,30	16,70 ± 0,46	35,08 ± 0,54	14,28 ± 0,34

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). † n=9/grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. MCV – volume corpuscular médio. MCH – hemoglobina corpuscular média. MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média. RDW – índice de distribuição de normalidade.

4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Como pode ser observado nas tabelas 9, 10 e 11, houve alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos seguintes parâmetros bioquímicos: ALT, AST, GGT, FAL, bilirrubina direta e total, fósforo, glicose, uréia, creatinina, triglicérides e colesterol.

Houve aumento nas concentrações plasmáticas de ALT, AST, GGT, glicose, uréia, colesterol e fósforo para todos os animais nos quais foram administrados qualquer uma das doses de BS (100, 200 ou 300 mg/kg). Também houve aumento na FAL de todos os machos que utilizaram BS, mas, com relação às fêmeas, esse aumento foi apenas entre aquelas que receberam as doses de 200 ou 300 mg/kg.

Para a creatinina, houve diminuição estatisticamente significativa nos animais que utilizaram a dose de 300 mg/kg. Para a bilirrubina total, houve aumento tanto nos machos quanto nas fêmeas nos quais foram administradas as doses de 200 ou 300 mg/kg. Já para a bilirrubina direta, esse mesmo fenômeno foi observado para as fêmeas das doses de 200 ou 300 mg/kg, mas somente nos machos que consumiram a maior dose. Houve aumento plasmático dos triglicérides para os machos nos quais foram administrados as doses de 100 ou 200 mg/kg.

A avaliação dos grupos satélites mostrou que esses efeitos foram reversíveis para os seguintes parâmetros: FAL, bilirrubina direta, fósforo, glicose e creatinina. Enquanto que para ALT, AST, GGT, bilirrubina total, uréia, triglicérides e colesterol, essas alterações foram irreversíveis.

TABELA 9 - Efeitos nos parâmetros bioquímicos após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	ALT (U/L)	AST*** (U/L)	GGT (U/L)	FAL*** (U/L)	CK (U/L)	Amilase (U/L)
Controle	Macho	49,89 ± 8,70 ^B	45,30 ± 5,01 ^{aC}	6,22 ± 3,38 ^B	93,00 ± 23,63 ^{bD}	211,33 ± 96,67	698,11 ± 60,99 ^a
	Fêmea†	57,63 ± 12,43 ^B	45,60 ± 4,52 ^{aC}	4,11 ± 3,40 ^B	129,38 ± 53,84 ^{aC}	294,43 ± 155,04	547,88 ± 64,68 ^b
100 mg/kg	Macho	62,30 ± 10,82 ^A	60,02 ± 6,82 ^{aA}	17,56 ± 16,54 ^A	199,22 ± 54,78 ^{aC}	234,80 ± 119,95	847,30 ± 168,50 ^a
	Fêmea	79,80 ± 30,04 ^A	54,30 ± 5,81 ^{bA}	12,03 ± 10,11 ^A	130,90 ± 49,73 ^{bC}	188,90 ± 79,87	651,11 ± 108,02 ^b
200 mg/kg	Macho	81,00 ± 14,37 ^A	50,11 ± 4,91 ^{bB}	27,45 ± 18,58 ^A	225,60 ± 97,76 ^{aB}	154,10 ± 75,62	832,50 ± 79,42 ^a
	Fêmea†	80,75 ± 12,09 ^A	54,13 ± 2,30 ^{aA}	19,27 ± 14,52 ^A	204,10 ± 88,86 ^{bB}	226,70 ± 141,62	624,20 ± 73,63 ^b
300 mg/kg	Macho	94,75 ± 4,50 ^A	51,20 ± 2,62 ^{aB}	22,55 ± 16,59 ^A	232,20 ± 62,31 ^{bA}	218,10 ± 78,56	782,90 ± 273,28 ^a
	Fêmea	87,75 ± 9,22 ^A	50,60 ± 4,84 ^{aB}	16,85 ± 18,34 ^A	249,00 ± 65,24 ^{aA}	272,30 ± 148,10	522,40 ± 107,98 ^b
Satélite Controle	Macho	66,30 ± 19,35	41,75 ± 10,87	8,15 ± 2,80	110,80 ± 23,51	255,80 ± 122,77	764,80 ± 73,50
	Fêmea	65,90 ± 10,37	44,60 ± 4,93	3,94 ± 2,18	108,00 ± 33,77	233,25 ± 55,78	565,00 ± 31,04
Satélite 300 mg/kg	Macho	79,10 ± 44,66 ^S	49,80 ± 2,17 ^S	20,70 ± 9,27 ^S	124,00 ± 29,45	281,00 ± 38,74	662,75 ± 74,09
	Fêmea	71,20 ± 21,22 ^S	49,25 ± 2,50 ^S	23,55 ± 4,63 ^S	113,00 ± 44,74	298,20 ± 89,06	583,20 ± 106,84

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). † n=9/grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. ^Ssignificativamente diferente do grupo satélite controle. *** variável com interação sexo x dose. ALT – alanina aminotransferase, AST – aspartato aminotransferase, FAL – fosfatase alcalina, GGT – gama glutamiltransferase, CK – creatinina quinase. U – unidade internacional.

TABELA 10 - Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteínas Totais (mg/dL)	Albumina (g/dL)	Triglicérides (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
Controle	Macho	212,78 ± 69,95 ^B	27,11 ± 4,51 ^C	0,71 ± 0,13 ^{bA}	6,78 ± 0,28 ^b	2,86 ± 0,16	86,44 ± 35,06 ^{aB}	105,11 ± 24,84 ^C
	Fêmea†	174,88 ± 21,40 ^B	27,00 ± 3,51 ^C	0,51 ± 0,22 ^{aA}	7,48 ± 0,27 ^a	3,26 ± 0,16	93,63 ± 34,93 ^{bB}	95,00 ± 30,15 ^C
100 mg/kg	Macho	289,60 ± 98,71 ^A	34,80 ± 5,65 ^B	0,79 ± 0,13 ^{bA}	7,20 ± 0,26 ^b	2,83 ± 0,21	150,60 ± 47,11 ^{aA}	126,10 ± 12,28 ^B
	Fêmea	252,00 ± 117,42 ^A	30,70 ± 3,86 ^B	0,52 ± 0,19 ^{aA}	8,17 ± 0,59 ^a	3,19 ± 0,25	83,30 ± 54,22 ^{bB}	112,00 ± 14,49 ^B
200 mg/kg	Macho	315,50 ± 78,13 ^A	35,90 ± 19,81 ^B	0,74 ± 0,19 ^{bA}	8,48 ± 1,51 ^b	2,42 ± 0,25	152,60 ± 39,84 ^{aA}	146,90 ± 29,24 ^A
	Fêmea†	322,80 ± 73,21 ^A	39,80 ± 3,46 ^B	0,58 ± 0,36 ^{aA}	8,18 ± 0,77 ^a	3,01 ± 0,59	87,90 ± 15,77 ^{bB}	131,40 ± 23,65 ^A
300 mg/kg	Macho	268,20 ± 75,76 ^A	71,90 ± 23,57 ^A	0,46 ± 0,15 ^{bB}	7,86 ± 0,40 ^b	3,28 ± 0,29	97,10 ± 60,14 ^{aAB}	128,10 ± 28,05 ^{AB}
	Fêmea	276,10 ± 88,70 ^A	58,20 ± 18,37 ^A	0,44 ± 0,16 ^{aB}	8,54 ± 0,94 ^a	3,53 ± 0,44	98,10 ± 61,70 ^{bAB}	139,90 ± 30,92 ^{AB}
Satélite Controle	Macho	241,20 ± 77,98	35,75 ± 5,06	0,72 ± 0,08	7,62 ± 0,33	2,02 ± 0,67	89,20 ± 15,13	115,40 ± 21,17
	Fêmea	184,00 ± 70,53	38,20 ± 7,56	0,43 ± 0,22	8,10 ± 0,20	3,85 ± 1,57	92,75 ± 12,47	111,25 ± 14,82
Satélite 300 mg/kg	Macho	343,75 ± 92,34	53,60 ± 3,95 [§]	0,73 ± 0,10	8,38 ± 0,69	3,08 ± 0,10	98,50 ± 23,56 [§]	132,25 ± 14,84 [§]
	Fêmea	205,20 ± 47,53	43,25 ± 6,95 [§]	0,50 ± 0,10	9,78 ± 0,41	3,62 ± 0,18	96,40 ± 23,73 [§]	138,00 ± 10,07 [§]

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). † n=9/grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. [§]significativamente diferente do grupo satélite controle.

TABELA 11 - Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração *per os* de BS durante 90 dias em ratos Wistar.

Grupos	Sexo	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Ácido Úrico (mg/dL)	Cálcio (mg/dL)	Cloreto mEq/L	Fósforo (mg/dL)
Controle	Macho	0,09 ± 0,08 ^{ab}	0,39 ± 0,22 ^B	0,91 ± 0,54	9,52 ± 1,12 ^b	100,67 ± 2,29	8,39 ± 1,01 ^B
	Fêmea†	0,07 ± 0,05 ^{bb}	0,31 ± 0,13 ^B	1,21 ± 0,39	9,08 ± 1,80 ^a	99,60 ± 10,36	7,88 ± 1,54 ^B
100 mg/kg	Macho	0,07 ± 0,06 ^{ab}	0,36 ± 0,17 ^B	1,09 ± 0,47	8,81 ± 0,46 ^b	110,50 ± 3,41	9,33 ± 0,81 ^A
	Fêmea	0,08 ± 0,04 ^{bb}	0,35 ± 0,06 ^B	1,28 ± 1,54	9,60 ± 0,95 ^a	101,30 ± 9,60	9,80 ± 2,84 ^A
200 mg/kg	Macho	0,11 ± 0,04 ^{aAB}	0,54 ± 0,14 ^A	1,44 ± 2,78	8,61 ± 2,43 ^b	110,20 ± 3,61	11,22 ± 2,06 ^A
	Fêmea†	0,13 ± 0,04 ^{ba}	0,43 ± 0,16 ^A	1,25 ± 1,15	9,00 ± 1,31 ^a	109,67 ± 9,07	9,23 ± 2,26 ^A
300 mg/kg	Macho	0,19 ± 0,03 ^{aA}	0,48 ± 0,11 ^A	0,96 ± 0,25	9,54 ± 1,63 ^b	112,90 ± 4,72	10,24 ± 1,02 ^A
	Fêmea	0,18 ± 0,07 ^{ba}	0,54 ± 0,09 ^A	1,04 ± 0,35	8,71 ± 0,80 ^a	109,30 ± 4,03	9,99 ± 1,01 ^A
Satélite Controle	Macho	0,10 ± 0,04	0,38 ± 0,12	1,30 ± 0,84	8,62 ± 0,36	106,60 ± 3,36	8,48 ± 0,88
	Fêmea	0,07 ± 0,04	0,32 ± 0,22	0,70 ± 0,47	9,05 ± 0,24	101,25 ± 2,87	7,65 ± 1,44
Satélite 300 mg/kg	Macho	0,06 ± 0,03	0,41 ± 0,04 [§]	1,80 ± 0,61	8,55 ± 0,44	112,75 ± 4,72	8,95 ± 0,13
	Fêmea	0,06 ± 0,02	0,50 ± 0,10 [§]	1,28 ± 0,13	9,52 ± 0,95	118,20 ± 3,35	8,56 ± 1,24

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10/grupo (n=5/grupo para os satélites). † n=9/grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses do mesmo sexo. Letras minúsculas – comparação entre sexos na mesma dose. § significativamente diferente do grupo satélite controle.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi observado o efeito protetor de BS sobre a mucosa gástrica em todas as doses usadas (100, 200 e 300 mg/kg) em lesões de intensidade moderada a maior (lesões tipo II e III). Houve, também, manutenção do pH e volume gástrico em todos os grupos. Com relação às lesões do tipo I, apenas o grupo que recebeu a dose de BS de 200 mg/kg apresentou valor significativamente maior que o grupo que utilizou o controle negativo.

A etiologia das úlceras gástricas induzidas por etanol pelos fatores de agressão foi citada na Tabela 3 e, dentre esses fatores, é importante ressaltar o aumento da geração de radicais livres e a diminuição de produção de glutathione (GSH) endógena (GLAVIN, SZABO, 1992; LA CASA *et al.*, 2000; MacMATH, 1990).

A geração de radicais livres e a depleção de GSH são causas importantes no dano à mucosa gástrica após a administração de etanol absoluto. Portanto a estabilização ou prevenção da formação desses radicais livres pode ser alvo potencial para a proteção ou mesmo para acelerar o reparo do dano causado ao epitélio do estômago (REPPETTO, LLESUY, 2002).

A estrutura química da molécula de BS (**Figura 1**) possui um grupo aril altamente conjugado com seu grupo substituinte e, portanto, essa substância se assemelha com antioxidantes de baixo peso molecular encontrados na literatura tais como ácido ascórbico, α -tocoferol, prolina e betaína (FOYER, NOCTOR, 2009; SHAO *et al.*, 2008). Portanto, um possível mecanismo de ação protetora de BS na mucosa gástrica de ratos poderia ser devido a captação de radicais livres.

Além disso, a ação direta do etanol na mucosa gástrica perturba os mastócitos localizados na lâmina basal, e esses respondem ao estímulo liberando histamina

(OATES, HAKKINEN, 1988). Esse mediador inflamatório também regula a produção ácida por meio do receptor H_2 (HOOGERWERF, PASRICHA, 2001).

Em ratos, a mucosa gástrica produz a histamina através de um processo de descarboxilação intracelular da histidina por uma enzima substrato-específica: a histidina descarboxilase (SCHAYER, 1957). Estudos *in vivo* e *in vitro* estabeleceram que a piridoxima é uma coenzima necessária para essa reação (ONO, HAGEN, 1959) e que a semicarbazida é capaz de inibir a atividade da histidina descarboxilase em rins de porcos da Índia (WERLE, HEITZER, 1938).

Foi demonstrado que a quantidade endógena de histamina na mucosa gástrica de um rato é reduzida significativamente quando o animal é mantido em uma dieta deficiente de piridoxima por duas semanas. Uma redução ainda maior é obtida quando a semicarbazina é administrada simultaneamente em dose diária de 100 mg/kg (KAHLSON *et al.*, 1963).

Nosso grupo de pesquisa recentemente verificou que a BS, em meio ácido, degrada em seus substratos prévios: semicarbazida e benzaldeído (dados ainda não publicados). A reação de degradação encontra-se na Figura 20.

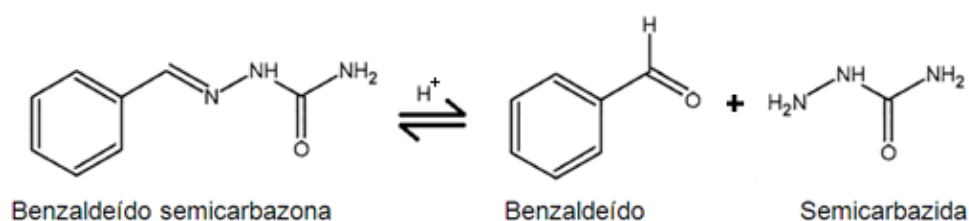


Figura 20 – Benzaldeído semicarbazona e seus metabólitos de degradação.

Dessa forma, sugere-se que BS esteja degradando no suco gástrico e que a liberação de semicarbazida proveniente dessa reação esteja inibindo a histidina

descarboxilase. Assim, a liberação de histamina endógena é diminuída e, conseqüentemente, ocorre o efeito gastroprotetor na mucosa dos animais.

Como não foi possível determinar se somente um ou mesmo a conjunção dos dois mecanismos anteriormente citados foram responsáveis pelo efeito observado, é recomendado que estudos adicionais sejam realizados.

Os estudos pré-clínicos têm por objetivo a caracterização dos efeitos tóxicos considerando órgão alvo, dose dependência, tempo de exposição, reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem ou desaparecem (EATON, KLASSEN, 1996). Essas informações são importantes para a estimativa da dose segura inicial para os ensaios clínicos e identificação de parâmetros para a monitorização clínica dos efeitos adversos potenciais (FDA, 2010).

Na avaliação do consumo de água e ração, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Esse parâmetro é importante, pois, indica que nenhuma das alterações que os animais sofreram foi causada por desnutrição e/ou por desidratação (CAMPBELL *et al.*, 2009; RAO, 2002).

Na avaliação hematológica, não foi verificada alteração com significado clínico. Esses resultados são de grande relevância pois os sinais de toxicidade encontrados em roedores apresentam alto valor preditivo (cerca de 91%) quando comparados com os sinais de toxicidade encontrados para humanos (OLSON *et al.*, 2000).

Na análise de todas as alterações encontradas no presente estudo, demonstrou-se que, durante o período de 90 dias de exposição a diferentes doses de BS, os tecidos mais afetados são o hepático e o ósseo.

Substâncias de naturezas químicas distintas atuam sobre os hepatócitos, inicialmente, por vias diversas. Não obstante, os eventos bioquímicos seguem um caminho comum. A maioria dos fármacos que causa hepatotoxicidade parece provocar alterações das membranas celulares e do retículo endoplasmático causando, com isso, modificações da permeabilidade da membrana plasmática, inibição da síntese protéica, bloqueio do transporte dos lipídeos e diminuição da produção de energia, levando, finalmente, à necrose (GREER *et al.*, 2009).

É amplamente conhecido que um efeito adverso freqüentemente induzido pelos anticonvulsivantes é a hepatotoxicidade, como pode ser observado na Tabela 2. BS, assim como outros anticonvulsivantes, também induziu hepatotoxicidade em ratos Wistar (BJÖRNSSON, 2008; MURRAY, HADZIC, 2008). Esse efeito adverso pode ser visto por meio dos parâmetros bioquímicos alterados: ALT, AST, GGT e glicose nos animais tratados com todas as doses e; FAL, bilirrubina direta e total nos animais tratados com as doses de 200 ou 300 mg/kg.

Também pode ser observada a hepatotoxicidade por meio do aumento da massa do fígado nos animais que foram tratados com as doses de 200 ou 300 mg/kg, bem como por meio da análise histopatológica na qual foram encontrados hepatócitos com o aspecto de corpos acidófilos geralmente isolados e esparsos irregularmente nos lóbulos de animais tratados com todas as doses. No presente estudo, verificou-se maior freqüência desses hepatócitos alterados perto dos capilares sinusóides. Esta é uma alteração freqüentemente induzida por várias substâncias hepatotóxicas (ROBBINS *et al.*, 1998).

Existem poucos fármacos que causam hepatotoxicidade de forma previsível e dose-dependente, como é o caso do paracetamol. A maioria dos casos de lesão é idiossincrática e o risco é aumentado quanto maior a dose e a duração do tratamento (BJÖRNSSON, 2008). Apesar do aumento da concentração de algumas enzimas plasmáticas terem sido dose dependente, aparentemente, BS também não causa hepatotoxicidade por meio de um mecanismo de ação dose-dependente, pois,

durante o exame histopatológico, foram encontrados hepatócitos alterados com igual frequência para todas as doses.

As enzimas que são rotineiramente utilizadas no diagnóstico de lesão hepática que são AST, ALT, GGT e FAL. ALT e GGT estão presentes em vários tecidos (fígado, rins, pâncreas), porém, as atividades plasmáticas refletem, primariamente, a lesão hepática. AST é encontrada no fígado, nos músculos cardíaco e esquelético e, em proporção limitada, nos eritrócitos. A FAL é principalmente encontrada em ossos e fígado. Assim, com base na distribuição tecidual, a ALT e a GGT são consideradas marcadores específicos da função hepática (DUFOUR, 2008).

A Figura 21 demonstra a localização celular das enzimas hepáticas e, por meio dela, é possível observar que AST está localizada no citoplasma e na mitocôndria do hepatócito enquanto que ALT só está presente no citoplasma. A alteração nas membranas do hepatócito causa a liberação dessas enzimas no plasma, tornando-as aumentadas. As enzimas FAL e GGT são consideradas indicadores laboratoriais da ocorrência de colestase porque a sua localização no hepatócito denota que o fármaco foi capaz de obstruir o fluxo de bile (RAMAIAH, 2007).

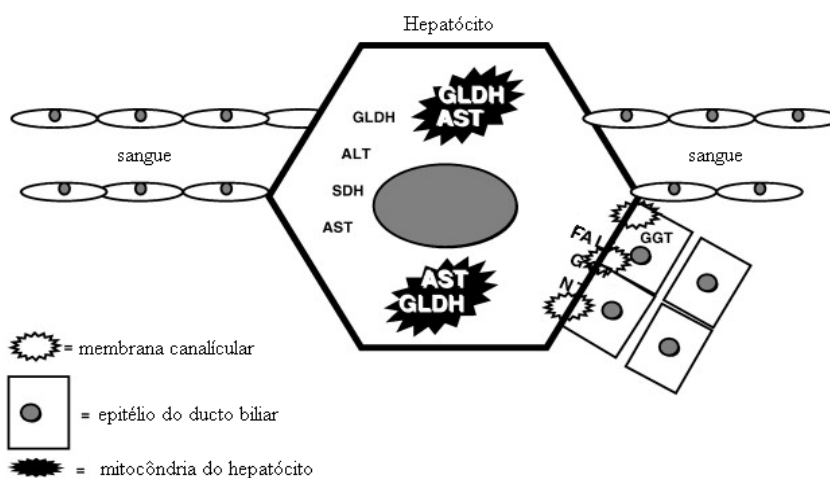


Figura 21 – Localização das enzimas hepáticas.

Fonte: RAMAIAH, 2007

Às vezes, são encontrados aumentadas as enzimas hepáticas ALT e AST em pacientes portadores de hepatopatias colestáticas (CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1997; LUCENA *et al.*, 2009). Não obstante, a bile é uma via importante no mecanismo de excreção de colesterol o qual é convertido pelo fígado em ácidos biliares que posteriormente são eliminados no intestino delgado. Por isso, o aumento do colesterol no plasma é comumente encontrado em pacientes com colestase (MARRA *et al.*, 2008; TRAUNER *et al.*, 2010).

A bilirrubina é um produto de degradação do grupo heme. É extraída e biotransformada no fígado e excretada na bile e urina (DUFOUR, 2008). A determinação de qual tipo de bilirrubina (bilirrubina direta ou indireta) está alterada indica o local associado à lesão causada pelo agente exógeno (RAMAIAH, 2007).

O aumento de todos esses parâmetros bioquímicos indica que BS é um fármaco que causa colestase e essa está associada à retenção de bile dentro do sistema excretor. Os fármacos constituem cerca de 15% dos casos de colestase descritos na literatura (ZIMMERMAN, LEWIS, 1987). A carbamazepina e a amitriptilina são usados na neuralgia do trigêmio e ambos causam colestase. O primeiro é um anticonvulsivante, enquanto que o segundo é um antidepressivo tricíclico. (LEWIS, 2004).

Vários fármacos que causam colestase atuam inibindo a bomba exportadora de sais de bilirrubina que é também denominada BSEP;ABCB11 (GREER *et al.*, 2009). Portanto, a investigação de uma possível ação de BS nesse carreador é um passo importante a ser incluído nos próximos estudos envolvendo essa molécula.

Outra importante informação a ser considerada é proveniente um estudo de farmacocinética de um análogo de BS, o 4-[4-fluorofenoxi]benzaldeído semicarbazona, demonstrou que a circulação enteroepática é uma importante rota de eliminação e reabsorção dessa substância (RAMU *et al.*, 2000). Logo, BS poderia

estar sendo transportada pela BSEP;ABCB11, e, dessa forma, haveria aumento da concentração de sais biliares no hepatócito, provocando ação tóxica no mesmo com conseqüente diminuição da excreção de bile no intestino.

Devido à diminuição da excreção de bile, o prolongamento da colestase pode levar à deficiência de ácido biliar, causando má absorção de lipídeos e das vitaminas solúveis A, D, E e K (CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1997). Portanto, é sugerida que a causa da diminuição do ganho de peso dos animais que receberam a maior dose de BS possa ser pela diminuição da absorção de lipídeos.

Já a deficiência da absorção de vitamina D pode explicar as deformidades ósseas encontradas nos animais no presente estudo. É conhecido na literatura que a diminuição da concentração plasmática de vitamina D é uma das causas da osteomalácia (VIETH, 1999). Essa patogenia é a deficiência da mineralização da matriz do osso cortical e trabecular com acúmulo de tecido pouco mineralizado e um dos indicadores bioquímicos mais usados para caracterizá-la é o aumento da FAL (FINCH *et al.*, 1992).

Diversas condições resultam em osteomalácia como ingestão alimentar inadequada de vitamina D, exposição inadequada aos raios ultravioleta do sol, com conseqüente formação inadequada de vitamina D endógena, má absorção intestinal de vitamina D, distúrbios hereditários no receptor da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ nos tecidos-alvo, acidose crônica, defeitos tubulares renais que provocam hipofosfatemia ou acidose, intoxicação por alumínio e administração crônica de anticonvulsivante (HARRISON, 1998).

A vitamina D exerce papel essencial no organismo e necessita passar por um processo metabólico complexo até a formação do seu metabólito ativo. É difícil manter as doses diárias somente através de alimentação e, por isso, a vitamina D, além da obtenção exógena, tem também produção endógena (GRÜDTNER *et al.*,

1997). A Figura 22 é uma demonstração esquemática do metabolismo, regulação e transporte de vitamina D, bem como suas ações fisiológicas. Através dessa mesma figura é possível observar que a vitamina D ativa atua em vários órgãos, sendo, portanto, os locais onde a diminuição da concentração de $25(\text{OH})_2\text{D}$ pode causar efeitos prejudiciais.

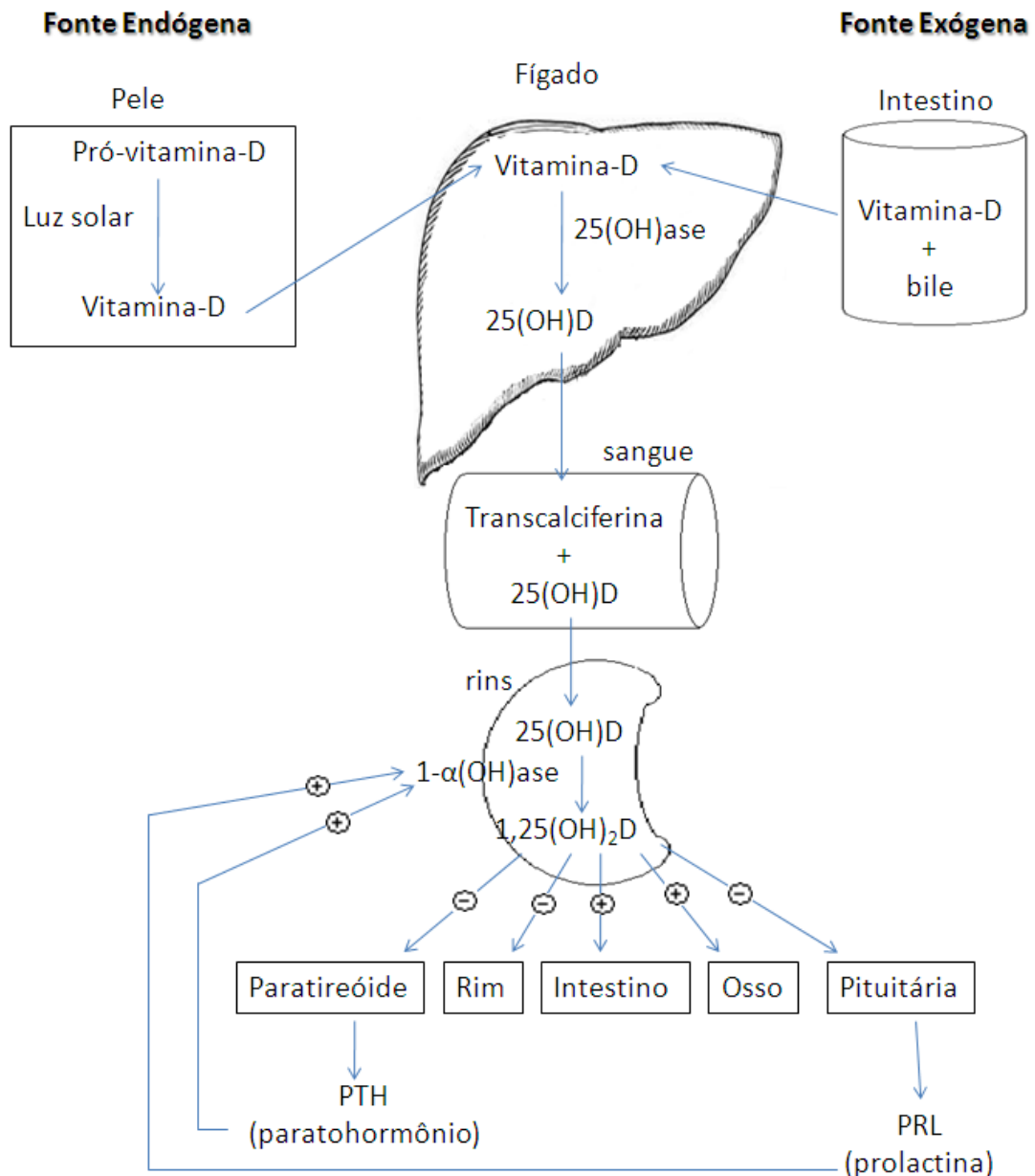


Figura 22 – Esquema do metabolismo, regulação e transporte de vitamina D.

Fonte: DUFOUR, 2008; GRÜDTNER *et al.*, 1997 (adaptado)

Como a vitamina D é hidroxilada no organismo para formar $25(\text{OH})_2\text{D}$, os pacientes com hepatopatia parenquimatosa ou obstrutiva grave podem apresentar produção reduzida desse metabólito. Entretanto, os pacientes raramente exibem evidências bioquímicas ou histológicas de osteomalácia. Com efeito, a redução franca de $25(\text{OH})_2\text{D}$ requer, em geral, deficiência nutricional concomitante ou interrupção da circulação enteroepática (DREZNER, 2000). Essa é provavelmente a causa das alterações ósseas macroscópicas visualizadas na Figura 9. É importante ressaltar que durante a observação dos animais, as fezes não estavam alteradas, dessa forma, é possível inferir que não houve interrupção total da liberação de bile, pois, caso o mesmo ocorresse, haveria sido observada a presença de fezes com esteatose.

Uma vez que a ingestão de anticonvulsivantes é de uso contínuo, a investigação dos marcadores de alteração do metabolismo ósseo é muito importante para os pacientes. Estudos indicam que 20 a 60% daqueles que utilizam anticonvulsivantes podem desenvolver osteomalácia (KULAK *et al.*, 2004). Apesar do elevado risco, VALMADRID *et al.* (2001) concluíram que apenas 41% dos neurologistas investigam rotineiramente os marcadores de metabolismo ósseo. Outro valor descoberto pela referida pesquisa demonstra que apenas aproximadamente 10% dos neurologistas prescrevem a vitamina D como tratamento profilático para o tratamento da osteomalácia induzida pelos anticonvulsivantes.

O mecanismo de ação da osteomalácia causada pelos anticonvulsivantes usados na farmacoterapia atual é ainda controverso (PACK, MORRELL, 2003). Alguns autores atribuem esse efeito adverso à indução das enzimas hepáticas do citocromo P450 e, conseqüentemente, ao aumento da depuração de vitamina D. No entanto, há fármacos como o ácido valpróico e valproato de sódio que inibem o citocromo P450. Para esses anticonvulsivantes, os pesquisadores creditam esse efeito adverso à ação direta sobre o tecido ósseo. Assim, esses fármacos aumentariam a atividade osteoclástica, aumentando a reabsorção óssea e diminuindo a densidade mineral óssea (KULAK *et al.*, 2004; PACK, MORRELL, 2003).

Assim, não foi possível determinar se somente um ou os três mecanismos mencionados (diminuição da liberação de bile, indução do citocromo P450 e ação direta sobre os osteoclastos) foi (foram) responsável(eis) pelas alterações ósseas observadas. Dessa forma, estudos complementares são necessários para a identificação do mecanismo de ação do efeito observado.

Os efeitos adversos de fármacos podem também ser causados pelos produtos de metabolização (EATON, KLASSEN, 1996). Como citado anteriormente, BS degrada-se em benzaldeído e semicarbazona na presença do H^+ (**Figura 20**). Portanto, é plausível que os efeitos observados também possam ser causados pelos produtos de degradação de BS. Em estudo recentemente publicado sobre a toxicidade subcrônica da semicarbazida foram demonstrados aumento da FAL, ALT e fósforo (TAKAHASHI *et al.*, 2009), tendo os autores detectado as mesmas alterações ósseas encontradas no presente trabalho.

Esse fato direciona as atenções ao composto de inclusão de BS em β -ciclodextrina. Em teoria, a inclusão desse composto protegeria contra a ação do H^+ estomacal acarretando dois efeitos: um é a diminuição da dose de BS necessária para seu efeito farmacológico e o outro é a redução dos efeitos adversos devido à diminuição da extensão em que a substância é degradada, pois, assim, haveria menor quantidade de semicarbazida.

Além disso, determinar a extensão na qual BS se degrada em semicarbazida após a administração de uma formulação gastroprotetora e/ou intravenosa também se torna de grande importância, pois a principal causa dos efeitos ósseos observados foi atribuída à formação desse metabólito.

Outro fator também observado é o aumento da massa dos rins e da uréia plasmática. Elevações da uréia e creatinina plasmáticas são indicativas de dano

renal (HOOGERWERF, PASRICHA, 2001). No presente estudo, foi observado o aumento da uréia, no entanto, a creatinina encontrou-se diminuída. De acordo com a literatura, essa substância pode estar diminuída quando há aumento acentuado da concentração da bilirrubina sérica (WALLACH, 1999) o que significa, portanto, que essa redução da creatinina ocorreu devido a um problema metodológico.

A análise histopatológica demonstrou que não houve dano renal. Além disso, a concentração de albumina não se encontrou diminuída e, portanto, provavelmente, não houve dano glomerular. Esses fatores não excluem a presença de um dano renal em longo prazo, pois, como pode ser observado na Figura 23, a vitamina D possui parte de seu metabolismo e auto-regulação nos rins. Porém, no período de 90 dias de administração de BS em ratos, não foi observada presença de lesão.

É importante ressaltar que a *European Medicine Agency* indica que para a continuidade dos estudos pré-clínicos deve haver uma margem de segurança da dose farmacológica para a dose tóxica da ordem de dez vezes (EMA, 2009). No presente estudo, a dose tóxica de BS foi considerada como 300 mg/kg, portanto, a dose farmacológica deveria ser, no máximo, 30 mg/kg. A dose indicada desse fármaco para tratamento da epilepsia é de 100 mg/kg, ou seja, apenas três vezes menor que a dose tóxica. Dessa forma, BS não seria adequada para o tratamento da epilepsia e da neuralgia do trigêmio.

No entanto, em protocolos realizados anteriormente no laboratório de toxicologia experimental da UFMG, BS não apresentou toxicidade relevante no estudo de toxicidade aguda, sendo classificada na categoria 5 do *Globally Harmonized System for the Classification and Labelling of Chemicals* (RODRIGUES, 2006). Isso significa que esse fármaco apresenta baixo risco toxicológico agudo. Portanto, a continuidade dos estudos para esse fármaco poderia ser indicada para tratamentos de afecções de curto prazo, como, por exemplo, antiinflamatórios.

E, finalmente, é também fundamental ressaltar que esses estudos são inéditos, sendo, portanto, um passo importante na comprovação da segurança desse candidato a novo fármaco.

6 CONCLUSÕES

Assim, com base nos resultados obtidos no presente estudo, concluímos que:

- a) Há um efeito protetor de BS sobre a mucosa gástrica em todas as doses usadas (100, 200 e 300 mg/kg) em lesões de intensidade moderada a maior (lesões tipo II e III) no modelo de lesão por etanol;
- b) BS não apresentou segurança adequada para o seu uso como anticonvulsivante e para a neuralgia do trigêmio pois ele não possui margem de segurança entre a dose farmacológica e a dose tóxica da ordem de dez vezes;
- c) mecanismos de ação conforme descrito no corpo da dissertação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, A.; POMAR, F.; SEVILLA; MONTERO, M.J. Gastric antisecretory and antiulcer activities of an ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schult. Bip. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n.3, p. 333-340, Nov. 1999.
- ASÍS, S. E.; BRUNO, A. M.; MOLINA, D. A.; CONTI, G. M.; GAOZZA, C. H. Synthesis, DNA interaction and antineoplastic activity of semicarbazone derivatives. **Farmaco**, France, v. 51, n. 6, p. 419–423, Jun. 1996.
- AUTHIER, N.; DUPUIS, E.; KWASIBORSKI, A.; ESCHALIER, A.; COUDORÉ, F. Behavioural assessment of dimethylsulfoxide neurotoxicity in rats. **Toxicology Letters**, v.132, n.2, p. 117-121, Jun. 2002.
- BARKER, G. F.; JANNETTA, P.J.; BISSONETTE, D.J.; LARKINS, M.V.; JHO, H.D. The Long-Term Outcome of Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 17, p. 1077-1084, Apr.1996.
- BASIC-KES, V.; ZAVOREIO, I.; BOSNAR-PURETIC, M.; IVANKOVIC, M.; GOVORI, V.; DEMARIN, V. Neuropathic Pain. **Acta Clinical Croat**, v. 48, n. 3, p. 359 -365, Sep. 2009.
- BERALDO, H.; SINISTERRA, R. D.; TEIXEIRA, L. R.; VIEIRA, R. P.; DORETTO, M.C. An effective anticonvulsant prepared following a host-guest strategy that uses hydroxypropyl- β -cyclodextrin and benzaldehyde semicarbazone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 296, n. 2, p. 241-246. 2002.
- BIALER, M.; WHITE, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, United States, v.9, p. 68-82, Jan. 2010.
- BIANCHI, M. L.P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, **Rev. Nutr**, v.12, n.2, p. 123-130, May/Aug. 1999.
- BIRDANE, F.M.; CEMEK, M.;BIRDANE, Y.O., Gülçin, I.; Büyükokuroğlu, M.E. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.4, p. 607-611, Jan. 2007.
- BJÖRNSSON, E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. **Acta Nerol. Scand**, v. 118, p. 281-290, Feb. 2008.
- BOYD, S.C.; SASAME, H.A.; BOYD, M.R. Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethylmaleate given subcutaneously to rats. **Life Science**, v. 28, n. 26, p. 2987-2992, Jun. 1981.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). RDC 136 de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136_03rdc.htm>. Acesso em: jan. 2009.

BROGGI, G.; FERROLI, P.; FRANZINI, A. Treatment strategy for trigeminal neuralgia: a thirty years experience. **Neurological Sciences**, v. 29, suppl. 1, p. 79 – 82, May. 2008.

CAMPBELL, M.A.; GOLUB, M.S.; LYER, P.; KAUFMAN, F.L.; LI, L. H.; MORAN MESSÉN, F.; MORGAN, J. E.; DONALD, J. M. Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. **Birth defects research part B: developmental and reproductive toxicology**, v. 86, n.3, p. 157-175, Jun. 2009.

CANAVARO, S.; BONICAZI V. Drug therapy of trigeminal neuralgia. **Expert Rev Neurother**, v. 6, p. 429-440. 2006.

CASTRO E SILVA JR., O.; CENEVIVA, R.; RIZZO, C. C.; SANKARANKUTTY, A. K.; GRANATO, R. G.; MENEGAZZO, L. A. G. Alterações hepáticas na icterícia obstrutiva. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 165-172, abr./jun. 1997.

CAVALETTI, G.; OGGIONI, N.; SALA, F.; PEZZONI, G. CAVALLETTI, E. MARMIROLI, P.; PETRUCCIOLI, M.G.; FRATTOLA, L.; TREDICI, G. Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. **Toxicology Letters**, n.118, suppl 1-2, p. 103-107, Dec. 2000.

CELESTE, R.K. Análise comparativa da legislação sobre rótulo alimentício do Brasil, Mercosul, Reino Unido e União Européia. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n.3, p. 217-223, Jun. 2001.

CELLOTTI, F.; LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem: the dual inhibition concept. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 5, p. 429 – 436, 2001.

CHEN, D.; ZHAO, C.M.; ANDERSSON, K.; MEISTER, B.; PANULA, P.; HAKANSON, R. ECL cell morphology. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 71, p. 217-231, 1998.

CZAPINSKI, P.; BLASZCZYK, B.; CZUCZWAR, S. J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Current Topics Medicinal Chemistry, Netherlands**, v. 5, n. 1, p. 3-14. 2005.

DE SIMONE, R.; RANIERI, A.; BILO, L.; FIORILLO, C.; BONAVIDA, V. Cranial neuralgias: from physiopathology to pharmacological treatment. **Neurological Sciences**, v. 29, suppl. 1, p. 69 – 78, May, 2008.

DEEKER, P. A. **Epilepsy – A manual for Medical and Clinical Officers In Africa**. Geneva: WHO, 2002. 133 p.

DIENTER, H.C.; GENDOLLA, A.; KATSARAVA, Z. Diagnosis and treatment of head and facial pain. **HNO**, v. 57, n. 9, p. 937 – 938, Sep., 2009.

DIMMOCK, J. R.; BAKER, G. B. Anticonvulsant activities of 4-bromobenzaldehyde semicarbazone. **Epilepsia**, United States, v. 35, n. 3, p. 648-655, May-Jun. 1994.

DIMMOCK, J.R.; SIDHU, K.K.; THAYER, R.S.; MACK, P., DUFFY, M.J.; REID, R.S.; QUAIL, J.W.; PUGAZHENTHI, U.; ONG, A.; BIKKER, J.A. Anticonvulsant activities of

some arylsemicarbazones displaying potent oral activity in the maximal electroshock screen in rats accompanied by high protection indices. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, n.16, p. 2243-2252, Aug. 1993.

DREZNER, M.K. Osteomalacia and Rickets. In: Goldman, L.; BENNETT, J.C. **Cecil Textbook of Medicine**, 4 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2000, p. 675 – 679.

DUFOUR, R. Doenças do fígado. In: BURTIS, C.A; ASHWOOD, E.R; BRUNS, D.E. **Tietz - Fundamentos de química clínica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 36, p. 691-712.

EATON, D.L.; KLASSEN, C.D. Principles of toxicology. In: KLASSEN, C.D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1996. Chapter 2, p. 13-33.

EBOLI, P.; STONE, J.L., AYDIN, S.; SLAVIN, K.V. Historical characterization of trigeminal neuralgia. **Neurosurgery**, v. 64, n. 6, p. 1186 – 1187, Jun. 2009.

ELGER, C. E. Epilepsy: a model for the study of brain function. **The Lancet Neurology**, England, v. 4, n. 1, p. 3, Jan. 2005.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). ICH Topic M3(R2) **Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (CMP/ICH/286/95)**. EMA, 2009. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ich/028695en.pdf>. Acesso em: jan. 2010.

Food and Drug Administration (FDA). **Guidance for industry: M3(R2) nonclinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals** FDA, 2010. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073246.pdf>. Acesso em: jan. 2010.

FINCH, P.J.; EASTWOOD, J.B.; MAXWELL, J.D. Clinical and Histological Spectrum of Osteomalacia Among Asians in South London. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 83, n.3, p. 439-448, Apr. 1992.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidant Redox Signal**, v. 11, n. 4, p. 861-905, Apr. 2009.

GALASSI, C.; BLASI, G.; GALASSI, G.; SERRA, M.; FAVERIO, A. Nevralgie trigeminali. **Parodonty and Stomatology**, v. 2, p. 45-160, 1985.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, Winnipeg, v. 6. n. 3, p. 825-831, Feb. 1992.

GONZALEZ F., PORTELA T., STIPP E. & DI STASI L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea blomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, Sep. 2001.

GRAHAM, D.Y. Peptic Ulcer Disease: Medical Therapy. In: Goldman, L.; BENNETT, J.C. **Cecil Textbook of Medicine**, 4 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2000, p. 675 – 679.

GRAFF-RADFORD, S.B. Facial pain. **Neurologist**, v. 15, n.4, p. 171 - 177, Jul. 2009.

GREER, M. L.; BARBER, J.; EAKINS, J. KENNA, J.G. Cell-based approaches for evaluation of drug-induced liver injury. **Toxicology**, doi:10.1016/j.tox.2009.08.007, Ago, 2009.

GRÜDTNER, V.S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A.L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 37, n. 3, p.143 – 151, maio/jun. 1997.

GUTH, P. H.; HALL, P. Microcirculatory and mast cell changes in restrain-induced gastric ulcer. **Gastroenterology**, v.50, p.562-570, Apr.1966.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MONTIEL-RUÍZ, C.; VÁZQUES-MARTÍNEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Lab Invest**, v. 80, n. 8, p. 1161-1169, Aug. 2000.

HILALY, EL Z.; ISRAILI AND B. LYOUSSEI, Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 43–50, 2004.

HIRUMA-LIMA, C.A. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n.3, p. 229-234, 2000.

HONDA, K.; TOMINAGA, S.; OSHIKATA, T.; KAMIYA, K.; HAMAMURA, M.; KAWASAKI, T.; WAKIGAWA, K. Thirteen-week repeated dose oral toxicity study of coenzyme Q10 in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 32, n.4, p. 437-448, Aug. 2007.

HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. Em: HARDMAN, J. G.; LIMBRID, L. E. (ED.). **Goodman and Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**, 10 ed. New York, Mc. Graw-Hill, 2001, p. 757-767.

ILYIN, V.I.; HODGES, D.D.; WHITTEMORE, E.R.; CARTER, R.B.; CAI, S.X.; WOODWARD, R.M. V102862 (Co 102862): a potent, broad-spectrum state-dependent blocker of mammalian voltage-gated sodium channels. **Br J Pharmacol**, v.144, n.6, p. 801-812, Mar. 2005.

JORGE, R.M. Avaliação anti-inflamatória, antinociceptiva e antiulcerogênica da *Maytenus ilicifolia* in vivo. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.14, n.2, p. 102, 2004.

KAHLSON, G.; ROSEGREN, E.; SVAHN, D.; THUNBERG, R. Mobilization and formation of histamine in the gastric mucosa as related to acid secretion. **Journal of Physiology**, v. 174 p.400-416, Nov.1964.

KANJANAPOTHI, A.; PANTHOG, N.; LERTPRASERTSUKE, T.; TAESOTIKUL, C.; RUJJANAWATW, D.; KAEWPINIT, R.; SUDTHAYAKORN, W.; CHOOCHOTE, U. CHAITHONG, A.; JITPAKDI AND B. PITASAWAT, Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 359–365, 2004.

KARCESKI, S.; MORRELL, M.; CARPENTER, D. The expert consensus guidelines series: treatment of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, n.2, suppl.2, p. A1-A50, Dec, 2001.

KLAUS, T. Drug Interactions with antiepileptic agents. **Wiener Klinische Wochenschrift**, Austria, v. 116, n. 4, p. 112-118, 2004.

KULAK, C. A. M.; BORBA, V.Z.C.; BILEZIKIAN, J. P.; SILVADO, C.E.; PAOLA, L.; BOGUSZEWSKI, C.L. Bone mineral density and serum levels of 25 OH vitamin D in chronic users of antiepileptic drugs. **Arq. de Neuropsiquiatr.**, v. 62, n. 4, p. 940-948, Dec. 2004.

LA CASA, C. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**. v.71, n.1-2, p. 45-53, 2000.

LA ROCHE, S. M.; HELMERS, S.L. The New Antiepileptic Drugs. **The Journal of the American Medical Association**, v.291, n. 5, p. 505-614, Feb. 2004.

LEE, A. Animal models of gastroduodenal ulcer disease. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v. 14, n.1, p. 75-96, 2000.

LEITAO, F.; FIGUEIREDO, D. Termocoagulação do trigêmio por radiofrequência: experiência em 51 casos. **Nerobiol**, v. 48, n.1, p.59-68, mar. 1985.

LEWIS, J.H.; MOHI-UD-DIN, R. Drug- and chemical-induced cholestasis. **Clinical Liver Disease**, v.8, n.1, p. 95-132, Feb. 2004.

LIPTAK, J.M.; HUNT, G.B.; BARRS, V.R.; FOSTER, S.F.; TISDALL, P.L.; O'BRIEN, C.R.; MALIK, R. Gastroduodenal ulceration in cats: eight cases and a review of the literature. **Journal of Feline Medical Surgery**, v.4, n.1, p. 27-42, Mar.2002.

LOESER, J.D. Nerve and atypical facial pain. **Journal of Canadian Dentistry Association**, v. 1, p. 125-167, 1974.

LOWENSTEIN, D. H. Convulsões e epilepsia. In: **Harrison Medicina Interna**. 14a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1998. Cap. 365, p. 2453-2467.

LUCENA, M.I.; GARCÍA-CORTÉS, M.; CUETO, R.; LOPEZ-DURAN, J.L., ANDREADE, R.J. Assessment of drug-induced liver injury in clinical practice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.22, p. 141-158, Jan. 2008.

LUEF, G.; RAUCHENZAUNER, M. Epilepsy and hormones: a critical review. **Epilepsy & Behavior**, v.15, p.73-77, May. 2009.

MacMATH, T.L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. **Emerg Med Clin North Am**, v. 8, n.4, p. 859-872, Nov. 1990.

MAKOVEK, F.; REVEL, L.; LETARI, O.; MENNUNI, L.; IMPICCIATORE, M. Characterization of antisecretory and antiulcer activity of CR 2945, a new potent and selective gastrin/CCK(B) receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 369, n. 1, p. 81-90, Mar. 1999.

MATTEI, C.; MOLGO, J.; JOSEPH, X.; ISRAEL, M.; BLOY, C. Naftazone reduces glutamate cerebro spinal fluid levels in rats and glutamate release from mouse cerebellum synaptosomes. **Neuroscience letters**, Ireland, v. 271, n. 3, p.183-186, 1999.

McCORRY, D.; CHADWICK, D.; MARSON, A. Current drug treatment of epilepsy in adults. **The Lancet Neurology**, England, v. 3, n. 12, p. 729-735, Dec. 2004.

McNAMARA, J. O. Mc. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: hardman, j. g.; limbrid, l. e. (ED.). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th ed. New York, Mc. Graw-Hill, 2001, p. 521-547.

MARRA, F.; GASTALDELLI, A.; SVEGLIATI, G.B.; TELL, G.; TIRIBELLI, C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. **Trends Mol Med**, v. 14, n.2, p. 72-81, Feb. 2008.

MURRAY, K. F.; N. HADZIC. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 47, n. 4, p.395-405, Oct. 2008.

NBR 6023:2002 – Informação e documentação – Referências – Elaboração.

NISSEN-MEYER, L.S.; SVALHEIM, S.; TAUBOLL, E.; GJERSTAD, L.; REINHOLT, F.P.; JEMTLAND, R. How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies. **Seizure**. n.17, Issue 2, p.187-191, March, 2008.

OATES, P. J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, Connecticut, v.94. n.1, p.10-21, Jan.1988.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, 474 p.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G., LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M., DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, United States, v. 32, p.56-67, Aug. 2000.

ONO, S., HAGEN, P. Pyridoxal phosphate: a coenzyme for histidine decarboxylase. **Nature**, v.184, Suppl. 15, p.1143-1144, Oct. 1959.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the testing of chemicals, OECD 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents**. Paris, 1998. 10 p.

PACK, A. M.; MORREL, M. J. Epilepsy and bone health in adults. **Epilepsy & Behavior**, v. 5. suppl. 2, p. 24-29, Feb. 2004.

PALMEIRO, N.M.S. PALMEIRO; C.E. ALMEIDA, P.C; GHEDINI, L.S.; GOULART, M.C.F.; PEREIRA, S.; HUBER, J.E.P.; SILVA AND S. LOPES. Oral subchronic toxicity of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 15–18, 2003.

PANDEYA, S. N., AGGARWAL, N., JAIN, J.S. Evaluation of semicarbazones for anticonvulsant and sedative-hypnotic properties. **Pharmazie**, Varanasi, v. 54, p. 300-302, 1999.

PEREIRA, A. B. **Diretivas estruturais básicas para elaboração de dissertação ou tese**. 1 ed. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia. 2009. 31 p.

PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D.; GÓMEZ, B.C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p.1-3, 2001.

PERRICONE, C.; CAROLIS, C.; PERRICONE, R. Glutathione: a key player in autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, issue 8, p. 697-701, Jul. 2009.

PERUCCA, E.; JOHANNESSEN, S. I. The ideal pharmacokinetic properties of an antiepileptic drug: how close does levetiracetam come? **Epileptic Disorders. International epilepsy**, v. 5, n. supplement 1, p.17-26, 2003.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats form pre-clinical toxicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, p. 213-219, 2006.

POULSEN, H.E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion, **Eur J Cancer Prev**, v. 7, n.1, p. 9-16, Feb. 1998.

PRITCHAR, J. F.; JURIMA-ROMET, M.; REIMER, M.L.; MORTIMER, E.; ROLFE, B. CAYEN, M.N., Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n.7, p. 542-553, Jul. 2003.

PRIVITERA, M. D. Evidence-based medicine and antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 40, suppl. 5, p. 47-56, 1999.

PUGH, A.J.; BARVE, A.J.; FALKNER, K.; PATEL, M.; MCCLAIN, C.J. Drug-induced hepatotoxicity or drug-induced liver injury, **Clinics in Liver Disease**, v. 13, n.2, p. 277-294, May. 2009.

RAMAIAH, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1551-1557, Jun. 2007.

RAO, G. H. Diet and kidney diseases in rats. **Toxicology Pathology**. v. 30, n. 6, p. 651-656, Nov-Dec, 2002.

REPPETTO. M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n.5, p. 523-534, 2002.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Pathologic basis of disease**. 6 ed. New York: W.B. Saunders Company, 1998. 1425 p.

ROCHA, L. T. S.; COSTA, K. A.; OLIVEIRA, A. C. P.; NASCIMENTO JR., E. B.; BERTOLLO, C. M., ARAÚJO, F.; TEIXEIRA, L. R., ANDRADE, S. P., BERALDO, H., COELHO, M.M. Antinonceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. **Life Sciences**, England, v. 79, n. 5, p. 499-505, 2006.

RODRIGUES, R. F. **Avaliação da toxicidade pré-clínica de benzaldeído semicarbazona e de seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina**. Belo Horizonte. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035-1041, Apr. 2003.

SEITO, N.L.; MAZARO, R.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of the *Austroplenckia populnea* extracts in mice. **Phytoterapy Research**, v. 16, n.2, p. 193-196, 2002.

SCHARFMAN, H.E. The neurobiology of epilepsy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, New York, v.7, n.4, p. 348-354, Jul. 2007.

SCHAYER, R. W. Histidine decarboxylase of rat stomach and other mammalian tissues. **Amer. J. Physiol.**, v.189, p. 533-536, 1957.

SCHUBERT, R. Attention deficit disorder and epilepsy. **Pediatric Neurology**, United States, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2005.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; SHAO, M.A.; JALEEL, C.A.; MI, H.M. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. **C R Biol.** v.331, n.6, p. 433-441, Apr. 2008.

SRIRAM, D., YOGESWARI, P., THIRUMURUGAN, R. Antituberculous activity of some aryl semicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, England, v.14, n. 15, p. 3923–3924, 2004.

STABLES, J.P.; BERTRAM, E.H.; WHITE, H.S.; COULTER, D.A.; DICHTER, M.A.; JACOBS, M.P.; LOSCHER, W.; LOWENSTEIN, D.H.; MOSHE, S.L.; NOEBELS, J.L.; DAVIS, M. Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland. **Epilepsia**, v. 43, n.11, p. 1410-1420, Nov. 2002.

SZABO, S.; PIHAN, G.; REGILLO, C. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v.32, n.12, p. 1395-1401, Dec. 1987.

SZABO, S. Mechanisms of Mucosal Injury in the Stomach and Duodenum: Time-sequence Analysis of Morphologic, Functional, Biochemical and Histochemical Studies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.22, n. 127, p. 21-28, 1987.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Archives of Toxicology**, Frankfurt, v.41, n.1, p. 67-71, 1978.

TAKAHASHI, M.; YOSHIDA, M.; INOUE, K.; MORIKAWA, T.; NISHIKAWA, A. A ninety-day toxicity study of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n. 10, p. 2490-2498, Jul. 2009.

TAN, P. V.; NYASSE, B.; DIMO, T.; MEZUI, C. Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, suppl 2-3, p. 69-74, Oct.2002.

TAYLOR JC, BRAUER S, ESPIR ML. Long-term treatment of trigeminal neuralgia with carbamazepine. **Postgrad Med J**, v. 57, p. 16-18, 1981.

TEIXEIRA, L. R.; SINISTERRA, R. D.; VIEIRA, R. P.; DORETTO, M.C.; BERALDO, H.. Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into β -cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Netherlands, v. 47, n. 1-2, p. 77-82, 2003.

TERANO, A.; HIRAISHI, H.; OTA, S.; SHIGA, J.; SUGIMOTO, T. Role of Superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol **Journal of Gastroenterology**, v. 24, n.5, Oct. 1989.

THIRUMURUGAN, R.; SRIRAM, D.; SAXENA, A.; STABLES, J.; YOGEE SWARIA, P. 2,4-Dimethoxyphenylsemicarbazones with anticonvulsant activity against three animal models of seizures: synthesis and pharmacological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, England, v. 14, n. 9, p. 3106–3112, 2006.

TRAUNER, M.; ARRESE, M.; WAGNER, M. Fatty liver and lipotoxicity, **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n.3, p. 299-310, Mar. 2010.

TRIER, J.S.; PIHAN, G.; SZABO, S. Alterations in Blood Vessels during Gastric Injury and Protection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 125, p. 92-99, 1986.

TÜRKP, J.C.; GOBETTI, J.P. Trigeminal neuralgia versus atypical facial pain: a review of the literature and case report. **Oral Surg. Med. Pathol.**, v. 81, n.4, p. 424-432, Apr. 1996.

TURP JC, GOBETTI JP. Trigeminal neuralgia-an update. **Compend Cont Educ Dent**, v. 21, p. 279-292, 2000.

TWEDT, D.C.; MAGNE, M.L. Moléstias do estômago. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1992. Cap. 85, p. 1353-1386.

UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG). Heloísa de Oliveira Beraldo, Márcio de Matos Coelho, Ruben Dario Sinisterra, Maria Carolina Doretto, Rafael Pinto Vieira, Letícia Regina de Souza Teixeira, Sílvia Passo Andrade. **Composições farmacêuticas de semicarbazonas e/ou tiossemicarbazonas e/ou seus derivados e produtos dessas composições e usos como anticonvulsivantes, antinociceptivos antiinflamatórios, e na terapia angiogênica**. BR n. PI 0705589-7 A2, 04 ago. 2009.

VAJDA, F.J.E. New antiepileptic drugs. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.7, n.2, p.88-101, Jan. 2000.

VALMADRID, C.; VOORHEES, C.; LITT, B.; SCHNEYER, C. Practice patterns of neurologis regardinG bone and mineral effects of antiepileptic drug therapy. **Archives of Neurology**, v. 58, n.9, p. 1369-1374, Sep. 2001.

VIETH, R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations and safety. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n.5, p. 842-856, May.1999.

WALLACH, J. B. **Interpretação de exames laboratoriais**. 6 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999, 1039 p.

WARREN, J. D., WOODWARD, D. L., HARGREAVES, R. T. 4-substituted semicarbazones of mono- and dichlorobenzaldehydes as antihypertensive agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, United States, v. 20, n. 11, p. 1520–1521, 1977.

WERLE, E., HEITZER, K. Zür Kenntnis der histidindecaboxylase. **Biochem.**, v.299, p. 429-436, 1938.

WHO. Health Topics. Disponível em <[http:// www.who.int](http://www.who.int)>. Acesso em: 20 fev. 2008.

WHO. World Health Organization. Health Topics. Disponível em <<http://www.who.int>>. Acesso em: 20 fev. 2008.

WIEBE, S.; BLUME, W.T.; GIRVIN, J.P.; ELIASZIW, M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 5, p.311-318, Aug. 2001.

WONG, O. T., HALL, I.H., CHAPMAN Jr., J.M., The hypolipidemic activity of 1-N-3-methylphthlimido-butan-3-semicarbazone in rodents. **Pharmaceutical Research**, United States, v.6, p. 230-234, 1989.

ZAKRZEWSKA, J.M. Facial pain: neurological and non-neurological. **Journal of Neurologic Neurosurgery Psychiatry**, v. 72, suppl 2, p. 27 – 32, Jun. 2002.

ZENTLER-MUNRO, P. L.; NORTHFIELD, T. C. Drug-induced gastrointestinal disease. **British Medical Journal**, v.1, p. 1263-1265, May.1979.

ZIMMERMAN, H.J.; LEWIS, J.H. Drug induced cholestasis. **Medicinal Toxicology**, v. 2, n.2, p. 112-260, Mar-Apr. 1987.

Anexo A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 25/2008**, relativo ao projeto intitulado **"Avaliação da toxicidade sub-crônica do benzaldeído semi carbazona em roedores"**, que tem como responsável(is) **Carlos Alberto Tagliati**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 04/2008**.

Este certificado expira-se em **9/ 04/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 25/2008**, related to the project entitled **"Subchronic toxicity of benzaldehyde semicarbazone in rodents"**, under the supervisors of **Carlos Alberto Tagliati**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 9, 2008**.

This certificate expires in **April 9, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Abril de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefons: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioet.ca/cetee - cetee@p.pg.ufmg.br

Anexo B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÉ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 208/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da gastrototoxicidade de benzaldeído semí carbazona em roedores**", que tem como responsável(is) **Carlos Alberto Tagliati**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comité de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **24/ 02/2010**.

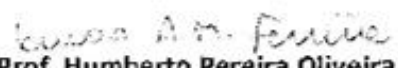
Este certificado expira-se em **24/ 02/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 208/2009**, related to the project entitled "**Gastric toxicity of benzaldehyde semicarbazone in rodents**", under the supervisors of **Carlos Alberto Tagliati**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 24, 2010**.

This certificate expires in **February 24, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Março de 2010.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/etica/cetea - cetea@orgao.ufmg.br

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](#)