

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO FITOTERÁPICO CONTENDO  
*Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*,  
*Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto<sup>®</sup>) EM RATOS WISTAR

Autora: Carina Rauber

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias na área de Farmacologia  
Orientador: Dr. João Roberto Braga  
de Mello

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO FITOTERÁPICO CONTENDO  
*Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*,  
*Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto<sup>®</sup>) EM RATOS WISTAR

Autora: Carina Rauber

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias na área de Farmacologia  
Orientador: Dr. João Roberto Braga  
de Mello

Porto Alegre

2006

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Espírito Santo, o qual me revelou seus dons, dando-me fortaleza, ciência, força e perseverança para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, pelo incentivo, paciência, e por sua exigência, tão importante para a concretização deste trabalho.

Às colegas e amigas Gisele, Raquel, Fabiana, e ao colega Rodrigo que me auxiliaram na execução dos experimentos.

Ao prof. Dr. Paulo Waquil pelo seu auxílio na análise estatística

À Prof. Dr. Fernanda Bastos de Mello, pela incansável disposição com que me ajudou, pelos conselhos e sugestões, e pela amizade continuamente demonstrados.

À empresa Cibecol, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Finalmente, a luz da minha vida, minha família que sempre me apoiou e torceu por mim, com amor incondicional.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1 Aspectos farmacobotânicos sobre o gênero <i>Aristolochia</i> .....	17
2.2 Aspectos farmacológicos e terapêuticos sobre o gênero <i>Aristolochia sp.</i> .....	19
2.3 Constituintes tóxicos e fitoquímicos do gênero <i>Aristolochia sp.</i> .....	21
2.4 Intoxicação natural e experimental por <i>Aristolochia sp.</i> .....	22
2.5 Aspectos farmacobotânicos sobre <i>Plantago major L.</i> .....	24
2.6 Aspectos farmacológicos e terapêuticos sobre <i>Plantago major L.</i> .....	27
2.7 Aspectos farmacobotânicos e toxicológicos sobre o gênero <i>Luehea</i> .....	28
2.8 Aspectos farmacobotânicos sobre <i>Piptadenia colubrina</i> .....	31
2.9 Aspectos farmacobotânicos sobre <i>Myrocarpus frondosus</i> .....	32
2.10 Estudos de toxicologia pré-clínica de fitoterápicos.....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Medicamento fitoterápico.....	39
3.2 Animais.....	40
3.3 Protocolo experimental.....	40
3.3.1 Experimento 1- Toxicidade oral aguda.....	40
3.3.2 Experimento 2- Toxicidade oral de doses repetidas.....	42
3.4 Análise Estatística.....	45
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Toxicidade Aguda do fitoterápico Cassaú Composto®.....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Desenvolvimento ponderal das ratas.....	46
4.1.2 Consumo relativo da água e ração das ratas.....	46
4.1.3 Produção de fezes e urina das ratas.....	48
4.1.4 Desenvolvimento ponderal dos ratos.....	49
4.1.5 Consumo relativo de água e ração dos ratos.....	49
4.1.6 Produção de fezes e urina dos ratos.....	51
4.1.7 Observação clínica dos animais.....	52
<b>4.2 Toxicidade de doses repetidas do fitoterápico Cassaú Composto®.....</b>	<b>53</b>
4.2.1 Desenvolvimento ponderal das ratas.....	53
4.2.2 Consumo de ração das ratas.....	54
4.2.3 Consumo de água das ratas.....	55
4.2.4 Desenvolvimento ponderal dos ratos.....	56
4.2.5 Consumo de ração dos ratos.....	57
4.2.6 Consumo de água dos ratos.....	58
4.2.7 Produção de fezes das ratas.....	59
4.2.8 Produção de urina das ratas.....	60

4.2.9	Produção de fezes dos ratos.....	61
4.2.10	Produção de urina dos ratos.....	62
<b>4.3</b>	<b>Massa relativa e histologia dos órgãos das ratas.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4</b>	<b>Massa relativa e histologia dos órgãos dos ratos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação bioquímica sanguínea das ratas.....</b>	<b>65</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação hematológica das ratas.....</b>	<b>66</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação bioquímica sanguínea dos ratos.....</b>	<b>68</b>
<b>4.8</b>	<b>Avaliação hematológica dos ratos.....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXO A - Foto gaiola metabólica.....	86

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Massa relativa dos órgãos das ratas tratadas durante 30 dias com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> com três diferentes doses (CC1) 1,3 ml/kg/dia, (CC5) 6,5 ml/kg/dia, (CC10) 13 ml/kg/dia, e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. São apresentados os valores percentuais médios  $\pm$  epm..... 63
- TABELA 2 Massa relativa dos órgãos dos ratos tratados durante 30 dias com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> com três diferentes doses (CC1) 1,3 ml/kg/dia, (CC5) 6,5 ml/kg/dia, (CC10) 13 ml/kg/dia, e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. São apresentados os valores percentuais médios  $\pm$  epm..... 65
- TABELA 3 Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicérides, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC). Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos)  $\pm$  epm..... 66
- TABELA 4 Valores médios de hematócrito ( $\pm$  erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC)..... 67
- TABELA 5 Valores médios do leucograma ( $\pm$  erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC)..... 67
- TABELA 6 Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicérides, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC). Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos)  $\pm$  epm..... 68
- TABELA 7 Valores médios de hematócrito ( $\pm$  erro padrão da média) em ratos tratados com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC)..... 69

TABELA 8 Valores médios do leucograma ( $\pm$  erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC)..... 70

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Foto de <i>Aristolochia cymbifera</i> Mart. Disponível em: < <a href="http://www.sunshine-seeds.de/.../foto_aristolochia.htm">www.sunshine-seeds.de/.../foto_aristolochia.htm</a> >.....	18
FIGURA 2	Foto de <i>Plantago Major</i> L. Disponível em: < <a href="http://people.uvawise.edu/swavaflora/Plantago_major.html">people.uvawise.edu/swavaflora/Plantago_major.html</a> >.....	25
FIGURA 3	Foto de <i>Luehea grandiflora</i> Mart. Disponível em: < <a href="http://www.malvaceae.info/Genera/Luehea/gallery.html">www.malvaceae.info/Genera/Luehea/gallery.html</a> >.....	29
FIGURA 4	Foto de <i>Piptadenia colubrina</i> Benth. Disponível em: < <a href="http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/angbr.htm">www.arvores.brasil.nom.br/florin/angbr.htm</a> >.....	31
FIGURA 5	Foto de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão. Disponível em: < <a href="http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/balsamo.htm">www.arvores.brasil.nom.br/florin/balsamo.htm</a> > .....	34
FIGURA 6	(A) Desenvolvimento ponderal (1º dia = 100%), (B) consumo relativo de água e (C) de ração das ratas tratadas com uma dose de 26 ml/kg (CC20) por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).....	47
FIGURA 7	(A) Produção de urina (%) e (B) de fezes (%) das ratas tratadas com uma dose de 26 ml/kg (CC20) por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).....	48
FIGURA 8	(A) Desenvolvimento ponderal (1º dia = 100%), (B) consumo relativo de água e (C) de ração dos ratos tratados com uma dose de 26 ml/kg (CC20) por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).....	50
FIGURA 9	(A) Produção de urina (%) e (B) de fezes (%) dos ratos tratados com uma dose de 26 ml/kg (CC20) por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).....	51
FIGURA 10	Desenvolvimento ponderal das ratas (1º dia = 100%) tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto® com três diferentes doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).....	53



FIGURA 11	Consumo percentual de ração (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3ml/kg/dia) CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	54
FIGURA 12	Consumo percentual de água (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	55
FIGURA 13	Desenvolvimento ponderal dos ratos (1º dia = 100%) tratados com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> com três diferentes doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).....	56
FIGURA 14	Consumo percentual de ração (%) em relação a massa corporal dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3ml/kg/dia) CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	57
FIGURA 15	Consumo percentual de água (%) em relação a massa corporal dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	58
FIGURA 16	Produção percentual de fezes (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	59
FIGURA 17	Produção percentual de urina (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	60
FIGURA 18	Produção percentual de fezes (%) em relação a massa corporal dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	61
FIGURA 19	Produção percentual de urina (%) em relação a massa corporal dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto <sup>®</sup> na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	por cento
ALT	Alanina-aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANOVA MR	Análise de Variância de Medidas Repetidas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato-aminotransferase
cm	centímetro (s)
COBEA	Colégio Brasileiro de Bioterismo
CREAL	Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório
DL 50	dose letal que mata 50 % da população
epm	erro padrão da média
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> – Administração de Drogas e Alimentos
g	grama (s)
g/dl	grama por decilitro (s)
GGT	Gama-glutamilttransferase
h	hora (s)
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
kg	kilograma (s)
Ltda	Limitada
mEq/l	miliequivalente por litro (s)
mg	miligrama (s)
mg/dl	miligrama por decilitro (s)
ml	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
Nº	número
°C	graus Celcius
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> – Organização para o desenvolvimento e cooperação econômica.
°GL	graus <i>Gay Lussac</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
p	probabilidade, nível de significância
q.s.p.	quantidade suficiente para
RE	resolução
SDH	Sorbitol desidrogenase
U/l	unidade por litro (s)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## RESUMO

*Avaliou-se a segurança de um fitoterápico, constituído de extratos fluidos de *Aristolochia cymbifera* (“cassaú”), *Plantago major* L.(“transagem”), *Luehea grandiflora* Mart.(“açoita-cavalo”), *Myrocarpus frondosus* Allemão (“cabreúva”), *Piptadenia colubrina* Benth (“angico”) (Cassaú Composto<sup>®</sup>), através de estudos de toxicidade aguda e subcrônica, tendo como base a resolução Nº 90, de 16 de março de 2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Para o teste de toxicidade aguda, ratos Wistar de ambos os sexos foram tratados por via oral com uma única dose de 26 ml/kg, correspondendo a 20 vezes a dose terapêutica indicada pelo fabricante para seres humanos adultos. Os resultados revelaram haver sinais de toxicidade sistêmica com o aparecimento de ataxia, porém de forma transitória e reversível, não causando interferência no desenvolvimento ponderal dos animais, nos consumos de água e ração, nas produções de urina e fezes, bem como alterações macroscópicas nos órgãos dos animais. Avaliou-se também a exposição a doses repetidas do fitoterápico (toxicidade subcrônica). Constituíram-se 4 grupos experimentais (10 animais/sexo/dose), onde administrou-se por via oral a ratos Wistar, durante 30 dias, doses diárias de 1,3 ml/kg, 6,5 ml/kg e 13 ml/kg, respectivamente a dose terapêutica indicada pelo fabricante para seres humanos adultos, 5 vezes, e 10 vezes a dose terapêutica, além de um grupo controle, onde administrou-se o veículo do fitoterápico. Os resultados revelaram ausência de toxicidade sistêmica, fundamentados na ausência de alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas, bem como peso e análises histopatológicas dos órgãos, nos diferentes grupos. As flutuações nos consumos de água e ração, bem como produções de urina e fezes, não influenciaram de maneira negativa o desenvolvimento ponderal dos animais. Concluiu-se portanto, que a utilização do fitoterápico nas doses e períodos referidos pode ser considerado segura.*

## ABSTRACT

*The security of a phytotherapeutic constituted of extracts fluid of Aristolochia cymbifera, Plantago major L., Luehea grandiflora Mart., Myrocarpus frondosus Allemão and Piptadenia colubrina Benth (Cassaú Composto<sup>®</sup>) was evaluated through studies of acute and sub-chronic toxicity, being based in the resolution N<sup>o</sup> 90, March 16<sup>th</sup>, 2004 from ANVISA (National Agency of Sanitary Vigilance). For the test of acute toxicity Wistar rats of both sexes were treated orally with a single dose of 26 ml/kg, which corresponds to 20 times the therapeutic dose indicated by the producer for adult human beings. The results revealed that there are signals of systemic toxicity with the appearing of lack of motor coordination (ataxy), however, in a transitory and reversible way, not causing interference in the development of weight gain in the animals, in the consume of water and feed, in the production of urine and feces, neither macroscopic alterations in the animals' organs. It was also evaluated the exposition of repeated doses of the phytotherapeutic (sub-chronic toxicity). There were 4 experimental groups (10 animals/sex/dose); during 30 days, daily doses of 1,3 ml/kg, 6,5 ml/kg and 13 ml/kg were given orally to Wistar rats, respectively to the therapeutic dose indicated by the producer for adult human beings, 5 times, and 10 times the therapeutic dose, besides a control group, which was given the vehicle of the phytotherapeutic. The results revealed the absence of systemic toxicity, which were based in the absence of hematological and blood biochemical alterations, as well as weigh and histopatological analysis of organs, in the different groups. The variations in terms of water and feed consume, as well as the production of urine and feces, did not negatively influenced the development of weight gain in the animals. Thus, it was concluded that the utilization of the referred phytotherapeutic in the mentioned doses and periods might be considered secure.*

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de extratos vegetais com fins terapêuticos (fitoterápicos), tem sido crescente, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento, através de uma intensa ascensão da indústria farmacêutica (SHARAPIN, 1996; CARVALHO, J.C.T., 2005).

Segundo Wojcikowski et al. (2004) este crescente aumento é devido a utilização de uma medicina humana complementar e alternativa, com a falsa idéia de que plantas medicinais ou medicamentos a base de vegetais (fitoterápicos) não possuem toxicidade.

Heinrich et al. (2004) citam que pessoas de muitos países pobres utilizam um sistema de medicina tradicional, onde o conhecimento a respeito da maioria das plantas medicinais está baseado no uso popular, sem qualquer investigação a respeito de seus constituintes químicos e efeitos biológicos.

Segundo Eldin & Dunford (2001), com o mercado crescente dos fitoterápicos e o interesse renovado pela fitoterapia em geral, tornou-se necessário rever a situação destes produtos colocados à venda. Supermercados, lojas de produtos naturais e farmácias estão entre os locais onde estes produtos podem ser adquiridos, muitas vezes sem controle quanto a sua segurança e eficácia.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os medicamentos fitoterápicos são definidos como produtos com fins medicinais que contém derivado ativo obtido das partes aéreas ou subterrâneas de vegetais ou outro material vegetal. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos ainda são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Muitos países através de suas legislações, objetivam garantir que produtos fitoterápicos sejam regulados e controlados adequadamente ( HEIRINCH et al.; 2004).

No Brasil, de acordo com a resolução nº 89, de 16 de março de 2004, foi criada uma Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Nesta lista são encontradas a nomenclatura botânica, o nome popular, a parte utilizada, a padronização, formas de uso, indicações e ações terapêuticas, dose diária, via de administração e restrição de uso. As plantas constantes nesta lista, não necessitam validar as indicações terapêuticas e segurança de uso. As plantas que não constarem nesta lista, deverão seguir a Resolução nº 48 (BRASIL,2004b), na qual os medicamentos fitoterápicos deverão apresentar segurança quanto ao uso, e as indicações terapêuticas deverão ser avaliadas através de uma das três opções:

- 1) Atingir no mínimo 6 pontos, com estudos publicados entre as obras da “ Lista de Referências Bibliográficas para avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos (RE nº 88).
- 2) Apresentar comprovação de segurança de uso através de testes (toxicologia pré-clínica, toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde (RE nº 90).
- 3) Apresentar um levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações técnico-científicas ou publicações), que será avaliado consoante aos seguintes critérios: indicação de

uso, coerência com relação às indicações terapêuticas propostas; ausência de risco tóxico ao usuário; ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, presentes dentro de limites comprovadamente seguros; comprovação de uso seguro por um período igual ou superior a 20 anos.

Caso o medicamento fitoterápico integre a última publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, nas condições ali definidas, não há necessidade de validar as indicações terapêuticas e a segurança do uso (BRASIL, 2004a).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade pré-clínica oral aguda e de doses repetidas (30 dias) do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> em ratos, tendo como base o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, conforme resolução N° 90, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> é uma associação de extratos fluidos de *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major* L., *Luehea grandiflora* Mart., *Myrocarpus frondosus* Allemão, *Piptadenia colubrina* Benth, e segundo o fabricante é um tônico reconstituente indicado como auxiliar no tratamento da inapetência e da debilidade física.

Quanto à posologia segue a indicação:

- a) Como estimulante digestivo – uma colher das de sopa, meia hora antes de cada refeição;
- b) Na inapetência e nas astenias – duas colheres das de sopa, três vezes ao dia;
- c) Na convalescença e desnutrição – uma colher das de sopa, três a quatro vezes ao dia;

Segundo o fabricante, o produto é contra-indicado para diabéticos, gestantes e lactantes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos farmacobotânicos sobre o gênero *Aristolochia* sp.

Plantas do gênero *Aristolochia* pertencem à família Aristolochiaceae. Essa família compreende mais de 7 gêneros, dos quais os mais importantes são *Aristolochia* e *Asarum* (TREASE & EVANS, 1980).

Do gênero *Aristolochia* provém em torno de 300 espécies de plantas, dentre as quais destacam-se as espécies *Aristolochia triangularis* Cham. et Schlecht. e *Aristolochia cymbifera* Mart. e Zucc., nativas do Brasil e encontradas principalmente no estado do Rio Grande do Sul (SIMÕES et al., 1995).

De acordo com Lorenzi & Matos (2002), outras espécies de *Aristolochia* são encontradas em outros estados brasileiros, com características e propriedades semelhantes, sendo conhecidas inclusive pelos mesmos nomes populares, sendo elas: *A. esperanzae* O Kuntze (encontradas nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), *A. ridícula* N. E. Br. (São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul), *A. Brasiliensis* Mart. e Zucc. (encontrada nos estados do Nordeste), *A. arcuata* Mast. (São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul) e *A. gigantea* Mart. e Zucc. (região da caatinga), esta, utilizada como planta ornamental.

Segundo Dermardenosian & Bentler (2002), plantas deste gênero podem ser encontradas em todo continente americano e europeu. Também em países como Índia, Marrocos e especialmente na China, onde são muito utilizadas na medicina tradicional Chinesa.

O gênero *Aristolochia* é composto de plantas trepadeiras herbáceas perenes, caracteristicamente vigorosas, melhor adaptadas a ambientes quentes (LORENZI & MATOS, 2002).

As plantas da espécie *A. triangularis* são volúveis, podendo medir até 4 metros de comprimento. As folhas são simples, inteiras, de até 11 centímetros de comprimento e 8 centímetros de largura, verdes, às vezes verde-arroxeadas. Flores são de coloração amarelo-avermelhadas, de até 3 centímetros de comprimento (SIMÕES et al., 1995). O caule apresenta a casca grossa, rugoso-estriada em forma de jarra, que segundo Lorenzi & Matos (2002) pode ter originado o nome “jarrinha”, como é conhecida



popularmente. Outros nomes populares incluem, “cipó-jarrinha”, “cipó-mil-homens”, “cipó-de-cobra”, “cipó-mata-cobra”, “cassau” (TROPICAL PLANT DATABASE, 2004).



FIGURA1 *Aristolochia cymbifera* Mart.

Disponível em: <[www.sunshine-seeds.de/.../foto\\_aristolochia.htm](http://www.sunshine-seeds.de/.../foto_aristolochia.htm)>

Na medicina tradicional popular, o uso da planta é bastante amplo, sendo utilizado não somente as folhas, mas também caules e raízes (SIMÕES et al., 1995).

Lorenzi & Matos (2002) citam que a planta é considerada diurética, sedativa, anti-séptica e emenagoga, e que em algumas regiões é empregada obtendo-se bons resultados contra anorexia e dispepsia.

Segundo Dermardesian & Bentler (2002), os nativos americanos utilizavam a espécie *A. serpentaria*, chamada popularmente de “Snakeroot”, para curar mordida de cobra, e em pequenas doses, como estimulante do apetite. Esta mesma espécie é citada por Duke (1989), como sendo expectorante e vermífuga.

Estudos fitoquímicos realizados com plantas do gênero *Aristolochia*, evidenciaram a presença de estruturas químicas como alcalóides, ácidos aristolóquicos, flavonóides, ésteres fenólicos e óleos voláteis (TREASE & EVANS, 1980).

Watanabe & Lopes (1995) isolaram da espécie *A. arcuata*, 2 novos alcalóides, o 13-oxidodibenzeno e quinolizirium, além de diterpenos, sitosterol e frutose. Diterpenos podem ser isolados a partir do extrato etanólico do caule de *A. pubescens* segundo Nascimento & Lopes (2003).

A partir do extrato etanólico de folhas de *A. gigantea*, Lopes & Hureipfer (1997) identificaram estruturas químicas como 8-benzilberberina e N-oxide (alcalóides) e pinitol.

Vila et al. (1997), realizaram estudos a partir de amostras de óleos essenciais, obtidos através de hidrodestilação de folhas, raízes e caule de *A. elegans* Mast., onde evidenciaram a presença de grande quantidade de sesquiterpenóides, principalmente nas folhas, havendo um decréscimo em outras partes da planta.

Simões et al. (1995), citam que em estudos fitoquímicos realizados com diferentes partes da planta *A. triangularis*, foram encontradas variadas estruturas químicas. Nas raízes e caule constatou-se a

presença de mono, sesqui e diterpenos, além de esteróides, lignanos e uma neoligana, mucilagem, taninos, alcalóides e um ácido aristolóquico, presente somente nas raízes da planta.

Num outro estudo com raízes e caule de *A. cymbifera*, evidenciou-se a presença de diterpenos, assim como sesquiterpenóides nas folhas da planta (LORENZI & MATOS, 2002).

Os mais importantes princípios tóxicos encontrados no gênero *Aristolochia* são os chamados ácidos aristolóquicos (HEIRINCH et al., 2004).

Estes ácidos aristolóquicos conforme Ioset et al. (2002) são conhecidos por conterem muitos metabólitos nefrotóxicos e carcinogênicos, que afetariam humanos e animais.

De acordo com Tropical Plant Database (2004), o consumo de produtos contendo ácidos aristolóquicos, tem sido associado com permanentes danos renais, ocasionando em alguns casos até mesmo falência renal. Em adição, alguns pacientes podem desenvolver certos tipos de câncer, sendo a ocorrência mais freqüentemente no trato urinário.

Devido a estas informações, a Agência Européia de Medicamento, vem proibindo a comercialização de produtos à base de plantas que sabidamente contém estes ácidos aristolóquicos (CREUS et al.; 2003).

A agência Americana *Food and Drug Administration* (FDA), vem advertindo consumidores em relação a continuidade do uso de produtos que contenham ácidos aristolóquicos (TROPICAL PLANT DATABASE, 2004).

## **2.2 Aspectos farmacológicos e terapêuticos sobre o gênero *Aristolochia* sp.**

De acordo com Zhou et al. (2004) existem evidências quanto ao ressurgimento da utilização de plantas medicinais no mundo todo. Estimativas relatam que aproximadamente um terço dos adultos do mundo ocidental utilizam terapias alternativas, incluindo plantas utilizadas na sua forma primária ou combinadas.

Lans et al. (2001), realizaram um estudo etnofarmacológico veterinário a respeito de certos medicamentos utilizados por caçadores e seus cães na região de Trinidad e Tobago. Segundo os autores, plantas do gênero *Aristolochia*, especialmente *Aristolochia trilobata* e *Aristolochia rugosa*, são utilizadas com sucesso para o tratamento de cães de caça acometidos por mordidas de cobras e picadas de escorpiões. Tinturas com álcool ou óleo de oliva são feitas a partir destas plantas e utilizadas terapêuticamente no local da ferida.

Otero et al. (2000), avaliaram a capacidade anti-hemorrágica de 75 extratos de plantas da região nordeste da Colômbia, frente ao veneno de *Bothrops atrox*. Extrato etanólico de 19 espécies entre elas *Aristolochia grandiflora* Sw., demonstrou através de experimentos *in vivo*, uma moderada atividade neutralizante do veneno.

Sosa et al. (2002), verificaram o potencial antiinflamatório de folhas e casca de *Aristolochia trilobata* L. Esta planta vem sendo utilizada na medicina tradicional de Belize para o alívio da dor e cura de várias dermatopatias. Segundo os autores, extratos de clorofórmio e hexano, obtiveram bons índices de atividade antiinflamatória experimentalmente. Este potencial antiinflamatório foi avaliado após aplicação

tópica destes extratos em orelhas de camundongos, acometidos por inflamações cutâneas (edemas), provocadas experimentalmente.

Um estudo para avaliar a atividade antibacteriana de *Aristolochia paucinervis* Pomel foi realizado por Gadhi et al. (1999). Os autores utilizaram frações de extrato metanólico obtido de folhas e rizoma de *A. paucinervis* Pomel. O potencial de atividade antibacteriana foi avaliado usando método de diluição em ágar e da determinação da concentração inibitória mínima. Gadhi et al. (1999) concluíram que a fração etil acetato obtida do rizoma da planta, mostrou alta atividade bacteriostática contra bactérias anaeróbias *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*, responsáveis por infecções de pele e doenças intestinais.

Em outro estudo Gadhi et al. (2001), investigaram o efeito inibitório de extratos de folhas e rizoma de *Aristolochia paucinervis* Pomel sobre o crescimento de *Helicobacter pylori*, bactéria responsável por doenças do trato gastrointestinal. Os autores utilizando o mesmo método citado anteriormente, constataram que a fração hexano, obtida a partir do extrato metanólico das folhas da planta, demonstrou alta atividade bacteriostática contra *Helicobacter pylori*. Esta alta atividade bacteriostática, segundo os autores, pode ser devida a grande quantidade de componentes químicos como ácidos oleosos e terpenos, encontrados na planta. Entretanto, os autores sugerem que mais estudos *in vivo* são necessários para confirmar estas hipóteses.

Shafi et al. (2002), constataram que o óleo essencial de *Aristolochia indica* L. possui moderada atividade antibacteriana. Segundo os autores, esta atividade poderia ser atribuída aos componentes químicos  $\beta$ -cariopileno e  $\alpha$ -humuleno.

### **2.3 Constituintes tóxicos e fitoquímicos do gênero *Aristolochia* sp.**

A utilização de plantas medicinais, especialmente as do gênero *Aristolochia*, vem ressurgindo, através da fabricação de medicamentos alternativos. Como consequência há um consumo crescente destes produtos por pessoas do mundo todo, especialmente em países desenvolvidos (WOJCIKOWSKI et al., 2004).

Em contraste com medicamentos sintéticos, plantas medicinais muitas vezes tem sido chamadas de não tóxicas, devido as suas origens naturais e a longos períodos de utilização na medicina tradicional (WOJCIKOWSKI et al., 2004).

Entretanto, devido a contaminações, adulterações, interações planta-medicamento, carência de conhecimento e a sua toxicidade intrínseca, podem desenvolver certas patologias (WOJCIKOWSKI et al., 2004).

De acordo com Ioset et al. (2002) numerosos casos de intoxicações tem sido associados com plantas do gênero *Aristolochia*, especialmente *Aristolochia fangchi*. Estas intoxicações, tem sido relatadas após o consumo de suplementos dietéticos comerciais, chás e fitoterápicos, oriundos da China e utilizados como adjuvantes em dietas de emagrecimento. Estas intoxicações estão associadas, segundo os autores, aos metabólitos nefrotóxicos e carcinogênicos, chamados ácidos aristolóquicos.

Ácidos aristolóquicos, são estruturalmente descritos como ácidos carboxílicos nitrofenantrenos e estão presentes em plantas do gênero *Aristolochia* (NORTIER & VANHERWEGHEM, 2002).

Segundo Zhou et al. (2004), os ácidos aristolóquicos predominantes são o ácido aristolóquico I (8-metoxi-6-nitrofenantro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-ácido carboxílico) e o ácido aristolóquico II (6-nitrofenantro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-ácido carboxílico).

Bianucci et al. (1993), isolaram através de estudos fitoquímicos de *Aristolochia rigida* Duch, o ácido aristolóquico IV (2,3-metilenedioxi-5,7-dimetoxi-10-ácido nitrofenantroico).

Segundo Hashimoto et al. (1999), a quantidade de ácidos aristolóquicos presentes nestas plantas, pode ser determinada utilizando métodos de cromatografia líquida de alta pressão, equipado com detector espectrofotométrico.

Ioset et al. (2002), utilizaram a cromatografia em camada delgada como método para determinar a quantidade de ácidos aristolóquicos I, presente na espécie *Aristolochia fangchi*. Segundo os autores, a cromatografia em camada delgada é um método rápido, específico e sensível.

O mecanismo tóxico destas plantas ainda permanece indefinido, mas segundo Zhou et al. (2003), dados sugerem que os ácidos aristolóquicos, sofrem redução do grupo nitro pelo citocromo P 450, resultando em metabólitos reativos, que podem ligar-se a proteínas celulares e DNA, levando a múltiplos mecanismos de toxicidade.

### **2.3 Intoxicação natural e experimental por *Aristolochia sp.***

Grande parte das intoxicações naturais por *Aristolochia sp.*, ocorrem em países que utilizam remédios a base destas plantas. A maioria destes, segundo Schaneberg & Khan (2004), são oriundos da China, onde são fortemente empregados na medicina tradicional.

Entre os consumidores estão, principalmente pessoas, entre estas mulheres, que de acordo com Nortier & Vanherweghem (2002), ingerem pílulas, contendo o pó extraído de *Aristolochia fangchi* como tratamento coadjuvante de emagrecimento. Estas pessoas acabam desenvolvendo uma doença renal chamada nefropatia por plantas Chinesas.

Esta nefropatia é uma forma progressiva de fibrose renal, que leva a uma severa atrofia dos túbulos proximais (NOETIER & VANHERWEGHEM, 2002). De acordo com Wojcikowski et al. (2004), o glomérulo é usualmente poupado sendo ausente a evidência de depósitos de imunocomplexos.

Nortier & Vanherweghem (2002), realizaram um estudo com 115 pacientes do departamento de nefrologia de um hospital localizado na Bélgica. De acordo com os autores, 48 pacientes apresentavam nefropatia em estágio final. Aproximadamente 46% destes pacientes apresentavam carcinoma no trato urinário. Amostras de tecido de rins e ureteres continham ácidos aristolóquicos, indicativo segundo os autores, de possíveis exposições anteriores.

Martinez et al. (2002), concluíram que, a relação entre a dose cumulativa e a proporção da progressão de falência renal é confirmada através da ingestão regular de extratos de *Aristolochia sp.*, onde estariam envolvidos no início de uma nefropatia intersticial crônica.

Pittler & Ernest (2003), relatam que plantas do gênero *Aristolochia*, estariam associadas também com eventos hepatotóxicos. Os autores citam o caso de uma paciente que teria ingerido chá de raiz de *Aristolochia debilis*. Sabidamente estas plantas contém ácidos aristolóquicos e segundo os autores seriam os mais prováveis responsáveis pelo desenvolvimento da hepatite tóxica. De acordo com os autores esta hepatite teria sido curada após 3 meses sem a ingestão do chá, onde os valores laboratoriais retornaram ao normal.

Liu et al. (2003) realizaram um experimento com ratos Wistar fêmeas, para avaliar o potencial tóxico de *Aristolochia manshuriensis* Kom. Dois estudos foram realizados. No estudo 1, doses de 0,4 e 4g/dia de *A. manshuriensis* foram administradas oralmente através de sonda gástrica, duas vezes ao dia, durante 5 dias. No sexto dia os animais eram sacrificados. No estudo 2, doses de 4g/dia de *A. manshuriensis* e 4mg/dia de ácido aristolóquico foram administrados oralmente em outro grupo de animais duas vezes ao dia, durante 5 dias. Amostras de sangue e urina foram coletados para avaliações bioquímicas e mensuração de ácido aristolóquico. O sacrifício era realizado nos dias 1, 3, 5 e 14 e órgãos como rins, pulmão, coração, fígado e baço foram pesados e investigados quanto a presença de ácido aristolóquico. O mesmo protocolo era realizado no estudo 3, sendo que os animais eram sacrificados no sexto dia. Os autores concluíram que os ratos que recebiam 4g/dia de *A. manshuriensis* apresentaram alterações bioquímicas como proteinúria, glicosúria, além de alterações histológicas, como necrose tubular e, portanto, levando a uma diminuição da função renal. Estas alterações eram similares nos animais tratados com 4mg/dia de ácido aristolóquico. Além disso, as concentrações destes ácidos no soro, urina e tecido renal, foram comparáveis nos ratos tratados com *A. manshuriensis* e ácidos aristolóquicos, o que indicaria que estes ácidos aristolóquicos poderiam ser os responsáveis pela toxicidade renal.

Debelle et al. (2002) confirmam a hipótese de que estes ácidos aristolóquicos seriam os responsáveis pela patogenia das lesões renais. Os autores realizaram um experimento com ratos Wistar machos, administrando por via subcutânea 10mg/kg de ácido aristolóquico uma vez ao dia, durante 35 dias. Os resultados bioquímicos revelaram proteinúria, glicosúria e creatinina elevada. Atrofia e necrose tubular renal foram os achados histopatológicos.

Hu et al. (2004) sugerem mais atenção a influência de fatores de distribuição geográfica e da biodiversidade das subespécies populacionais de *Aristolochia sp.* Embora estas plantas possuam ácidos aristolóquicos, a quantidade destes nas espécies podem ser diferentes e, portanto, efeitos adversos correlacionados a doses e tempo de uso também podem ser diferentes.

Hu et al. (2004) realizaram estudos de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos, utilizando extrato etanólico de *Aristolochia manshuriensis* provenientes de várias regiões da China. De acordo com os autores, doses entre 195-200g/kg de *A. manshuriensis* tiveram efeitos toxicológicos variáveis. Extrato etanólico, de uma subespécie do norte da China, provocou morte na maioria dos animais 2 h após a sua administração por via oral, com auxílio de sonda intragástrica. Diferentemente, uma subespécie da região central da China, não desencadeou nenhuma morte nos 3 primeiros dias de experimento.

#### **2.4 Aspectos farmacobotânicos sobre *Plantago major* L.**

*Plantago major* L. é uma planta pertencente a família *Plantaginaceae*. Essa família compreende mais de 200 espécies, sendo arbustos e ervas, caracterizados por folhas basais e presença de pequenas flores (DERMARDEROSIAN & BENTLER, 2002; DUKE, 2000).

Segundo Lorenzi & Matos (2002), o crescimento desta planta se dá espontaneamente em terrenos baldios e lavouras perenes do sul do Brasil, onde é considerada uma planta daninha. Devido a este crescimento espontâneo, somado às suas características gerais, *Plantago major*, é classificada como uma erva bianual ou perene.

*Plantago major* L., é caracterizada como uma erva de aproximadamente 20-30 cm de altura, com folhas dispostas em roseta basal. Apresentam pecíolo longo e lâmina membranácea com nervuras bem destacadas de aproximadamente 15-25 cm de comprimento. As flores são muito pequenas, dispostas em inflorescências espigadas eretas sobre a haste floral de 20-30 cm de comprimento, que transformam-se em frutos (sementes), sendo estas facilmente colhidas (LORENZI & MATOS, 2002).

De acordo com Dermarderosian & Bentler (2002), cada planta produz de 13.000-15.000 sementes, permanecendo viáveis no solo por aproximadamente 60 anos.

Caracteristicamente, as sementes são pequenas, cerca de 1,5-3,5 mm, ovais, de coloração castanho-avermelhadas e recobertas por mucilagem, que atua auxiliando o seu transporte e favorecendo a sua aderência a várias superfícies (DERMARDEROSIAN & BENTLER, 2002).

Lorenzi & Matos (2002), citam a semente como parte muito importante, pois é através desta que ocorre a multiplicação da planta.



FIGURA 2 *Plantago major* L.

Disponível em: <[people.uvawise.edu/swavafloa/Plantago\\_major.html](http://people.uvawise.edu/swavafloa/Plantago_major.html)>

*Plantago major* L. é originária da Europa, mas hoje encontra-se difundida em todo Continente Americano e Asiático, além de países como África do Sul e Nova Zelândia (DERMARDEROSIAN & BENTLER, 2002).

No Brasil, a planta é encontrada principalmente no sul do Brasil onde foi “naturalizada”, seguindo a sua utilização na medicina popular, com os mesmos propósitos acerca das informações

originárias da planta (LORENZI & MATOS, 2002; GUILLÉN et al., 1997). Em medicina popular a utilização da planta é bastante ampla, sendo utilizada não somente as folhas, mas também sementes, flores e raiz. As folhas são utilizadas no tratamento de afecções da pele, como feridas, queimaduras, picadas de insetos, acnes e espinhas, além de afecções do trato respiratório superior ( LORENZI & MATOS, 2002). As sementes são muito utilizadas na medicina chinesa para o tratamento da diarreia, febre, reumatismo e disenteria (DUKE, 1989). As flores são empregadas contra conjuntivite e irritações oculares (LORENZI & MATOS, 2002). As raízes, no tratamento de dores dentárias (DUKE, 1989).

*Plantago major* L. é conhecida popularmente como “plantagem”, “sete-nervos”, “tanchagem”, “tansagem”, “tranchagem” ou “transagem” (PLANTAMED, 2004; LORENZI & MATOS, 2002).

Em recente estudo etnofarmacológico, Samuelsen (2000) relata que a planta é utilizada em muitos países para o tratamento de várias doenças, entre elas: doenças da pele, infecciosas, circulatórias e digestivas. Segundo o autor também há relatos da utilização da planta contra tumores.

Hoffmann (2003), cita que *Plantago major* é uma das ervas ocidentais de utilização primariamente tópica, em ulcerações de pele, com agentes cicatrizantes, usados na forma de loções, compressas e cataplasmas.

França et al. (1996), relatam o uso de folhas de *Plantago major* por trabalhadores rurais, para o tratamento de úlceras de pele, causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em áreas consideradas endêmicas, como a faixa litorânea produtora de cacau, do estado da Bahia.

Estudos fitoquímicos realizados com folhas de *Plantago major* L. evidenciaram a presença de componentes químicos como flavonóides, glicosídeos, esteróides, saponinas, taninos, alcalóides, mucilagens, triterpenos, ácidos orgânicos (ácido clorogênico, ácido ursólico, ácido salicílico), ácido cafêico, ácido ferúlico, além de vitaminas A, C, e K (LORENZI & MATOS, 2002; SAMUELSEN, 2000; PLANTAMED, 2004; MANUCHAIR, 2002).

Conforme Gálvez et al. (2003) os flavonóides estariam envolvidos com atividade citotóxica sobre certos tipos de tumores.

Segundo Chiang et al. (2001), certos componentes químicos como o ácido cafêico, ácido clorogênico e ácido ferúlico, demonstraram através de estudos *in vitro*, possuir atividade antiviral (Adenovírus, Herpesvírus).

A partir das folhas de *Plantago major* L., Samuelsen et al. (1996) isolaram a pectina, um tipo de polissacarídeo que, segundo experimentos, teria a capacidade de ativar o sistema complemento. Frações de polissacarídeos foram isolados de sementes de *Plantago major* (SAMUELSEN et al., 1999).

Este polissacarídeo (pectina) isolado de folhas de *P. major* segundo Hetland et al. (2000), possui efeito antibacteriano, comprovado experimentalmente através da utilização de camundongos infectados com *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B. Os autores revelam que este efeito antibacteriano é observado somente naqueles animais que receberam previamente à inoculação da bactéria, 3 doses diárias de pectina, durante 3 dias.

Taskova et al. (1999), isolaram um tipo pouco comum de glicosídeo, o 10-acetoximajoroside, extraído do extrato metanólico de folhas e flores secas de *Plantago major* L.

Conforme Duke (1989), as sementes da planta contém proteínas, fibras, óleos voláteis, óleos fixos, adenina, aucubina, colina, mucilagens, além de ácidos oléico e linoleico. Em medicina chinesa, as sementes são utilizadas como diurética.

Samuelsen (2000), cita que as folhas de *Plantago major* L. são classificadas como alimentícias. Esta característica é devidamente justificada por estudos fitoquímicos, que evidenciaram a presença de proteínas, açúcares, vitaminas e minerais.

Enfatizando o aspecto toxicológico, doses extremamente altas podem induzir diarreia e queda da pressão arterial (DUKE, 2000).

Samuelsen (2000), cita que em experimento realizado com ratos, a administração oral e intraperitoneal, determinou uma dose letal 50% (DL50) de 1000 mg/kg, quando da utilização intraperitoneal e acima de 4000 mg/kg, quando utilizada por via oral, determinando uma baixa toxicidade.

Em humanos, tanto o contato direto com as partes da planta, como a sua ingestão, podem provocar irritações cutâneas e reações alérgicas. O consumo da semente pode causar choque anafilático (DUKE,2000; PLANTAMED, 2004; DERMARDEROSIAN & BENTLER, 2002).

## **2.6 Aspectos farmacológicos e terapêuticos sobre *Plantago major* L.**

Guillén et al. (1997), realizaram um estudo para avaliar os efeitos farmacológicos e terapêuticos de *Plantago major*. O extrato aquoso foi preparado a partir de folhas da planta e administrado oralmente e topicamente, em ratos Wistar e camundongos Swiss albino, com o intuito de avaliar a atividade antiinflamatória e analgésica. Substâncias químicas foram utilizadas parenteralmente e topicamente para provocar edemas tanto no membro posterior, como na orelha dos animais. A formação de exsudato na cavidade pleural também foi avaliado no estudo. Em ratos, o pré tratamento com 1g/kg de extrato aquoso, administrado oralmente, diminuiu o edema no membro posterior e pleurite exsudativa, induzida por carragenina. Em camundongos, houve um decréscimo nas contorções de dor, induzidas por injeções intraperitoneais de ácido acético. Segundo os autores, o extrato aquoso de *Plantago major* demonstra atividade antiinflamatória e analgésica e que estas atividades estariam relacionadas com a inibição da síntese de prostaglandinas. Além disso, o tratamento oral de ratos e camundongos com o extrato da planta utilizando doses até 2g/kg não alteraram significativamente o comportamento dos cobaios ou induziram sinais evidentes de toxicidade.

Atta & Abo EL-Sooud (2004), utilizaram o extrato metanólico obtido de folhas e sementes de *Plantago major*, com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo da planta. Camundongos Swiss albinos, pré-tratados oralmente, com dose de 400 mg/kg de extrato metanólico de sementes e folhas de *P. major*, resultaram em uma significativa inibição da nocicepção, induzida experimentalmente por ácido acético, administrado por via intraperitoneal 1 h após o tratamento dos cobaios. Paralelamente, camundongos pré-tratados oralmente, com dose de 400mg/kg de extrato metanólico de folhas da planta, resultaram segundo os autores, em um significativo aumento na latência da resposta, avaliada através da



estimulação térmica da cauda do camundongo, 30 minutos após a administração do extrato. Um estudo de toxicidade aguda também foi realizado e neste, camundongos receberam por via oral em dose única 3 diferentes doses do extrato metanólico obtido das folhas da planta ( 0,4;1;2g/kg ). De acordo com os autores não foram evidenciados sinais de toxicidade, assim como óbitos.

Holetz et al. (2002), realizando testes *in vitro* com extrato hidroalcoólico de *Plantago major*, citam que a planta possui fraca atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e nenhuma atividade contra a levedura *Candida albicans*. Segundo os autores, o extrato da planta ainda demonstrou uma resposta moderada contra *Candida krusei*.

## 2.7 Aspectos farmacobotânicos e toxicológicos sobre o gênero *Luehea*

Plantas do gênero *Luehea* pertencem a família *Tiliaceae*, são árvores de médio a grande, que destacam-se pelo interesse econômico na indústria marceneira, têxtil e no curtume (LOPES et al., 1990).

Dentre as espécies deste gênero, destacam-se as espécies *Luehea grandiflora* Mart. e *Luehea divaricata* Martius et Zucc., conhecidas popularmente como “açoita-cavalo” (CORRÊA, 1984).

*Luehea divaricata* é uma espécie nativa do Brasil, sendo encontrada desde os estados do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte. Também pode ser encontrada em países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Uruguai (ALICE et al., 1999).

Conforme Alice et al. (1999), *L. divaricata* é uma árvore caducifólia alta, de até 25 metros de altura, com o tronco geralmente tortuoso e copa globosa. As folhas são simples oval-elípticas, elípticas de até 15 centímetros de comprimento e 6,5 centímetros de largura, apresentando coloração esbranquiçada na face dorsal, e verde oliva na face ventral com raros pêlos estrelados. As flores são vistosas, de coloração rosada a amarelada, com 3 a 4 centímetros de diâmetro. Fruto do tipo cápsula lenhosa, coberto de pêlos dourados, de coloração escura quando maduro, com até 3 centímetros de comprimento. Sementes aladas, com ala unilateral.



FIGURA 3 *Luehea grandiflora* Mart.

Disponível em: <[www.malvaceae.info/Genera/Luehea/gallery.html](http://www.malvaceae.info/Genera/Luehea/gallery.html)>

Na medicina popular, o uso da planta é amplo, sendo utilizada as folhas, flores e também a casca (CORRÊA, 1984).

Segundo Alice et al. (1999) a casca é utilizada no combate a febre, sendo também indicada para as afecções gastrointestinais e hepáticas. As folhas são utilizadas como antiinflamatórias e empregadas em afecções do aparelho respiratório e nas bronquites. As flores são usadas como calmante e antiespasmódicas.

Lopes et al. (1990), através de um estudo fitoquímico com a espécie *Luehea divaricata*, identificaram a partir do extrato alcoólico, substâncias ativas como taninos, saponinas e flavonóides. Os autores isolaram por cromatografia em camada delgada bidimensional os flavonóides: rutina, quercetina e vitexina.

Coelho de Souza et al. (2004), em decorrência de um estudo etnofarmacológico, avaliaram o potencial antimicrobiano de algumas plantas usadas no Brasil, mais precisamente no estado do Rio Grande do Sul. Utilizando o método de difusão em ágar, os autores constataram que o extrato metanólico de *Luehea divaricata* apresentava atividade contra a bactéria *Micrococcus luteus*. O extrato não apresentou nenhuma atividade contra bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, além da levedura *Candida albicans*.

Lopes et al. (1990) avaliaram a atividade antiinflamatória da espécie *Luehea divaricata*. A partir de um experimento utilizando o extrato aquoso obtido de folhas secas da planta, os autores empregaram o teste do edema da pata do rato, induzido por carragenina. O extrato foi administrado por via intraperitoneal, nas doses de 100 e 150 mg/kg e via oral, com auxílio de sonda orogástrica, na dose de 300 mg/kg. De acordo com os autores, a dose de 150 mg/kg administrada intraperitonealmente obteve o pico máximo de redução do edema.

Bianchi et al., (1991) realizaram estudos de toxicidade aguda e sub-aguda com a espécie *Luehea divaricata*. Em ambos os estudos foram utilizados camundongos Swiss, machos. O extrato alcoólico administrado por via intraperitoneal, nas doses de 250mg/kg e 500mg/kg desencadearam diarreia e eriçamento do pêlo, nas 72 horas em que foram observados no teste de toxicidade aguda. Óbitos de 50% dos animais foram evidenciados, utilizando dose de 500mg/kg em 48 horas. Para o teste de toxicidade sub-aguda, os autores administraram a dose de 25mg/kg de extrato aquoso e alcoólico por via intraperitoneal, uma vez por semana durante 8 dias. O extrato aquoso desencadeou a morte de um animal após a 8ª dose, diferentemente do extrato alcoólico, que nesta dose não desencadeou nenhum óbito.

## **2.8 Aspectos farmacobotânicos sobre *Piptadenia colubrina***

*Piptadenia colubrina* Vell. Benth, também chamada de *Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan é uma planta pertencente a família *Fabaceae* (PLANTAMED, 2004).

De acordo com Lorenzi & Matos (2002), *Anadenanthera colubrina* é uma árvore leguminosa caducifólia, de copa aberta e irregular, medindo de 5-15 metros de altura. O tronco quase cilíndrico de 30-50 centímetros de diâmetro, é revestido por uma casca rugosa, provida de espinhos esparsos. As folhas são compostas, bipinadas, com folíolos opostos de 4-6 milímetros de comprimento. Flores de coloração

branca. Os frutos são legumes (vagens) achatados, rígidos, glabros, brilhantes, de coloração amarronzada, de 10-29 centímetros de comprimento, contendo de 5-10 sementes lisas e escuras.

Corrêa (1984), cita que a planta é originalmente brasileira, sendo nativa desde o estado do Maranhão e Nordeste (incluindo a região da caatinga), até os estados do Paraná, Minas Gerais e Goiás. Nestas regiões é conhecida popularmente como “angico branco”, “angico”, “cambuí-angico”, “goma-de-angico”, “angico-de-casca”, “cambuí” (PLANTAMED, 2004; LORENZI & MATOS, 2002).



FIGURA 4 *Piptadenia colubrina* Benth.

Disponível em: < [www.arvores.brasil.nom.br/florin/angbr.htm](http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/angbr.htm) >

Conforme Lorenzi & Matos (2002), a árvore possui uma ampla importância econômica. Por ser fornecedora de uma madeira de boa qualidade, sua utilização é ampla, sendo empregada na construção civil, além da produção de lenha e carvão. A casca é amplamente utilizada na indústria de curtume (GARCIA et al., 2004).

Em medicina popular, a utilização da árvore é restrita, sendo utilizada somente a casca e uma espécie de goma extraída do caule. A casca é indicada para o tratamento de diarreia, disenteria, gases e hemorragias (PLANTAMED, 2004). O decocto e o xarope da casca do caule são empregados contra tosse, bronquite e coqueluche (LORENZI & MATOS, 2002). A goma é indicada para o tratamento de problemas respiratórios e úlceras, além de ser utilizada pela indústria como ingrediente para a fabricação da goma de mascar.

Segundo Plantamed (2004) as sementes e folhas secas da planta são tóxicas, possuindo atividades alucinógena e hipnótica.

Estudos fitoquímicos realizados com a casca de *Anadenanthera colubrina*, constataram a presença de um alcalóide (óxido de N,N- dimetiltriptamina), esteróides (palmitato de B- sitosterol, B- sitosterol glicosídeo), flavonóides e triterpenóides (luperona e lupeol), também compostos fenólicos (dalbergina, 3,4,5- dimethoxidalbegiona) (LORENZI & MATOS, 2002).

Gutierrez Lugo et al. (2003) realizando uma investigação química com as partes aéreas de *Anadenanthera colubrina*, isolaram a substância ativa anadantoflavona, um tipo de flavonóide, que segundo os autores, teria a capacidade de inibir a lipoxigenase.

As sementes da planta, segundo Plantamed (2004), possuem substâncias ativas, como saponina e bufotenina. Na goma estão presentes matérias resinosas e mucilaginosas.

De acordo com Delgobo et al. (1999), substâncias química como oligossacarídeos (dissacarídeos, trissacarídeos, pentassacarídeos e heptassacarídeos) podem ser encontrados no exsudato da goma de *Anadenanthera colubrina*.

Moretão et al., (2003) através de estudos fitoquímicos, com o exsudato da goma da árvore, isolaram um complexo heteropolissacarídeo contendo galactose e arabinose (ARAGAL). Segundo Moretão et al. (2004), este complexo heteropolissacarídeo demonstrou através de estudos, possuir atividade anti-tumoral, assim como um aumento da habilidade fagocítica, devido a ativação de macrófagos.

## 2.9 Aspectos farmacobotânicos sobre *Myrocarpus frondosus*

*Myrocarpus frondosus* alemão é uma árvore leguminosa pertencente a família *Fabaceae* (LORENZI & MATOS, 2002).

Segundo Sartori & Tozzi (2004), os representantes do gênero *Myrocarpus*, geralmente são árvores de grande porte, com espécies que ultrapassam 20 metros de altura, como verificado na espécie *Myrocarpus frondosus* alemão.

*Myrocarpus* é um gênero exclusivamente Sul-Americano, cujas espécies ocorrem no norte da América do Sul, no leste da Bolívia e nas regiões norte, sul, sudeste Brasileiras, inclusive na costa Atlântica, preferencialmente em florestas. A única espécie amplamente distribuída é *M. frondosus*, que ocorre no sudoeste Paraguai, norte da Argentina, e nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil (SARTORI & TOZZI, 2004).

De acordo com Lorenzi & Matos (2002), *M. frondosus* apresenta o tronco cilíndrico, com aproximadamente 60-80 centímetros de diâmetro, onde através de incisão, libera uma resina aromática denominada “bálsamo”. As folhas são compostas, apresentando folíolos de 5-10 cm de comprimento. Flores são de coloração esbranquiçadas, suavemente perfumadas. Os frutos são sâmaras, de cerca de 5 cm de comprimento.

Sartori & Tozzi (2004), citam que *Myrocarpus* foi descrito por Allemão baseado na presença de flor regular e presença de bálsamo no fruto. O nome é uma alusão a presença de bálsamo no fruto, conforme implícito no prefixo grego “Myron” que significa óleo perfumado.

A árvore é conhecida popularmente como “bálsamo”, “bálsamo caboriba”, “bálsamo caboreíba”, “cabreúva”, “cabriúna”, “caboreíba”, “caboré” (PLANTAMED, 2004).



FIGURA 5 *Myrocarpus frondosus* Allemão  
Disponível em: <[www.arvores.brasil.nom.br/florin/balsamo.htm](http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/balsamo.htm)>

Em medicina popular a resina (bálsamo) é amplamente usada em preparações tópicas para o tratamento de feridas, abscessos, úlceras, frieiras e sarnas. Também tem sido indicado para o tratamento de bronquite, laringite, catarro, tuberculose, disenteria. O “bálsamo” ainda pode ser encontrado em tônicos capilares, desodorantes, sabonetes, cremes e loções (LORENZI & MATOS, 2002).

Estudos fitoquímicos realizados com a resina (bálsamo) da árvore, identificaram a presença de 50-64% de óleo volátil e 20-28% de resina. O óleo volátil contém como ingredientes ativos, ésteres dos ácidos benzóico e ciânico, bem como pequenas quantidades de nerolidol e ácidos benzóico e ciânico livres (LORENZI & MATOS, 2002).

## 2.10 Estudos de toxicologia pré-clínica de fitoterápicos

Estes estudos são uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações acerca dos riscos sobre a saúde, resultantes de sua exposição (BRITO, 1995).

Segundo Simões et al., (2003) a toxicologia pré-clínica deve indicar o grau de confiança de um determinado medicamento a ser administrado à espécie humana, devendo guardar relação dose-efeito satisfatória e, assim, permitindo estabelecer uma relação causa-efeito.

A partir da definição de fitoterápico como medicamento de origem vegetal, pela portaria nº. 123, de 19 de outubro de 1994, estes, estão sujeitos à legislação vigente para medicamentos (BRITO, 1995).

Brito (1995) cita que de acordo com a resolução nº 1 de 13 de junho de 1988, do Conselho Nacional de Saúde, em seu capítulo VIII, no artigo 52 (que trata das exigências da pesquisa pré-clínica), incisos 3 e 4 (duração dos estudos pré-clínicos, período de exposição do homem e estudos pré-clínicos a serem realizados) os estudos toxicológicos pré-clínicos estão divididos em:

a) Dose Letal 50% (DL 50): consiste na administração de níveis crescentes de doses, obtendo-se um nível de dose que não mata nenhum dos animais tratados, 3 níveis crescentes de dose nos quais morrem entre 10% e 90% dos animais, e uma última dose que mata 100% dos animais

b) Toxicidade aguda (dose simples): avalia a toxicidade após exposição a uma única dose ou dose fracionada do fitoterápico, administrada no período de 24 horas. Fornece informações iniciais do modo de ação tóxica do fitoterápico. Serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre os estudos de toxicidade a longo prazo ou doses repetidas.

c) Toxicidade Aguda (doses repetidas): fornece informações iniciais do modo de ação do fitoterápico, fornecendo informações a respeito dos riscos sobre a saúde, resultante de uma exposição de doses repetidas, em um curto espaço de tempo

d) Toxicidade subcrônica (doses repetidas): fornece informações acerca dos riscos potenciais sobre a saúde, resultante de uma exposição preferencialmente oral, de doses repetidas de um determinado fitoterápico em um período mais longo, porém limitado, de tempo;

e) Toxicidade crônica: tem por objetivo caracterizar o perfil toxicológico de um fitoterápico, administrado repetidamente por um longo período de tempo.

No teste de toxicidade aguda são utilizados mamíferos roedores em idade adulta, ambos os sexos (mínimo de 6 animais/sexo), sendo que as fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. O fitoterápico é administrado por via oral ou parenteral uma única vez ou fracionado em período não superior a 24 horas, obedecendo a via proposta para o uso do produto em seres humanos. Após 15, 30 e 60 minutos, e a cada 4 horas e diariamente, durante os 14 dias após a administração, os animais são observados quanto à variação de peso e consumo de alimentos, além da observação clínica, incluindo parâmetros a serem observados, tais como: alterações de comportamento, pêlos, pele e mucosas, sistemas respiratório e circulatório, sistemas nervosos central, periférico e autônomo. Os animais que morrem no decorrer do estudo são necropsiados e aqueles que sobrevivem são sacrificados e necropsiados ao final do período de observação. (BRASIL, 2004c ; BRITO, 1995; WHO, 1993).

No teste de toxicidade aguda (doses repetidas), são realizadas sete administrações do fitoterápico em teste, em dias alternados, pela via selecionada, totalizando 14 dias de tratamento. A duração do período de observação é de 14 dias após administração do último tratamento, avaliando-se qualquer manifestação tóxica ocorrida, além de parâmetros diários de peso corporal, consumo de água e alimento, e produção de excretos. Para este estudo são utilizados mamíferos roedores (ratos wistar) em idade adulta ambos os sexos (10 animais/sexo). Os animais que morrem no decorrer do estudo, são necropsiados para a determinação da causa *mortis*, aqueles que sobrevivem, ao final do estudo, são eutanasiados e

necropsiados. Órgãos como fígado, rins, coração, baço, pulmões, estômago, testículos ou ovários, são retirados e pesados (BRITO, 1995).

O estudo de toxicidade subcrônica (doses repetidas), é realizado previamente a um estudo a longo prazo (crônico). No estudo de toxicidade subcrônica, o fitoterápico é administrado diariamente, pela mesma via preconizada para seres humanos, a vários grupos de animais do estudo, a razão de uma dose por grupo, além do grupo controle, durante um período de 30 dias. Os níveis de dose são estabelecidos para, pelo menos três: menor dose que produza o efeito terapêutico; maior dose que produza efeito adverso detectável (limitada pelo volume da dose); e uma dose intermediária (média geométrica entre a dose maior e menor). Para este estudo são utilizadas duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora (10 animais/sexo/dose) e uma não-roedora (3 animais/sexo/dose). No decorrer do período de administração do fitoterápico, os efeitos nos animais são diariamente observados, como massa corporal, quantidade de água e alimento consumidos e de excretas produzidas são determinadas. Após os 30 dias do estudo, são realizadas análises bioquímicas completas de sangue, incluindo hemograma completo. Na necropsia geral de todos os animais, é feito um exame macroscópico, pesagem de órgãos, sendo obrigatório a realização de exames histopatológicos nos animais tratados com a maior dose e grupo controle (BRITO, 1995; BRASIL, 2004c). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em resolução Nº 90, de 16 de março de 2004, recomenda que sejam analisados macro e microscopicamente órgãos como fígado, rins, pulmão, coração, esôfago e estômago, intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, glândulas adrenal e tireóide.

Por fim, em um estudo de toxicidade crônica, utiliza-se o mesmo protocolo experimental do estudo subcrônico, em relação a todos os itens, exceto no que se refere ao tempo de tratamento dos animais, que pode variar de três meses a um ano, de acordo com o tempo de exposição previsto para o homem. A garantia da qualidade do estudo está vinculada aos cuidados com: regime alimentar, onde a água e a ração são analisadas periodicamente; conhecimentos de detalhes veterinários da espécie sob investigação; e conhecimento da classe química a que pertence o fitoterápico (BRITO, 1995; BRASIL, 2004c).

A escolha dos animais de laboratório, como espécies utilizadas nos testes toxicológicos, está baseada na sua fácil manutenção e observação, na possibilidade de utilização de um grande número de indivíduos, com ciclos vitais curtos, alta prolificidade, padronização genética e do ambiente de laboratório. As espécies de laboratório convencionais são o *Mus domesticus domesticus* (camundongo) e o *Rattus norvegicus* (rato) (COBEA, 1996).

Segundo Simões et al. (2003), alguns estudos de toxicidade à longo prazo possuem características especiais e, portanto, considerados estudos complementares, entre eles: embriofetotoxicidade, fertilidade e capacidade reprodutiva, carcinogenicidade e mutagenicidade.

O período de administração do produto em teste nos animais deve seguir o período proposto para utilização terapêutica. Segundo WHO (1993), os testes de toxicidade pré-clínica seguem padrões comumente utilizados por diversos países, podendo variar de acordo com regulamentações individuais.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na resolução Nº 90, de 16 de março de 2004, determina que a duração mínima dos estudos de toxicidade pré-clínica de doses repetidas (longa

duração) de fitoterápicos, deve ser de 4 semanas até 30 dias de uso terapêutico do produto por ano, e de 12 semanas acima de 30 dias de uso terapêutico do produto por ano.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Medicamento Fitoterápico**

##### **a) Fabricante, Amostra e Composição**



O medicamento fitoterápico Elixir Cassaú Composto<sup>®</sup> utilizado nos experimentos foi fornecido pelo laboratório Cibecol, sob lote nº 040131(fabricado em junho de 2004 com validade de 3 anos) tendo registro no Ministério da Saúde sob número 1.0077.0004, sendo responsável técnica a Farmacêutica Márcia W. da Costa com registro no Conselho Regional de Farmácia do Rio Grande do Sul sob o número 3767.

O fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> apresenta a seguinte composição:

Extrato fluido de <i>Aristolochia cymbifera</i> Mart.....	0,019 ml (0,019 mg)
Extrato fluido de <i>Plantago major</i> L. ....	0,056 ml (0,056 mg)
Extrato fluido de <i>Luehea grandiflora</i> Mart. ....	0,142 ml (0,142 mg)
Extrato fluido de <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão.....	0,038 ml (0,038 mg)
Extrato fluido de <i>Piptadenia colubrina</i> Benth. ....	0,056 ml (0,056 mg)
Veículo q.s.p.....	1,000 ml

Os valores entre parênteses correspondem as quantidades em mg da planta utilizada.

De acordo com o fabricante o veículo do fitoterápico é uma mistura de água purificada, álcool etílico, glicose e sorbitol. Também possui conservantes, sendo benzoato de sódio e sorbato de potássio. A graduação alcoólica depois de pronto é em torno de 18° GL.

As partes utilizadas das plantas são as seguintes: *Aristolochia cymbifera* ( caule e raiz), *Plantago major* L. (folhas e talos), *Luehea grandiflora* Mart. (casca), *Myrocarpus frondosus* Allemão (casca), *Piptadenia colubrina* Benth. (casca).

As matérias-primas vegetais envolvidas na elaboração do fitoterápico são provenientes da área de cultivo da empresa, localizada em Riozinho – RS.

## 3.2 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, com idade inicial de 120 dias com peso médio de 304,70 ± 28,88g para os machos e 218,04 ± 15,16g para as fêmeas (média ± desvio-padrão da média), provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), com condições constantes de umidade, temperatura (21°C ± 2) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 7 às 19h). Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/ PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

## 3.3 Protocolo Experimental

(baseado na resolução nº 90, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA)

### 3.3.1 Experimento 1 - Toxicidade oral aguda

#### a) Tratamento

Foi administrada dose correspondente a 20 vezes a dose terapêutica preconizada pelo fabricante para seres humanos adultos com peso de  $\pm 70$  kg, correspondendo a dosagem de 26 ml/kg ou 2,6 ml/100g. Formou-se dois grupos de machos e fêmeas (n = 6 / sexo) onde um grupo recebeu em dose única por via oral através de sonda gástrica flexível, o volume correspondente do fitoterápico, e o outro grupo recebeu a mesma dose, porém do veículo do fitoterápico. Quando necessário fracionou-se o volume correspondente a cada animal, sendo administrado em duas vezes com intervalo de 15 minutos quando ultrapassasse o volume de 2ml/100g, conforme referência normativa 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico ( Organization for Economic Cooperation and Development – OECD).

Durante os 14 dias do período de experimentação, machos e fêmeas foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas medindo (25 x 22 x 21 cm),. Estas gaiolas metabólicas foram utilizadas com o intuito de se avaliar diariamente e individualmente cada animal quanto aos consumos de ração e água, e também produções de fezes e urina. Estruturalmente a gaiola é composta por bandeja coletora de fezes, funil e proveta para coleta de urina, além de bebedouro e comedouro (Anexo A-foto).

#### **b) Sacrifício dos animais**

Após os 14 dias do período de observação, os animais foram eutanasiados por decapitação.

A pele e a parede abdominal e torácica foram incisadas, onde procedeu-se o exame macroscópico dos órgãos da cavidade torácica e abdominal, além de órgãos e glândulas da região cervical. Fígado e rins foram dissecados e retirados de cada um dos animais do grupo tratado e acondicionados em solução de formol tamponado.

#### **c) Variáveis avaliadas**

##### **Machos e Fêmeas:**

- Consumo diário de ração ( g );
- Consumo diário de água ( g );
- Massa corporal diária ( g );
- Produção diária de urina ( g );
- Produção diária de fezes ( g );
- Análise macroscópica dos órgãos;
- Aparecimento de sinais de toxicidade. De forma a padronizar o teste, procurou-se observar os seguintes sinais:
  - a) alteração da locomoção - movimentação dos animais na gaiola;
  - b) insuficiência respiratória e cardíaca (dispnéia, bradicardia,taquicardia);
  - c) piloereção - a ocorrência de eriçamento dos pêlos;

- d) sialorréia - presença de secreção na boca dos animais;
- e) contorções abdominais;
- f) diarreia;
- g) reflexos auricular e corneal – comprovar se o animal responde a excitação provocada por pinça hemostática nas regiões auriculares e corneal, através da movimentação sensitiva;
- h) atividade sobre a musculatura esquelética (força para agarrar) – avaliar a capacidade do animal permanecer seguro a grade superior da gaiola;
- i) atividade no sistema nervoso central – tremores, convulsões, sedação, hipnose e coma;

Os animais foram observados quanto a sinais de toxicidade durante as primeiras 24 horas, nos seguintes tempos após a administração: 15 e 30 minutos, 1 e 4 h. Após estes tempos os animais foram observados diariamente uma vez ao dia durante os 14 dias do experimento, onde os resultados foram anotados em ficha específica.

### **3.3.2 Experimento 2 - Determinação de toxicidade oral de doses repetidas**

#### **a) Tratamento e grupos experimentais**

Grupo 1: 20 ratos, sendo 10 machos e 10 fêmeas, tratados diariamente durante 30 dias por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo a dose total diária recomendada pelo fabricante para seres humanos adultos de 1,3 ml/kg, completada com veículo para proporcionar volume de 13ml/kg, como nos demais grupos.

Grupo 2 : 20 ratos, sendo 10 machos e 10 fêmeas, tratados diariamente durante 30 dias por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo dose 5 vezes maior que a dose total diária recomendada para seres humanos adultos de 6,5 ml/kg, completada com veículo até 13 ml/kg.

Grupo 3 : 20 ratos, sendo 10 machos e 10 fêmeas, tratados diariamente durante 30 dias por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo dose 10 vezes maior que a dose total diária recomendada para seres humanos adultos de 13 ml/kg.

Grupo 4 ( controle ) : 20 ratos, sendo 10 machos e 10 fêmeas, tratados diariamente durante 30 dias por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo a dose diária de 13 ml/kg de veículo.

Durante o período de experimentação, os animais dos grupos 1 e controle foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas de (25 x 22 x 21 cm). Os animais dos grupos 2 e 3 foram mantidos individualmente em caixas plásticas medindo (29 x 12 x 17 cm) com maravalha limpa.

#### **b) Coleta de sangue e sacrifício dos Animais**

Todos os animais machos e fêmeas de todos os grupos após o término dos 30 dias de tratamento, foram previamente anestesiados com tiopental, administrado intraperitonealmente na dose de 35 mg/kg.

A pele e a parede abdominal foram incisadas, onde então procedeu-se a coleta de sangue da veia cava para posterior análise. Foram coletadas aleatoriamente através de sorteio amostras de sangue de 10 animais de cada grupo ( 5 amostras de machos e 5 amostras de fêmeas) e acondicionadas em tubos com e sem anticoagulante. O volume de sangue coletado foi o suficiente para a realização das análises.

Após a coleta de sangue, todos os animais foram sacrificados por decapitação e então procedeu-se a necropsia em todos ( naqueles onde houve coleta de sangue e naqueles onde não houve a coleta de sangue).

Na necropsia todos os órgãos foram observados macroscopicamente. Fígado, rins, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestinos, pâncreas, adrenais, tireóides e órgãos sexuais foram retirados de cada um dos animais.

Cada um dos órgãos foi dissecado e pesado em balança analítica individualmente. Estômago e vesícula seminal foram esvaziados antes da pesagem.

Todos os órgãos retirados dos animais foram acondicionados em solução de formalina tamponada. Os órgãos dos animais pertencentes ao grupo controle e ao grupo onde foi utilizada a maior dose, foram enviados para análise histopatológica. Após a fixação em formol, foram embebidos em parafina, seccionados com 3 µm. Os fragmentos foram montados sobre a lâmina, fixados com xilol, corados com hematoxilina/eosina e observados em microscópio óptico a 40, 100 e 400 x de aumento. A análise da histopatologia foi realizada no laboratório de Patologia Veterinária, do Departamento de Medicina Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, tendo como responsável o Prof. Dr. David Driemeier.

### **c) Exames Complementares**

Foram realizados hemograma completo e análise bioquímica de sangue (sódio, potássio, gama-glutamyltranspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicerídeos, glicose, proteínas totais e bilirrubina total). As respectivas análises foram realizadas no Laboratório Veterinário de Análises Clínicas Ltda – Petlab, situado à rua Dr. Oscar Bittencourt, nº 154 Bairro Menino Deus, Porto Alegre, tendo como responsável técnica a Médica Veterinária Márcia Regina Oliveira Cordeiro.

Para a análise bioquímica sanguínea foram utilizados kits para dosagens bioquímicas que utilizam metodologia cinética e colorimétrica da marca Labtest. A leitura dos resultados foi realizado utilizando aparelho espectrofotométrico SB 190 da marca Celm.

Para a realização do hemograma foram confeccionadas 2 lâminas de esfregaço, onde posteriormente foram coradas com Wright para a realização do diferencial leucocitário. As contagens de eritrócitos, hemoglobina e leucócitos totais foram realizadas pelo contador de células CC 550 da marca

Celm. Para a identificação do volume globular ou hematócrito foram preenchidos capilares de micro-hematócrito.

#### **d) Variáveis avaliadas**

Em todos os grupos tratados com o fitoterápico, assim como o grupo controle, foram avaliados a massa corporal diária (g), consumo diário de ração (g), consumo diário de água (ml), análise macroscópica dos órgãos, peso relativo (%) das vísceras no dia do sacrifício (fígado, rins, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestinos, pâncreas, adrenais, tireóides e órgãos sexuais), assim como também foram avaliados o aparecimento de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso progressiva e diminuição na ingestão de água e ração.

Nos grupos 1 e controle, também foram avaliados as produções diárias de urina e fezes (g).

Exames complementares como análise histopatológica dos órgãos, hemograma completo e análise bioquímica sanguínea foram realizados no grupo 3 e controle.

### **3.4 Análise Estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de MR) e teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa SPSS para Windows 11.0 e o EXCEL. As variáveis quantitativas como o desenvolvimento ponderal dos animais de cada grupo, consumo de água e de ração, produção de urina e fezes, foram comparadas através da análise de variância de medidas repetidas.

As variáveis quantitativas como análise bioquímica, massa relativa dos órgãos de machos e fêmeas foram comparadas através da análise de variância de uma via (ANOVA). Quando necessário efetuou-se o pós-teste de Bonferroni para identificação dos grupos estatisticamente diferentes (CALLEGARI-JAQUES, 2004; TRIOLA, 2003).

As diferenças foram consideradas significativas sempre que  $p < 0,05$ , com nível de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS

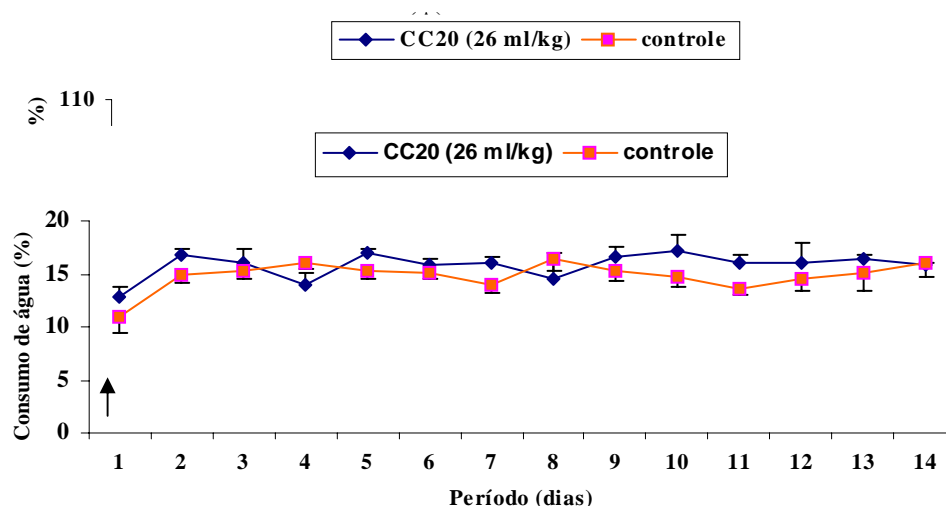
### 4.1 Toxicidade Aguda do fitoterápico Cassaú Composto®

#### 4.1.1 Desenvolvimento ponderal das ratas

A Figura 6A mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia=100%) durante os 14 dias de observação, calculados a partir da mensuração diária de massa corporal (g) das ratas tratadas com uma única dose por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® na dose de 26 ml/kg (CC20), e um grupo controle. Verificou-se que ambos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal ascendente durante o período sem diferença estatisticamente significativa entre si ( $p>0,05$  ANOVA de MR). No período observou-se um ganho relativo médio de  $2,60 \pm 0,86$  no grupo CC 20 (26 ml/kg) e  $3,15 \pm 0,88$  no grupo controle (% média  $\pm$  epm).

#### 4.1.2 Consumo relativo de água e ração das ratas

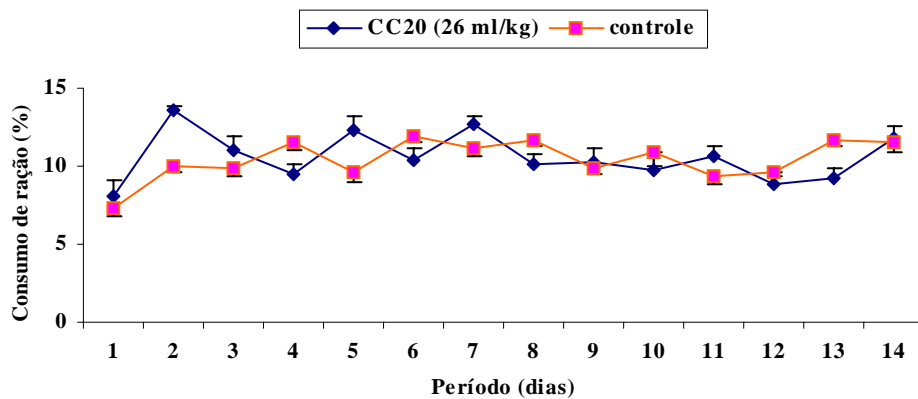
O tratamento com o fitoterápico Cassaú Composto® não interferiu no consumo percentual médio de água (Figura 6B) e de ração (Figura 6C) em relação a massa corporal (%) durante o período de observação. O cálculo foi efetuado a partir dos consumos de água e ração (g) relacionados a massa corporal diária (g) das ratas tratadas com uma única dose por via oral, do fitoterápico. Verificou-se que, tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto aquelas do grupo controle, apresentaram consumo relativo (%) de água e ração semelhante durante o período de observação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$  ANOVA de MR). As ratas tratadas apresentaram um consumo relativo médio (% média  $\pm$  epm) de água:  $15,80 \pm 0,50$  no grupo CC20 e  $14,82 \pm 0,54$  no grupo controle; e de ração  $10,58 \pm 0,64$  no grupo CC20 e  $10,44 \pm 0,53$  no grupo controle.



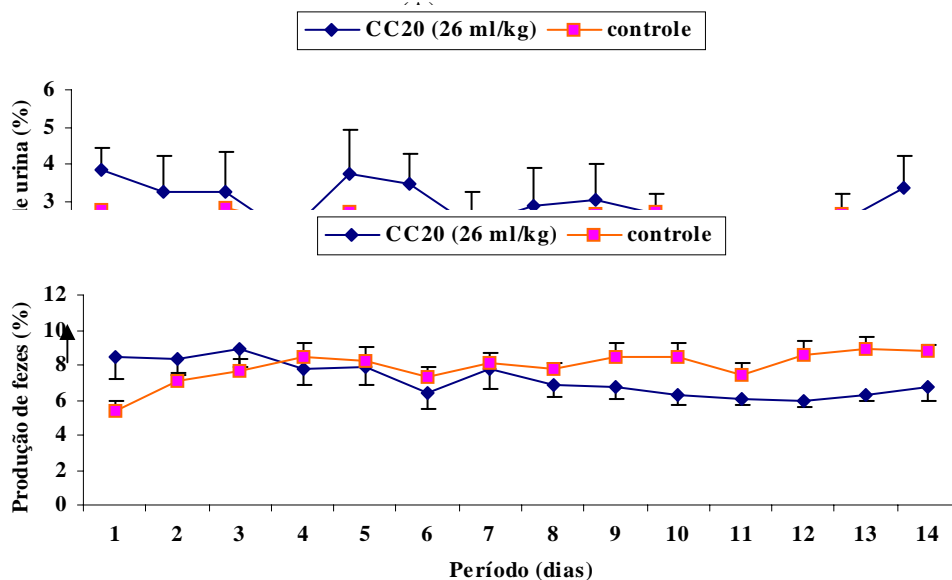
(B)  
(C)

FIGURA 6. (A) Desenvolvimento ponderal (1º dia = 100%), (B) consumo relativo de água e (C) de ração das ratas tratadas com uma dose de 26 ml/kg (CC20), por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).

↑  
4.1.3 Produção de fezes e urina das ratas



A Figura 7 mostra a produção de urina (Figura 7A) e de fezes (Figura 7B) em relação a massa corporal (%) durante o período de observação. O cálculo foi efetuado a partir da produção diária de urina (g), e de fezes (g) relacionado a massa corporal diária (g), das ratas tratadas com uma única dose por via oral, do fitoterápico. Verificou-se que, tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto aquelas do grupo controle, apresentaram uma produção relativa (%) de urina e fezes semelhantes durante o período de observação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$  ANOVA de MR). As ratas tratadas apresentaram uma produção relativa média (média  $\pm$  epm) de urina:  $2,85 \pm 0,27$  no grupo CC20 e  $2,47 \pm 0,11$  no grupo controle; e de fezes  $7,18 \pm 0,41$  no grupo CC20 e  $7,91 \pm 0,37$  no grupo controle.



(B)

FIGURA 7. (A) Produção de urina (%) e (B) de fezes (%) das ratas tratadas com uma dose de 26 ml/kg (CC20) por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).

#### 4.1.4 Desenvolvimento ponderal dos ratos

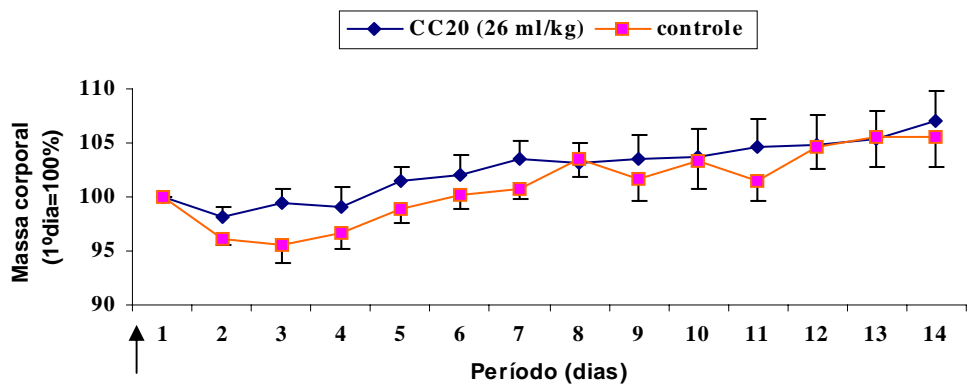


A Figura 8A mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia=100%) durante os 14 dias de observação, calculados a partir da mensuração diária de massa corporal (g) dos ratos tratados com uma única dose por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 26 ml/kg (CC20), e um grupo controle. Verificou-se que ambos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante o período sem diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$  ANOVA de MR). Observou-se um ganho relativo (%) médio de  $2,56 \pm 1,17$  no grupo CC 20 (26 ml/kg) e  $1,00 \pm 1,36$  no grupo controle (média  $\pm$  epm).

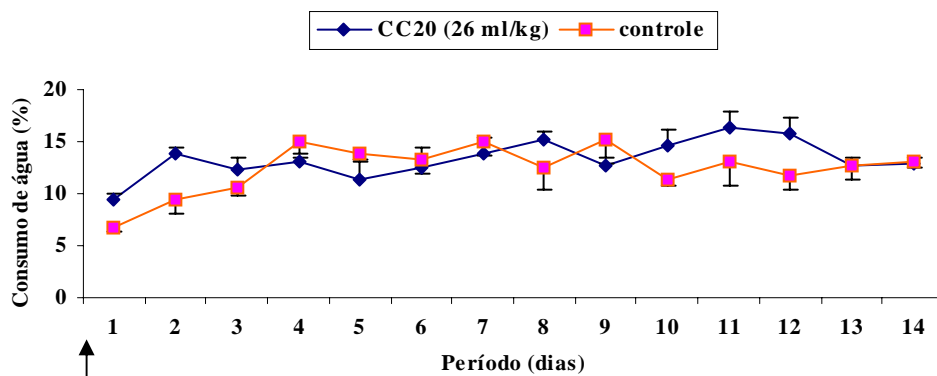
#### 4.1.5 Consumo relativo de água e ração dos ratos

O tratamento com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> não interferiu no consumo médio de água (Figura 8B) e de ração (Figura 8C) em relação a massa corporal (%) durante o período de observação. O cálculo foi efetuado a partir dos consumos de água e ração (g) relacionados a massa corporal diária (g) dos ratos tratados com uma única dose por via oral, do fitoterápico. Verificou-se que, tanto os ratos tratados com o fitoterápico quanto aqueles do grupo controle, apresentaram consumo relativo (%) de água e ração durante o período de observação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$  ANOVA de MR). Os ratos tratados apresentaram um consumo relativo médio (média  $\pm$  epm) de água:  $13,30 \pm 0,74$  no grupo CC20 e  $12,35 \pm 0,97$  no grupo controle; e de ração  $8,77 \pm 0,30$  no grupo CC20 e  $9,06 \pm 0,77$  no grupo controle.





(A)



(B)

(C)

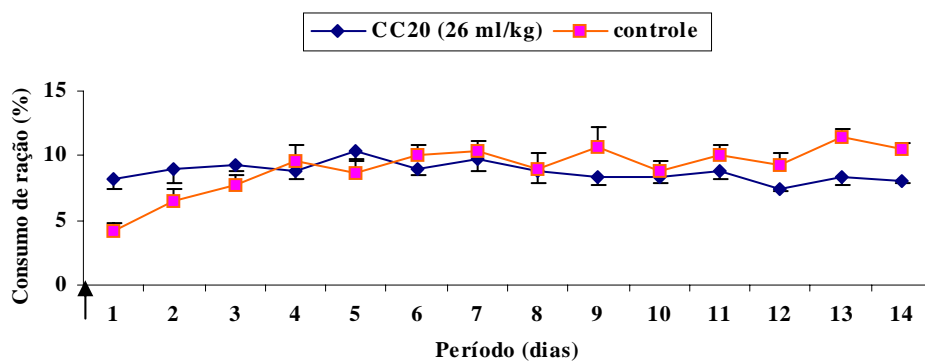


FIGURA 8. (A) Desenvolvimento ponderal (1º dia = 100%), (B) consumo relativo de água e (C) de ração dos ratos tratados com uma dose de 26 ml/kg (CC 20), por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto® e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo)

#### 4.1.6 Produção de fezes e urina dos ratos

A Figura 9 mostra a produção de urina (Figura 9 A) e de fezes (Figura 9B) em relação a massa corporal (%) durante o período de observação. O cálculo foi efetuado a partir da produção diária de urina (g), e de fezes (g) relacionado a massa corporal diária (g), dos ratos tratados com uma única dose por via oral, do fitoterápico. Verificou-se que, tanto os ratos tratados com o fitoterápico quanto aqueles do grupo controle, apresentaram uma produção relativa (%) de urina e fezes durante o período de observação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$  ANOVA de MR). Os ratos tratados apresentaram uma produção relativa média (média  $\pm$  epm) de urina:  $3,36 \pm 0,27$  no grupo CC20 e  $3,15 \pm 0,21$  no grupo controle; e de fezes  $5,78 \pm 0,49$  no grupo CC20 e  $6,66 \pm 0,61$  no grupo controle.

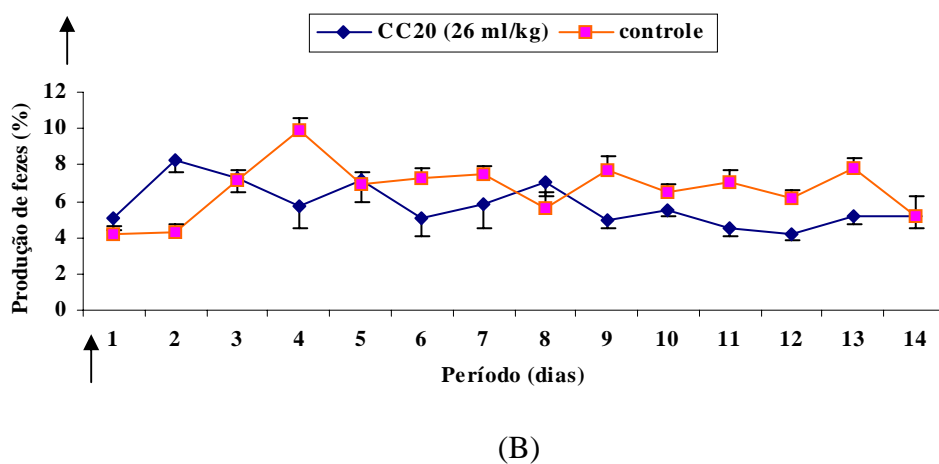
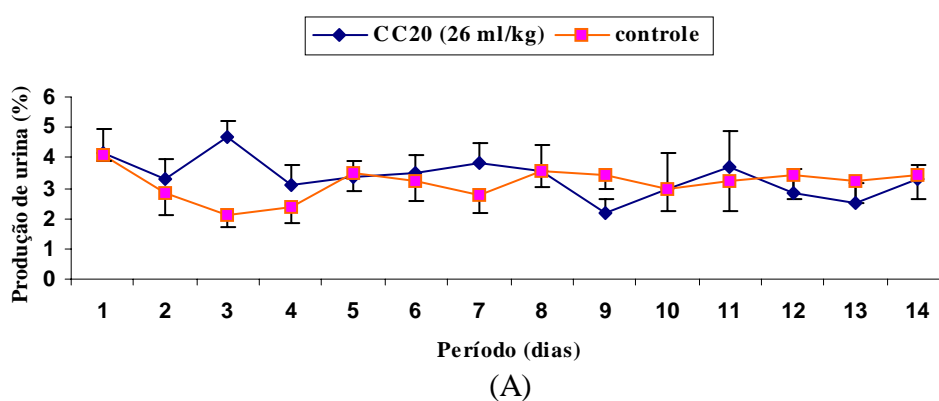


FIGURA 9. (A) Produção de urina (%) e (B) de fezes (%) dos ratos tratados com uma única dose por via oral, do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 26ml/kg (CC20), e um grupo controle. A seta assinala o dia do tratamento. Dados expressos pela média e erro padrão da média (n=6/grupo).

#### 4.1.7 Observação clínica dos animais

Todos os animais foram observados individualmente, imediatamente após a administração do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup>, e nos períodos de 15, 30, 60 minutos e após 4 horas e diariamente durante os 14 dias do estudo.

Tanto nos animais do grupo tratado com o fitoterápico, quanto nos animais tratados com o veículo do fitoterápico observou-se alteração da locomoção (ataxia) sendo observado nos períodos iniciais à administração, onde posteriormente houve a reversão deste sinal clínico 24 horas após o tratamento.

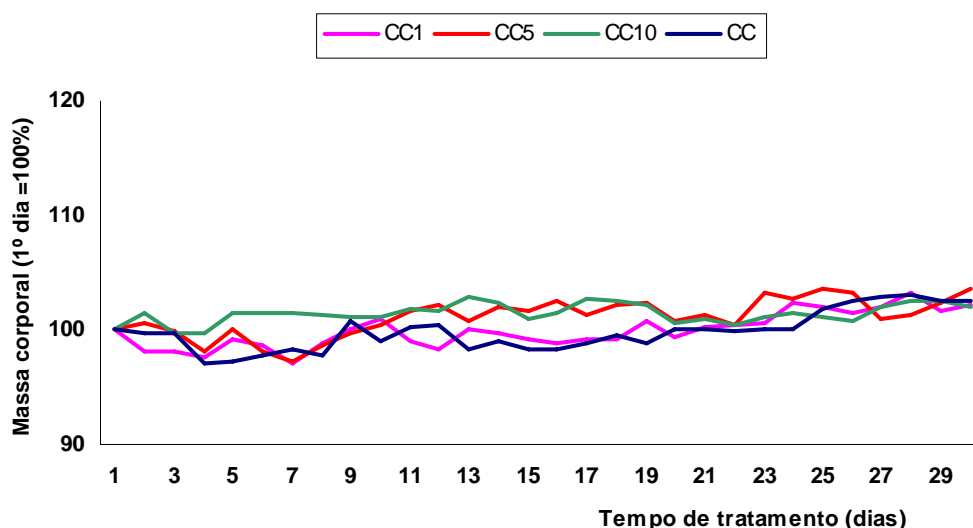
Os animais do grupo controle demonstraram uma discreta depressão no sistema nervoso central, com o aparecimento de sedação, com reversão do sinal 24 horas após a administração do veículo.

## **4.2 Toxicidade de doses repetidas**

### 4.2.1 Desenvolvimento ponderal das ratas

A Figura 10 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 30 dias de tratamento, calculado a partir da mensuração diária de massa corporal (g) das ratas tratadas diariamente, por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto® com três doses diferentes CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Verificou-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal semelhante durante esse período. Os grupos CC1 e CC apresentaram média relativa menor de ganho de massa corporal em relação aos grupos CC5 e CC10, porém a diferença não foi estatisticamente significativa.

FIGURA 10. Desenvolvimento ponderal das ratas (1º dia = 100%) tratadas com o



fitoterápico Cassaú Composto® com três diferentes doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

#### 4.2.2 Consumo de ração das ratas

A Figura 11 mostra o consumo de ração em relação a massa corporal (%), avaliado durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado a massa corporal diária (g) das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto® nas doses de CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com veículo do fitoterápico. Com base nos resultados, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de MR  $p < 0,01$ ). Com a realização do teste de Bonferroni, concluiu-se que o grupo CC1, diferente estatisticamente dos demais grupos. As ratas apresentaram um consumo relativo médio (média  $\pm$  epm) de ração de:  $10,56 \pm 0,38$  no grupo CC1,  $6,56 \pm 0,13$  no grupo CC5,  $5,10 \pm 0,24$  no grupo CC10, e  $7,03 \pm 0,47$  no grupo controle.

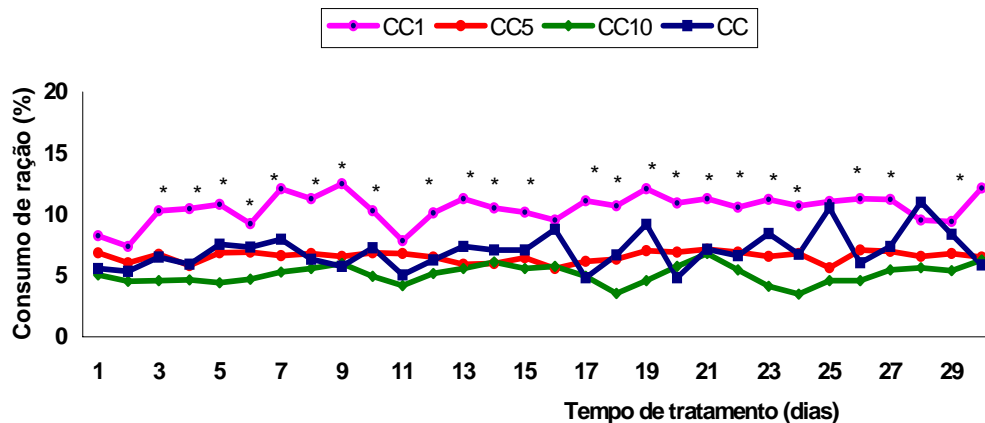


FIGURA 11. Consumo percentual de ração (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC1) em relação aos demais grupos tratados e controle ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.3 Consumo de água das ratas

A Figura 12 mostra o consumo de água em relação a massa corporal (%), avaliados durante os 30 dias de tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado a massa corporal diária (g), das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> por via oral nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Apesar das flutuações, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de MR  $p > 0,05$ ). As ratas apresentaram um consumo relativo médio (média  $\pm$  epm) de água de:  $14,15 \pm 0,37$  no grupo CC1,  $13,44 \pm 0,35$  no grupo CC5,  $13,45 \pm 0,41$  no grupo CC10, e  $13,86 \pm 0,39$  no grupo controle.

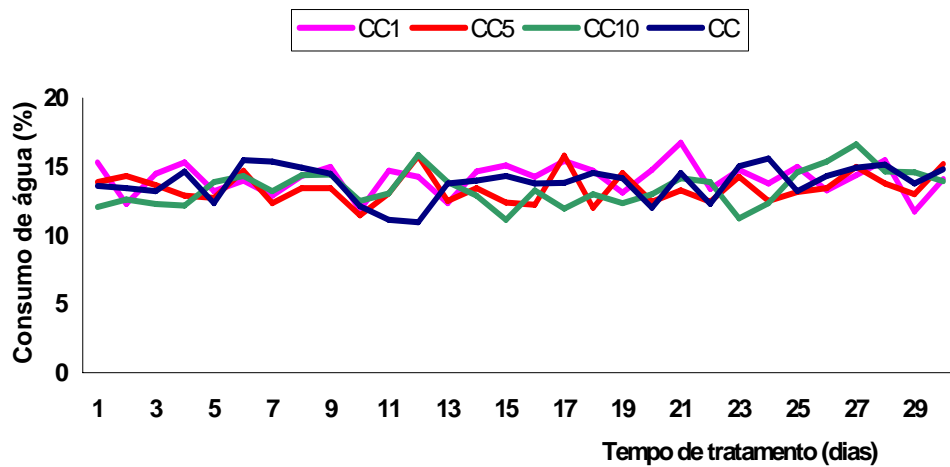
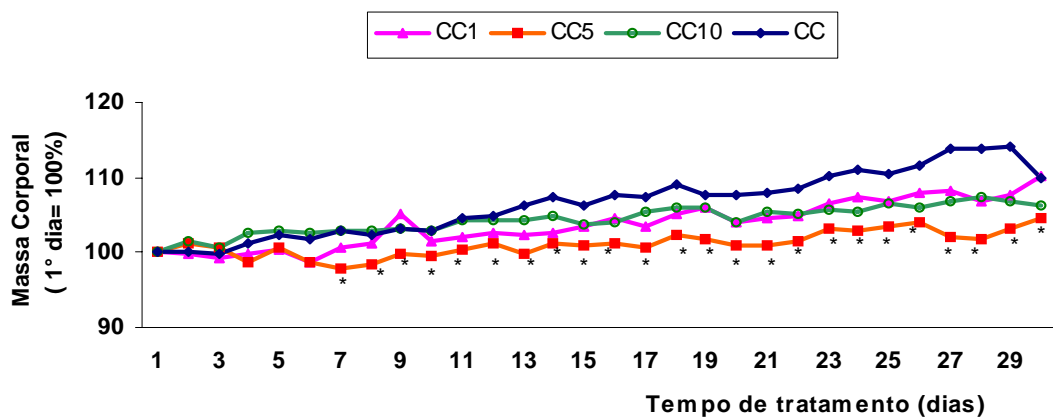


FIGURA 12. Consumo percentual de água (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

#### 4.2.4 Desenvolvimento ponderal dos ratos

A Figura 13 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 30 dias de tratamento, calculado a partir da mensuração diária de massa corporal (g) dos ratos tratados diariamente, por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> com três doses diferentes CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do



fitoterápico. Verificou-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal. Entretanto houve um menor ganho relativo de massa corporal do grupo CC5 em relação ao grupo tratado CC10 e controle durante esse período, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$  ANOVA de MR, Bonferroni).

FIGURA 13. Desenvolvimento ponderal dos ratos (1º dia = 100%) tratados com o fitoterápico Cassaú Composto® com três diferentes doses, CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC5) em relação ao grupo tratado CC10 e controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Consumo de ração dos ratos

A Figura 14 mostra o consumo de ração em relação a massa corporal (%), avaliado durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado a massa corporal diária (g) das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto® nas doses de CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Com base nos resultados, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de MR  $p < 0,01$ ). Com a realização do teste de Bonferroni, concluiu-se que o grupo CC1, difere estatisticamente dos demais grupos. Os ratos apresentaram um consumo relativo médio (média  $\pm$  epm) de ração de:  $9,55 \pm 0,49$  no grupo CC1,  $5,99 \pm 0,12$  no grupo CC5,  $5,78 \pm 0,21$  no grupo CC10, e  $7,48 \pm 0,38$  no grupo controle.

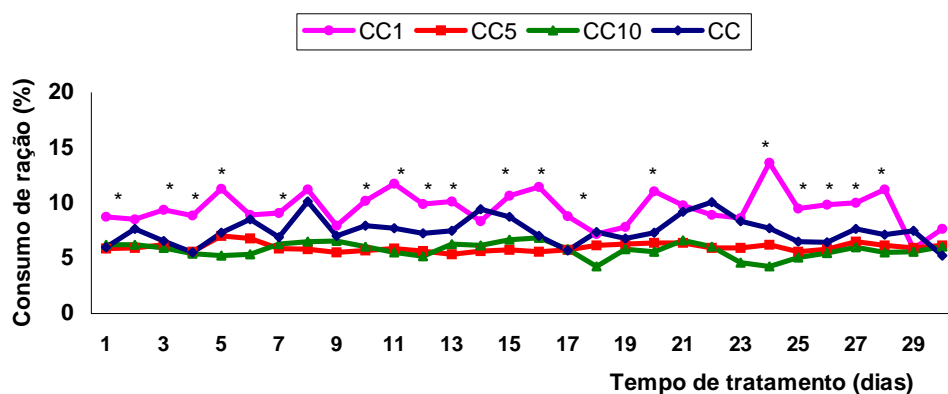


FIGURA 14. Consumo percentual de ração (%) em relação a massa corporal dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto® nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC(13 ml/kg/dia). Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC1) em relação aos demais grupos tratados e controle (p< 0,01).

#### 4.2.6 Consumo de água dos ratos

A Figura 15 mostra o consumo de água em relação a massa corporal (%), avaliados durante os 30 dias de tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado a massa corporal diária (g), dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto® por via oral nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Com base nos resultados verificou-se que houve diferença estatisticamente entre os grupos (ANOVA de MR p<0,01). Com a realização do teste de Bonferroni, concluiu-se que o grupo CC10 diferiu estatisticamente dos demais grupos tratados e controle. Os ratos apresentaram um consumo relativo médio (média ± epm) de água de: 11,26 ± 0,29 no grupo CC1, 11,09 ± 0,39 no grupo CC5, 13,15 ± 0,64 no grupo CC 10, e 11,44 ± 0,50 no grupo controle.

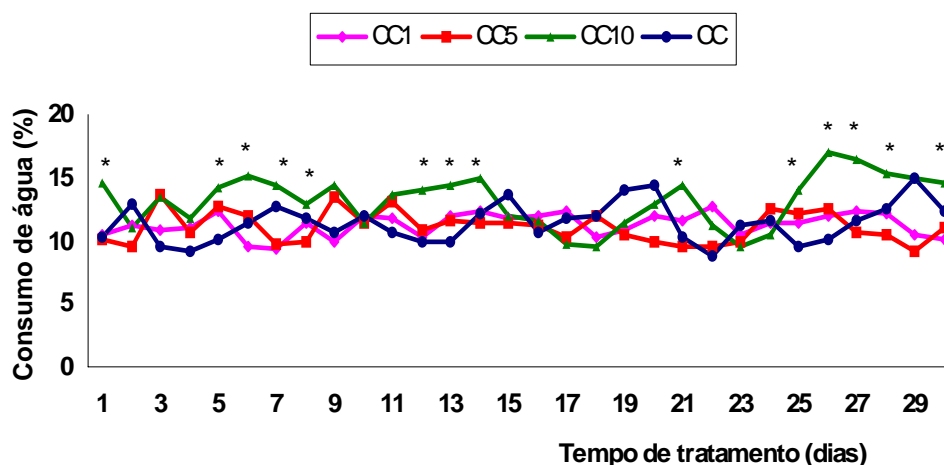




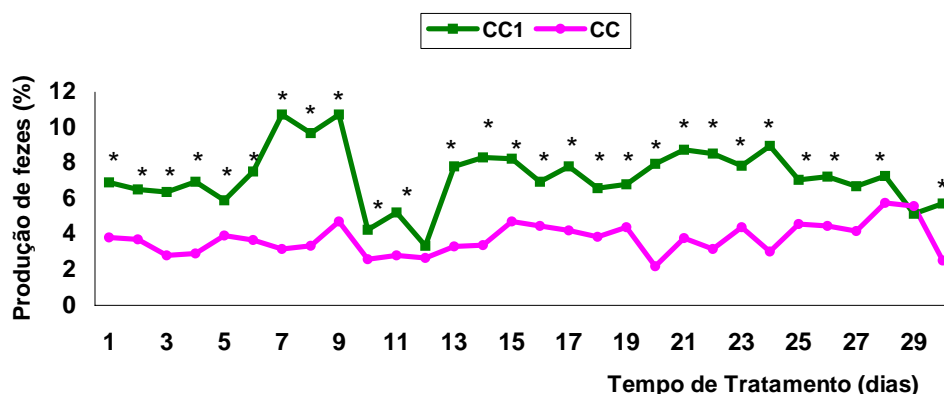
FIGURA 15. Consumo percentual de água (%) em relação a massa corporal dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> nas doses CC1 (1,3 ml/kg/dia), CC5 (6,5 ml/kg/dia), CC10 (13 ml/kg/dia) um grupo controle CC (13 ml/kg/dia).

Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC10) em relação aos demais grupos tratados e controle (p<0,01).

#### 4.2.7 Produção de fezes das ratas

A Figura 16 mostra a produção de fezes em relação a massa corporal (%), avaliada durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir da produção diária de fezes (g), relacionado a massa corporal diária (g) das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Com base nos resultados, verificou-se que as ratas tratadas com o fitoterápico apresentaram uma produção relativa de fezes maior, comparadas ao grupo controle, com diferença estatisticamente significativa (p<0,01 ANOVA). A média relativa de fezes de produção de fezes foi de (média ± epm): 7,27 ± 0,52 no grupo CC1, e 3,74 ± 0,28 no grupo controle.



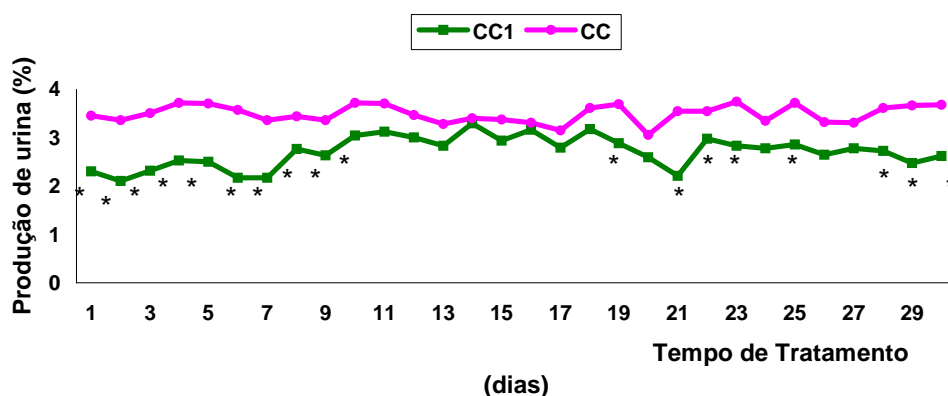
**FIGURA 16. Produção percentual de fezes (%) em relação a massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia). Os valores**

representam a média dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC1) em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.8 Produção de urina das ratas

A Figura 17 mostra a produção de urina em relação a massa corporal (%), avaliada durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir da produção diária de urina (g), relacionado a massa corporal diária (g) das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose de 1,3 ml/kg/dia (CC1), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Com base nos resultados, verificou-se que as ratas tratadas com o fitoterápico apresentaram uma menor produção relativa de urina, comparadas ao grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ; ANOVA). A média relativa de produção de urina foi de (média  $\pm$  epm):  $2,71 \pm 0,10$  no grupo CC1, e  $3,49 \pm 0,05$  no grupo controle.



**FIGURA 17. Produção percentual de urina (%) em relação a massa corporal das**

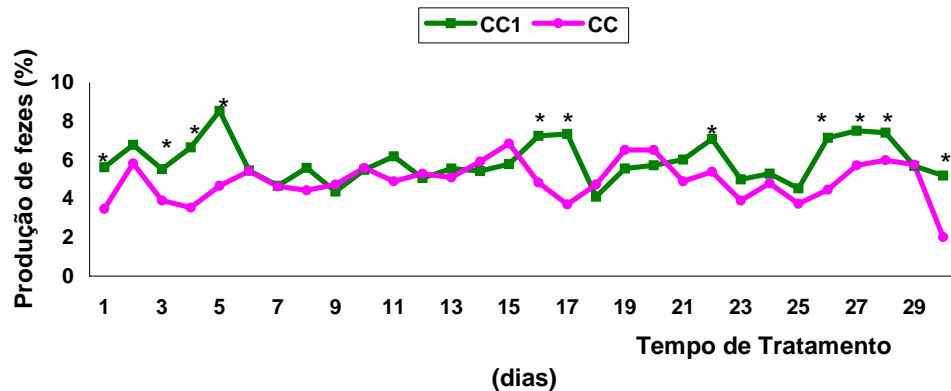
ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia).

Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC1) em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.9 Produção de fezes dos ratos

A Figura 18 mostra produção de fezes em relação a massa corporal (%), avaliada durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir da produção diária de fezes (g), relacionado a massa corporal diária (g) dos ratos tratados por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose de 1,3 ml/kg/dia (CC1), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Com base nos resultados, verificou-se que os ratos tratados com o fitoterápico apresentaram uma produção relativa de fezes maior, comparados ao grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; ANOVA). A média relativa de produção de fezes foi de (média  $\pm$  epm):  $5,92 \pm 0,33$  no grupo CC1, e  $4,91 \pm 0,33$  no grupo controle.



**FIGURA 18. Produção percentual de fezes (%) em relação a massa corporal dos**

ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia).

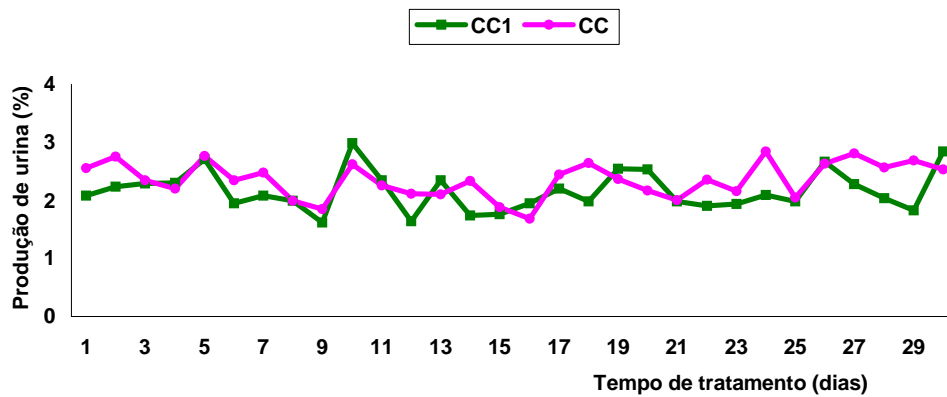
Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

\* Valor estatisticamente diferente (grupo CC1) em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.10 Produção de urina dos ratos

A Figura 19 mostra a produção de urina em relação a massa corporal (%), avaliada durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir da produção diária de urina (g), relacionado a massa corporal diária (g) dos ratos tratados por via oral com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose de 1,3 ml/kg/dia (CC1), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. Com base nos resultados, verificou-se que os ratos tratados com o fitoterápico apresentaram uma discreta redução na produção relativa de urina, comparados ao grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente

significativa ( $p > 0,05$ ; ANOVA). A média relativa de produção de urina dos ratos foi de (média  $\pm$  epm):  $2,16 \pm 0,10$  no grupo CC1, e  $2,35 \pm 0,09$  no grupo controle.



**FIGURA 19. Produção percentual de urina (%) em relação a massa corporal dos**

ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto® na dose CC1 (1,3 ml/kg/dia), e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia).

Os valores representam a média dos animais por grupo (n=10).

#### 4.3 Massa relativa e histologia dos órgãos das ratas

O fitoterápico Cassaú Composto® não alterou de forma significativa a massa relativa de órgãos (%) das ratas tratadas com três diferentes doses, 1,3 ml/kg/dia (CC1), 6,5 ml/kg/dia (CC5), 13 ml/kg/dia (CC10) em comparação ao grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC) (Tabela 1). A análise de variância de única via (ANOVA) para todos os animais tratados por grupo foi respectivamente: adrenal direita ( $p=0,054$ ), adrenal esquerda ( $p=0,243$ ), baço ( $p=0,128$ ), coração ( $p=0,068$ ), esôfago ( $p=0,644$ ), fígado ( $p=0,061$ ), ovário direito ( $p=0,735$ ), ovário esquerdo ( $p=0,052$ ), rim direito ( $p=0,115$ ), rim esquerdo ( $p=0,070$ ), tireóide direita ( $p=0,942$ ), tireóide esquerda ( $p=0,800$ ), útero ( $p=0,295$ ), estômago ( $p=0,554$ ), pulmão ( $p=0,065$ ).

A análise histopatológica dos órgãos demonstrou pneumonia intersticial difusa associada com hiperplasia linfóide peribronquiolar como sinal de resposta inflamatória. No baço foi evidenciado congestão e hiperplasia linfóide. Estes achados histopatológicos foram evidenciados em todas as ratas tratadas com a dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e controle.

TABELA 1. Massa relativa dos órgãos das ratas tratadas durante 30 dias com

fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> com três diferentes doses, CC1 1,3 ml/kg/dia, (CC5) 6,5 ml/kg/dia, (CC10) 13 ml/kg/dia, e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. São apresentados os valores percentuais médios  $\pm$  epm.

<b>Massa relativa dos órgãos (%)</b>	<b>CC1</b> (n=10)	<b>CC5</b> (n=10)	<b>CC10</b> (n=10)	<b>CC</b> (n=10)
Adrenal direita	0,023 $\pm$ 0,004	0,020 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,001
Adrenal esquerda	0,023 $\pm$ 0,003	0,020 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,001	0,020 $\pm$ 0,001
Baço	0,272 $\pm$ 0,015	0,307 $\pm$ 0,001	0,291 $\pm$ 0,002	0,269 $\pm$ 0,001
Coração	0,362 $\pm$ 0,013	0,363 $\pm$ 0,002	0,331 $\pm$ 0,003	0,348 $\pm$ 0,001
Esôfago	0,035 $\pm$ 0,005	0,032 $\pm$ 0,002	0,030 $\pm$ 0,003	0,034 $\pm$ 0,002
Estômago	0,688 $\pm$ 0,021	0,661 $\pm$ 0,024	0,667 $\pm$ 0,004	0,701 $\pm$ 0,004
Fígado	3,678 $\pm$ 0,044	3,654 $\pm$ 0,004	3,507 $\pm$ 0,004	3,505 $\pm$ 0,004
Ovário direito	0,037 $\pm$ 0,005	0,043 $\pm$ 0,007	0,039 $\pm$ 0,005	0,037 $\pm$ 0,007
Ovário esquerdo	0,037 $\pm$ 0,004	0,047 $\pm$ 0,010	0,035 $\pm$ 0,005	0,037 $\pm$ 0,009
Pulmão	0,635 $\pm$ 0,030	0,619 $\pm$ 0,021	0,569 $\pm$ 0,013	0,547 $\pm$ 0,018
Rim direito	0,348 $\pm$ 0,009	0,353 $\pm$ 0,053	0,324 $\pm$ 0,022	0,338 $\pm$ 0,028
Rim esquerdo	0,354 $\pm$ 0,010	0,348 $\pm$ 0,072	0,322 $\pm$ 0,032	0,332 $\pm$ 0,034
Tireóide direita	0,006 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,079	0,007 $\pm$ 0,058	0,006 $\pm$ 0,042
Tireóide esquerda	0,006 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,097	0,006 $\pm$ 0,060	0,005 $\pm$ 0,055
Útero	0,425 $\pm$ 0,017	0,407 $\pm$ 0,364	0,335 $\pm$ 0,257	0,351 $\pm$ 0,304

#### 4.4 Massa relativa e histologia dos órgãos dos ratos

O fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> não alterou de forma significativa a massa relativa de órgãos (%) dos ratos tratados com três diferentes doses, 1,3 ml/kg/dia (CC1), 6,5 ml/kg/dia (CC5), 13 ml/kg/dia (CC10) em comparação ao grupo controle, tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC) (Tabela 2). A análise de variância de única via (ANOVA) para todos os animais tratados por grupo foi respectivamente: adrenal direita (p=0,602), adrenal esquerda (p=0,131), baço (p=0,163), coração (p=0,312), esôfago (p=0,062), fígado (p=0,102), epidídimo direito (p=0,087), epidídimo esquerdo (p=0,079), rim direito (p=0,066), rim esquerdo (p=0,998), tireóide direita (p=0,076), tireóide esquerda (p=0,076), próstata (p=0,062), estômago (p=0,605), pulmão (p=0,064), testículo direito (p=0,409), testículo esquerdo (p=0,077), vesícula seminal vazia (p=0,115).

A análise histopatológica dos órgãos demonstrou pneumonia intersticial difusa associada com hiperplasia linfóide peribronquiolar como sinal de resposta inflamatória local. Este achado foi evidenciado em todos os ratos tratados com a dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e controle.

No baço de todos os animais do grupo tratado CC10 e controle foi evidenciado congestão.

TABELA 2. Massa relativa dos órgãos dos ratos tratados durante 30 dias com fitoterápico Cassaú Composto® com três diferentes doses, CC1 1,3 ml/kg/dia, (CC5) 6,5 ml/kg/dia, (CC10) 13 ml/kg/dia, e um grupo controle CC (13 ml/kg/dia) tratado com o veículo do fitoterápico. São apresentados os valores percentuais médios  $\pm$  epm.

Massa relativa dos órgãos %	CC1	CC5	CC10	CC
	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
Adrenal direita	0,011 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001
Adrenal esquerda	0,010 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001
Baço	0,318 $\pm$ 0,013	0,335 $\pm$ 0,023	0,313 $\pm$ 0,010	0,286 $\pm$ 0,010
Coração	0,335 $\pm$ 0,012	0,321 $\pm$ 0,006	0,331 $\pm$ 0,008	0,314 $\pm$ 0,007
Epidídimo direito	0,294 $\pm$ 0,012	0,269 $\pm$ 0,016	0,247 $\pm$ 0,012	0,263 $\pm$ 0,011
Epidídimo esquerdo	0,294 $\pm$ 0,009	0,297 $\pm$ 0,017	0,256 $\pm$ 0,015	0,259 $\pm$ 0,011
Esôfago	0,025 $\pm$ 0,001	0,030 $\pm$ 0,003	0,032 $\pm$ 0,002	0,028 $\pm$ 0,002
Estômago	0,553 $\pm$ 0,023	0,539 $\pm$ 0,016	0,539 $\pm$ 0,018	0,570 $\pm$ 0,017
Fígado	3,543 $\pm$ 0,077	3,379 $\pm$ 0,048	3,346 $\pm$ 0,052	3,382 $\pm$ 0,055
Próstata	0,170 $\pm$ 0,020	0,129 $\pm$ 0,010	0,129 $\pm$ 0,015	0,118 $\pm$ 0,007
Pulmão	0,535 $\pm$ 0,012	0,505 $\pm$ 0,007	0,489 $\pm$ 0,016	0,468 $\pm$ 0,007
Rim direito	0,336 $\pm$ 0,006	0,328 $\pm$ 0,011	0,317 $\pm$ 0,006	0,310 $\pm$ 0,005
Rim esquerdo	0,339 $\pm$ 0,006	0,331 $\pm$ 0,009	0,307 $\pm$ 0,006	0,306 $\pm$ 0,009
Testículo direito	0,508 $\pm$ 0,024	0,523 $\pm$ 0,012	0,536 $\pm$ 0,012	0,501 $\pm$ 0,010
Testículo esquerdo	0,493 $\pm$ 0,019	0,540 $\pm$ 0,016	0,539 $\pm$ 0,014	0,507 $\pm$ 0,010
Tireóide direita	0,005 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001
Tireóide esquerda	0,004 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001
Vesícula seminal	0,238 $\pm$ 0,021	0,231 $\pm$ 0,016	0,190 $\pm$ 0,009	0,214 $\pm$ 0,010

#### 4.5 Avaliação bioquímica sanguínea das ratas

A Tabela 3 mostra a média dos valores bioquímicos sanguíneos absolutos das ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratadas com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC). Os animais tratados demonstraram uma redução estatisticamente significativa na atividade das enzimas alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), bem como da gama-glutamyltransferase (GGT) e proteínas totais em relação ao grupo controle. Os valores de ácido úrico, creatinina e potássio aumentaram significativamente no grupo tratado quando comparado ao grupo controle.

O eletrólito sódio, assim como uréia, colesterol total, bilirrubina total, glicose e triglicerídeos não diferiram estatisticamente entre os grupos.

TABELA 3. Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratas tratadas com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC). Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos)  $\pm$  epm.

Variáveis	CC10 (n=5)	CC (n=5)
Ácido úrico (mg/dl)	3,50 $\pm$ 0,45*	1,56 $\pm$ 0,21
ALT (U/l)	40,64 $\pm$ 4,47*	64,60 $\pm$ 3,53
AST (U/l)	83,59 $\pm$ 12,08*	126,60 $\pm$ 6,90
Bilirrubina total (mg/dl)	0,59 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,01
Creatinina (mg/dl)	0,70 $\pm$ 0,05*	0,54 $\pm$ 0,02
Proteínas totais (g/dl)	4,90 $\pm$ 0,07*	6,20 $\pm$ 0,09
Triglicerídeos (mg/dl)	117,77 $\pm$ 21,27	72,20 $\pm$ 6,29
Colesterol total (mg/dl)	65,68 $\pm$ 4,68	52,40 $\pm$ 3,24
FA (U/l)	41,34 $\pm$ 6,59*	98,20 $\pm$ 7,21
Glicose (mg/dl)	134,74 $\pm$ 4,49	145,40 $\pm$ 16,42
Potássio (mEq/l)	6,32 $\pm$ 0,45*	4,14 $\pm$ 0,17
Sódio (mEq/l)	143,00 $\pm$ 0,54	144,60 $\pm$ 0,98
Uréia (mg/dl)	40,26 $\pm$ 5,63	52,08 $\pm$ 2,93
GGT (U/l)	2,60 $\pm$ 0,40*	5,00 $\pm$ 0,00

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

#### 4.6 Avaliação hematológica das ratas



Na avaliação do quadro hematológico das ratas tratadas com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> tanto o grupo tratado com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) quanto o grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC) apresentaram valores de hematócrito similares, sem diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabela 4).

TABELA 4. Valores médios de hematócrito ( $\pm$  erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC) .

Variável	CC10 (n=5)	CC (n=5)
Hematócrito (%)	40,6 $\pm$ 1,7	39,4 $\pm$ 1,3

A contagem global absoluta de leucócitos, assim como as contagens relativas de neutrófilos segmentados e monócitos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e o grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC). Entretanto houve uma diminuição da contagem relativa de eosinófilos e um aumento da contagem relativa de linfócitos no grupo tratado com o fitoterápico, com diferença significativa quando comparados ao grupo controle tratado com o veículo (Tabela 5).

TABELA 5. Valores médios do leucograma ( $\pm$  erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC).

Variáveis	CC10 (n=5)	CC (n=5)
Contagem global de Leucócitos (mm <sup>3</sup> ) (ª)	4280 $\pm$ 374,4	5780 $\pm$ 940,3
Neutrófilos bastonados (%)	nihil	nihil
Neutrófilos segmentados (%)	29 $\pm$ 2,2	33,8 $\pm$ 1,0
Eosinófilos (%)	0,6 $\pm$ 0,2*	2,2 $\pm$ 0,4
Basófilos (%)	nihil	nihil
Linfócitos (%)	68,2 $\pm$ 2,4*	59,8 $\pm$ 2,1
Monócitos (%)	2,2 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,9

nihil= zero

(<sup>a</sup>) a contagem global de leucócitos representa valores absolutos. A contagem de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos representa valores relativos (percentuais) à contagem global de leucócitos.

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

#### 4.7 Avaliação bioquímica sangüínea dos ratos

A Tabela 6 mostra a média dos valores bioquímicos sangüíneos absolutos dos ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratados com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC). Os animais tratados com o fitoterápico demonstraram uma redução significativa na atividade da enzima fosfatase alcalina (FA), bem como creatinina, e proteínas totais, e um aumento significativo do ácido úrico, em relação ao grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico.

A atividade das enzimas hepáticas aspartato- aminotransferase (AST) e alanina-aminotranferse (ALT), assim como os valores de triglicerídeos, colesterol total, glicose, uréia, bilirrubina total, gama-glutamilttransferase (GGT), sódio e potássio não diferiram estatisticamente entre os grupos.

TABELA 6. Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC).

Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos)  $\pm$  epm.

Variáveis	CC10 (n=5)	CC (n=5)
Ácido úrico (mg/dl)	2,86 $\pm$ 0,38*	1,84 $\pm$ 0,14
ALT (U/l)	37,81 $\pm$ 7,90	44,22 $\pm$ 4,37
AST (U/l)	57,51 $\pm$ 3,18	62,84 $\pm$ 5,72
Bilirrubina total (mg/dl)	0,49 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,04
Creatinina (mg/dl)	0,66 $\pm$ 0,05*	0,84 $\pm$ 0,01
Proteínas totais (U/l)	4,54 $\pm$ 0,10*	6,26 $\pm$ 0,12
Triglicerídeos (mg/dl)	77,54 $\pm$ 13,30	51,80 $\pm$ 10,07
Colesterol total (mg/dl)	62,77 $\pm$ 3,42	54,60 $\pm$ 2,93
FA (U/l)	67,88 $\pm$ 3,62*	104,80 $\pm$ 15,40
Glicose (mg/dl)	144,50 $\pm$ 6,19	138,60 $\pm$ 7,08
Potássio (mEq/l)	5,66 $\pm$ 0,35	5,04 $\pm$ 0,11

Sódio (mEq/l)	141,80 ± 0,74	139,60 ± 0,25
Uréia (mg/dl)	30,74 ± 2,61	34,80 ± 1,17
GGT (U/l)	2,60 ± 0,40	2,00 ± 0,45

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05)

#### 4.8 Avaliação hematológica dos ratos

Os ratos tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> bem como os do grupo controle tratados com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC) apresentaram valores de hematócrito similares, sem diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabela 7).

TABELA 7. Valores médios de hematócrito (± erro padrão da média) em ratos tratados com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose 13 ml/kg/dia (CC).

Variável	CC10 (n=5)	CC (n=5)
Hematócrito (%)	42,4 ± 2,0	41,2 ± 0,5

A contagem absoluta de leucócitos, assim como as contagens relativas de linfócitos, monócitos e eosinófilos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e o grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose 13 ml/kg/dia (CC). Entretanto houve uma diminuição da contagem relativa de neutrófilos segmentados no grupo tratado, com diferença significativa quando comparados ao grupo controle (Tabela 8).

TABELA 8. Valores médios do leucograma ( $\pm$  erro padrão da média) em ratos tratados com fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 13 ml/kg/dia (CC10) e um grupo controle tratado com o veículo do fitoterápico na dose de 13 ml/kg/dia (CC).

Variáveis	CC10 (n=5)	CC (n=5)
Contagem global de Leucócitos (mm <sup>3</sup> ) (*)	4540 $\pm$ 373,3	5040 $\pm$ 342,4
Neutrófilos bastonados (%)	nihil	nih
Neutrófilos segmentados (%)	25 $\pm$ 1,9*	37,2 $\pm$ 3,2
Eosinófilos (%)	1,8 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 1,2
Basófilos (%)	nih	nih
Linfócitos (%)	68,2 $\pm$ 2,4	58,6 $\pm$ 3,7
Monócitos (%)	1,2 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,4

nihil = zero

(\*) a contagem global de leucócitos representa valores absolutos. A contagem de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos representa valores relativos (percentuais) à contagem global de leucócitos.

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

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que: (I) a associação de extratos fluidos de *Aristolochia cymbífera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto<sup>®</sup>) utilizado na dose única de 26 ml/kg ocasionou sinais de toxicidade sistêmica em ratos Wistar, porém transitório e reversível, sem óbitos e (II) utilizado em doses repetidas diárias (30 dias) de 1,3ml, 6,5ml e 13 ml/kg não desencadeou sinais sugestivos de toxicidade sistêmica.

O fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> nas dosagens de 1,3 ml/kg, 6,5 ml/kg, 13 ml/kg, correspondentes a dose terapêutica, 5 vezes a dose terapêutica e 10 vezes a dose terapêutica, administrados por via oral durante 30 dias, interferiram significativamente no desenvolvimento ponderal, consumo de ração e água dos machos e no consumo de ração das fêmeas, sendo que nestas não houve diferença significativa no desenvolvimento ponderal dos animais, assim como consumo de água.

Entre os machos houve diferença no desenvolvimento ponderal do grupo CC5 em relação aos demais grupos, porém manteve-se o ganho de massa corporal como nos demais grupos (inclusive no CC10), sem a evidência característica de sinais atribuídos de toxicidade sistêmica.

Segundo Mello (1997), a toxicidade sistêmica é manifestada através de alterações de desenvolvimento ponderal dos animais, redução dos consumos de água e ração, alterações comportamentais como prostração, apatia e presença de pêlos arrepiados. Harkness & Wagner (1993), citam que a perda de peso é um sintoma não específico de doença, e que a superpopulação e a competição pelo alimento, má oclusão, megaeosôfago e nefrose estão entre as possíveis causas de perda de peso em ratos.

Machos e fêmeas tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na dose de 26 ml/kg, correspondente a 20 vezes a dose terapêutica, administrada por via oral em dose única, não interferiu significativamente no desenvolvimento ponderal, nos consumos de ração e água, bem como na produção de fezes e urina. Entretanto nos primeiros quinze

minutos após a administração, os animais apresentaram um quadro de ataxia e sedação, observado em ambos os grupos, mas de forma mais intensa no grupo controle, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Estes sinais de podem ser desencadeados pela presença de álcool etílico no veículo do fitoterápico. Segundo Zanini & Oga (1994) o álcool etílico é um depressor do sistema nervoso central, e em doses altas é também um agente anestésico. Devido a sua alta lipossolubilidade, o álcool etílico é facilmente e completamente absorvido em todo o trato gastrointestinal. Vinte e quatro horas após a administração do fitoterápico, os animais tanto do grupo tratado quanto do grupo controle estavam completamente recuperados. Segundo os mesmos autores o etanol ingerido é biotransformado utilizando a oxidação hepática como principal via metabólica, sendo posteriormente excretado via renal.

Almeida et al. (1983) evidenciaram em experimentos de toxicidade aguda uma discreta atividade no sistema nervoso central de camundongos, com o aparecimento de sedação, após a administração oral e intraperitoneal de extrato etanólico e aquoso de *Anacardium occidentale* Linn. e *Waltheria viscosissima* St. Hill.

As plantas do gênero *Aristolochia* e do gênero *Luehea*, são capazes de produzir intoxicações agudas ou crônicas, de forma natural e/ou experimental, principalmente quando ingeridas ou administradas altas doses. As espécies *Aristolochia cymbifera* e *Luehea grandiflora* estão entre as plantas que compõem o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup>, com concentrações respectivamente de 0,019 mg e 0,142 mg.

A dose letal DL<sub>50</sub> proposta por Hu et al. (2004), para a espécie *Aristolochia manshuriensis* é de 29,2 g/kg, com uma incrível variação da dose (podendo chegar até 200g/kg), dependendo da região onde a planta é colhida. Segundo os autores a biodiversidade das espécies é um fator importante.

Hu et al. (2004) verificaram em estudos de toxicidade crônica, que o extrato etanólico de *Aristolochia manshuriensis* administrado a ratos em dose 40 vezes maior que a indicação terapêutica, o equivalente a 4g/kg, não interferiu no desenvolvimento ponderal dos animais.

Debelle et al. (2002) verificaram uma redução no desenvolvimento corporal de ratos tratados durante 35 dias subcutaneamente com 10 mg/kg de ácido aristolóquico. Este ácido aristolóquico segundo Hashimoto et al. (1999) pode ser encontrado em plantas do gênero *Aristolochia*.

Bianchi et al. (1991) verificaram em estudos de toxicidade aguda que o extrato alcoólico de *Luehea divaricata* administrado intraperitonealmente, nas doses de 500 e 250 mg/kg, desencadearam diarreia e eriçamento do pêlo, sinais característicos de toxicidade sistêmica, nas 72 horas em que foram observados, onde a dose maior causou óbito em 50% dos animais. Os autores ainda comprovaram através de testes de

toxicidade subcrônica que o extrato aquoso produz uma toxicidade menor em relação ao extrato alcoólico.

Com relação ao consumo de ração, durante os 30 dias observou-se tanto em machos quanto em fêmeas um aumento estatisticamente significativo do consumo entre os animais tratados com a dose terapêutica CC1 (1,3 ml/kg/dia) em relação aos grupos CC5, CC10 e controle. Porém este aumento do consumo de ração não demonstrou uma correlação positiva com o ganho de massa corporal. Entretanto a produção de fezes no grupo CC1 foi maior quando comparada ao grupo controle, portanto a correlação entre consumo de ração e produção de fezes foi positiva, e significativamente diferente.

Segundo Duke (1989) a espécie *Aristolochia serpentaria* quando utilizada em pequenas doses, poderia estimular o apetite. Samuelsen (2000) em seu estudo etnofarmacológico cita a planta *Plantago major* como estimulante do apetite. Porém estas informações segundo estes autores, estão baseadas nos usos tradicionais.

A presença das plantas das espécies *Aristolochia cymbifera* e *Plantago major* na composição do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup>, além da presença de álcool etílico constituinte do veículo, poderiam sugerir este aumento do consumo de ração no grupo onde administrou-se a menor dose ou dose terapêutica (1,3 ml/kg/dia). De acordo com o fabricante do fitoterápico esta dose indicada funcionaria como auxiliar no tratamento da inapetência e da debilidade física. Segundo Zanini & Oga (1994) o álcool etílico usado com moderação poderia estimular o apetite.

Em relação ao consumo de água nos 30 dias, os machos, do grupo CC10 apresentaram um consumo ligeiramente maior em relação aos grupos CC1, CC5 e controle, diferentemente das fêmeas que não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. No caso dos machos, estas diferenças estatisticamente significativas de consumo de água, não mantiveram relação com o desenvolvimento ponderal dos animais.

Em relação aos aspectos hematológicos, os valores médios de hematócrito obtidos no grupo tratado com a maior dose (13ml/kg/dia) do fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup>, mantiveram-se dentro dos limites referidos como normais, para ambos os sexos, por Anderson (1998), e Harkness & Wagner (1993).

Segundo Lopes et al. (1996); Raskin (1998) e Feldman (2000) o hematócrito é um dos mais úteis exames laboratoriais para se registrar a ocorrência de anemia, pois através dele informações como volume globular (%) e coloração do plasma podem ser obtidas.

Os valores encontrados no leucograma referentes a contagem global, não apresentaram diferenças significativas entre o grupo tratado CC10 (13 ml/kg/dia) e controle, assim como a contagem relativa de monócitos, para ambos os sexos. Já as fêmeas tratadas apresentaram um contagem relativa menor de eosinófilos, e maior de linfócitos com diferença significativa. Uma das possibilidades para tentar explicar esta diferença é que dos animais observados, dois pertencentes ao grupo controle apresentaram uma contagem relativa maior de eosinófilos, e um animal do grupo tratado apresentou uma contagem relativa maior de linfócitos, porém, ambos dentro dos valores normais propostos por Anderson (1998). Entre os machos do grupo tratado CC10 houve uma diminuição dos neutrófilos segmentados, em relação ao grupo controle, talvez pelo fato de dois animais do grupo controle apresentarem aumento, ocasionando diferenças significativas. É importante ressaltar que apesar deste pequeno aumento, ainda assim, os valores encontravam-se dentro dos limites normais referidos para a espécie segundo Anderson (1998).

De acordo com Lopes et al. (1996) o leucograma é a parte do hemograma que pesquisa alterações quantitativas e/ou morfológicas das séries leucocitárias. Suas alterações quantitativas são a leucocitose (aumento) e a leucopenia (diminuição). Os autores citam que a leucocitose pode ocorrer devido a causas fisiológicas como exercício extremo, parto/gestação, excitação, e patológicas, devido a algum efeito mórbido (infecções bacterianas, necrose tecidual). Já a leucopenia está relacionada mais a doenças virais, e severas infecções bacterianas. Assim segundo os autores, é fundamental conhecer os valores normais da espécie considerada, pois estes exames complementares são de extrema importância para um bom diagnóstico.

No presente estudo, as alterações das séries leucocitárias não obtiveram correlação com o quadro clínico dos animais, uma vez que os animais permaneceram saudáveis durante todo o experimento.

Na avaliação bioquímica sanguínea, machos e fêmeas tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> na maior dose (13 ml/kg/dia), demonstraram um perfil bioquímico sanguíneo dentro dos padrões normais para ratos segundo Anderson (1998) e Thrall et al. (2004), à exceção de proteínas totais, que esteve abaixo dos valores normais. Diferenças significativas de determinadas enzimas e alguns metabólitos foram observados no grupo tratado, quando comparadas ao grupo controle. Nas fêmeas tratadas, houve uma diminuição da atividade das enzimas ALT, AST, FA e GGT, assim como de proteínas totais, diferentemente dos valores de creatinina, ácido úrico, e



potássio que encontravam-se aumentados em relação ao grupo controle. Entre os machos tratados houve diferenças significativas, com diminuição da atividade das enzimas FA e creatinina, assim como proteínas totais, e aumento dos valores de ácido úrico comparados ao grupo controle.

Estas diferenças, talvez possam ser explicadas pelo fato de que os limites de referência para determinadas enzimas e metabólitos, sejam muito extensos. Segundo Loeb (1997) os limites de valores normais apropriados para a espécie, sexo e idade são particularmente importantes na análise individual de cada animal, sendo uma espécie de “controle de qualidade total”, onde a análise estatística não se limita apenas a comparação do grupo tratado e controle.

Na avaliação da função hepática, as enzimas ALT, AST, FA e GGT apesar de serem indicadoras de doenças hepáticas, o decréscimo de seus valores não tem significado clínico, a não ser em casos de degeneração celular grave e/ou processos crônicos, no qual ocorre uma perda da função celular, o que não foi observado no experimento (BUSH, 1991; GONZÁLEZ & SILVA, 2003). Segundo Loeb (1997) a enzima sorbitol desidrogenase (SDH) é mais sensível para detectar lesões hepáticas em ratos, mas sua atividade é instável, com decréscimo rápido no soro.

Neste estudo, mesmo não havendo diferenças significativas entre os grupos tratado e controle, foi observado uma elevação dos valores do metabólito uréia acima dos valores normais para a espécie em ambos os sexos. Segundo González & Silva (2003) a uréia é sintetizada no fígado a partir da amônia proveniente do metabolismo dos aminoácidos. Fatores renais (pré-renal, renal e pós-renal) e extra-renais (ingestão de proteína) podem interferir no aumento do nível de concentração sérica de uréia (LOPES et al., 1996). Sendo assim, este pequeno aumento dos níveis séricos de uréia em ambos os grupos, pode ser sugerido por fatores extra-renais como a ingestão de proteína na dieta pelos animais, já que a uréia é o principal produto final do catabolismo protéico. Além disso, exames histopatológicos não revelaram alterações de parênquima e tecido renais. Loeb (1997) cita que a mensuração sérica de uréia constitui um indicador insensível de danos renais em roedores. Segundo Loeb (1997); Lopes et al. (1996) a utilização da creatinina endógena “clearance test” é o mais específico e sensível teste para avaliar funcionamento renal, pois o seu nível sanguíneo não é afetado pela dieta, idade e sexo. Neste teste as concentrações de creatinina são determinadas no soro e também em uma alíquota do homogeneizado urinário total.

Valores aumentados de ácido úrico segundo González & Silva (2003), podem ser observados em decorrência de neoplasias de células sanguíneas, doenças hepáticas, insuficiência renal, endocrinopatias, ingestão de substâncias tóxicas ou drogas, e em falhas genéticas das enzimas necessárias para o metabolismo do ácido úrico. A possibilidade de algum constituinte químico presente nas plantas que compõem o fitoterápico aumentar os níveis de ácido úrico não pode ser descartada.

Segundo Lopes et al. (1996) e González & Silva (2003), a concentração de proteínas totais encontra-se diminuída em falhas hepáticas, transtornos gastrointestinais e renais, hemorragia, parasitas, super hidratação ou por deficiência na alimentação. A causa determinante da diminuição de proteínas totais observadas no grupo tratado torna-se difícil, uma vez que inúmeras patologias podem desencadear tal alteração sérica, e também porque os animais observados não apresentaram sinais clínicos compatíveis com algumas das patologias citadas.

Liu et al. (2003) em seus estudos com a espécie *Aristolochia manshuriensis* avaliaram o efeito renal desta planta ao utilizar doses diárias de 0,4 e 4 g da planta administrada oralmente a ratos durante 5 dias. Seus resultados demonstraram que apenas a dose maior (4g diárias) produziu uma elevação das concentrações séricas de creatinina, assim como aumento de excreção urinária de proteína e glicosúria. Esta mesma dose ainda produziu necrose tubular renal aguda nos animais. Já os resultados obtidos com a menor dose (0,4g diárias) não demonstraram alterações bioquímicas e também não desenvolveram mudanças histológicas a nível renal. Esta mesma espécie de planta em estudos de toxicidade crônica segundo Hu et al. (2004), não demonstrou alterar a função renal, quando administrada diariamente a ratos nas doses de 1 a 4g/kg, embora exames histológicos revelassem inflamação intersticial renal.

Os machos e fêmeas tratados com o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> sacrificados ao final do período de tratamento, em ambos os estudos e grupos (toxicidade aguda e de doses repetidas) não apresentaram alterações de peso e nem macroscópicas de seus órgãos. Também não foram evidenciadas lesões microscópicas, há exceção de órgãos como baço e pulmão, onde neste estudo, os achados histopatológicos podem ser considerados incidentais.

Do conjunto de resultados, pode-se concluir que o fitoterápico Cassaú Composto<sup>®</sup> parece constituir um medicamento com uma boa margem de segurança, pois sua utilização até 10 vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante durante 30 dias, comprovou não produzir toxicidade sistêmica em ratos. Doses maiores, de até

20 vezes a dose terapêutica, demonstrou ocasionar sinais de toxicidade, porém transitórios. Contudo, o rato apesar de ser uma espécie muito utilizada na investigação científica, pode ser resistente a maioria dos fármacos, daí a necessidade de se utilizar outras espécies não roedoras, que podem ser mais suscetíveis às intoxicações.

O fato da associação de extratos fluidos contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major* L., *Luehea grandiflora* Mart., *Myrocarpus frondosus* Allemão, *Piptadenia colubrina* Benth (Cassaú Composto<sup>®</sup>) utilizado nestes estudos não ter causado toxicidade sistêmica em ratos Wistar, não descarta a necessidade de maiores estudos, como os de toxicidade crônica, e desta forma caracterizar o perfil toxicológico, considerando-se o aumento de suas concentrações ou de seus metabólitos sobre tecidos sensíveis.

Outro fato a considerar é a necessidade de maiores estudos isolados a respeito das espécies de plantas que constituem o fitoterápico, pois segundo Bacchi (1995) quando se tem várias espécies vegetais presentes em único fitoterápico, é de se considerar a possibilidade de que não seja possível prever a sua ação como um todo, uma vez que pode ficar impossível estudar todas as interferências das diferentes substâncias dos mais variados vegetais. Também deve-se considerar a biodiversidade das espécies, tipo de solo onde são cultivadas, assim como questões referentes à colheita e armazenamento, que podem interferir de maneira significativa na toxicidade das plantas.

## 6 CONCLUSÕES

### a) Toxicidade Aguda

A associação de extratos fluidos contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major* L., *Luehea grandiflora* Mart., *Myrocarpus frondosus* Allemão, *Piptadenia colubrina* Benth (Cassaú Composto<sup>®</sup>) administrado por via oral em dose única de 26 ml/kg, correspondendo a 20 vezes a dose terapêutica indicada para seres humanos adultos, não interferiu no desenvolvimento ponderal, consumo relativo de água e ração, produção relativa de urina e fezes, assim como também não produziu alterações macroscópicas nos órgãos dos animais. Porém machos e fêmeas tratados apresentaram um moderado e transitório quadro de ataxia, onde este processo mostrou-se reversível 24 horas após a administração.

### b) Toxicidade subcrônica

A associação de extratos fluidos contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major* L., *Luehea grandiflora* Mart., *Myrocarpus frondosus* Allemão, *Piptadenia colubrina* Benth (Cassaú Composto<sup>®</sup>) administrado por via oral durante 30 dias a ratos machos e fêmeas nas doses 1,3 ml/kg, 6,5 ml/kg, 13 ml/kg, respectivamente a dose terapêutica indicada pelo fabricante, 5 vezes a dose terapêutica e 10 vezes a dose terapêutica, não desencadeou sinais de toxicidade sistêmica, demonstrado através de avaliações hematológicas e bioquímicas sanguíneas, bem como de exames histopatológicos. Portanto a sua utilização nas doses e período referidos pode ser considerado segura.

## REFERÊNCIAS

ALICE, C.B. et al. **Plantas Medicinais de uso Popular: Atlas Farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 1999, 205p.

ALMEIDA, R.N. et al. Triagem Farmacológica de plantas do Nordeste Brasileiro. In: Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais, nov.1983, Paraíba. **Anais**. p.345-354, 1983.

ANDERSON, N.L. Criação e Medicina Básicas dos Animais de Estimação de Bolso. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Clinica de Pequenos Animais**. Manual Saunders. São Paulo: Roca, 1998. p. 1523-1552.

ATTA, A.H.; EL-SOUD, A.K. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 235-238, July 2004.

BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASE, L.C. **Plantas Medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995. p. 170-197.

BIANCHI, N.R. et al. Estudo da toxicidade de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.72, n.3, p.57-58. Jul.1991.

BIANUCCI, M.P. et al. Mutagenic Activity of aristolochic acid IV isolated from *Aristolochia rigida* Duch. **Pharmacological Research**, v. 27, p.117-118, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº 89 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de registros simplificado de fitoterápicos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 18 mar. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 16 mar. 2004 c.

BRITO, A.R.M.S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais In: DI STASE, L.C. **Plantas Medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995. p. 100-107.

BUSH, B.M. **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians**. London: Blackwell Scientific Publications, 1991. p. 311-340.

CALLEGARI-JAQUES, S.M. **Bioestatística princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 255 p.

CARVALHO, J.C.T. **Formulário Médico - Farmacêutico de Fitoterapia**. Belo Horizonte: Ciência Brasilis, 2005, p. 2-9.

CHIANG, L.C. et al. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. **Antiviral Research**, v. 55, p. 53-62, dec. 2001.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996, 259p.

COELHO de SOUZA, G. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 6v.

CREUS, A.J. et al. **Fitoterapia: Vademécum de prescripción**. 4 ed. Barcelona: Masson, 2003. 1091p.

CRUZ, G. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1984. 599 p.

DEBELLE, F.D. et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, p. 431-436, 2002.

DELGOBO, C.L. et al. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 167-175, 1999.

DERMAEDEROSIAN, A.; BENTLER, J.A. **The review of natural products**. 2.ed. Missouri: Faetsand Comparisons, 2002. p. 508-601.

DUKE, A.J. **Handbook of Medicinal Herbs**. Flórida: CRC Press, 1989. 677p.

DUKE, A.J. **Herbal Handbook**. Rodale St. Martin's Press, 2000. 282p.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia**. Na ação primária à saúde. São Paulo: Manole, 2001, p.79-85.

FELDMAN, B.F. **Veterinary Hematology**. 5.ed. New York: Lippincott Willians e Willians, 2000, 1344 p.

FRANÇA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in na endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, nº 3, p.229-232,1996.

GADHI, C.A. et al. Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 87-92, 1999.

GADHI, C.A. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 203-205, 2001.

GÁLVEZ, M. et al. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. On cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 125-130, may 2003.

GARCIA, L.C. et al. Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de *Anadenanthera colubrina*. **Ciência Florestal**, v.14, n.1, p. 85-90, 2004.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003, p. 179-198.

GUILLÉN, M.E.N. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n.2, p. 99-104, 1997.

GUTIERREZ-LUGO, M.T. et al. Lipoygenase inhibition by Anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Letter**, v.70, p. 263-265, 2003.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1993. 238p.

HASHIMOTO, K. et al. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 185-189, july 1999.

HEINRICH, M. et al. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytoterapy**. Filadélfia: Elsevier Science, 2004, p. 287-289.

HETLAND, G. et al. Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scand. J. Immunology**, v.52, p.348-355, may 2000.

HOFFMANN, D. **Medical Herbalism**. The science and practice of herbal medicine. Healing Arts Press, 2003. 666 p.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, oct. 2002.

HU, S.L. et al. Studies on the toxicity of *Aristolochia manshuriensis* (Guanmuton). **Toxicology**, v. 198, p. 195-201, 2004.

IOSET, J.R.; RAOELISON, G.E.; HOSTETTMANN, K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 29-36, 2002.

LANS, C. et al. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **BMC Complementary and alternative medicine**, nov.2001.

LIU, M-C. et al. The nephrotoxicity of *Aristolochia Manshuriensis* in rats is attributable to its aristolochic acids. **Clinical Exp. Nephrology**, v.7, p. 186-194, 2003.

LOEB, W.F. Clinical Biochemistry of Laboratory Rodents and Rabbits. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. P.845-855.

LOPES, E.C. et al. Avaliação das atividades biológicas de *Luehea divaricata*. In: Semana Acadêmica de estudos Farmacêuticos, jul.1990, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica da Faculdade de Farmácia (UFRGS), v. 1, n.1, p.10,1990.

LOPES, L.M.X.; HUMPFER. 8-benzylberberine and N-oxide alkaloids from *Aristolochia gigantea*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 431-435, 1997.

LOPES, S.T.A. et al. **Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, 1996, 166p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2002. 512 p.

MANUCHAIR, E.S. **Herbal Medicine- Pharmacodynamic basis of**. Flórida: CRC Press, 2002. 726 p.

MARTINEZ, M.C.M. et al. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.17, p. 408-412, 2002.

MELLO, J.R.B. et al. Avaliação do extrato aquoso dos frutos de *Crotalaria retusa* Leguminosae sobre a fertilidade de ratas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001. p.423-450.

MORETÃO, M.P. et al. Effect of na acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from de gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v.89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M.P. et al. Induction of secretory and tumoricidal activies in peritoneal macrophages by acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v.93, p.189-197, 2004.

NASCIMENTO, I.R.; LOPES, L.M.X. Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 953-957, 2003

NORTIER, J.L.; VANHERWEGHEM. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). **Toxicology**, v.181-182, p. 577-580, 2002.

OTERO, R. et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 233-241, 2000.



PITTLER, M.H.; ERNEST, E. Systematic review: hepatotoxic events associated with herbal medicinal products. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, p. 451-471, 2003.

PLANTAMED. Angico. Disponível em:  
< [http://www.plantamed.com.br/ESP/Mirocarpus\\_frondosus.htm](http://www.plantamed.com.br/ESP/Mirocarpus_frondosus.htm)>. Acesso em: 18 agosto 2005.

PLANTAMED. Bálsamo. Disponível em :  
< [www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCA/Anadenanthera\\_peregrina.htm](http://www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCA/Anadenanthera_peregrina.htm) >. Acesso em: 12 julho 2004.

PLANTAMED. Tanchagem. Disponível em:  
<[www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCP/Plantago\\_major.htm](http://www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCP/Plantago_major.htm)>. Acesso em: 12 julho 2004.

RASKIN, R.L. Criação e Medicina Básicas dos Animais de Estimação de Bolso. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Clinica de Pequenos Animais**. Manual Saunders. São Paulo: Roca, 1998. p. 165-184.

SAMUELSEN, A.B. et al. Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v.30, p. 37-44, mar.1996.

SAMUELSEN, A.B. et al. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 133-143, Aug.1999.

SAMUELSEN, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n.1-2, p. 1-21, mar. 2000.

SARTORI, L.B.S.; TOZZI, A.M.G.A. Revisão taxonômica de *Myrocarpus* Allemão. **Acta botânica brasileira**, v.18, n.3, p. 521-535, jan. 2004.

SCHANEBERG, B.T.; KHAN, I.A. Analysis of products suspected of containing *Aristolochia* or *Asarum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 245-249, july 2004.

SHAFI, P.M. et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 439-441, may 2002.

SHARAPIN, N. Normatização da Indústria Farmacêutica. In: **Seminário sobre Industrialización y Legalización de Productos Fitofarmacéuticos en Iberoamérica e Reunión Construtiva de la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos**, Guatemala, 1996, p.42-44.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 4.ed. Porto Alegre: Universidade, 1995. 173 p.

SOSA, S. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 211-215, 2002.

SOUZA, G.C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2003.

TASKOVA, R. et al. Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1443-1445, 1999.

THRALL, M.A. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. New York: Lippincott Williams e Willians, 2004, 518 p.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 11. ed. London: Baillière Trindall, 1980. 657 p.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros técnicos e científicos S.A. 2003. 410 p.

TROPICAL plant database. Rain tree Nutrition. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/jarrinha.htm>>. Acesso em 12 julho 2004.

VILA,R. et al. Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. **Phytochemistry**, v. 46, n.6, p. 1127-1129, 1997

WATANABE, L.Y.; LOPES, M.X. Alkaloids from *Aristolochia arcuata*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, p. 991-994, 1995.

WHO. Guidelines for toxicity investigation of herbal medicines In: **Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines**. 1993, p. 35-40.

WOJCIKOWSKI, K.; JOHNSON, D.W.; GOBÉ, G. Medicinal herbal extracts - renal friend or foe? Part one: The toxicities of medicinal herbs. **Nephrology**, v. 9, p. 313-318, 2004.

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1994. p. 391-395.

ZHOU, S. et al. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life Sciences**, v. 74, p.935-968, 2004.

ANEXO A - Foto gaiola metabólica

