



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

VANESSA HELENA DA SILVA SOUZA

**“Avaliação da toxicidade não clínica de extrato e
vouacapanos oriundos dos frutos da espécie
Pterodonpubescens Benth.”**

Piracicaba

2017

VANESSA HELENA DA SILVA SOUZA

**“Avaliação da toxicidade não clínica de extrato e
vouacapanos oriundos dos frutos da espécie
Pterodonpubescens Benth.”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Dra. Mary Ann Foglio

Coorientador: Dr. João Ernesto de Carvalho

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Vanessa Helena da Silva Souza, e orientada pela Profa. Dra. Mary Ann Foglio.

Piracicaba

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

So89a Souza, Vanessa Helena da Silva, 1981-
Avaliação da toxicidade não clínica de extrato bruto e vouacapanos obtidos dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth / Vanessa Helena da Silva Souza. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Mary Ann Foglio.

Coorientador: João Ernesto de Carvalho.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Pterodon pubescens*. 2. Toxicidade. 3. Plantas medicinais. I. Foglio, Mary Ann, 1960-. II. Carvalho, João Ernesto de, 1954-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of non-clinical toxicity of crude extract and vouacapanos obtained from fruits of the species *Pterodon pubescens* Benth

Palavras-chave em inglês:

Pterodon pubescens

Toxicity

Medicinal plants

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Fabício de Faveri Favero

Patrícia Maria Wiziack Zago

Carmen Silvia Passos Lima

Bruno Bueno Silva

Data de defesa: 27-01-2017

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27 de Janeiro de 2017, considerou a candidata VANESSA HELENA DA SILVA SOUZA aprovada.

PROF^a. DR^a. MARY ANN FOGLIO

PROF. DR. FABRÍCIO DE FAVERI FAVERO

PROF^a. DR^a. PATRÍCIA MARIA WIZIACK ZAGO

PROF^a. DR^a. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

PROF. DR. BRUNO BUENO SILVA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos meus pilares: esposo, pais e irmãos.

Certamente esta não é a melhor forma de homenageá-los, mas será uma singela maneira para ofertar a vocês toda a minha gratidão, amor e respeito. Afinal, um **“sonho que se sonha junto, é realidade”**.

Mãe e Pai, meus guerreiros incansáveis, meus anjos na Terra. Este Doutorado foi meu sonho, mas não teria sido possível se não fosse por vocês, pela educação recebi, pelos valores ensinados, incentivos que nunca faltaram, por nunca me deixarem sentir o real peso das dificuldades e mesmo a 100 km, vocês estiveram diariamente ao meu lado. Vocês dois são minha vida e eu os amo!

Viviane e Vinícius, meus irmãos mais lindos, cada mínima atitude, as brigas por coisas idiotas, cada lágrima de alegria ou não, nossos abraços e nossos beijos, as “surra de cócegas”, cada sorriso, cada palavra, cada mensagem, cada ligação e especialmente cada EU TE AMO que recebi de vocês, foram combustível para eu realizar, foram bússola para me orientar, lições que muito me ensinaram e tudo isso construiu a pessoa que sou hoje. Tenho certeza que estivemos sempre juntos por muitas vidas, pois esse nosso amor uns pelos outros não deve caber em uma só.

Alexandre e Talita, minha gratidão por serem parte da minha vida. Deus foi generoso por me dar dois irmãos queridos, duas almas tão lindas e especiais. AMO VOCÊS. Obrigada por tudo “marmotas”!

Guto, meu Anjo, esta é apenas uma de NOSSAS conquistas. Você teve papel fundamental ao longo de quatro anos para que mais esta etapa fosse concluída. Sou grata pelo seu amor, sua dedicação, seu carinho, sua paciência e pela sua generosidade. Te amo marido!

Vitor, meu sobrinho/filho amado, Deus nos ensina de maneiras misteriosas, estamos e continuaremos aprendendo um com o outro. Amo Você!

Dedico à vocês esta conquista com todo meu amor

Vanessa

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pelo acolhimento como sua aluna e orientada.

Amiga querida e incentivadora incansável, ela é um “poço” de sabedoria e bom-humor. Grande exemplo de mulher, extremamente dedicada ao que faz, que demonstra em suas atitudes o cuidado e a dedicação na formação de profissionais pesquisadores e professores de excelência.

Tornou-se parte da minha vida e nutriu minha paixão por ser professora quando mostrou-me que o bom profissional é o equilíbrio entre a formação, a dedicação e a humanização. Nunca permitiu a acomodação de seus alunos provando que o melhor de nós não tem limites e sempre podemos fazer mais. Com seus exemplos demonstrou que para crescermos devemos ser providos de honestidade, perseverança e generosidade, mas tudo isso com muita firmeza, assertividade e autoconfiança.

Poderia escrever a tese toda dizendo o quanto sou grata a você Mary e o quanto é especial e minha vida. Fica aqui meu sincero manifesto de respeito, admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida e por prover a existência e saúde de tantas pessoas maravilhosas a quem poderei agradecer.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da FOP-Unicamp, pela oportunidade de execução deste projeto e por todo apoio durante o Doutorado.

À querida Elisa, secretária do Programa de Pós-graduação em Odontologia, por ser tão querida e preocupada com os alunos.

À CAPES, pela bolsa de Doutorado

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, que desde o Mestrado orienta meus passos na carreira acadêmica. Um exemplo de professor que sempre ensinou com brilho nos olhos e como coorientador foi essencial no desenvolvimento deste trabalho. Suas aulas, suas palavras e sua sensibilidade sempre me encantarão. Gratidão.

Às queridas Núbia e Ilza, dois pilares para todo o grupo de pesquisa. Guerreiras incansáveis, altruístas e generosas. Obrigada pela amizade e por me ensinarem tanto.

Ao meu grande amigo Dr. Humberto Moreira Spíndola, pela sua colaboração em todo o trabalho.

À Prof. Dra. Glaucia Maria Pastore, por ceder gentilmente seu laboratório e equipamentos para o desenvolvimento de parte dos experimentos e a Técnica Angélica pela dedicação de seu tempo.

Às minhas amigas/irmãs Michelle Pedrosa Jorge, Gabriela M. Marchetti, Viviane Ferre e Mariana C. Figueiredo, por contribuírem direta e indiretamente com o trabalho, por tornarem meus dias mais felizes, leves e somente nutrido de boas energias.

Às minhas queridas Ana Possenti e Sirlene Valério Tinti, por toda energia dedicada a este projeto ajudando principalmente na execução das etapas mais complicadas, demoradas e cansativas. Com vocês ainda aproveito para carregar minha bateria nos abraços apertados e descansar minha tensão nas conversas boas do dia-a-dia. Deus às abençoe.

À minha doce amiga e grande exemplo de profissional Dra. Ana Lúcia T. G. Ruiz, pelos puxões de orelha, pelos elogios, pela preocupação dentro e fora do CPQBA, por colocar meus pés no chão o tempo todo, por ser tão “Google” e facilitar nossas vidas, por contribuir maravilhosamente para a execução e desenvolvimento do projeto de doutorado. Serei eternamente grata!

À amiga Ana Paula O. Hohne, por transmitir de forma tão perfeita seus conhecimentos e experiências.

À queridíssima Adriana Della Torre, uma profissional completa, um exemplo para todos os alunos. Grata por toda ajuda, especialmente na reta final do projeto.

Ao grupo “Sucupira’s crew” (sempre quis escrever esta parte), Matu, Rosanna, Leila Giarolla, Leila Servat, Núbia, Natalia, Beto, Rogério, Felipe, Elaine pela dedicação, união e comprometimento. Foi um prazer caminhar com vocês!

Às amigades de laboratório, que ao longo destes anos, configuraram uma grande família da Pós-graduação: Patricia Zago, Fabi Volpe Zanuto, Leilane Iwamoto, Verônica, Giovanna Fiorito, Giovanna Longato, Débora Vendramini, Karin Maia, Larissa Rizzo, Larissa Shiozawa, Paulinha, Paula Monteiro, Lúcia Braga, Livia Garcia, Rafael R. Zafred, Fabiana Nonato e Tamires Sedano.

Aos que passaram pelo laboratório, mas deixaram suas marcas e muita saudade: a querida amiga Sylvie, a fofíssima “marida” Carol Medeiros, Erika Ponchet, Jamerson Oliveira e queridos estagiários Jéssica, Lidiane, Lucas, Larissa, Danilo e Pâmela.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela colaboração e disponibilidade.

RESUMO

Popularmente conhecida como Sucupira, a *Pterodon pubescens* Benth é uma espécie vegetal típica do Cerrado brasileiro e utilizada por um grande número de pessoas para tratamento de dores inflamatórias na forma de infusão ou decocto de seus frutos. Diante da escassez de respostas consistentes sobre a segurança de sua utilização, este trabalho avaliou a toxicidade não clínica, em testes *in vivo* e *in vitro*, do extrato bruto diclorometânico (EBD) e dos isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila, estes últimos, obtidos em uma mesma amostra, a qual nos referimos neste estudo pela relação massa/carga como vouacapanos *m/z* 404. O presente trabalho buscou reunir resultados, contribuindo com informações sobre possíveis riscos associados ao uso popular e respaldando futuras investigações para desenvolvimento de produto fitoterápico. Os estudos toxicológicos foram realizados de acordo com legislações brasileiras vigentes, tendo como base o Guia de Orientação de Condução de Estudos, proposto pela Agência de Vigilância Sanitária, onde se estabelecem as normas para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico e/ou fitofármaco, além de documentos internacionais como protocolos da *Organization for Economic Co-operation and development* (OECD). As amostras foram inicialmente testadas em protocolos de toxicidade aguda oral para determinação da menor dose com potencial tóxico, valor que posteriormente foi utilizado como limite de maior dose no teste de toxicidade com doses repetidas. Os parâmetros de avaliação toxicológica, como: avaliação ponderal, análises hematológicas, bioquímicas, avaliação clínica diária e análises anatomopatológicas dos órgãos ao final dos testes, demonstraram que o EBD não demonstrou sinais que inferissem toxicidade inerente à amostra, mas a ingesta diária de altas doses (500mg/kg) alterou a homeostase metabólica dos animais que manifestaram esteatose microgoticular hepática. Resultados bioquímicos e histopatológicos dos animais tratados diariamente com os vouacapanos *m/z* 404 apontaram para a participação destes na toxicidade hepática de um animal na maior dose utilizada (300mg/kg) causando hepatotoxicidade aguda. Testes preliminares de toxicidade genética *in vitro* utilizando protocolos de indução de cometas em condições alcalinas demonstraram que tanto EBD quanto vouacapanos *m/z* 404 aumentaram a porcentagem de fragmentação de DNA, sem interferir no parâmetro *Tail moment* (relação matemática que indica o tamanho da cauda em relação à porcentagem de

DNA fragmentado). Estes dados indicam que o DNA possa ter sofrido clivagens específicas, gerando fragmentos maiores e mais concentrados próximos ao nucleóide. Apenas os vouacapanos *m/z* 404 na concentração de 30µg/mL ($23,37 \pm 3,44$) apresentou diferença estatística comparado ao controle celular (ANOVA, $p < 0,05$). Finalmente em teste de Indução de micronúcleos (MNs), o EBD e os vouacapanos *m/z* 404 não demonstraram potencial mutagênico. Os dados gerados serão utilizados para estabelecer as condições experimentais e as doses a serem utilizados em demais estudos não-clínicos e clínicos para posteriormente viabilizar o desenvolvimento e registro de um medicamento fitoterápico a partir dessa espécie vegetal.

Palavras chave: *Pterodon pubescens*. Sucupira. Plantas medicinais. Toxicidade

ABSTRACT

Pterodon pubescens Benth (Sucupira) is a typical Brazilian plant species found in the Cerrado region widely used in folk medicine for inflammatory disorders. A large number of people report clinical improvements after ingesting fruit infusion. Considering the lack of consistent data on safety issues, this study evaluated the non-clinical toxicity of EBD (crude dichloromethane extract) and vouacapanes obtained from the plant species contributing with data on risks of therapeutic use. Toxicological studies were performed in accordance with current legislation, based on the study guide proposed by the Sanitary Surveillance Agency - ANVISA, which establishes standards for the development of a herbal and / or phytochemical medicine. The EBD and isomers 6 α -hydroxy- 7 β -acetoxy- vouacapano - 17 β -oate and 6 α -acetoxy- 7 β -hydroxy- vouacapano - 17 β -oate (m/z 404) samples were tested for oral acute toxicity, repeated dose toxicity, and genotoxicity by the alkaline comet assay. The toxicological parameters, weight evaluation, haematological and biochemical analysis, daily clinical and pathological analyzes of the organs immediately after the tests were considered. The EBD did not show signs that inferred toxicity inherent to the sample, but the daily intake of high doses (500 mg/kg) altered the metabolic capacity of animals inducing microgoticular steatosis. Results of biochemical and histopathological animals treated daily with compound m/z 404 pointed to participation of liver toxicity in only one animal at the highest dose (300 mg/kg) causing acute hepatotoxicity. *In Vitro* preliminary tests in comets induction test in alkaline conditions showed that both EBD and m/z 404 increased the percentage of DNA fragmentation, but did not affect Tail moment parameter (mathematical ratio that indicates the size of the tail compared the percentage of fragmented DNA), indicating that the samples can interact with the genetic material, without demonstrating a high capacity for fragmentation thereof. Only compound m/z 404 at 30 μ g/mL (23.37 ± 3.44) dose showed statistical significance compared to the control cell (ANOVA, $p < 0.05$). The data generated will be used to determine conditions for establishing doses to be used in clinical studies that will further permit the development and registration of a herbal medicinal product from the plant species.

Key Words: *Pterodon pubescens*. Medicinal plants. Toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa representativo dos biomas brasileiros

Figura 2:Mapa de ocorrências do gênero *Pterodon* no Brasil

Figura 3:Ilustração da espécie *Pterodon pubescens* Benth e seus frutos

Figura 4:Estrutura molecular do diterpeno geranilgeraniol

Figura 5:Fluxograma das etapas do processo de obtenção do EBD pelo método de maceração dinâmica

Figura 6:Obtenção do extrato bruto em equipamentos da planta piloto

Figura 7:Imagem do sistema de cromatografia em coluna filtrante

Figura 8: Imagem do sistema de cromatografia em coluna clássica

Figura 9:Fluxograma representativo do procedimento do teste de toxicidade aguda oral (OECD 423) com dose inicial em 300mg/kg

Figura 10: Foto do aparato campo aberto utilizado para avaliação de atividade exploratória de camundongos

Figura 11: Fotomicroscopia da linhagem celular CHO-K1, aumento de 100x

Figura 12: Imagem representativa da placa de 96 compartimentos com as respectivas amostras testadas e seus controles

Figura 13: Fotomicroscopia de nucleóides de células CHO-K1, após corrida eletroforética em condições alcalinas. Imagem com aumento de 40X

Figura 14:Esquema simplificado do fracionamento em coluna filtrante, seguido por fracionamento em coluna clássica resultando na obtenção dos compostos vouacapanos.

Figura 15: Cromatografia de camada delgada das frações F e G provenientes do fracionamento do EBD

Figura 16: (A) Cristais obtidos após concentração da fração P1, obtida no fracionamento do EBD proveniente dos frutos de *Pterodon pubescens*; (B) recristalização em hexano

Figura 17: A) CCD com compostos de interesse B) CCD de estabilidade do EBD com extrato contendo P5 antes e após submeter à temperatura aquecimento

Figura 18: Cromatogramas normalizados dos compostos vouacapanos **P1** - éster-6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila; **P4** - éster 6 α ,7 β -diidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila e **P5**

Figura 19: Gráfico demonstrativo do número de áreas percorridas durante um período de 5 minutos pelos animais em aparato Campo aberto

Figura 20: Gráfico representando a variação de peso corporal de **ratos machos** tratados com doses-repetidas do EBD ao longo de 110 dias

Figura 21: Gráfico representando a variação de peso corporal de **ratos fêmeas** tratados com doses-repetidas do EBD ao longo de 110 dias

Figura 22: A) Avaliação macroscópica do estômago de rato (macho), tratado diariamente com extrato EBD na dose de 500 mg/Kg pelo período de 110 dias. B) Porção duodenal do intestino delgado do mesmo animal

Figura 23: Cortes histológicos de pulmão demonstrando nas imagens A e B o órgão sadio com paredes alveolares preservadas e bem definidas (setas)

Figura 24: Cortes histológicos de pulmão demonstrando nas imagens A e B o órgão com fibrose intersticial com colabamento da parede alveolar.

Figura 25: Cortes histológicos do fígado demonstrando degeneração hidrópica em zona centrolobular (seta1), com vacuolização (setas 2)

Figura 26: Corte histológico do fígado demonstrando esteatose microgoticular (setas) próximo ao espaço porta-hepático

Figura 27: Gráfico representando a média do ganho de peso dos grupos, tratados ao longo de 110 dias com doses-repetidas dos vouacapanos m/z 404

Figura 28: Corte histológico do fígado demonstrando infiltrado linfocítico em região centrolobular (setas)

Figura 29: Avaliação da viabilidade celular do extrato bruto diclorometânico e vouacapanos m/z 404, em cultura de células não-tumoral CHO-K1, correlacionando a porcentagem de crescimento *versus* concentração das amostras, após 24 horas de exposição

Figura 30: Fragmentação de DNA (expresso em %) em células CHO-K1 expostas por 4 horas às amostras EBD e m/z 404 nas concentrações (0,3, 3 e 30 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 31: *Tail moment* (Relação entre % de DNA fragmentado e comprimento do cometa) de células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e m/z 404 nas concentrações (0,3, 3 e 30 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 32: Frequência de MNs (%) de células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e m/z 404 nas concentrações (0,3, 3 e 30 $\mu\text{g/mL}$)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esqueleto básico de um diterpeno vouacapano com algumas possíveis substituições em (R) radicais

Tabela 2 : Gradiente de concentração das misturas de solventes utilizados como fase móvel para eluir as colunas cromatográficas

Tabela 3: Sinais clínicos observados durante o teste de toxicidade aguda **oral**

Tabela 4: Análises realizadas a partir das amostras sanguíneas

Tabela 5: Rendimento (% m/m) dos compostos isolados no processo de fracionamento em relação ao extrato bruto diclorometânico

Tabela 6: Relação das amostras avaliadas no teste de toxicidade aguda oral em camundongos fêmeas segundo protocolo OECD-423

Tabela 7: Valores de referência de Hemograma proposto para ratos Wistar (HanUnib:WH) machos e fêmeas oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP com idade de 6 meses

Tabela 8: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **satélite**

Tabela 9: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **veículo**

Tabela 10: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **EBD 50mg/kg**

Tabela 11: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **EBD 100mg/kg**

Tabela 12: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **EBD 500mg/kg**

Tabela 13: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratas **fêmeas** pertencentes ao grupo **satélite**

Tabela 14: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratas **fêmeas** pertencentes ao grupo **veículo**

Tabela 15: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **fêmeas** pertencentes ao grupo **EBD 50mg/kg**

Tabela 16: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **fêmeas** pertencentes ao grupo **EBD 100mg/kg**

Tabela 17: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **fêmeas** pertencentes ao grupo **EBD 500mg/kg**

Tabela 18: Valores de referência para análises bioquímicas proposto para ratos Wistar (HanUnib:WH) machos e fêmeas

Tabela 19: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos** pertencentes ao grupo **satélite**

Tabela 20: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos** pertencentes ao grupo **veículo**

Tabela 21: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos**, pertencentes ao grupo **EBD 50mg/kg**

Tabela 22: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos**, pertencentes ao grupo **EBD 100mg/kg**

Tabela 23: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos**, pertencentes ao grupo **EBD 500mg/kg**

Tabela 24: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratas **fêmeas**, pertencentes ao grupo **satélite**

Tabela 25: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **fêmeas**, pertencentes ao grupo **veículo**

Tabela 26: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **fêmeas**, pertencentes ao grupo **EBD 50mg/kg**

Tabela 27: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **fêmeas**, pertencentes ao grupo **EBD 100mg/kg**

Tabela 28: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **fêmeas**, pertencentes ao grupo **EBD 500mg/kg**

Tabela 29: Valores de referência de Hemograma proposto para camundongos *Swiss* (Unib:SW) fêmeas oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) com idade aproximada de 6 meses

Tabela 30: Valores de referência de análises bioquímicas propostos para Camundongos *Swiss* (Unib:SW) fêmeas oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) com idade=6 meses

Tabela 31: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **satélite**

Tabela 32: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **veículo**

Tabela 33: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **m/z 404 30mg/kg**

Tabela 34: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **m/z 404 100mg/kg**

Tabela 35: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **m/z 404 300mg/kg**

Tabela 36: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **satélite**

Tabela 37: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **veículo**

Tabela 38: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **m/z 404 30mg/kg**

Tabela 39: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **m/z 404 100mg/kg**

Tabela 40: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **m/z 404 300mg/kg**

Tabela 41: Contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo de animais tratados com vouacapanos **m/z 404**, analisado por microscopia. Média de células diferenciadas a cada 200 células contadas.

Tabela 42: Resultado da atividade genotóxica em células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e **m/z 404** nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µg/mL

Tabela 43: CBPI, RI e Frequência de micronúcleos em células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e **m/z 404** nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µg/mL

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBPI - Índice de Proliferação Pós-Bloqueio da Citocinese

CFA - Solução de antígenos de micobactérias emulsionado em óleo mineral (*Freund's Complete Adjuvant*)

CHO-K1 – Célula não-tumoral de ovário de Hamster Chinês (*Chinese Hamster Ovary*)

C-Myc – Gene regulador da oncogênese que codifica fator de transcrição em diversos tipos de câncer.

DMSO – Dimetilssulfóxido

EBD – Extrato bruto diclorometânico

EMA – *European Medicine Agency* (Agência Européia de Medicina – órgão fiscalizador)

FDA – *Food and drug administration* (Agência administradora/fiscalizadora de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos)

HCl – Ácido clorídrico

HCT – Hematócrito

HGB – Concentração de hemoglobina

I.P.- Via de administração intraperitoneal

ICH - *International Conference on Harmonization* (Conferência internacional de harmonização para registro de produtos farmacêuticos).

IN – Instrução Normativa

K-562 - Célula de leucemia humana (*Human erythromyeloblastoid leukemia*)

LMP – *Low Melting Point*

LOAEL – Menor nível de dose com observação de efeito tóxico (*lowest-observed-adverse-effect level*)

m RNA – Ácido ribonucléico mensageiro (Transporta informação genética transcrita do DNA)

m/z404 – relação massa/carga dos isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila.

MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*)

MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados.

MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*)

MMS- metanometilsulfonato (agente clastogênico)

MNs - micronúcleos

NaOH – Hidróxido de sódio

NCI -Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National cancer institute*)

NF- κ B - factor nuclear *kappa* B - complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição

NOAEL – Nível de dose sem observação de efeito tóxico (*no observed adverse effect level*)

OECD – Organização para cooperação e desenvolvimento da economia (*Organization for economic co-operation and development*)

OMS- Organização Mundial da Saúde

P. pubescens – *Pterodon pubescens* Benth

P.A. – Para análise

PGE2 – Tipo de Prostaglandina (Ácido graxo com diversas funções e está envolvida diretamente com a inflamação)

RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*)

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RE -Resolução

RPMI -meio de cultura de tecidos(*Roswell Park Memorial Institute*)

SFB – Soro fetal bovino

SNA – sistema nervoso autônomo

SNA – Sistema nervoso autônomo

SPF – *Specific Pathogen free* (livre de patógenos específicos)

SUS – Sistema Único de Saúde do Brasil

V.O. – Via de administração oral

WBC -contagem total de leucócitos (*white blood cell*).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
	2.1. O gênero <i>Pterodon</i>	26
	2.2. A espécie <i>Pterodon pubescens</i> Benth	28
	2.2.1. Relatos de estudos de eficácia	28
	2.2.2. Relatos de estudos de toxicidade	33
	2.3. Plantas medicinais e diretrizes que norteiam seus estudos	34
	2.4. Estudos de toxicidade para fitoterápicos	37
	2.4.1. Estudos de toxicidade aguda.....	39
	2.4.2. Estudos de toxicidade com doses repetidas.....	39
	2.4.3. Estudos de Toxicidade genética	40
3	PROPOSIÇÃO.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
	4.1. Estudos fitoquímicos	43
	4.1.1. Material vegetal.....	43
	4.1.2. Preparação do extrato bruto vegetal.....	43
	4.1.3. Fracionamento, isolamento e identificação de compostos	45
	4.1.3.1. Cromatografia de camada delgada	45
	4.1.3.2. Cromatografia em coluna filtrante	45
	4.1.3.3. Cromatografia em coluna clássica.....	46
	4.1.3.4. Análise dos constituintes químicos por CG-EM.....	47
	4.2. Estudos <i>in vivo</i>	48
	4.2.1. Análises toxicológicas em modelos <i>in vivo</i>	48
	4.2.1.1. Toxicidade aguda oral.....	48
	4.2.1.2. Teste do campo aberto (<i>Open field</i>)	50
	4.2.1.3. Toxicidade com doses repetida em roedores.....	51
	4.3. Estudos de toxicidade genética <i>in vitro</i>	55
	4.3.1. Avaliação da viabilidade celular da CHO-K1 pelo ensaio antiproliferativo	55
	4.3.1.1. Cultivo celular	56
	4.3.1.2. Preparo da suspensão celular	56

4.3.1.3.	Preparo e aplicação das amostras	56
4.3.2.	Teste alcalino do cometa.....	57
4.3.2.1.	Preparo das soluções.....	58
4.3.2.2.	Preparo das lâminas de microscopia	59
4.3.2.3.	Realização do teste	59
4.3.2.4.	Coloração das lâminas e análise	61
4.3.3.	Teste de indução de micronúcleos.....	62
4.3.3.1.	Análise dos resultados.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1.	Estudos fitoquímicos	64
5.2.	Estudos <i>in vivo</i>	70
5.2.1.	Avaliação da toxicidade aguda do EBD e vouacapanos isolados (OECD – 423)	71
5.2.2.	Escolha das amostras testadas e suas respectivas doses.....	73
5.2.3.	Avaliação da toxicidade com doses repetidas do EBD em ratos machos e fêmeas ...	74
5.2.4.	Avaliação da toxicidade com doses repetidas dos vouacapanos <i>m/z</i> 404	105
5.2.5.	Determinação da concentração das amostras em teste de viabilidade celular	123
5.2.6.	Teste do cometa – Avaliação de genotoxicidade	124
5.2.7.	Teste de indução de micronúcleos – Avaliação de mutagenicidade	128
6	CONCLUSÃO	131
7	REFERÊNCIAS	132
ANEXO 1	143

1 INTRODUÇÃO

Dentro do contexto de produtos naturais, as plantas medicinais são significativamente exploradas como alternativa para auxiliar terapias convencionais ou substituir medicamentos no tratamento de várias doenças (Cragg & Newman, 2013). Dentre os inúmeros problemas que a humanidade busca solucionar com o uso de plantas e seus derivados, destaca-se o alívio da dor, definida por Casey (1999) como uma experiência consciente que inclui componentes característicos, afetivo-motivacionais e cognitivos que produzem uma sensação unificada inerente a cada indivíduo.

Entre outros fatores, a preferência pelo uso das plantas medicinais decorre de sua facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que as plantas apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, que justificam a necessidade de um profundo conhecimento sobre suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, além da padronização de formulações, que garantam a reprodutibilidade entre lotes utilizados e consequentemente a segurança de quem faz seu uso (Simões et al., 2010; Newman et al., 2015).

Estima-se que em 2009 cerca de 65% da população mundial fazia uso de produtos obtidos de plantas medicinais como forma primária de tratamento, fato que corroborou na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Cragg et al., 2009). Neste período, cerca de 10% dos fármacos na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) eram exclusivamente de origem vegetal (Sahoo et al., 2010).

.Apesar do domínio da síntese química, as pesquisas para a utilização adequada de produtos naturais como agentes terapêuticos, especialmente os derivados de plantas, seguem crescentes. Aproximadamente metade das aprovações de novos medicamentos no mercado tem estruturas relacionadas a compostos presentes em produtos naturais. Isto se explica devido às estruturas químicas complexas e com atividades farmacológicas clinicamente significativas serem atribuídas aos metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais (Harvey, 2007; Stratton et al., 2015).

Em 2012, Newman & Cragg (2012) estimaram que aproximadamente 63% dos fármacos utilizados para o tratamento de câncer eram derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais. Dados de 2013 reportados pelos mesmos autores

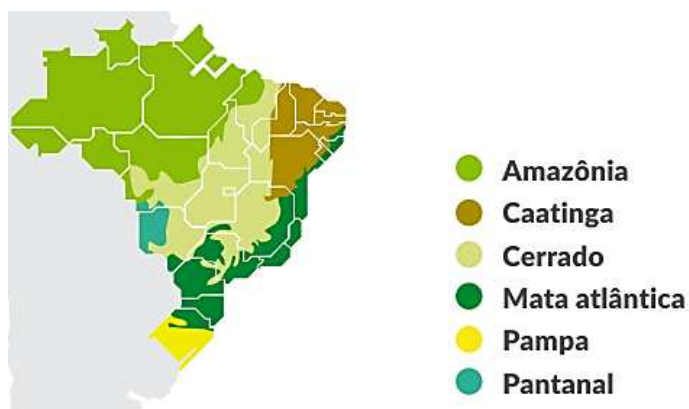
elevaram essa porcentagem para 65% (Cragg & Newman, 2013). Esses dados subsidiam o fato de haver um constante e relevante crescimento de publicações nessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas química e farmacológica (Cragg et al., 2009).

Uma vasta biodiversidade do território brasileiro permite que o país estabeleça-se de maneira estratégica para desenvolver a exploração racional e sustentada de novos metabólitos com valor terapêutico (Hansen et al., 2010). Na verdade, cerca de 10.000 trabalhos neste âmbito foram publicados por brasileiros em revistas científicas internacionais entre 2011 e 2013 (Dutra et al., 2016).

Vale ressaltar que no Brasil, a população tem uma latente tradição do uso popular de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças, isso se deve não só à biodiversidade como também ao potencial econômico da flora brasileira, que já eram descritos em inventários desde 1886, testemunhando a riqueza dos biomas e o potencial medicinal atribuído às muitas espécies (Jacobson et al., 2005; Dutra et al., 2016).

Segundo o Sistema de Informação Sobre Biodiversidade Brasileira (SiBBr), o Brasil, país que ocupa cerca de metade do continente sul-americano, apresenta uma notável diversidade climática, o que determina uma multiplicidade de espécies e uma ampla diversificação da flora, fauna e microrganismos presentes em seis importantes biomas, conforme representado na Figura 1.

Figura 1 – Mapa representativo dos biomas brasileiros



Fonte: <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade#biomas>

O Cerrado, bioma que representa ricamente nossa biodiversidade é segundo maior da América do Sul e compreende aproximadamente 24% do território brasileiro. Tem por características a baixa fertilidade do solo e predomínio de uma longa estação seca, que condicionam o desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação, muito atraente pela variedade em espécies medicinais e pela beleza dos aspectos estéticos que apresenta (Ferri, 1969). Além disso, possui um elevado potencial aquífero, por concentrar as nascentes das três maiores bacias hidrográficas: Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata (SiBBR 2016)

Também é cenário de grande importância social por fornecer recursos para a sobrevivência de comunidades e grupos que são detentores de conhecimentos tradicionais de sua biodiversidade como é o caso dos babaqueiros, ribeirinhos, indígenas e quilombolas (<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>). Faz parte deste bioma o nosso objeto de estudo, a espécie *Pterodon pubescens* Benth.

A espécie *Pterodon pubescens* Benth (Sucupira) tem sido objeto de estudo em nosso grupo de pesquisas desde 1998, período em que diversas investigações no âmbito fitoquímicos foram realizadas com o intuito de avaliar diferentes extratos, de diversas procedências, teores de compostos diterpênicos e suas respectivas atividades farmacológicas, especialmente o potencial anti-inflamatório, analgésico e antiproliferativo (Denny, 2002; Spindola, 2006; Spindola et al., 2009; Spindola et al., 2010; Servat et al., 2010; Grando, 2013); entretanto , nenhum estudo toxicológico não clínico havia sido realizado para esta espécie, o que tornou ainda mais relevante os resultados obtidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon* (família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*) é nativo do Cerrado brasileiro com transição para a floresta semidecídua da Mata Atlântica nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás e Piauí (Carvalho, et al., 1999). Compreende quatro espécies: *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon apparucuri* Pedersoli, *Pterodon polygalaeflorus* Benth e *Pterodon pubescens* Benth. (sinonímia - *Pterodon emarginatus* Vog.), que são conhecidas popularmente como sucupira-branca, fava-de-sucupira ou sucupira-lisa (Dutra et al., 2016).

Conforme dados obtidos através do SiBBr, existem 2197 ocorrências desse gênero registradas em território brasileiro, destas, 781 estão georreferenciadas conforme representado pelos pontos vermelhos no mapa da Figura 2.

Figura 2 – Mapa de ocorrências do gênero *Pterodon* no Brasil



Imagem obtida em <http://gbif.sibbr.gov.br/explorador/pt/busca> selecionando o filtro gênero com chave de busca o termo *Pterodon*

O gênero reúne espécies cujas árvores são de porte médio, intolerante ao sombreamento e características de terrenos secos e arenosos. Podem atingir até 16 metros de altura, dependendo da espécie. Apresentam copa piramidal rala, folhas inopinadas compostas com inflorescências terminais tipo panículo, tronco com casca lisa branco-amarelada e raízes que podem formar expansões de reserva. As diferentes espécies florescem em diferentes épocas, sendo que a *Pterodon pubescens* floresce nos meses de setembro e outubro, com frutificação de outubro a novembro (Lorenzi & Matos 2008). A morfologia do fruto é eurispérmica, variando entre ovóide, oblonga, elíptica e oblongo-elíptica, com uma única semente envolta em substância oleosa em cápsula fibrosa (Figura 3) (Ferreira, 2001).

As espécies pertencentes ao gênero *Pterodon* demonstram alto potencial terapêutico e inúmeros estudos atribuem ao gênero algumas propriedades farmacológicas, como antirreumática, analgésica, anti-inflamatória e anticâncer, correlacionadas à presença de compostos terpênicos (Ribeiro, 2015). Na medicina popular, as espécies são utilizadas na forma de decocto ou infusão aquosa das raízes, casca e frutos contra várias doenças, especialmente dores associadas a inflamações ou traumas. O extrato alcoólico, preparado a partir dos frutos, também é popularmente administrado como remédio (Sabino et al., 1999a).

Figura 3 – Ilustração da espécie *Pterodon pubescens* Benth e seus frutos



Fonte: Adaptado de Servat 2012

Estudos fitoquímicos com espécies pertencentes ao gênero *Pterodon* demonstraram a presença de compostos alcalóides (Torrenegra et al., 1989) e triterpenos (Moraes et al., 2012) nas cascas da planta. No óleo dos frutos encontrou-se isoflavonas, triterpenos (Marques et al., 1998) e diterpenos (Fascio et al., 1976; Arriaga et al., 2000; Denny, 2002, Servat, et al.; 2012; Braz-Filho & Gottlieb, 1970). No óleo essencial, obtido das folhas, identificaram-se nove hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo majoritários o γ -umuroleno e o biciclogermacreno. O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas permitiu o isolamento da mistura dos ésteróides estigmasterol e β -sitosterol (Dutra et al., 2009; Santos et al., 2010).

2.2. A espécie *Pterodon pubescens* Benth

2.2.1. Relatos de estudos de eficácia

As primeiras investigações dessa espécie foram motivadas pelo uso etnofarmacológico aliado à comprovação da atividade anti-cercariana do óleo obtido dos frutos (Mors et al., 1996) em que o composto 14,15-epoxigeranilgeraniol e seus derivados foram associados com atividade protetora contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni*, quando aplicados topicamente na cauda de ratos (dos Santos Filho et al., 1972).

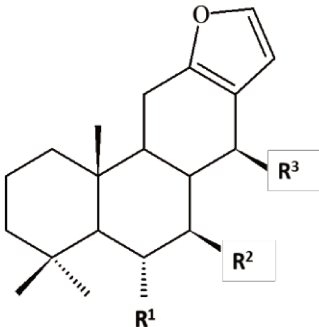
Seu uso popular já foi relatado através de estudo etnobotânico em 30 cidades do interior de Minas Gerais, onde a população fazia uso do chá para tratamento de reumatismo, dores de garganta, problemas da coluna, como tônico e depurativo, além do uso como anti-inflamatório e analgésico (Carvalho et al., 1999; Dutra et al., 2016).

Na literatura, encontram-se descritas diversas atividades farmacológicas, especialmente as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-edematogênica, anti-artrítica, antiproliferativa, antiplaquetária, confirmando a lógica do uso popular da planta (Coelho et al., 2001; Denny, 2002; Vieira et al., 2008; Calixto et al., 2007; Spindola et al., 2009; Spindola et al., 2010; Spindola et al., 2011; Servat et al., 2012; Nucci-Martins et al., 2015).

Os metabólitos, bem como as atividades farmacológicas de extratos, frações e compostos começaram a ser pesquisados quase que simultaneamente. Alguns autores

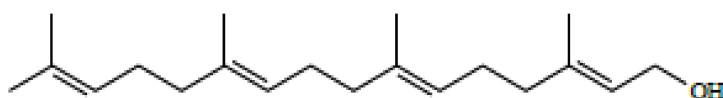
sugerem que os vouacapanos (Tabela 1) (Éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila; Éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila e o éster 6 α , 7 β -diidroxi-vouacapano- 17 β - oato de metila) e o diterpeno geranilgeraniol (Figura 4) estejam envolvidos com as propriedades anti-inflamatórias e antinociceptiva do óleo dos frutos de *Pterodonpubescens*(Nunan et al., 1982; Carvalho et al., 1999; Silva et al., 2004, Spindola et.al, 2009).

Tabela 1 – Esqueleto básico de um diterpeno vouacapano com algumas possíveis substituições em (R) radicais.

	Radicais			Composto	Relação m/z	
	R ¹	R ²	R ³			
	OH	OAc	CO ₂ CH ₃	Éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila	404 ^{*A}	1
	OAc	OH	CO ₂ CH ₃	Éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila	404 ^{*B}	2
	OH	OH	CO ₂ CH ₃	Éster 6 α , 7 β -dihidroxivouacapano- 17 β -oato de metila	362	3

A tabela reúne os principais vouacapanos que encontram-se em maior concentração nos frutos da espécie e que serão abordados neste trabalho . OAc = grupo acetóxi ; *A e *B = Isômeros de posição; m/z = relação massa/carga do composto, em análise por espectrometria de massas

Figura 4- Estrutura molecular do diterpeno geranilgeraniol



Quatorze diterpenos furânicos foram identificados e isolados dos frutos do gênero *Pterodon*. O vouacapano, 6 α -7 β -diidroxi-vouacapano-17 β -oato de sódio, foi isolado e sua atividade anti-inflamatória demonstrada através do teste de edema de pata induzido por carragenina (Carvalho, et al., 1999). A atividade antinociceptiva do vouacapano também foi estudada por Duarte e colaboradores (1996), sugerindo uma possível ação catecolaminérgica desse composto.

No intuito de comprovar o uso popular da *Pterodon Pubescens*, Sabino et al. (1999a) avaliaram o extrato hidroalcoólico dos frutos em estudo de artrite induzida por colágeno. Estes autores observaram que após administração oral de doses diárias, uma eficiente redução de danos para o tratamento profilático e curativo da artrite em camundongos. Tais resultados relacionaram a atividade anti-inflamatória do extrato hexânico à presença de terpenos, sugerindo que a atividade estivesse relacionada à inibição da liberação de prostaglandinas e outros mediadores envolvidos no sistema cininas. Assim, forneceram argumentos científicos para o uso popular e posteriores estudos da espécie (Carvalho et al., 1999).

O potencial anti-inflamatório da fração hexânica também foi comprovado em modelo de artrite induzido pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) e em modelo de pleurisia induzido por carragenina. A bioquímica hematológica e histológica indicou decréscimo na glicose, colésterol e níveis de triglicérides e redução do número total de leucócitos e células mononucleares (Hoscheid et al., 2013).

Em testes envolvendo a avaliação antinociceptiva de extratos e frações obtidos dos frutos de *Pterodon pubescens*, novamente foram obtidas correlações positivas entre atividades farmacológicas e presença de compostos diterpênicos. Assim, uma maior atividade antinociceptiva foi verificada em frações com compostos majoritários derivados vouacapanos e não-vouacapanos (Coelho et al., 2005). Ao composto geranilgeraniol foram atribuídas diversas atividades como: antiedematogênica (Silva et al., 2004); antiagregante plaquetária correlacionando à inibição da ciclooxygenase na cascata de coagulação sanguínea (Calixto et al., 2007); atividade tripanossomíada contra *T. cruzi*. (Menna-Barreto et al; 2008).

Dutra et al. (2009) demonstraram a atividade cicatrizante da fração hexânica, obtida das sementes de *P. emarginatus* no tratamento de queimaduras cutâneas em coelhos. Além da fração hexânica, rica no composto ácido 6 α ,7 β - diidroxi-vouacapano-17-

óico, foi demonstrada a ação cicatrizante do óleo essencial, possivelmente atribuída aos compostos biciclogermacreno, trans-cariofileno e α -humuleno. Artigos também relataram efeito antiespasmódico do óleo essencial dos frutos (Leonhardt et al. 2010) e a eficácia analgésica e anti-inflamatória do vouacapano 6 α ,7 β -diidroxi-vouacapan-17 β -óico, isolado do extrato hexânico da *Pterodon marginatus* (Galceran et al., 2011).

Investigando a sub-fração terpênica contendo farnesol, geranilgeraniol e derivados vouacapânicos, Pereira et al. (2012) observaram a indução de apoptose em células humanas de leucemia mielogênica crônica da linhagem K-562. A ação anti-leucêmica foi relacionada à inibição das vias de sinalização das ERKs, NF-kB e c-myc resultando na redução da expressão da ciclina E2 mRNA. A atividade supressora de linfócitos T e B, relacionada à atividade anti-inflamatória do extrato etanólico foram relatadas por Cardoso et al. (2008).

O extrato oleaginoso diclorometânico, testado *in vivo* em protocolos de nocicepção, demonstrou significativa inibição nas duas fases do teste da formalina e efetivamente, inibiu a hiperalgesia mecânica e térmica na dor pós-operatória em modelos animais (Nucci et al., 2012)

Nosso grupo de pesquisa iniciou suas atividades com a espécie *Pterodon pubescens* Benth em 1998. Desde então, realizou investigações fomentando a pesquisa com dados relacionados aos mecanismos da eficácia farmacológica, atividade anticâncer *in vitro*, (Spindola, 2006; Spindola et al., 2009; Spindola et al., 2010), parâmetros de qualidade e reprodutibilidade (Servat et al., 2010; Grando, 2013; Cabral, et al., 2012; Lioret, 2014) além de estudos sobre aspectos toxicológicos (Denny, 2002).

Denny (2002) demonstrou que o óleo de *Pterodon pubescens*, obtido por prensagem dos frutos, apresentou ação anti-inflamatória quando avaliado em modelo de edema de pata e em modelo de edema de orelha em camundongos, incluindo grupos de animais adrenalectomizados, sugerindo que a ação do óleo seria independente da liberação de corticoides endógenos. A ação antinociceptiva foi evidenciada no teste de placa quente, onde o tratamento com óleo dobrou o tempo para reação ao estímulo nociceptivo.

Spindola (2006) avaliou os efeitos do extrato bruto diclorometânico dos frutos em protocolos de atividade antinociceptivas, utilizando os modelos de nocicepção de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e algesia produzida pela

injeção subplantar de formalina, concluindo que o extrato bruto mostrou atividade superior comparada à do óleo extraído por prensagem dos frutos, sugerindo que os compostos com potencial antinociceptivo foram extraídos pelo solvente diclorometano.

Demonstrada a ação do extrato diclorometânico, Spindola (2006) deu continuidade aos estudos com o fracionamento do extrato bruto por cromatografia em coluna filtrante, originando duas frações ativas: 1) fração com os componentes majoritários geranilgeraniol e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano e 2) fração livre do composto vouacapanico. Ambas apresentaram efeitos antinociceptivos, no entanto quando comparadas ao extrato bruto de origem demonstraram menor eficácia, o que sugeriu uma possível atividade sinérgica entre os compostos (Spindola, 2010a). Os mecanismos da ação antinociceptiva dos compostos geranilgeraniol e éster 6 α ,7 β -diidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila foram relacionados aos sistemas serotoninérgicos e imidazólicos (Spindola et al., 2010 b)

Os fracionamentos foram biomonitorados em teste *in vitro* antiproliferativo em cultura de células tumorais onde os compostos éster 6 α ,7 β -diidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano, e 6 α ,7 β -diidroxi-vouacapano-17 β -metilenol demonstraram atividade citocida com grande seletividade e concentração dependente, para linhagem de tumor humano de próstata (PC-3) (Spindola et al., 2009).

Servat (2010), dando continuidade às pesquisas com a espécie, realizou estudos de estabilidade do extrato bruto diclorometânico e frações ativas, ambas submetidas a estudos de microencapsulação, e concomitantemente verificou a eficácia farmacológica. Ao longo do trabalho, constatou que o extrato bruto diclorometânico microencapsulado reproduziu sua atividade farmacológica com maior potência quando comparado ao extrato livre. O estudo de estabilidade foi realizado de acordo com os protocolos preconizados pela ANVISA. Foram avaliadas as amostras livres e microencapsuladas no tempo 0 e após 180 dias de exposição contínua à condições de temperatura e umidade desfavoráveis. No mesmo trabalho, foram isolados e avaliados dois vouacapanos, isômeros de posição, éster-6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila (Compostos 1 e 2 da Tabela 1).

Baseando-se no uso popular da espécie e procurando mimetizar as condições para validação de seu uso etnofarmacológico, Grando (2012) investigou eficácia

antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso, corroborando com seu uso popular. Os resultados obtidos com o extrato aquoso apresentaram menor intensidade quando comparado ao extrato diclorometano, que também foi avaliado em modelo de artrite induzida por CFA demonstrando eficácia inespecífica, atuando em diferentes vias da doença simultaneamente.

Lioret, (2014), avaliou parâmetros relacionados à padronização do insumo vegetal estudando o efeito do calor sobre o processo de formação e degradação dos componentes vouacapanos nos frutos e sua influência sobre a atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais de próstata (PC-03). Neste estudo, sugeriu-se a participação do diterpeno acíclico geranilgeraniol como possível precursor da formação dos demais vouacapanos após observar o aumento dos teores de vouacapanos aliado ao decréscimo do geranilgeraniol.

No intuito de avaliar qualidade, facilitar certificação e o controle de qualidade, Cabral et al. (2012) desenvolveram metodologias de impressão digital simples, rápidas e eficientes para caracterizar amostras aplicáveis ao controle de qualidade e certificação de autenticidade e origem da espécie.

Além do conhecimento etnofarmacológico, comprovação de eficácia farmacológica da espécie *Pterodon pubescens* e do investimento em métodos que certificassem a qualidade e reprodutibilidade, tornou-se imprescindível estudos sobre a segurança e toxicidade da mesma, evitando assim, possíveis danos à saúde de quem faz uso dessa espécie vegetal.

2.2.2. Relatos de estudos de toxicidade

Os primeiros dados sobre a toxicidade da espécie foram publicados por Sabino et al. (1999a) que realizaram estudo de toxicidade subaguda do extrato etanólico dos frutos de *Pterodon pubescens* em camundongos com artrite induzida por colágeno. Neste estudo o extrato reduziu o índice de artrite sem provocar nenhum efeito tóxico. Posteriormente esses dados foram confirmados por Coelho et al. (2001)

Estudos de citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico e mutagenicidade em cepa de bactéria *Salmonella*, realizados com o óleo do fruto de *Pterodon*

pubescens por Sabino et al. (1999b) forneceram dados comprobatórios para classificar o óleo do fruto da espécie como não citotóxico, não-mutagênico e sem potencial de toxicidade aguda, considerando que as doses utilizadas nos estudos foram substancialmente superiores às doses utilizadas empiricamente pela população.

Em ensaio toxicológico realizado com o óleo dos frutos, Denny (2002) observou que ratos tratados pela via subcutânea, por 14 dias, na dose 30 mg/kg, não apresentaram alterações no ganho de peso. Já nas doses de 100 e 300 mg/kg observou-se redução no ganho de peso de 50 e 75% respectivamente. Na dose de 300 mg/kg foram observadas ainda gastrite, discreta nefrite intersticial e vacuolização de hepatócitos. Efeitos adversos como estes, são também observados com o uso de anti-inflamatórios não ésteroidais, que por inibição da síntese de prostaglandinas podem ocasionar danos graves, hipótese que corrobora com dados já descritos por Calixto et al., (2007).

Além de investigar o potencial farmacológico de *Pterodon pubescens*, Spindola (2006) submeteu o extrato bruto diclorometânico ateste hipocrático, modelo que permite observar a toxicidade aguda e possíveis mudanças comportamentais. Os tratamentos, por via intraperitoneal, nas doses 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, não demonstraram alterações significativas nas características gerais dos animais, quando observados por um período de três horas.

De acordo com Assunção et.al. (2015), que investigaram o potencial mutagênico *in vivo* com o óleo dos frutos da *Pterodon emarginatus*, não foram observados efeitos significativos sobre a frequência e eritrócitos micronucleados, sugerindo não haver potencial atividade citotóxica e mutagênica.

2.3. Plantas medicinais e diretrizes que norteiam seus estudos

A crença de que o “natural não faz mal” e que plantas medicinais ou produtos fitoterápicos sejam isentos de riscos à saúde, faz parte da bagagem cultural da nossa população. Porém o potencial tóxico, a diversidade de respostas fisiológicas para cada indivíduo, a possibilidade de contaminação, como o desvio de qualidade de produtos, constituem fatores de risco que induzem a ocorrência de reações adversas, intoxicações e

outras complicações decorrentes do uso indiscriminado e deficiente de informações (Lanini, et al.; 2009).

Esta preocupação se acentua ainda mais quando se constata que as mais variadas espécies de plantas, consideradas medicinais, são comercializadas livremente em mercados populares ou pela internet com apelos de cura para quase todos os males (Bochner et al., 2012).

Assim como em diversos lugares do mundo, no Brasil, os cuidados primários da saúde estão muitas vezes associados ao uso de plantas medicinais, especialmente para a população que se depara com dificuldades em encontrar ou mesmo adquirir medicamentos convencionais e prescritos eticamente (Carvalho et al., 2011).

Desde 2006, o Ministério da Saúde do governo brasileiro definiu políticas nacionais sobre o uso de medicamentos à base de plantas na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (MS, 2015) e na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (MS, 2006). Estes documentos, juntamente com as diretrizes continuamente revisadas pelos órgãos fiscalizadores, incentivaram a investigação sobre o desenvolvimento de medicamentos à base de produtos naturais além de criar um apelo para a proteção da biodiversidade e promover um maior acesso a tratamentos seguros e eficazes (Carvalho et al., 2011). Além disso, levaram à inclusão de plantas medicinais para o Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) que passou a prescrevê-las com base em dados etnofarmacológicos (ANVISA, 2011).

No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pelo registro de medicamentos e pela fiscalização das empresas que os produzem. Esta agência realiza o controle sanitário dos produtos, e normatiza desde a sua produção até distribuição, publicidade, consumo e descarte. Embora a ANVISA desenvolva normas regulamentadoras que obrigam as indústrias farmacêuticas a apresentarem dados sobre a eficácia e segurança dos medicamentos a base de plantas, as informações são escassas e muitas vezes contraditórias e questionáveis. Desta forma, considera-se que não existam dados suficientes que sustentem a correta utilização, tendo como consequência um aumento observável da automedicação irresponsável. (Carvalho et al., 2011).

O crescente consumo de fitoterápicos e produtos obtidos a partir de produtos naturais levantou preocupações sobre a segurança do seu uso. Para que qualquer substância com potencial terapêutico, incluindo as oriundas de produtos naturais, possam ser comercializadas, registradas como medicamento fitoterápico ou mesmo investigadas no âmbito clínico, é necessário cumprir critérios mínimos de investigação não clínica que tenham a capacidade de sugerir seu potencial toxicológico e inferir seus reais riscos à saúde (Carvalho et al., 2009).

Segurança, eficácia e reprodutibilidade são critérios obrigatórios para possibilitar o registro de fitoterápicos em nosso país determinado pela Lei 6.360/76 e pela RDC 26/2014, que tem como principal objetivo estabelecer os requisitos mínimos para o registro e promover a entrada de medicamentos fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade, no mercado brasileiro. Esta resolução está apoiada pela Instrução normativa IN 04/2014 que determina a publicação do guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico.

Para tanto, uma das ferramentas de comprovação é a tradicionalidade de uso, preconizada também pela OMS, permitida no Brasil desde a publicação da RDC nº 17/2000, revogada pela RDC nº 48/2004 e depois pela RDC nº 14/2010. A nova RDC nº 26/2014 que substitui a RDC nº 14/2010, determinou a divisão dos fitoterápicos em dois grupos: medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico. O primeiro deve comprovar sua segurança e eficácia por meio de estudos não clínicos e clínicos podendo apresentar registro simplificado, o segundo cenário comprova a segurança e efetividade através do registro de uso em literatura técnico-científica e poderá apresentar registro simplificado ou notificação (ANVISA, 2014).

Existe ainda o guia para condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos e, embora este não se refira diretamente aos fitoterápicos, trata do assunto que envolve a pesquisa de medicamentos de uma forma ampla, muito detalhada e com argumentação mais concreta e atualizada. O guia foi publicado em Janeiro de 2013 com novas orientações, versando inclusive sobre a possibilidade do pesquisador/instituição comprovar a segurança de medicamentos por outros estudos científicos tecnicamente mais viáveis onde os dados apresentados devem ser avaliados pela ANVISA, além disso, deixa explícito que o uso de métodos alternativos *in*

vitro em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente, são recomendados (ANVISA, 2013)

A elaboração do guia foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMA), e de instituições de interesse na área (ICH, OECD, NCI, OMS), visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional. Além disso, o guia também tem a intenção de racionalizar estudos não clínicos, evitando duplicidades e utilização desnecessária de animais sem que isso possa comprometer a obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da substância a ser testada (ANVISA, 2013; Dutra et al., 2016).

2.4. Estudos de toxicidade para fitoterápicos

O uso de plantas medicinais no alívio de qualquer moléstia é uma prática antiga das atividades humanas. A OMS traz recomendações à difusão dos conhecimentos necessários ao uso das plantas medicinais, que embora sejam popularmente consideradas terapêuticas, frequentemente possuem propriedades tóxicas desconhecidas pela população. Entretanto, a utilização da medicina informal ou popular é bastante difundida no Brasil, onde algumas plantas consideradas medicinais são comercializadas livremente (Bochner et al., 2012).

A toxicidade de uma substância para um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte. Vale lembrar que toda substância, segundo os princípios da toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico e depende das condições de exposição (doses administradas e conseqüentemente o quanto foi absorvido), tempo e frequência de exposição (doses únicas ou repetidas), bem como as vias de administração envolvidas (Barros & Davino, 2014).

Existem dois tipos de efeitos adversos que podem ocorrer quando se trata de plantas medicinais. O efeito adverso intrínseco, relacionado diretamente a toxicidade inerente da espécie, uma dose inadequada (superdosagem) ou mesmo a interação com outras substâncias. O efeito adverso extrínseco está relacionado a erros de identificação da espécie, falta de padronização no preparo, contaminação, substituição e adulteração de plantas (Calixto et al., 2007).

Se por um lado qualquer substância é passível de produzir danos, por outro, o uso alicerçado em conhecimentos prévios, investigações comprobatórias atestando a ausência do perigo, permitem o exercício do uso seguro. Neste cenário, a toxicologia não clínica indica qual o grau de confiança deve ser depositado em um medicamento a ser administrado à espécie humana. Esses estudos devem seguir protocolos oficiais e guardar relação dose-efeito satisfatórios para permitir determinar a relação causa-efeito (Simões, 2010)

A avaliação toxicológica permite determinar a capacidade que uma substância ou extrato, tem de produzir injúrias a um organismo, usando como meios de observação os efeitos provocados, sinais diferenciados de comportamento ou alterações fisiológicas mensuráveis, entre outros. Assim consegue-se determinar o potencial de toxicidade. Uma das formas de proceder à avaliação toxicológica não clínica é através da administração de concentrações ou doses conhecidas de uma amostra avaliadas com células ou animais, podendo ser avaliado efeito de doses agudas, de administrações repetidas, efeitos citotóxicos e até genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos dependendo do tempo de exposição (Túrmina, 2012).

Segundo o órgão de regulamentação sanitária americano *Food and Drug Administration* (FDA), os principais objetivos da avaliação da segurança nos ensaios não clínicos são :caracterizar os efeitos tóxicos relacionados ao órgão alvo, determinar dose dependência, tempo de exposição, bem como avaliar a possibilidade de reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem.

Os estudos não clínicos para determinação de toxicidade aguda são conduzidos com o uso de animais roedores, sendo as espécies mais utilizadas os camundongos e os ratos. Normalmente utilizam-se fêmeas devido a maior sensibilidade relatada em relação aos machos. No entanto, se o conhecimento prévio das propriedades farmacológicas e/ou toxicológicas da substância indica a necessidade do uso dos machos, estes então devem ser utilizados (ANVISA, 2013; Barros & Davino, 2014).

2.4.1. Estudos de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ANVISA, 2013).

Trata-se de uma etapa inicial para a avaliação do perfil toxicológico de uma amostra, dando indicações dos efeitos produzidos quando doses excessivas são administradas, bem como sugerindo o mecanismo de toxicidade envolvido. O método de avaliação e classificação de toxicidade aguda é estabelecido em protocolos estabelecidos pela Organização para Cooperação e desenvolvimento da Economia (OECD) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), permitindo observar a toxicidade aguda através de verificações das alterações comportamentais e biométricas (OECD, 2001; ANVISA, 2013).

Esses estudos caracterizam a relação dose-resposta que por meio de probabilidades estatísticas, sugeridas em documentos protocolares como OECD-420 e OECD-423, que propõem administração de doses fixas, permitam estimar a dose que provoque o óbito de 50% da população testada (DL_{50}).

A toxicidade sistêmica pode ser identificada através da diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração (Cunha et al., 2009), além de sinais comportamentais como prostração, apatia e a presença de pelos eriçados. Segundo Lapa et al. (2010), a toxicidade sistêmica também pode ser identificada por meio das alterações relacionadas a massa relativa dos órgãos, sendo importante para a avaliação da toxicidade de uma determinada substância nociva ao organismo.

2.4.2. Estudos de toxicidade com doses repetidas

Os estudos de toxicidade de doses repetidas permitem caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida diariamente. A partir deles é possível obter informações sobre os efeitos tóxicos, fisiológicos, hematológicos, bioquímicos, anátomo e histopatológicos, além de informações sobre a indicação do menor nível de dose com observação de efeito tóxico (LOAEL) e o nível de dose sem observação de efeito tóxico (NOAEL). Este ensaio apresenta informações acerca dos efeitos tóxicos principais, indicando

órgãos-alvo e possibilidade de acúmulo no organismo, além de prover uma estimativa dos níveis de doses que poderão ser empregados em futuros estudos clínicos (OECD, 1998b; ANVISA, 2013)

A duração destes estudos é de no mínimo 90 dias e caracteriza um dos principais e mais importantes estudos realizados para avaliação toxicológica, pois permite coletar um grande volume de informações que podem classificar com grandes certezas o perfil da amostra (Barros & Davino, 2014), além de possibilitar a descoberta de novas potencialidades do medicamento, corrigir problemas de efeitos colaterais e toxicidade (Lima et al., 2014)

Esses estudos utilizam informações prévias, coletadas a partir dos testes de toxicidade de doses agudas. A maior dose utilizada para administração diária aos animais deve ser a menor dose que tenha exibido sinais leves de toxicidade no teste anterior. Também pode ser determinante a observação de efeitos tóxicos levando a necessidade de adequar via de administração, doses, tempo de exposição ou análises complementares (OECD, 1998 b; Lima et al., 2014).

2.4.3. Estudos de Toxicidade genética

Os estudos dos processos pelos quais as células sofrem mutações, tanto espontaneamente como por agentes exógenos, datam do início do séc. XX. Mesmo antes da descrição da estrutura do DNA, já existiam evidências que os agentes químicos, físicos e biológicos interagem com o material genético, resultando em mutações (Araldi, et al., 2015). Existem três tipos de mutações: as mutações gênicas, aberrações cromossômicas estruturais e aberrações cromossômicas numéricas. Essas mutações estão intimamente relacionadas com doenças como as neoplasias, além da participação em abortos, nascimentos de pessoas com anormalidades estruturais, fisiológicas e mentais (Ribeiro, et al., 2003).

O genoma humano está constantemente exposto a agentes que podem danificar o material genético. Segundo Hoeijmakers (2001), três categorias principais de agentes ou mecanismos podem induzir danos ao DNA, sendo elas: radiação ultravioleta, produtos de metabolismo fisiológico e agentes químicos com capacidade de ligar-se às bases do DNA, podendo provocar desintegração deste sob condições fisiológicas. O dano genético é causa

inicial das mutações, evento crucial para o aparecimento de carcinomas e outros problemas, sendo que o principal método para resolução do mesmo é a prevenção (Barros & Davino, 2014).

A indução de mutação gênica é uma das consequências da exposição humana a agentes genotóxicos que são importantes biomarcadores detectáveis de muitas alterações possíveis no DNA, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparação das quebras nas cadeias (Liao et al., 2009).

As lesões primárias configuram as quebras nas cadeias duplas do DNA e tornam-se fundamentais para a formação de aberrações cromossômicas que podem ser induzidas, ou podem ocorrer espontaneamente, sendo que falhas nos mecanismos de reparação levam, na maioria das vezes, à reunião não homóloga do DNA lesado, causando tais aberrações (Ribeiro, et al., 2003).

Estudos dos mecanismos de reparo de DNA pode auxiliar a compreender como agentes genotóxicos tornam-se mutagênicos, e como podemos identificá-los, de modo a reduzir os riscos associados a eles (Maciel et al., 2002). Testes para detecção de um potencial efeito genotóxico de uma amostra podem ser realizados *in vitro* e *in vivo* sendo designados para a detecção de compostos que induzem dano genético, como quebra da fita de DNA, mutação genética, quebra cromossomal e alteração na capacidade de reparo de DNA (Ribeiro et al., 2003).

Entre os testes de toxicidade genética disponíveis, os testes do cometa e de indução de micronúcleos, são reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar quebras de DNA, que podem ser considerados marcas de mutagenicidade. A associação de ambos os testes é a melhor opção para avaliar o potencial mutagênico, já que são altamente sensíveis, simples e permitem detectar rupturas em níveis cromáticos e cromossômicos, respectivamente (Araldi, et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar a toxicidade não clínica de produtos oriundos dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth, disponibilizando à sociedade e à comunidade científica, dados sobre os riscos associados ao uso.

Os objetivos específicos:

- Extrair e fracionar o extrato bruto diclorometânico obtido dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth.
- Avaliar a toxicidade aguda do EBD e vouacapanos isolados para eleger o melhor representante a fim de verificar a toxicidade em protocolos de doses repetidas
- Avaliar a toxicidade com doses repetidas do EBD e do vouacapano *m/z*404 por administração via oral em roedores, tendo como parâmetros análises ponderais, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas.
- Avaliar o potencial genotóxico do EBD e do composto *m/z*404 em protocolo de indução de cometas *in vitro* em células não tumorais CHO-K1.
- Avaliar o potencial mutagênico do EBD e do composto *m/z*404 em protocolo de indução de micronúcleos *in vitro* em células não tumorais CHO-K1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estudos fitoquímicos

Os estudos fitoquímicos foram realizados nas dependências do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP), na Divisão de Química de Produtos Naturais (DQPN), sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Mary Ann Foglio.

4.1.1. Material vegetal

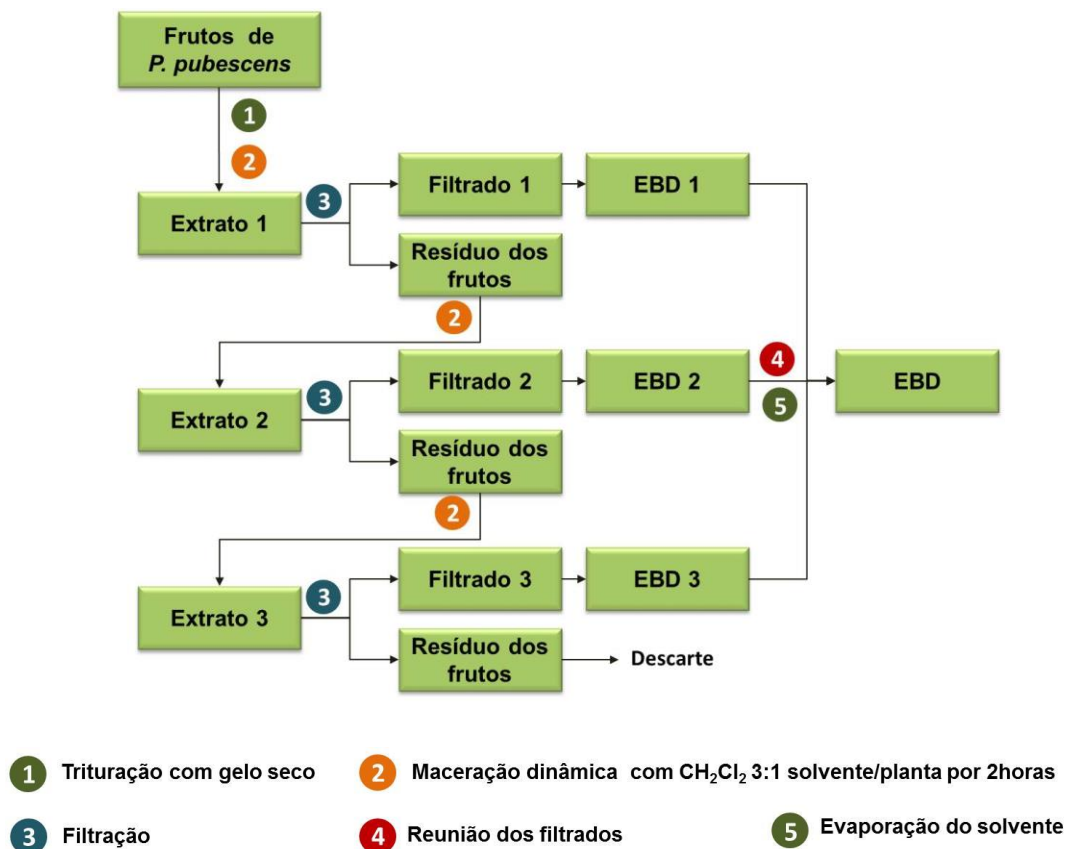
Os frutos de *Pterodon pubescens* Benth, foram coletados na cidade de Ponto Chique – MG (16º 37' 51'' S, 45º 3' 57'' W) no mês de setembro de 2011 e identificados pelo Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do departamento de Botânica do Instituto de Biologia (IB-UNICAMP). As exsiccatas foram depositadas no Herbário do IB-UNICAMP sob número 1398 - 1402. O acesso ao patrimônio genético (CGEN) foi autorizado conforme processo 010495/2012-6 e número de protocolo 0180220438370291.

4.1.2. Preparação do extrato bruto vegetal

Devido às características adesivas e untuosas do óleo presente nos frutos de *Pterodon pubescens* e visando um maior rendimento da extração, estes foram limpos e triturados com auxílio de gelo seco em liquidificador industrial Poli LS-06 e posteriormente submetidos à extração com diclorometano por maceração dinâmica (Figura 5).

Primeiramente realizou-se a extração em escala laboratorial com uma amostra (m = 100 g) de frutos triturados, que foram submetidos à extração por maceração dinâmica a frio com o solvente diclorometano na proporção de 3:1 de solvente/planta submetidos à agitação mecânica orbital pelo período de 2 horas. Após esse período o solvente foi filtrado utilizando vácuo, fornecendo a fração orgânica. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e posteriormente as três frações orgânicas foram reunidas, eliminando o solvente utilizando vácuo em sistema de evaporação rotativo Buchi RE 120 à temperatura média de 40 °C fornecendo o extrato bruto.

Figura 5: Fluxograma das etapas do processo de obtenção do EBD pelo método de maceração dinâmica.



Fonte: arquivo pessoal

Posteriormente, para garantir que todos os testes utilizassem o mesmo lote de extrato bruto, bem como permitir o isolamento de compostos em maior quantidade, realizou-se a extração em escala piloto (Figura 6), com 1 kg de frutos triturados em condições descritas anteriormente e extração deste com diclorometano em tanque de 8 litros na proporção de 3:1 (solvente/planta) com auxílio de agitador pneumático. Foram realizadas três renovações do solvente após 2 horas de agitação. O extrato obtido foi filtrado com o auxílio de funil de Büchner, o solvente evaporado utilizando vácuo em sistema de evaporação rotativo Buchi RE 120® à temperatura média de 40 °C, conforme esquema(Figura 5).

O EBD resultante foi seco em estufa a 30°C, sob vácuo, até total evaporação do solvente residual.

Figura 6: Obtenção do EBD em equipamentos da planta piloto.



Fonte: arquivo pessoal

4.1.3. Fracionamento, isolamento e identificação de compostos

4.1.3.1. Cromatografia de camada delgada

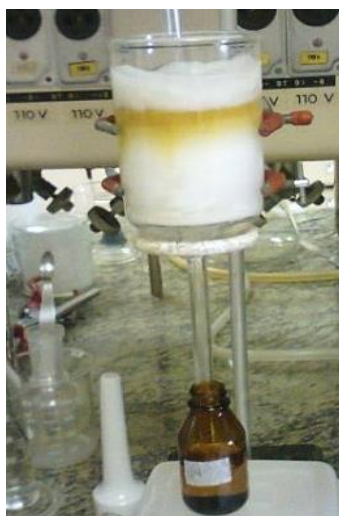
As análises qualitativas (monitoramento do extrato bruto e das frações) foram realizados por cromatografia decamada delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio de 20 cm x 20 cm com fase estacionária de sílica (cromatofolha–alumínio CCF-C/25, Merck®) com pontos de aplicação a 1 cm da margem inferior da placa. Como fase móvel foi utilizada a mistura de acetato de etila/hexano na proporção 60:40. As cromatofolhas foram observadas sob incidência de luz UV, a 254 e 366nm e posteriormente reveladas por pulverização com solução de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5), seguida de aquecimento em estufa a 100 °C, durante 5 minutos. Foram utilizados reagentes e solventes P.A.

4.1.3.2. Cromatografia em coluna filtrante

A cromatografia em coluna filtrante foi realizada conforme ilustrado na Figura 7, utilizando-se um funil de placa porosa, preenchido com Sílicagel 60[®] (Merck[®] 0,063 – 0,200 mm) na proporção amostra/fase estacionária (1:10). O preenchimento do funil com a sílica gel e sua compactação foram realizados com o auxílio de um sistema a vácuo. O preparo da

amostra foi composta por uma mistura de terra diatomácea e extrato na proporção de 1:1. A coluna foi eluída com gradientes hexano/acetato de etila, conforme Tabela 2, sendo o volume de eluente utilizado equivalente ao volume ocupado pela sílica gel no funil. As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas e as que continham vouacapanos refracionadas em cromatografia de coluna clássica.

Figura 7: Imagem do sistema de cromatografia em coluna filtrante



Fonte: arquivo pessoal

4.1.3.3. Cromatografia em coluna clássica

As cromatografias em coluna clássica foram efetuadas em suporte de vidro contendo Silicagel 60[®] (Merck[®], 0,063- 0,200 mm) e sua compactação foi realizada com auxílio de vácuo. Utilizou-se a proporção de 1:30 (amostra: fase estacionária) para a montagem da coluna. A amostra foi composta por uma mistura de terra diatomácea e extrato na proporção de 1:1. A coluna foi eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, conforme Tabela 2 e foram coletadas frações a cada 100mL, monitoradas por CCD, até completa eluição dos componentes (Figura 8).

Figura 8: Imagem do sistema de cromatografia em coluna clássica

Fonte: Laboratório da Divisão de Produtos Naturais, CPQBA, 2014

Tabela 2: Gradiente de concentração das misturas de solventes utilizados como fase móvel para eluir as colunas cromatográficas.

Solvente	% Mistura											
Hexano	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0	-
Acetato de Etila	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

4.1.3.4. Análise dos constituintes químicos por CG-EM

As frações e os vouacapanos isolados foram diluídas em 1 mL de acetato de etila, na concentração de 30mg/mL e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a detector de massas (GC Hewlett Packard 5890®, série II), diretamente acoplado a um detector seletivo de massa (Hewlett Packard 5970®), equipado com uma coluna de sílica fundida (WCOT, 30 m x 0.25 mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250 °C, temperatura do detector: 300 °C, programa de temperatura: 40 (2min)-240 °C, 5 °C/min, 240-300 °C, 10 °C/min, com ou sem razão de split 1:100, gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min.

4.2. Estudos *in vivo*

Para execução dos testes *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar (HanUnib:WH) machos e fêmeas e camundongos *Swiss* (Unib:SW) fêmeas, com idade inicial de aproximadamente oito semanas. Os animais, oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, foram mantidos em gaiolas identificadas em sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C, 12h luz/escuro) e aclimatados em laboratório por um período mínimo de sete dias antes do início dos estudos.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo COBEA – Colégio Brasileiro de experimentação animal e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEEa) sob nº3727-1 supervisionadas pela médica veterinária Dra. Karin Maia Monteiro.

4.2.1. Análises toxicológicas em modelos *in vivo*

4.2.1.1. Toxicidade aguda oral

Para avaliação e classificação de Toxicidade Aguda adotou-seo método estabelecido pela OECD 423, que utiliza três animais, preferencialmente fêmeas, por dose testada, conforme o roteiro proposto pelo fluxograma do próprio protocolo (Figura 9). A dose de partida foi selecionada a partir de níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000mg/kg de peso corporal, considerando a dose inicial para cada amostra, a mais provável para produzir toxicidade.

Grupos de camundongos *Swiss* fêmeas (n=3) foram submetidos a jejum de 9 horas e posteriormente tratados com amostras-teste por via oral, iniciando na dose de 300 mg/kg. Imediatamente após a administração, os animais ficaram em observação para constatação de alterações fisiológicas e comportamentais. Foram avaliados clinicamente (observação de possíveis sinais de injúria – Tabela3) por seis horas para determinação dos efeitos agudos ou letalidade. Posteriormente, foram avaliados diariamente pelo período de 15 dias.

4.2.1.2. Teste do campo aberto (*Open field*)

Para o teste, empregou-se a metodologia de Santos et al. (2005), com adaptações. O protocolo foi adotado como um meio de auxiliar a observação dos parâmetros de ambulação, indicativo de estímulo ou sedação nos animais. Portanto grupos de 3 camundongos fêmeas (*Swiss*), provenientes do ensaio de toxicidade aguda, após 60 min do tratamento pela via oral com veículo NaCl 0,9%, EBD e vouacapanos (nas doses citadas no teste de toxicidade), foram colocados no centro do aparato e o número de áreas percorridas durante um período de 5 minutos foi considerado indicativo de locomoção. O registro dos campos percorridos foi realizado presencialmente pelo pesquisador e comparados a um grupo satélite.

O aparato consiste em uma caixa plástica medindo 45 x 45 x 20 cm, com a parte interna dividida em 9 quadrantes de 15 x 15 cm (Figura 10). O teste avalia a atividade exploratória dos animais através dos parâmetros de movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo).

Figura 10:Foto do aparato (campo aberto) utilizado para avaliação de atividade exploratória de camundongos



Fonte: Servat, 2010

4.2.1.3. Toxicidade com doses repetidas em roedores

Os estudos de toxicidade de doses repetidas tem como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância. O estudo foi realizado segundo o guia OECD 408 após avaliação da toxicidade aguda. O protocolo experimental permite evidenciar efeitos adversos ainda não observados e que podem ser usados na seleção de doses para estudos de doses repetidas e para estabelecer critérios de segurança para a exposição humana.

Para a avaliação da toxicidade do EBD, ratos Wistar $n=20$ por dose (10 fêmeas e 10 machos) foram separados em grupos e acondicionados em gaiolas a cada 5 animais. Machos e fêmeas permaneceram em salas distintas. Os grupos amostra foram tratados pela via oral com EBD nas doses 50, 100 e 500 mg/kg, os grupos veículo receberam solução salina acrescida do tensoativo utilizado no preparo da amostra (NaCl 0,9% + 1% de Tween 80[®]) no volume de 2mL/kg de peso corpóreo e grupo satélite (grupo não tratado que reflete as condições do ambiente de teste).

Para a avaliação de toxicidade dos isômeros vouacapano m/z 404, utilizou-se camundongos *Swiss* fêmeas $n=10$ por grupo, separados em gaiolas a cada 10 animais, tratados pela via oral com amostra nas doses 30, 100 e 300 mg/kg, veículo (Solução NaCl 0,9% + 1% de Tween 80[®]) e grupo satélite (não tratado).

Em ambos os testes os animais receberam tratamento com as amostras pela via oral diariamente por um período de 110 dias. No momento da administração, bem como após 1 hora, os mesmos foram avaliados clinicamente buscando a detecção de possíveis sinais de toxicidade.

Os principais parâmetros observados ao longo do experimento foram:

- Consumo de ração: Avaliado a cada três dias para cada gaiola com a pesagem da ração residual e reposição da mesma;
- Acompanhamento de ganho de peso dos animais uma vez na semana;
- Sinais clínicos de toxicidade por observação diária;
- Hemograma completo ao final do teste;
- Análises bioquímicas do sangue avaliação das para funções hepáticas, renais, e outras análises complementares (Tabela 4);

- Análises anatomopatológicas e histopatológicas de todos os órgãos coletados ao final do teste, após eutanásia e analisados pelo médico patologista Dr. Paulo Newton Danzi Salvia.

A) Preparo das amostras – EBD e *m/z* 404

Visando maior homogeneidade no momento da administração das amostras e no intuito de garantir a dose correta para cada animal testado, as amostras foram preparadas da seguinte maneira:

O EBD utilizado ao longo de todo o teste foi obtido em uma única extração, conforme descrito no item 3.1.2. Por se tratar de um material oleoso, de baixa hidrossolubilidade e alta viscosidade, foi emulsificado com Tween 80® (tensoativo não-iônico) na proporção de 1% em veículo NaCl 0,9%. As amostras foram preparadas apenas no momento da administração, garantindo a preservação do EBD.

Os compostos vouacapanos isolados, devido a sua baixa hidrossolubilidade, foram levigados em 1% Tween 80® e suspensos em veículo NaCl 0,9%.

B) Condições de experimentação

Algumas condições de experimentação foram adotadas para minimizar o estresse dos animais, diminuir interferências nos testes e contemplar as normas para assegurar os princípios éticos na experimentação animal.

- Apenas dois pesquisadores, um principal e outro auxiliar, realizaram as administrações das amostras, manipulação dos animais e as trocas de gaiolas, bem como a higienização das mesmas;
- Os animais foram removidos de suas respectivas salas de manutenção apenas duas vezes na semana, momento em que se realizava a pesagem dos mesmos;
- As administrações das amostras, pela via oral, foram executadas com auxílio de cânulas plásticas, adaptadas com sonda uretral humana infantil, fabricado em polivinila. Esta ação visou reduzir a possibilidade de estresse mecânico na mucosa gastroesofágica;

- As administrações das amostras foram realizadas respeitando sempre o mesmo horário em que os animais comiam menos (uma hora antes das luzes acenderem);
- Diariamente, no momento da administração das amostras, as gaiolas com os animais foram alternadas de posição nas prateleiras, garantindo que ao longo do teste todos os animais estivessem expostos às mesmas condições de luminosidade, altura e fluxo de ventilação;
- Esferas de vidro ou plástico foram escondidas na maravalha, de forma a enriquecer o ambiente nas gaiolas.

C) Análises hematológicas e bioquímicas

Ao final do 110º dia, antes de proceder à eutanásia dos animais, realizou-se a coleta sanguínea utilizando como via de acesso o plexo retro-orbicular. Para a obtenção do soro, amostras de sangue foram coletadas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL (sem a presença de anticoagulante), armazenadas à temperatura ambiente por meia hora e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 2.500 rpm. O soro foi utilizado para realizar as análises bioquímicas descritas na Tabela 4, com exceção das análises Bilirrubina e colesterol, bem como as análises hematológicas e de eletrólitos para as quais se utilizou como analito sangue total coletado em tubo heparinizado e protegido da luz.

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados em equipamento veterinário (Reflotron® Plus – Roche, Macromed) por meio de fitas reativas (Testes Reflotron®); os parâmetros hematológicos obtidos em aparelho (Sysmex, modelo poch-100iV®, EUA) com programa específico para ratos e camundongos e os eletrólitos no equipamento Electrolyte Analyzer 9180- Roche®.

D) Procedimentos histopatológicos

Amostras de tecidos foram coletadas e fixadas em solução de formalina 10%. Posteriormente foram embebidas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram analisados em microscópio óptico, com objetivas de 10x, 20x e 40x.

Tabela 4: Análises realizadas a partir das amostras sanguíneas

	Análise	Unid.	Definição
Hemograma	WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	Contagem total de leucócitos (<i>white blood cell</i>)
	RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	Contagem total de eritrócitos (<i>red blood cell</i>)
	HGB	g/dL	Concentração de hemoglobina
	HCT	%	Hematócrito
	MCV	fL	Volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (<i>mean corpuscular volume</i>)
	MCH	Pg	Hemoglobina celular média (<i>mean corpuscular hemoglobin</i>)
	MCHC	g/dL	Concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados
	PLT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	Plaquetas
Bioquímica	BIL	mg/dL	Bilirrubina
	TGO	U/L	Transaminase oxaloacética (AST-aspartatoaminotransferase)
	TGP	U/L	Aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase)
	γ -GT	U/L	Gama glutamiltransferase
	ALP	U/L	Fosfatase alcalina
	CREA	mg/dL	Creatinina
	UREIA	mg/dL	Ureia
	AU	mg/dL	Ácido úrico
	COL	mg/dL	Colésterol
	TRIG	mg/dL	Triglicerídeos
Eletrólitos	GLIC	mg/dL	Glicose
	Na	mmol/L	Sódio
	K	mmol/L	Potássio
	Ca	mmol/L	Cálcio

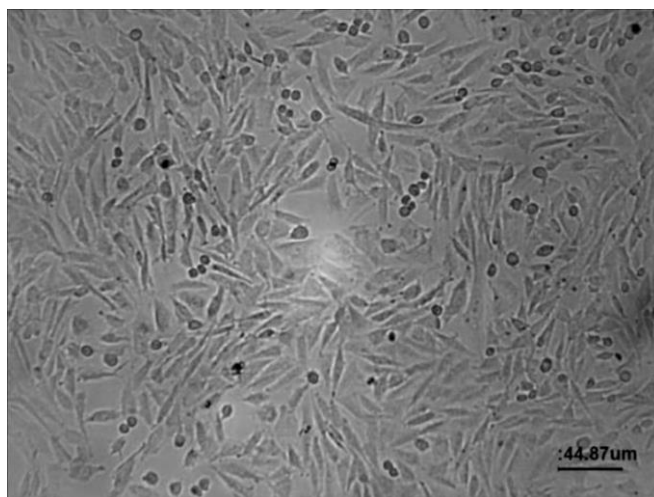
WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos

4.3. Estudos de toxicidade genética *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram realizados nas dependências do CPQBA – UNICAMP, na Divisão de Farmacologia e Toxicologia sob coorientação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e supervisão da Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Tasca G. Ruiz. As etapas de eletroforese e análise dos cometas por microscopia de fluorescência foram realizadas no laboratório de Carotenoides da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP sob supervisão da Profa. Dra. Gláucia M. Pastore.

Os testes *in vitro* foram conduzidos em condições assépticas e ambiente controlado de fluxo laminar biológico para evitar contaminação e garantir a viabilidade celular. Os materiais e reagentes utilizados foram esterilizados de acordo com a natureza de cada um. A linhagem imortalizada CHO-K1 (ATCC CCL-61) (Figura 11), com origem em ovário de hamster chinês, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mário S. Mantovani.

Figura 11 – Fotomicroscopia da linhagem celular CHO-K1, aumento de 100x.



Fonte: Della Torre, 2013

4.3.1. Avaliação da viabilidade celular da CHO-K1 pelo ensaio antiproliferativo

Por meio do teste antiproliferativo foi possível selecionar, dentre as 10 concentrações avaliadas, a maior que garantisse no mínimo 80% de viabilidade celular; sendo posteriormente selecionada para os testes de toxicidade genética com as amostras.

4.3.1.1. Cultivo celular

As células CHO-K1 foram cultivadas em frascos de 25 cm² (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

O desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®), a 37 °C, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

4.3.1.2. Preparo da suspensão celular

No primeiro dia de experimento, a suspensão celular foi preparada com meio RPMI com 5% de SFB, na densidade de inoculação 4x10⁴ células/mL. Foram inoculados 100 µL por compartimento da suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido.

4.3.1.3. Preparo e aplicação das amostras

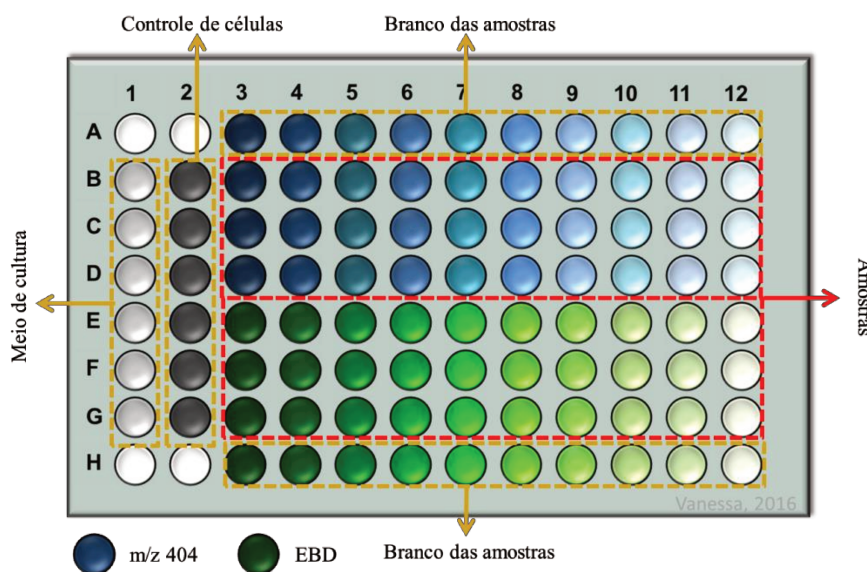
As amostras EBD e composto vouacapano *m/z*404 foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) com 5% de SFB, o que evitou a toxicidade do DMSO. As amostras foram adicionadas nas microplacas em 10 concentrações, sendo elas: 0.48, 0.97, 1.94, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicatas (conforme representado na Figura 12) e na sequência foram incubadas por 4 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido.

Após 24 horas de tratamento, as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% por compartimento e incubadas por uma hora, a 4 °C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para

a remoção dos resíduos de TCA, meio de cultura, soro fetal bovino e metabólitos secundários. Após isso, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados por compartimento 50 μ L do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich®) a 0,4 % (p/v) dissolvido em ácido acético a 1 % (v/v). As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos e depois lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v), com secagem completa à temperatura ambiente. A solubilização do corante ligado às proteínas celulares foi feita com 150 μ L/compartimento de Trizma Base (10 μ M, pH 10,5) (Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

Figura 12: Imagem representativa da placa de 96 compartimentos com as respectivas amostras testadas e seus controles.



Fonte: Arquivo pessoal

4.3.2. Teste alcalino do cometa

O potencial genotóxico foi avaliado com o teste do cometa, também conhecido por *Single-Cell Gel Electrophoresis*, em condições alcalinas, para detecção de danos no DNA de células CHO-K1.

4.3.2.1. Preparo das soluções

Antes de iniciar o teste, todas as soluções (descritas de A – J) foram preparadas, preservadas sob refrigeração a 4 °C. As lâminas de microscopia (limpas) foram preparadas com uma camada de agarose com ponto de fusão normal à temperatura de aproximadamente 60 °C, secas e armazenadas sob refrigeração para posterior utilização.

A) Solução de lise (estoque)

Para 1 litro de solução utilizou-se: 146,1 g de NaCl, 37,2 g de EDTA sal dissódico P.A. (100mM, Synth®) e 1,2 g de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris HCL) (Merck®, C₄H₁₁NO₃). Os reagentes foram misturados e solubilizados em 1 litro de água deionizada. OpH(pH= 10) foi corrigido com NaOH (Synth®). Esta solução foi conservada refrigerada, ao abrigo da luz por no máximo um mês.

B) Solução de lise (uso)

Para 100 mL de solução utilizou-se: 1 mL de Triton 100x® (Merck®) e 10 mL de DMSO (Synth®), completando o volume com a solução lise estoque. Esta solução foi preparada no escuro apenas no momento de uso, e mantida na geladeira até atingir 4 °C.

C) Solução de EDTA (i)

A solução (i) foi preparada utilizando 14,89 g de EDTA em 200 mL de água deionizada. OpH(pH= 10) foi corrigido com HCl. Esta solução foi conservada em temperatura ambiente.

D) Solução de NaOH (ii)

A solução (ii) foi preparada utilizando 200g de NaOH em 500mL de água deionizada. Esta solução foi conservada em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

E) Solução de eletroforese

Foram misturados 5 mL da solução de EDTA (i) com 30 mL de solução de NaOH (ii), completando o volume para 1 L com água deionizada. Ajustou-se o pH = 13.

F) Solução tampão de neutralização

Foram adicionados 48,5 g de Tris (0,4M) em 1 L de água deionizada. Acertou-se o pH = 7,5 utilizando HCl. Conservação em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

G) Solução de coloração (estoque)

Foram adicionados 10 mg de brometo de etídio (Sigma) em 50 mL de água deionizada. A solução foi conservada sob refrigeração e ao abrigo da luz.

H) Solução de coloração (uso)

A solução de coloração estoque foi diluída na proporção de 1 : 10 partes de água deionizada e conservada sob refrigeração e ao abrigo da luz.

I) Agarose de ponto de fusão normal 1% (Merck®)

Foi dispersado 1 g de agarose normal em 100 mL de PBS e posteriormente aquecido com o auxílio de aparelho micro-ondas até completa fusão e homogeneização. Esta solução já diluída foi colocada no banho-maria a 60°C minutos antes do preparo das lâminas.

J) Agarose de baixo ponto de fusão = *Low Melting Point* (LMP) 0,5%

Foram diluídos 0,5 g de LMP em 100 mL de PBS. A solução foi levada a aquecimento em micro-ondas até sua fusão. Esta solução já diluída foi colocada no banho-maria a 37°C minutos antes de sua utilização.

4.3.2.2. Preparo das lâminas de microscopia

Lâminas histológicas de vidro e com extremidade fosca foram colocadas de molho por 4 horas em solução detergente de Extran® 5% e posteriormente higienizadas com auxílio de uma esponja macia exclusiva para esta função. Após este período foram lavadas com água corrente 3 vezes e posteriormente em água destilada 3 vezes, sendo colocadas de molho em álcool etílico 96% por mais 4 horas. Ao final do processo as lâminas foram secas com lenços de papel e armazenadas em laminário ao abrigo de poeira e umidade.

4.3.2.3. Realização do teste

Células CHO-K1 (ovário de hamster chinês) foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 12 compartimentos (1mL/compartimento) e a seguir incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera 5% de CO₂ e ambiente úmido a 37°C.

Posteriormente as células foram expostas às amostras que foram avaliadas em triplicata: MMS (metilsulfonilmetano) 4,7 μ M, agente genotóxico e controle positivo do teste; DMSO (dimetilsulfóxido) 0,03%, veículo de diluição das amostras; EBD (extrato bruto diclorometânico) nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μ g/mL e o vouacapano (*m/z* 404) nas concentrações 0,3, 3 e 30 μ g/mL.

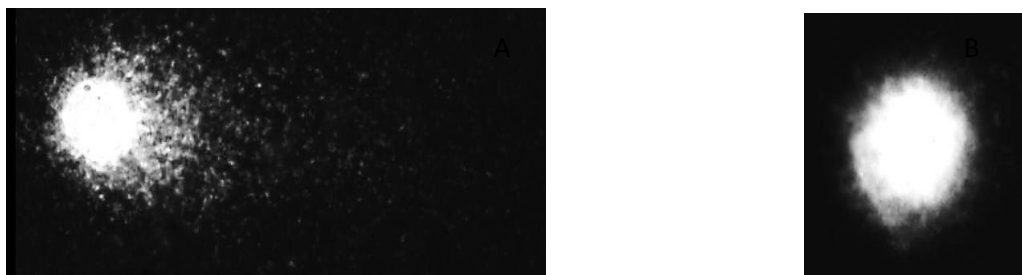
A exposição contemplou o período de 4 horas, após o qual a suspensão celular foi coletada, centrifugada e o precipitado ressuspendido em LMP. Foram então aplicadas sobre as lâminas previamente preparadas e cobertos cuidadosamente com lamínula. Antes de ser usada, aLMP foi diluída 10 vezes em solução de PBS sendo mantida em banho termostatzado a 37 °C ao abrigo de luz branca.

As lâminas, preparadas em triplicata a partir de cada compartimento com células, foram mantidas no refrigerador por 5 minutos; a lamínula foi retirada cuidadosamente e a lâmina mergulhada em solução de lise por 12 horas, utilizando refrigeração e ao abrigo da luz. As lâminas foram submetidas à eletroforese em banho de gelo, mantendo-as a 4°C. Na cuba, a solução tampão de eletroforese a 4°C foi colocada até cobrir as lâminas, que foram deixadas durante 20 minutos em repouso, para que houvesse o relaxamento das moléculas de DNA nas células. Em seguida, a fonte de eletroforese foi regulada com 25 volts e 300 mA, por 25 minutos.

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e mergulhadas em solução de neutralização por 5 minutos, processo repetido três vezes; posteriormente fixadas em etanol 100% e secas a temperatura ambiente.

O DNA possui carga negativa, e se rompido quando exposto à passagem de uma corrente elétrica, migra para fora do núcleo ficando com a aparência de um cometa ou cauda conforme Figura 13a. O DNA que não estiver rompido ou quebrado ficará armazenado no núcleo, sendo muito denso para migrar, conforme ilustrado na Figura 13b (Silva et al., 2003).

Figura 13– Fotomicroscopia de nucleóides de células CHO-K1, após corrida eletroforética em condições alcalinas. Imagem com aumento de 40X.



A- Nucleóide com 63% de fragmentação (Cometa). B - Nucleóide não fragmentado. (Fonte: arquivo pessoal)

4.3.2.4. Coloração das lâminas e análise

Para a coloração foi utilizada a solução de brometo de etídio na concentração de 20µg/mL, gotejando cerca de 50µL por lâmina e cobrindo-a com lamínula de vidro 24mm x 60mm. As lâminas foram coradas somente no momento da leitura e imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência (filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm) com aumento total de 400 vezes, com auxílio do Software Comet Imager® (MetaSystem). Foram analisados 50 cometas em cada lâmina, selecionados de forma aleatória, evitando-se os nucleóides nas extremidades das lâminas. Para análise dos resultados utilizamos os seguintes descritores:

$$\% \text{ DNA na cauda} = \frac{\text{Intensidade de DNA na cauda } (\mu\text{m})}{\text{Intensidade de DNA na célula}} \times 100$$

$$\textit{Tail moment} = \% \text{ DNA na cauda} \times \textit{Tail moment length}^*$$

* (distância mensurada do meio da cabeça até o meio da cauda do cometa)

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância não paramétrica (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para valores de $p < 0,001$.

4.3.3. Teste de indução de micronúcleos

O procedimento utilizado neste trabalho foi executado de acordo com o guia da OECD 487 (2010) e teve suas condições experimentais padronizadas por DellaTorre (2013).

O teste foi conduzido em placa de 6 compartimentos. As células CHO-K1, na densidade de inoculação de 2×10^5 células/compartimento, foram semeadas e incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera 5% de CO₂ e ambiente úmido a 37 °C. Em seguida, iniciou-se o tratamento das células com meio de cultura (RPMI 1640, controle de células), com as soluções de DMSO (0,25% em RPMI 1640), MMS (metilmetanosulfonato, 25 µg/mL em RPMI 1640) e amostras-teste (EBD e compostom/z 404 nas concentrações 30, 3 e 0,3µg/mL). Após 4 horas, o meio de cultura foi aspirado dos compartimentos, seguido da adição de solução de Citocalasina B (Sigma- Aldrich®, 3 µg/mL em RPMI 1640). As culturas retornaram à estufa úmida de CO₂, permanecendo por 20 horas. Ao final do período, iniciaram-se os processos de hipotonia, fixação e preparação das lâminas.

Após o período de incubação por 20 horas, o meio de cultura foi aspirado de todos os compartimentos, as células lavadas em tampão fosfato (pH 7,0) e tripsinizadas com solução de Tripsina/EDTA 0,25% (Vitrocell®). O conteúdo de cada compartimento foi transferido para um tubo cônico, a suspensão celular centrifugada (2000 rpm por 5 minutos) e o precipitado celular ressuspensionado em 5 mL de citrato de sódio 1% (p/v) (Synth®) à temperatura ambiente. Decorridos 5 minutos, 5 mL de fixador (uma mistura de metanol:ácido acético na proporção de 3:1) foi adicionado aos tubos e as suspensões foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos), novamente o precipitado celular foi ressuspensionado em 5mL da solução fixadora por 5 minutos e mais uma vez centrifugados (2000 rpm, 5 minutos). Esta etapa foi repetida por mais 2 vezes.

Concluída a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando-se cerca de 1 mL de fixador para ressuspender as células. A suspensão celular foi gotejada em três lâminas de vidro, que foram mantidas sob atmosfera a 65°C (ponto de evaporação do metanol) sobre banho termostaticado por 3 minutos. As lâminas secaram à temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa (Dinâmica®) a 5% em água deionizada, por 15 minutos. Após rápida lavagem em água destilada e secagem das mesmas, iniciou-se a análise em microscópio óptico com objetiva de 40x.

4.3.3.1. Análise dos resultados

Todas as lâminas foram analisadas por microscopia óptica e de cada tratamento foram contadas no mínimo 2000 células, sendo pelo menos 1000 células em cada cultura. Nessa população foi contada a incidência de células binucleadas com 1, 2 ou 3 micronúcleos. Além disso, foram contadas também a quantidade de células mononucleadas e multinucleadas. Com esses valores experimentais, calculou-se o índice de proliferação pós-bloqueio da citocinese (CBPI do inglês, *Cytokinesis-Block Proliferation Index*), o índice de replicação (RI do inglês, *Replication Index*), ambos para inferir a citotoxicidade das amostras, e a frequência (porcentagem) de micronúcleos, segundo as fórmulas descritas pela OECD 487 (2010):

$$\text{CBPI} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ mononucleadas} + 2 (\text{n}^\circ \text{ binucleadas}) + 3 (\text{multinucleadas}))}{\text{n}^\circ \text{ total de células}}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{n}^\circ \text{ binucleadas} + 2 (\text{n}^\circ \text{ multinucleadas}))/(\text{n}^\circ \text{ total de células da cultura}))}{((\text{n}^\circ \text{ binucleadas} + 2 (\text{n}^\circ \text{ multinucleadas}))/(\text{n}^\circ \text{ total de células do controle}))} * 100$$

$$\% \text{ frequência de micronúcleos} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de MN}}{\text{total de células binucleadas}} * 100$$

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p \leq 0,05$ para que seja considerada diferença significativa entre os grupos, seguida de Teste de Tukey.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Segundo os princípios da toxicologia, toda substância pode se comportar como um agente tóxico dependendo das condições de exposição, frequência de exposição e vias de administração. De acordo com o último relatório do SINITOX, em 2012 foram registrados 102.822 casos de intoxicações exógenas no Brasil sendo que destes, 27% correspondiam a intoxicação por medicamentos (SINITOX, 2015).

Muitos fitoterápicos são utilizados sem o acompanhamento médico, assim como inúmeros produtos naturais encontrados em mercados populares ou obtidos por extrativismo também são objeto de uso irresponsável ou alheio a qualquer orientação profissional. Desses produtos, quase que a totalidade não tem seu perfil toxicológico determinado (Veiga-Junior, 2005).

As plantas medicinais produzem metabólitos secundários como recurso para atender às necessidades da espécie no habitat, viabilizar a comunicação da mesma através da produção de feromônios, além de produzir componentes para defesa contra seus predadores. Estes componentes, pelos mesmos motivos, podem provocar reações diversas nos humanos (Barros & Davino, 2014; Veiga-Junior et al., 2005).

5.1. Estudos fitoquímicos

Algumas variáveis que podem afetar o produto de extração são: o estado de divisão da droga, pois quanto menor o tamanho da partícula maior a superfície de contato com o líquido extrator e a natureza do solvente extrator, quanto mais solúveis forem as substâncias ativas no líquido extrator mais ágil será o processo. Outro aspecto refere-se à temperatura utilizada no processo de extração que está relacionada com o aumento da solubilidade das substâncias no líquido extrator. Para estudos com plantas medicinais, a escolha correta do processo de extração é uma etapa fundamental, sendo necessários a associação adequada entre método e o líquido extrator para que os compostos de interesse sejam preservados e totalmente extraídos. O processo de maceração, realizado sob agitação mecânica e sem o uso de temperaturas altas, minimiza o tempo de contato da amostra com o solvente e a influência do aquecimento em compostos termolábeis (Simões et al., 2010). A obtenção do extrato diclorometânico em escala piloto foi padronizada por Servat (2010).

Grando (2013) demonstrou que o extrato bruto diclorometânico, comparado ao extrato aquoso, foi mais potente quando testado em modelos de nocicepção e inflamação. Sugeriu ainda que a atividade poderia estar relacionada com a presença do geranilgeraniol presente no extrato diclorometânico.

Os frutos foram extraídos conforme fluxograma (Figura 5) e forneceram 42,7% de extrato bruto diclorometano (EBD) considerando a relação da massa total de frutos triturados.

O EBD foi submetido a fracionamento através do sistema de cromatografia em coluna filtrante, fornecendo 32 amostras que posteriormente foram reunidas em sete grupos (F-A → F-G) de acordo com o perfil cromatográfico, monitorado por CCD, conforme demonstrado nas Figuras 14 e 15.

Os compostos marcadores de interesse (m/z 362 e m/z 404), cuja atividade farmacológica foi previamente constatada por Spíndola (2010) e Servat (2010), estavam concentrados nas frações F e G. Com o objetivo de isolá-los para posteriores análises toxicológicas, estas frações foram então reunidas para novo fracionamento. Este processo resultou em 41 novas frações que de acordo com o perfil cromatográfico monitorado por CCD, foram reunidas em seis grupos (P1 – P6).

Figura 14: Esquema simplificado do fracionamento em coluna filtrante, seguido por fracionamento em coluna clássica resultando na obtenção dos compostos vouacapanos.

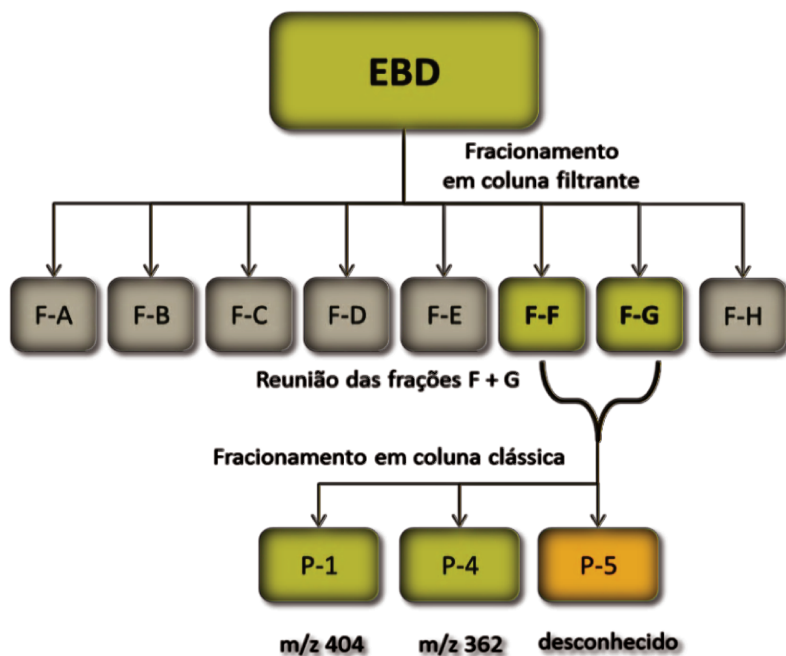
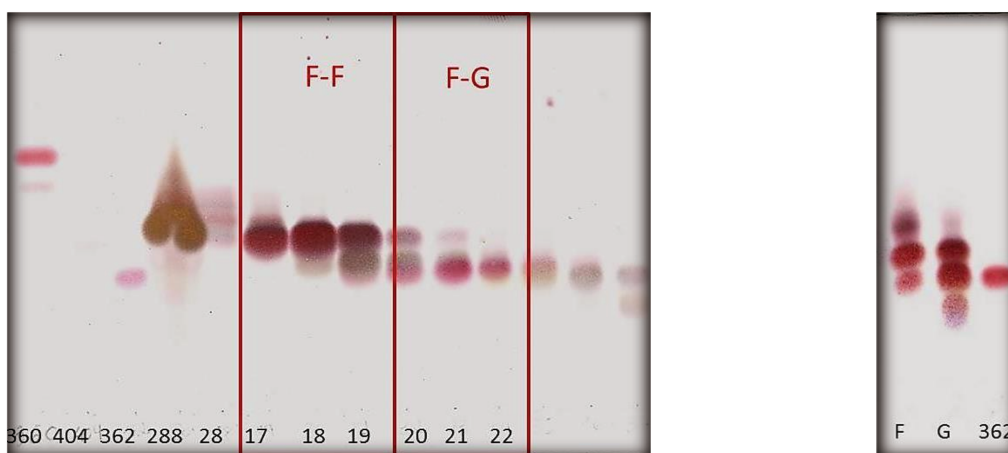


Figura 15: Cromatografia de camada delgada das frações F e G provenientes do fracionamento do EBD.



Fase móvel da CCD – Acetato de etila/Hexano 60:40 , revelador anisaldeído 2% com exposição à temperatura de 150 °C por 1 min. F-F = Fração F , F-G = Fração G, 362 = composto vouacapano m/z 362 (Éster $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapano- 17 β - oato de metila)

Fonte: Arquivo pessoal

Ao eliminar o solvente orgânico das frações P1 (Figura 16), P4 e P5 observou-se a formação de cristais. Estes foram recristalizados e posteriormente caracterizados por análise em CG-EM (Figura 18) em comparação com amostras autênticas, previamente isoladas e identificadas por métodos espectroscópicos.

Figura 16: (A) Cristais obtidos após concentração da fração P1, obtida no fracionamento do EBD proveniente dos frutos da *Pterodonpubescens*; (B) recristalização em hexano.



Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 5 demonstra o rendimento, em porcentagem, correlacionado a massa de partida do EBD. A mistura de isômeros vouacapanos (m/z 404), éster-6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila, apresentaram rendimento superior aos demais componentes isolados (4,8%), subsequentemente o P4 (m/z 362) apresentou rendimento de 2,5% e o P5 2,38% .

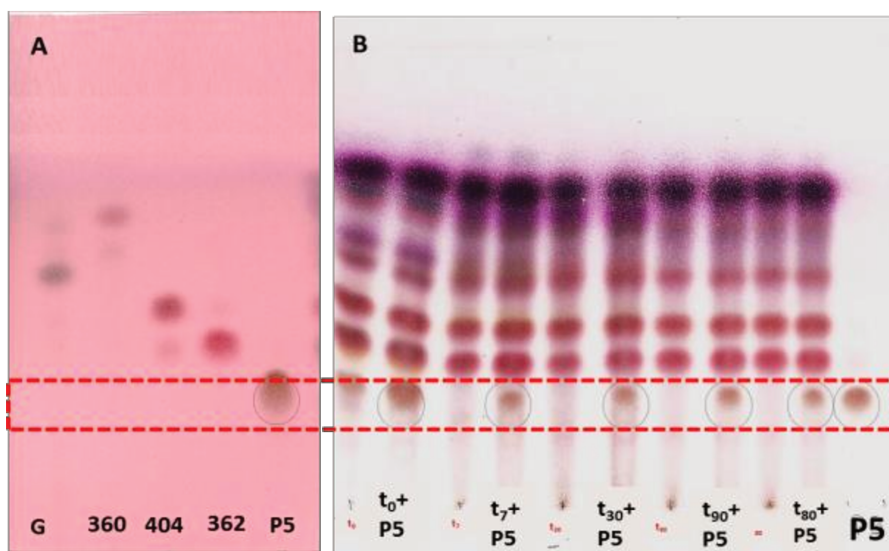
Tabela 5: Rendimento (% , m/m) dos compostos isolados no processo de fracionamento em relação ao extrato bruto diclorometânico.

Fração	Rendimento em relação ao EBD	Composto
P1	4,8%	m/z 404 (isômero A e B)
P4	2,5%	m/z 362
P5	2,38%	Desconhecido

m/z 404 = mistura dos isômeros: éster-6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila; **m/z 362**= Éster 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano- 17 β - oato de metila

Ao se analisar o perfil por CCD (Figura 17 A), observou-se que o composto P5 exibiu maior polaridade que os demais. Grando (2013), em estudos de estabilidade do extrato, observou a presença deste composto, que exibiu comportamento termolábil quando o extrato foi exposto a altas temperaturas (Figura 17 B). O composto P5 com fórmula molecular $C_{24}H_{35}NO_5$ ainda encontra-se em processo de elucidação estrutural. O esqueleto vouacapano foi determinado pela comparação de dados espectrais dos outros compostos previamente identificados. Porém, ainda é necessário identificar a sua estereoquímica.

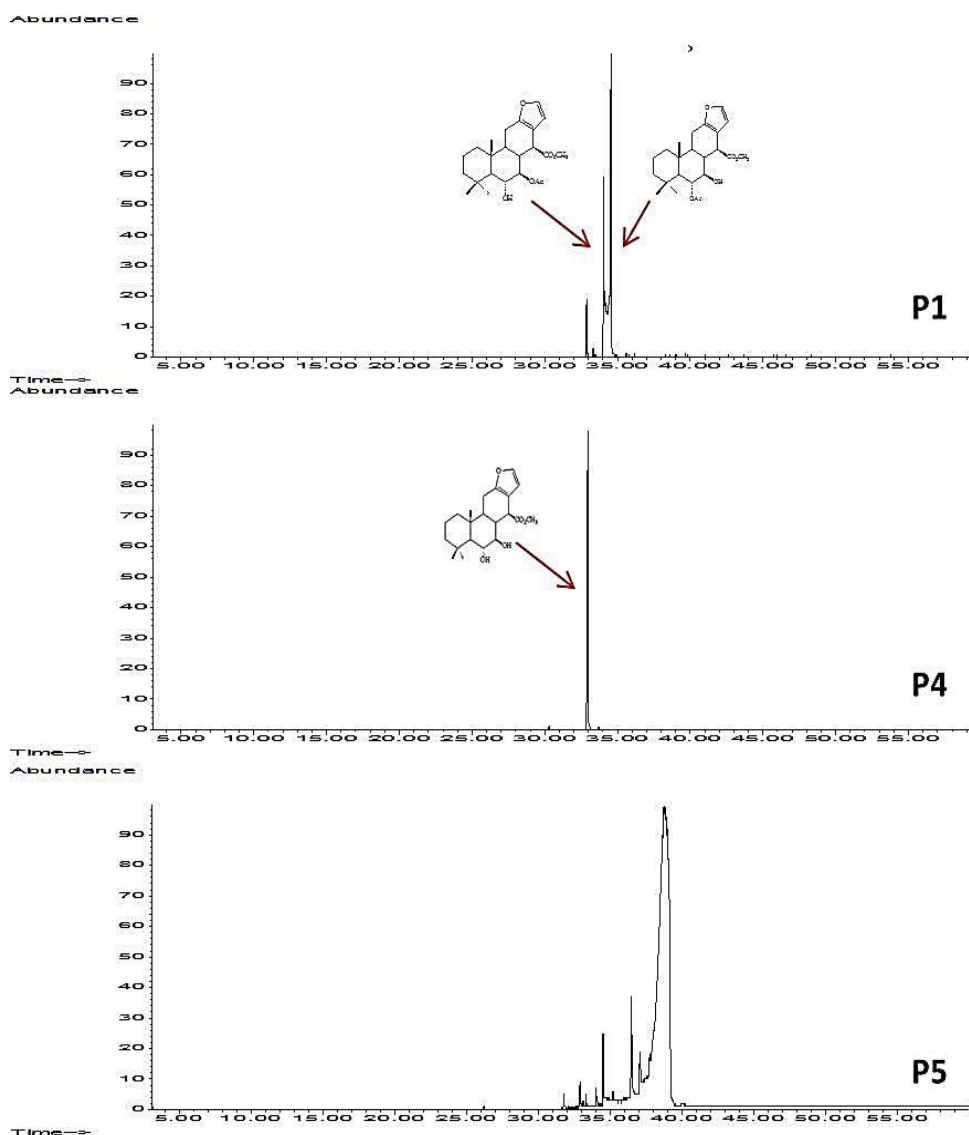
Figura 17-A) CCD com compostos de interesse B) CCD de estabilidade do EBD com extrato contendo P5 antes e após submeter à temperatura aquecimento.



Fase móvel– Acetato de etila/Hexano 60:40 , revelador anisaldeído 2% com exposição à temperatura de 150 °C por 1 min.

Fonte: Grando 2013

Figura 18-Cromatogramas normalizados dos compostos vouacapanos **P1** - éster-6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e éster-6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila; **P4** - éster 6 α ,7 β -diidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila e **P5**.



A extração em escala piloto permitiu obter amostras de um mesmo lote em maior quantidade para a execução de todos os testes realizados ao longo do projeto. Para tanto, o EBD foi fracionado em frascos de 50 mL, colocado em estufa a 30 °C sob ação de vácuo pelo período de 6 horas. Visto que o diclorometano ou cloreto de metileno é um solvente altamente volátil (pressão de vapor a 25 °C=440mmHg), este procedimento mostrou-se eficaz e garantiu que todo o solvente residual fosse exaurido da amostra. Posteriormente, os frascos foram fechados e armazenados em temperatura de -20°C preservando o EBD até seu uso.

A ausência de diclorometano residual nas amostras foi monitorada para garantir que quaisquer sinais de toxicidade, observados ao longo dos testes, não tivessem a interferência do solvente. Se ingerido, o diclorometano pode ser rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal por difusão passiva, causando danos hepáticos e renais devido a sua alta lipossolubilidade e distribuição eficaz, ultrapassando barreiras como a hematoencefálica atingindo o SNC (Leite, 2014).

5.2. Estudos *in vivo*

Estudos de toxicidade em animais de experimentação são muitas vezes a fonte mais explorada para obtenção de informações acerca da toxicidade intrínseca de substâncias químicas (Hau, 2003; Amaral, 2013). A exposição de um organismo à diversas substâncias resulta normalmente em uma variedade de efeitos, que por vezes podem ser tóxicos. Neste sentido, as plantas medicinais são excelentes exemplos, pois apresentam em sua composição uma variedade de compostos químicos capazes de interferir de maneira benéfica ou maléfica ao organismo (Barros & Davino, 2014; Veiga-Junior et al., 2005).

A espécie *Pterodon pubescens* Benth teve sua eficácia, bem como os mecanismos de ação envolvidos, detalhadamente investigados, provendo resultados que corroboram com seu uso etnofarmacológico (Denny, 2002; Spindola, 2006; Spindola et al., 2009; Spindola et al., 2010; Servat et al., 2010; Grando, 2013). Portanto fazia-se necessário o investimento na investigação de seu potencial toxicológico.

Os estudos toxicológicos não clínicos foram realizados de acordo com a legislação vigente, tendo como base o guia de orientação de condução de estudos, proposto pela Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA, onde estabelecem-se as normas para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico e/ou fitofármaco. Para tanto foram realizadas avaliações de toxicidade aguda e de doses repetidas, além de iniciarmos os testes de toxicidade genética (ANVISA, 2013).

5.2.1. Avaliação da toxicidade aguda do EBD e vouacapanos isolados (OECD – 423)

Cumprindo as legislações e normas vigentes, que incluímos protocolos da OECD, inicialmente foi avaliada a toxicidade aguda das amostras em roedores com doses pré-determinadas a fim de inferir o risco e adequar as doses aos protocolos posteriores. O método baseia-se na avaliação biométrica, fisiológica e comportamental dos animais em ação utilizando doses sugeridas, com a possibilidade de classificação do perigo. Deste modo, o teste foi aplicado para detecção e avaliação do potencial tóxico do extrato bruto diclorometânico e dos vouacapanos isolados (*m/z* 404, *m/z* 362 e P5) através da observação de alterações (Tabela 3) e/ou quantificação do número de mortes após a administração das amostras em camundongos.

Tanto o teste com EBD quanto com os compostos vouacapanos *m/z*404 e *m/z*362 tiveram dose de partida em 300mg/kg. A escolha da dose foi baseada em levantamento de estudos prévios (Denny, 2002; Spindola, 2006; Spindola et al., 2009; Spindola et al., 2010; Servat et al., 2010; Grando, 2013) em que doses maiores, que não demonstraram óbito dos animais. Já os experimentos com o composto P5, por serem desconhecidos dados sobre seus efeitos em animais, iniciou-se com dose menor de 50mg/kg, conforme orientação do protocolo adotado. O protocolo OECD 423 orienta que a dose de partida seja escolhida baseada em conhecimentos químicos, farmacológicos ou mesmo tóxicos da substância testada, respeitando a integridade dos animais, mas que exiba toxicidade mínima para que alterações possam ser observadas e seja realizada a proposição de classificação de perigo.

Tabela 6: Relação das amostras avaliadas no teste de toxicidade aguda oral em camundongos fêmeas segundo protocolo OECD-423.

Amostra	Dose de partida	> Dose testada	Dose com efeito tóxico
EBD	300mg/kg	2000mg/kg	--
<i>m/z</i> 404	300mg/kg	2000mg/kg	2000mg/kg
<i>m/z</i> 362	300mg/kg	2000mg/kg	--
P5	50mg/kg	2000mg/kg	--

EBD = extrato bruto diclorometânico; *m/z* 404 = mistura dos isômeros: éster-6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila; *m/z* 362 = Éster 6 α , 7 β -dihidroxivouacapano- 17 β - oato de metila

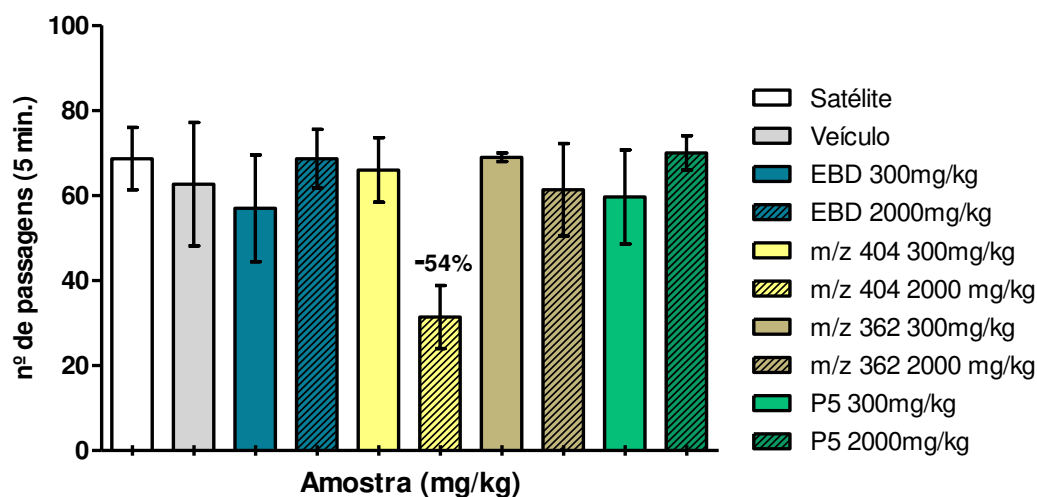
A Tabela 6 relaciona as doses avaliadas inicialmente, a dose máxima sugerida pelo protocolo OECD-423 testada para cada substância e a maior dose testada com efeitos tóxicos observados.

Os animais tratados com dose única, pela via oral com as amostras EBD, vouacapano *m/z* 362 e P5, nas doses descritas na Tabela 6, não exibiram qualquer sinal de toxicidade nas primeiras 6 horas de avaliação, bem como durante avaliação diária ao longo de 15 dias. No teste do Campo aberto, onde foi possível observar a mobilidade dos animais sob influência da administração das amostras, não foi constatado sinais de excitação (aumento de mobilidade) ou sedação (redução da mobilidade), quando comparados ao grupo controle (Figura 19). Após eutanásia, os órgãos foram macroscopicamente avaliados e também não foi observado qualquer desvio de normalidade.

Entretanto o vouacapano *m/z* 404, quando administrado pela via oral na dose de 300mg/kg, provocou uma discreta piloereção em um dos três animais testados. De acordo com o protocolo, a dose foi elevada (2000mg/kg) e administrada em outros três animais que apresentaram intensa piloereção, redução da ambulação em aproximadamente 54% comparado ao grupo controle (verificado em aparato Campo Aberto- Figura 10) nas primeiras 6 horas. Dois dos três animais recuperaram-se ao longo de 15 dias de observação e um animal foi a óbito no quinto dia, mesmo após apresentar aparente recuperação.

Rotineiramente o teste do Campo Aberto é empregado para avaliar atividade ansiolítica e ansiogênica de amostras, no entanto, vale ressaltar que neste trabalho foi utilizado como ferramenta para refinamento de observações clínicas dos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda oral ($n = 3$ por grupo), não sendo possível uma análise estatística para comparação dos grupos. Desta forma, o resultado expresso no gráfico Figura 19 retrata a quantificação de passagens pelas demarcações do aparato Campo Aberto quantificadas pelo pesquisador para que pudessem ser comparadas.

Figura 19- Gráfico demonstrativo do número de áreas percorridas durante um período de 5 minutos pelos animais em aparato “Campo Aberto”. Avaliação realizada concomitantemente ao teste de toxicidade aguda oral das amostras.



Utilizando doses pré-definidas os resultados alcançados com uma substância, podem classificar, de acordo com o sistema global harmonizado (GSH), substâncias químicas que causam toxicidade aguda (OECD, 423). Desta maneira, o perigo inerente ao vouacapano *m/z*404 foi classificado na categoria 4, ou seja, de substâncias com potencial de causar toxicidade nas doses acima de 300 – 2000mg/kg.

5.2.2. Escolha das amostras testadas e suas respectivas doses

Para dar continuidade aos estudos de toxicidade da espécie, foram selecionadas as amostras com potencial para provocar possíveis efeitos tóxicos aos animais, considerando seu uso etnofarmacológico e fomentar a possibilidade do desenvolvimento de um fitoterápico com base no óleo fixo da espécie.

O vouacapano *m/z*404 foi selecionado para posterior estudo de administração doses repetidas. Embora sua média de dose efetiva 50% (DE50 = 35,6mg/kg), em testes de dor inflamatória, seja relativamente maior que a do composto *m/z* 362 (DE50 = 18,7mg/kg), o composto *m/z*404 apresentou maior lipossolubilidade, característica clássica de substâncias com maior biodisponibilidade e conseqüentemente maior distribuição sistêmica, podendo provocar efeitos que não seriam observados em substâncias mais hidrossolúveis. As

diretrizes orientam para que se leve em conta todos os dados toxicológicos existentes, incluindo testes de toxicidade aguda oral (OECD 423, OECD 408, ANVISA, 2013). A dose mais elevada deve ser escolhida com o objetivo de provocar toxicidade, mas não a morte ou sofrimento grave. Desta forma o composto *m/z*404 foi o único a exibir toxicidade, demonstrando-se o composto mais representativo do EBD.

Foram selecionadas as doses máximas de 500mg/kg para EBD e 300mg/kg para o *m/z*404. A partir dessas doses uma sequência decrescente de doses foram propostas considerando a provável detecção de qualquer relação dose-resposta ou mesmo a verificação da menor dose testada onde não se observa qualquer efeito tóxico (NOAEL).

5.2.3. Avaliação da toxicidade com doses repetidas do EBD em ratos machos e fêmeas

Para a avaliação do perfil tóxico do EBD em teste de toxicidade oral doses repetidas, suas características químicas e dados prévios de toxicidade foram considerados. Os estudos de no mínimo 90 dias permitem obter informação sobre os possíveis riscos que possam decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de tempo prolongado.

AVALIAÇÃO PONDERAL

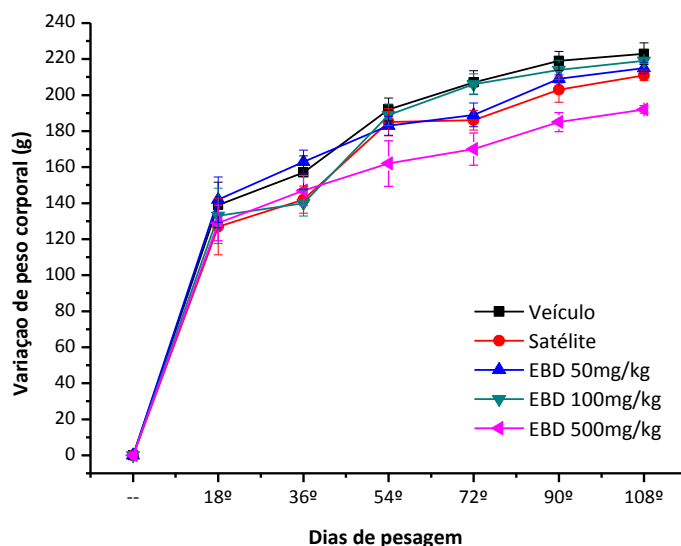
Durante todo o procedimento experimental o peso dos animais foi monitorado individualmente a cada 6 dias, até o 110º dia, em balança semi-analítica eletrônica, para determinação do ganho da massa corporal (em gramas). Ao final do teste os animais foram eutanasiados e amostras de sangue coletadas para realização das análises hematológicas, bioquímicas e órgãos coletados para análises histopatológicas. Todas as avaliações diárias, bem como o peso de cada animal, foram registrados em ficha de acompanhamento individualizada.

Os resultados da variação de peso dos animais foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p < 0,05$, seguidos de teste Tukey.

Na Figura 20, observa-se o ganho de peso dos grupos de ratos machos submetidos ao tratamento com amostra de EBD nas doses de 50, 100 e 500mg/kg(V.O.)e dos grupos controle (veículo e satélite). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados comparados ao grupo controle satélite ($p>0,05$), no entanto, vale observar que a partir do 54º dia de avaliação, a evolução do peso do grupo 500mg/kg do EBD foi notavelmente menor. Houve uma variação de peso em relação ao satélite de 12,4% (54º dia), 8% (72ºdia), 11% (90º dia) permanecendo a diferença de 11% até finalização do teste.

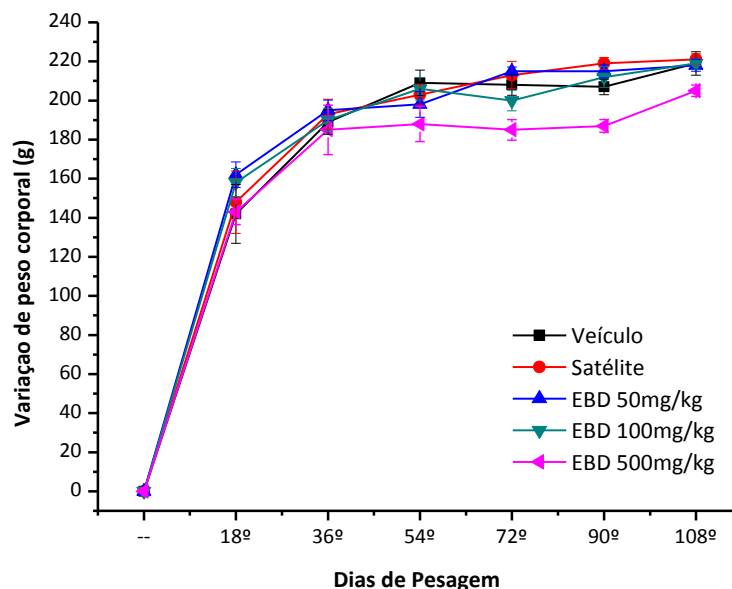
Em relação ao ganho de peso corpóreo das fêmeas, do mesmo teste, observamos na Figura 21, também não houve diferença estatística entre os grupos tratados comparados ao grupo controle satélite ($p>0,05$), no entanto, houve um menor ganho de peso do grupo da maior dose em relação ao satélite que fica evidente a partir do 72º dia de avaliação, sendo menor em 13,1% (72ºdia), 14,6% (90º dia) e 7,2% no 108º dia.

Figura 20: Gráfico representando a variação de peso corporal de **ratos macho** tratados com doses-repetidas do EBD ao longo de 110 dias.



Teste de Tukey, $p\leq 0,05$ (ANOVA). comparado ao controle

Figura 21-Gráfico representando a variação de peso corporal de **ratos fêmeas** tratados com doses-repetidas do EBD ao longo de 110 dias.



Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA). comparado ao controle

A ração dos animais foi pesada a cada três dias em balança semi-analítica e o consumo anotado foi ponderado para detecção de qualquer sinal de inapetência dos grupos avaliados. Até o 36º não se observou diminuição no consumo de ração para fêmeas e machos. Após este período os animais tratados com a dose de 500 mg/kg manifestaram uma variação entre 10 e 15% para menos no consumo do alimento, comparados ao grupo satélite. Este resultado não apresentou relevância estatística ($p < 0,05$) mas foi ferramenta fundamental somada ao acompanhamento clínico.

O extrato bruto diclorometânico possui característica oleosa e viscoso que pode ter contribuído para a saciedade dos animais quando administrado diariamente na maior dose (500mg/kg), diminuindo o consumo de ração e consequentemente interferindo no ganho ponderal.

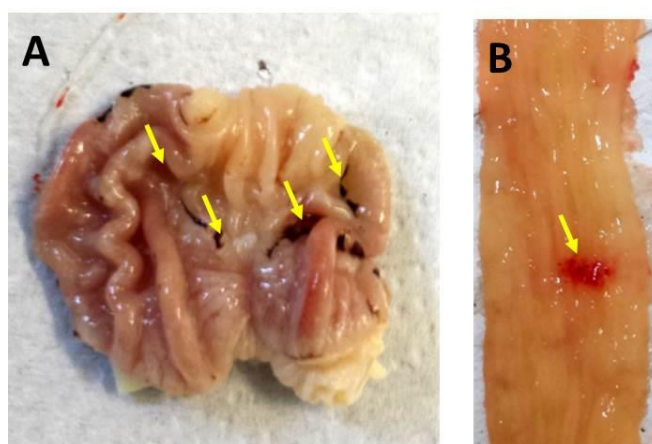
Outra observação relevante foi realizada no momento da necropsia após os 110 dias de tratamento com o EBD. Dos 10 animais machos tratados com a dose de 500mg/kg, 3 animais apresentaram pontos ulcerados em seus estômagos (Figura 22-A), sendo que um deles também apresentou pontos de ulceração no intestino delgado na porção duodenal

(Figura 22-B). Todos os demais animais, machos e fêmeas, controles e tratados, apresentaram os órgãos (estômago e intestinos) macroscopicamente preservados. Na figura 22-A o estômago apresenta pontos ulcerados iguais ou maiores que 1cm, pregas preservadas não apresentando edema.

A Sucupira (*Pterodon pubescens*) é notavelmente reconhecida como um excelente anti-inflamatório natural e seu uso não é pautado em orientações. A desproteção da mucosa gastrintestinal, com erosão do tecido, hemorragias, úlcera, é classicamente citada como evento adverso de diversos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos. A fisiopatologia é decorrente da diminuição das sínteses de prostaglandinas e prostaciclina através da inibição da enzima cicloxigenase (Jones et al., 2008).

Grando (2013) sugeriu que a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato EBD de frutos de *Pterodon pubescens* possa estar relacionada com inibição da formação de prostanóides pela inibição de cicloxigenases, hipótese citada após constatar uma correlação entre diterpenóides como o ácido acantoico e o triptolideo, compostos com esqueleto vouacapânico e inibidores de cicloxigenase II, que são estruturalmente análogos do esqueleto básico dos diterpenos encontrados na *Pterodon pubescens*.

Figura 22- A) Avaliação macroscópica do estômago de rato (macho), tratado diariamente com EBD na dose de 500mg/Kg pelo período de 110 dias. B) Porção duodenal do intestino delgado do mesmo animal.



Fonte: arquivo pessoal

VALORES DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOS

Os valores de referência hematológicos e bioquímicos em ratos não tratados (grupo satélite) são dados de grande valor como ponto de partida para diversos estudos. Além disso, a pesquisa biomédica não clínica, em contraste com a medicina clínica, sustenta que o principal critério para a tomada de decisão deve ser a comparação dos animais tratados com grupos controle (Lima et al., 2014; Evans, 2009a). De acordo com Melo *et al.* (2012), os parâmetros hematológicos e bioquímicos podem variar entre linhagens diferentes de uma mesma espécie, em função da dieta, do sexo ou idade como também podem ser influenciados pelos diferentes métodos de coleta sanguínea.

Desta forma, na ausência de uma padronização oficial de valores de referência, foram utilizados dados de animais provenientes do CEMIB e mantidos sob as mesmas condições no Biotério de manutenção da Divisão de Farmacologia e toxicologia do CPQBA-UNICAMP. Os dados que compuseram esta normalização foram coletados ao longo de três anos em diferentes experimentos, de animais do mesmo sexo, com as mesmas idades e sob as mesmas condições de manutenção, coleta e análise.

Foram utilizados valores dos analitos de grupos contendo 50 machos e 50 fêmeas, com idade de seis meses, integrantes de grupos controles satélite, sem administração de nenhuma amostra e com coleta realizada por punção retro-orbicular. Os valores foram tratados por distribuição de *Gauss* para descrever os limites que incluem 95 por cento dos resultados do teste em uma população livre de doença (Evans, 2009a) e realizou-se o cálculo da média somando duas vezes o desvio padrão para propor o limite máximo e subtraindo duas vezes o desvio padrão para propor limite mínimo.

Tabela 7: Valores de referência de Hemograma proposto para Ratos Wistar (HanUnib:WH) Machos e Fêmeas oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP com idade de 6 meses

Parâmetros	MACHO		FÊMEA	
	Limite Min.	Limite Máx.	Limite Min.	Limite Máx.
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,2	12,5	1,3	10,1
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,9	10,0	6,5	9,9
HGB (g/dL)	13,9	19,8	12,6	19,1
HCT (%)	42,5	53,6	36,2	53,8
MCV (fL)	50,0	56,6	51,3	56,8
MCH (pg)	16,5	20,4	15,3	20,5
MCHC (g/dL)	33,0	37,1	33,7	36,5
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	605,5	1221	488,1	1155,8

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. Calculado a partir de n=50/sexo.

HEMOGRAMA DOS MACHOS

Os valores relacionados nas tabelas (8-12) representam valores brutos de cada parâmetro sanguíneo analisado, coletados de cada animal ao final do teste. Estes foram comparados aos valores de referência propostos na Tabela 7 e destacados em vermelho os valores que não permaneceram dentro da normalidade.

Tabela 8: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **satélite**.

Parâmetros	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,2	6,1	3,6	2,6	5,6	4,5	1,3	1,2	10,1	-
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,25	9,61	11,05	9,46	9,70	9,93	9,31	8,79	8,9	9,27
HGB (g/dL)	16,3	17,1	19,1	17,2	17,4	17,5	16,9	16,4	18,1	16,6
HCT (%)	46,6	49,4	54,4	49,0	50,6	50,9	48,2	45,0	52,5	46,6
MCV (fL)	50,4	51,4	51,0	51,8	52,2	51,3	51,8	51,2	59,0	50,3
MCH (pg)	17,6	17,8	17,3	18,2	17,9	17,6	18,2	18,7	20,3	17,9
MCHC (g/dL)	35,0	34,6	33,9	35,1	34,4	34,4	35,1	36,4	34,5	35,6
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-	948	654	1060	843	894	940	960	841	947

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 9: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos **machos** pertencentes ao grupo **veículo**

Parâmetros	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,5	4,9	3,9	3,2	3,8	3,6	3,0	3,4	4,6	3,3
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,65	8,29	8,45	8,24	8,90	8,18	8,65	8,79	8,88	8,72
HGB (g/dL)	16,3	15,4	15,7	15,5	16,1	15,3	16,3	16,7	15,9	15,5
HCT (%)	45,5	42,7	42,5	42,8	45,2	42,0	44,2	45,4	44,1	43,8
MCV (fL)	52,6	51,5	50,3	51,9	50,8	51,3	51,1	51,6	49,7	50,2
MCH (pg)	18,8	18,6	18,6	18,8	18,1	18,7	18,8	19,0	17,9	17,8
MCHC (g/dL)	35,8	36,1	36,9	36,2	35,6	36,4	36,9	36,8	36,1	35,4
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	649	819	914	781	940	732	766	909	800	722

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 10: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos machos pertencentes ao grupo EBD 50mg/kg

Parâmetros	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,6	2,7	7,5	3,2	5,1	3,3	10,0	6,5	4,9	-
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,25	8,53	7,68	8,86	9,35	9,74	7,69	7,42	9,84	-
HGB (g/dL)	17,3	15,4	15,9	16,1	17,2	18,0	15,5	14,8	18,4	-
HCT (%)	47,6	43,3	46,8	44,3	47,7	50,8	46,4	43,7	52,7	-
MCV (fL)	51,5	50,8	60,9	50,0	51,0	52,2	60,3	58,9	53,6	-
MCH (pg)	18,7	18,1	20,7	18,2	18,4	18,5	20,2	19,9	18,7	-
MCHC (g/dL)	36,3	35,6	34,0	36,3	36,1	35,4	33,4	33,9	34,9	-
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	934	1037	653	1006	900	843	384	449	902	-

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 11: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos machos pertencentes ao grupo EBD 100mg/kg

Parâmetros	4.0	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,9	5,5	3,7	5,2	3,5	4,3	7,7	4,7	2,9	7,7
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,26	9,52	9,02	9,35	9,57	6,36	8,13	8,98	8,74	8,13
HGB (g/dL)	17,1	16,9	16,2	17,3	17,3	14,6	16,1	15,7	15,4	16,1
HCT (%)	49,3	47,6	45,4	47,0	49,4	37,8	47,0	45,1	44,5	47,0
MCV (fL)	59,7	50,0	50,3	50,3	51,6	59,4	57,8	50,2	50,9	57,8
MCH (pg)	20,7	17,8	18,0	18,5	18,1	19,8	19,8	17,5	17,6	19,8
MCHC (g/dL)	34,7	35,5	35,7	36,8	35,0	33,3	34,3	34,8	34,6	34,3
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	879	855	931	698	194	773	478	671	781	488

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 7

Tabela 12: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos machos pertencentes ao grupo EBD 500mg/kg

Parâmetros	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4,0	4,3	4,7	5,1	4,7	5,1	4,2	3,6	5,4	5,2
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,30	7,84	8,00	8,91	9,24	8,47	8,30	8,39	9,43	8,23
HGB (g/dL)	17,4	13,8	14,0	16,3	15,6	15,3	14,4	14,9	16,7	14,5
HCT (%)	49,8	39,5	40,7	46,5	44,0	42,9	41,3	42,9	46,7	41,1
MCV (fL)	48,3	50,4	50,9	52,2	47,6	50,6	49,8	51,1	49,5	49,9
MCH (pg)	16,9	17,6	17,5	18,3	16,9	18,1	17,3	17,8	17,7	17,6
MCHC (g/dL)	34,9	34,9	34,4	35,1	35,5	35,7	34,9	34,7	35,8	35,3
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	767	735	995	1064	827	972	867	913	835	897

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Os valores normais e os possíveis desvios do número de células e as taxas dos componentes não celulares do sangue são critérios importantes para avaliar a extensão da homeostase, as alterações resultantes de processos patológicos e da singularidade dos dados obtidos a partir de procedimentos experimentais (Jorge, 2013).

Os resultados obtidos para os animais machos demonstraram pequenos desvios heterogeneamente distribuídos entre os grupos. Foram observados valores maiores de MCV (volume médio do eritrócito) para três animais da dose de 50mg/kg e três animais na dose de 100mg/kg com a diminuição de MCV para quatro animais na dose de 500mg/kg.

O MCV trata do volume médio das células vermelhas do sangue e seus valores podem ser influenciados pela deficiência no consumo de nutrientes. Nos humanos a diminuição de seus valores está relacionada à deficiência de ferro e seu aumento indica a deficiência de vitaminas como ácido fólico e cobalamina. No âmbito veterinário, especificamente para animais de laboratório, este parâmetro somente seria preocupante se o animal estivesse em quadro de anemia intensa com decréscimo dos valores de RBC (contagem total de eritrócitos (*red blood cell*)) (Evans, 2009b).

O HCT, ou hematócrito, é o cálculo de massa, dado em porcentagem, em relação ao volume original de sangue após o processo de centrifugação sanguínea e sua alteração esta diretamente relacionada à contagem de HGB e MCV. Desta maneira apenas dois animais na dose de 500mg/kg e um animal na dose de 100 mg/kg exibiram diminuição de dois dos parâmetros concomitantemente. Esta alteração pode ser resultado da diminuição de ganho de peso como consequência da ingestão deficiente de nutrientes.

Dois animais na dose de 50mg/kg e dois animais na dose de 100mg/kg exibiram trombocitopenia (diminuição nos valores das plaquetas - PLT). Esses animais não demonstraram qualquer outra alteração clínica. Esta modificação não parece ser provocada pela amostra já que a maior dose não provocou essa redução em qualquer animal avaliado.

A trombocitopenia pode ser provocada por diversos fatores, dentre eles, defeitos na produção das células sanguíneas causados por hipoplasia das células hematopoiéticas primordiais, substituição da medula normal e trombocitopoiese ineficaz, doenças autoimunes, diminuição da produção do hormônio trombopoietina e uso de alguns medicamentos (Longhi, et al., 2001; Pavanelli, et al., 2011). A produção do hormônio glicoproteico trombopoietina também pode ser influenciada por eventos de hepatotoxicidade ou de nefrotoxicidade interferindo consequentemente no evento da trombocitopoiese tanto elevando o nível de plaquetas por intermédio da interleucina 6 (IL-6) como na redução destas por diminuir a produção do hormônio nestes órgãos (Laurence, et al. 2012).

HEMOGRAMA DAS FÊMEAS

Os valores relacionados nas Tabelas (13-17) representam valores brutos de cada parâmetro analisado, para cada animal. Em vermelho os valores que não se enquadraram dentro dos limites de referência propostos.

Os resultados de hemograma obtidos para as ratos fêmeas, tratados com extrato EBD nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 500mg/kg, não demonstraram qualquer alteração que sugerisse efeitos tóxicos. Mesmo com a diminuição do MCV para cinco animais na maior dose (500mg/kg), ambos mantiveram-se no limite do valor referencial (50,6 e 49,5fL - valor de referência mínimo 51,3fL).

Tabela 13: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos fêmeas pertencentes ao grupo **satélite**

Parâmetros	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,5	2,6	2,2	1,2	2,4	2,9	9,8	1,2	1,3	0,5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,52	7,91	8,26	6,42	7,77	8,73	8,14	8,09	8,20	8,28
HGB (g/dL)	12,6	14,5	15,7	12,5	14,8	16,0	15,1	14,9	14,7	15,4
HCT (%)	36,8	42,7	45,1	35,9	43,2	47,4	44,1	44,1	43,2	44,5
MCV (fL)	56,4	54,0	54,6	55,8	55,6	54,3	54,2	54,5	52,7	53,7
MCH (pg)	19,3	18,3	19,0	19,4	19,0	18,3	18,6	18,4	17,9	18,6
MCHC (g/dL)	34,2	34,0	34,8	34,8	34,3	33,8	34,2	33,8	34,0	34,6
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	118	746	783	--	617	895	791	749	676	753

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 14: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos fêmeas pertencentes ao grupo **veículo**

Parâmetros	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,3	2,6	2,0	2,1	0,9	5,2	4,4	1,5	3,2	1,1
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,24	7,50	7,82	7,48	7,88	7,55	7,16	8,11	7,49	7,44
HGB (g/dL)	15,2	14,3	15,1	13,8	14,8	14,4	13,4	15,2	14,0	14,3
HCT (%)	43,8	41,0	43,5	40,3	42,5	41,6	38,9	44,4	40,4	40,7
MCV (fL)	53,2	54,7	55,6	53,9	53,9	55,1	54,3	54,7	53,9	54,7
MCH (pg)	18,4	19,1	19,3	18,4	18,8	19,1	18,7	18,7	18,7	19,2
MCHC (g/dL)	34,7	34,9	34,7	34,2	34,8	34,6	34,4	34,2	34,7	35,1
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	944	748	987	653	758	943	815	817	840	222

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 15: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos fêmeas pertencentes ao grupo EBD 50mg/kg

Parâmetros	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,9	2,4	2,7	3,1	4,1	3,9	2,7	2,4	10,4	2,4
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,8	7,97	7,54	8,65	8,86	8,28	8,22	7,30	8,34	7,32
HGB (g/dL)	15,4	15,5	14,6	16,9	16,8	15,9	16,0	14,1	16,0	13,8
HCT (%)	42,9	42,4	41,0	46,7	46,9	44,2	44,3	39,5	45,1	38,9
MCV (fL)	55,0	53,2	54,4	54,0	52,9	53,4	53,9	54,1	54,1	53,1
MCH (pg)	19,7	19,4	19,4	19,5	19,0	19,2	19,5	19,3	19,2	18,9
MCHC (g/dL)	35,9	36,6	35,6	36,2	35,8	36,0	36,1	35,7	35,5	35,5
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	792	825	789	620	841	751	768	726	581	674

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 16: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos fêmeas pertencentes ao grupo EBD 100mg/kg

Parâmetros	4.0	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,6	7,0	3,8	2,9	2,6	3,1	2,3	2,9	3,4	4,4
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,85	8,17	7,97	7,23	7,61	8,03	7,65	8,63	8,34	7,49
HGB (g/dL)	14,7	15,7	14,8	13,9	14,1	15,4	14,5	16,7	15,3	14,1
HCT (%)	41,6	44,4	42,3	38,5	39,7	42,7	39,7	46,5	43,7	40,0
MCV (fL)	53,0	54,3	53,1	53,3	52,2	53,2	51,9	53,9	52,4	53,4
MCH (pg)	18,7	19,2	18,6	19,2	18,5	19,2	19,0	19,4	18,3	18,8
MCHC (g/dL)	35,3	35,4	35,0	36,1	35,5	36,1	36,5	35,9	35,0	35,3
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	894	343	595	753	644	892	695	1018	865	764

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

Tabela 17: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de ratos fêmeas pertencentes ao grupo EBD 500mg/kg

Parâmetros	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,7	2,9	3,0	2,9	2,5	2,8	2,9	1,6	3,8	3,0
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,95	7,88	7,39	7,61	7,66	7,59	7,69	7,57	7,73	7,34
HGB (g/dL)	14,4	13,6	13,7	13,7	13,9	13,2	13,6	13,5	13,5	13,0
HCT (%)	41,3	39,9	38,9	39,3	40,1	37,6	39,3	38,1	39,3	38,0
MCV (fL)	51,8	50,6	52,6	51,6	52,3	49,5	51,1	50,3	50,8	51,8
MCH (pg)	18,1	17,3	18,5	18,0	18,1	17,4	17,7	17,8	17,5	17,7
MCHC (g/dL)	34,9	34,1	35,2	34,9	34,7	35,1	34,6	35,4	34,4	34,2
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	999	1039	1144	1024	833	959	1000	887	1063	960

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados; PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 7

VALORES DE REFERÊNCIA BIOQUÍMICOS

Os valores de referência que contemplam limites máximos e mínimos dos parâmetros bioquímicos foram calculados, assim como os parâmetros hematológicos, com base em valores obtidos de animais que compunham grupos satélite, sendo 20 animais deste teste (macho $n=10$ e fêmeas $n=10$) e 20 animais de outro teste que cumpria com as mesmas condições já citadas. Para cada parâmetro foi calculada a média mais dois desvios padrão acima e abaixo da média.

Para os analitos, BIL (Bilirrubina), γ -GT (gama glutamiltransferase), CREA (creatinina), AU (ácido úrico), COL (colésterol) e TRIG (triglicérides), foram utilizadas referências da literatura, atrelada as demais análises realizadas com o animal.

Em um recente trabalho realizado por Lima et al. (2014), o qual propôs valores de referência hematológicos e bioquímicos para animais provenientes do biotério da Universidade de Tiradentes-MG, os autores compararam valores de referência disponíveis na literatura de estudos semelhantes, demonstrando a existência de diferentes

padrões entre animais de biotérios distintos, no entanto o cruzamento de tais informações permitiu estabelecer uma faixa de normalidade para as análises bioquímicas, onde qualquer alteração não determinava uma aparente doença. Estes valores podem ser norteadores para análise de grandes desvios e encontram-se descritos na mesma Tabela 18 destacados na cor azul.

Tabela 18: Valores de referência para análises bioquímicas proposto para ratos Wistar (HanUnib:WH) machos e fêmeas

Parâmetros	MACHOS		FÊMEAS	
	Limite Min.	Limite Máx.	Limite Min.	Limite Máx.
BIL (mg/dL) ^c	0,02	0,18	0,10	0,89
TGO (U/L)	41,4	374,5	68,2	264,7
TGP (U/L)	20,2	45	10,8	43,8
γ-GT (U/L) ^a	1	6	2	5
ALP (U/L)	10,1	160,8	2,4	92,6
CREA (mg/dL) ^e	0,24	1,20	0,28	1,10
UREIA (mg/dL)	36,8	71,5	40,0	77,2
AU (mg/dL) ^b	1	3,2	1,2	3,4
COL (mg/dL) ^d	45	76	54	96
TRIG (mg/dL) ^f	22	100	23	138
GLIC (mg/dL)	62	114	72	125
Na (mmol/L)	141	145	137,7	144,2
K (mmol/L)	3,1	4,9	2,2	4,8
Ca (mmol/L)	1,2	1,4	1,2	1,5

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Animais oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) com idade=6 meses (calculado a partir n=20/sexo).

ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS MACHOS

Tabela 19: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos** pertencentes ao grupo **satélite**

	Parâmetros	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	384	333	418	285	366	376	338	340	392	338
	TGP (U/L)	33,0	26,5	30,8	24,3	27,3	30,1	20,4	27,9	29,0	24,0
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	182	73,5	87,1	63,8	85,8	95,1	81,0	151	78,1	85,2
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	39,6	39,7	48,7	49,2	46,1	44,4	39,2	43,4	46,8	44,0
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	91	105	113	76	83	65	88	99	92	89
	Na (mmol/L)	145	144	144	143	144	142	144	143	142	142
	K (mmol/L)	4,1	3,3	3,7	3,9	3,5	3,5	4,0	4,0	3,9	3,7
	Ca (mmol/L)	1,37	1,31	1,29	1,29	1,29	1,26	1,33	1,22	1,26	1,26

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamilttransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerides. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 18

Tabela 20: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue totalde ratos **machos** pertencentes ao grupo **veículo**

	Parâmetros	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	199	158	151	161	121	99,7	133	94,2	128	114
	TGP (U/L)	25,2	24,7	24,9	20,5	28,1	25,0	20,7	22,1	26,8	21,0
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)		121	68,5	66,7	102	150	120	86,1	96,8	156
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA(mg/dL)	27,5	31,4	43,4	49,3	43,8	37,9	44,9	49,7	36,5	39,0
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	98	103	91	110	85	85	118	92	98	92
	Na (mmol/L)	141	144	144	143	145	142	142	142	144	144
	K (mmol/L)	4,0	3,2	3,6	3,6	3,1	3,2	3,6	4,1	4,1	3,6
	Ca (mmol/L)	1,28	1,34	1,31	1,36	1,35	1,33	1,23	1,32	1,37	1,30

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 21: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos**, pertencentes ao grupo **EBD 50mg/kg**

	Parâmetros	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	183	171	187	160	160	192	218	215	211
	TGP (U/L)	33,0	27,4	26,4	23,1	24,7	27,6	32,7	28,6	24,7
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	61,4	63,1	128	60,5	67,5	93,7	62,1	87,2	105
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	31,8	39,1	34,3	37,6	33,9	37,6	29,3	40,2	34,3
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	100	105	85	94	107	93	105	98	95
	Na (mmol/L)	144	143	143	143	142	144	142	143	141
	K (mmol/L)	4,0	3,7	3,7	4,2	3,9	3,8	3,8	3,6	4,1
	Ca (mmol/L)	1,38	1,30	1,30	1,39	1,32	1,40	1,34	1,40	1,20

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 22: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos**, pertencentes ao grupo **EBD 100mg/kg**

	Parâmetros	4.0	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	201	175	131	163	141	154	154	186	181	215
	TGP (U/L)	32,9	20,1	34,7	25,1	24,5	24,5	25,9	20,1	26,2	26,6
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	81,9	91,4	95,7	85,6	135	135	76,3	73,4	91,6	167
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	0,531	<0,500
	UREIA(mg/dL)	35,7	38,0	40,6	41,2	35,9	27,6	51,1	23,2	43,6	39,3
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	103	91	92	80	90	95	99	113	95	95
	Na (mmol/L)	143	143	144	143	143	144	141	143	143	144
	K (mmol/L)	3,5	4,3	3,4	3,4	3,5	3,3	3,6	3,5	3,4	3,7
	Ca (mmol/L)	1,31	1,33	1,33	1,31	1,35	1,36	1,08	1,29	1,29	1,36

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 23: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos **machos**, pertencentes ao grupo **EBD 500mg/kg**

	Parâmetros	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	53,0	156	145	118	98,5	135	120	155	138	107
	TGP (U/L)	20,5	16,5	17,2	18,9	16,6	14,5	13,7	14,2	17,6	16,4
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	63,3	72,7	73,6	62,2	56,4	44,8	44,0	86,6	49,7	51,0
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	0,581	<0,500	0,555	0,599	<0,500	<0,500	0,651	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	53,8	47,4	39,0	52,1	31,6	37,6	42,3	41,5	47,4	42,4
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	82	75	83	70	75	78	79	64	74	85
	Na (mmol/L)	142	142	143	144	144	144	141	144	144	145
	K (mmol/L)	3,9	4,3	4,1	4,1	3,7	3,6	3,7	3,4	3,9	3,5
	Ca (mmol/L)	1,26	1,39	1,30	1,27	1,38	1,37	1,17	1,38	1,41	1,36

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS FÊMEAS

Tabela 24: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos fêmeas, pertencentes ao grupo satélite

	Parâmetros	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	152	168	165	275	217	224	160	203	102	145
	TGP (U/L)	24,9	26,1	28,6	21,5	25,6	18,7	31,0	48,4	34,7	28,9
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	40,4	105	49,4	62,2	40,7	33,8	46,7	48,4	82,3	39,2
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	0,542	<0,500	0,530	0,632	<0,500	<0,500	0,508	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	52,5	42,9	70,7	62,4	59,6	65,6	63,9	48,3	58,2	46,1
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	2,13	2,0	2,0	2,0	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	100	96	94	109	89	86	96	83	80	89
	Na (mmol/L)	141	143	141	139	144	140	141	144	141	142
	K (mmol/L)	3,5	3,5	3,3	4,9	3,5	3,1	4,0	4,9	3,9	3,4
	Ca (mmol/L)	1,35	1,42	1,31	1,43	1,38	1,26	1,33	1,41	1,40	1,34

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 25: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos fêmeas, pertencentes ao grupo veículo

	Parâmetros	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	138	126	164	117	161	162	374	122	135	155
	TGP (U/L)	21,7	25,4	21,1	21,0	31,0	38,2	43,0	17,6	22,4	28,7
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	37,7	49,2	47,7	49,0	64,9	58,2	46,3	53,2	40,6	52,5
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	0,503	<0,500	0,526	0,530	0,561	0,509	<0,500
	UREIA(mg/dL)	48,7	38,2	54,4	52,3	55,4	64,0	46,8	71,1	52,6	50,4
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	68	66	101	98	73	85	77	78	87	77
	Na (mmol/L)	142	136	142	141	143	142	140	141	142	141
	K (mmol/L)	3,6	3,1	3,6	3,6	3,8	3,9	3,5	3,1	3,4	3,3
	Ca (mmol/L)	1,31	1,31	1,31	1,27	1,35	1,36	1,29	1,23	1,27	1,29

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 26: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos fêmeas, pertencentes ao grupo EBD 50mg/kg

	Parâmetros	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	1,36	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	104	126	158	118	58,5	155	166	126	136	95,5
	TGP (U/L)	18,5	40,2	27,9	26,9	21,1	25,3	36,0	22,4	19,2	25,4
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	39,9	34,6	56,4	65,1	45,4	70,1	54,0	54,6	95,0	45,2
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	0,504	<0,500	<0,500	<0,500	0,551	0,510	<0,500	<0,500	0,562
	UREIA (mg/dL)	50,3	54,4	51,4	44,4	57,5	57,1	52,8	46,4	49,0	61,9
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	79,5	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	84	113	80	109	78	89	105	109	72	113
	Na (mmol/L)	141	142	144	145	141	141	142	141	142	141
	K (mmol/L)	3,5	3,4	3,4	3,8	3,4	3,7	3,0	3,0	3,4	3,3
	Ca (mmol/L)	1,33	1,40	1,37	1,39	1,40	1,36	1,32	1,27	1,32	1,38

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 27: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos fêmeas, pertencentes ao grupo EBD 100mg/kg

	Parâmetros	4.0	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	101	120	125	101	122	131	97,9	140	107	104
	TGP (U/L)	19,1	18,1	22,6	15,8	23,1	25,9	17,2	20,3	21,8	12,1
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	23,7	24,5	38,6	51,5	41,7	83,0	84,8	35,6	24,3	37,6
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	0,554	0,506	<0,500
	UREIA (mg/dL)	51,7	56,8	76,1	38,2	57,9	56,8	55,6	84,7	63,4	47,0
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	71,8	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	95	74	74	95	79	90	101	69	85	79
	Na (mmol/L)	143	141	137	137	142	143	140	142	142	142
	K (mmol/L)	3,6	3,5	3,6	3,7	3,5	3,6	3,6	3,9	3,5	3,6
	Ca (mmol/L)	1,43	1,27	1,15	1,11	1,27	1,36	1,23	1,45	1,35	1,45

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

Tabela 28: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de ratos fêmeas, pertencentes ao grupo EBD 500mg/kg

	Parâmetros	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	0,669	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	164	152	162	143	134	131	101	128	126	180
	TGP (U/L)	18,7	17,0	22,1	20,9	19,6	15,7	28,0	18,9	16,7	20,5
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	25,2	48,9	39,3	31,4	40,3	21,4	30,4	41,0	28,3	43,4
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	0,510	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	71,6	60,7	54,3	45,6	50,0	61,2	60,1	51,8	52,6	59,9
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	102	<100	104	<100	109	100	<100	<100	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0	<70,0
	GLIC (mg/dL)	80	84	85	94	87	88	91	79	90	73
	Na (mmol/L)	143	144	143	142	145	147	144	142	143	143
	K (mmol/L)	3,5	3,9	3,2	4,0	3,7	3,7	3,6	3,4	3,4	4,6
	Ca (mmol/L)	1,25	1,40	1,27	1,34	1,43	1,42	1,50	1,39	1,39	1,44

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na Tabela 18

O diagnóstico de qualquer doença ou desequilíbrio não deve ser praticado apenas pela observação de uma única alteração, mas baseado em um conjunto de análises individualizadas considerando a particularidade de cada organismo (Gad, 2006 ; Evans, 2009; Lima, et al., 2014). As análises bioquímicas realizadas avaliaram a homeostase dos principais sistemas com a dosagem de enzimas marcadoras hepáticas, renais, lipídeos e eletrólitos, que foram mais uma ferramenta para atestar o estado de saúde dos animais.

Os animais submetidos à avaliação de toxicidade de doses repetidas com administração do EBD foram diariamente avaliados de maneira individualizada e os resultados de suas respectivas análises descritos de forma detalhada para que houvesse uma maior clareza na análise dos dados. Tanto o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia (ANVISA, 2013), como os documentos redigidos pela OECD, orientam para que cada animal testado seja considerado um indivíduo único e potencialmente representativo no teste. Portanto as tabelas anteriormente apresentadas representam os resultados brutos coletados.

Ao final do teste, após administração via oral de doses repetidas do EBD, 5 animais machos da dose de 50 mg/kg (Tabela 21), 4 animais machos da dose de 100 mg/kg (Tabela 22) e 1 animal macho da dose de 500 mg/kg (Tabela 23) apresentaram uma dosagem de ureia inferior ao o limite mínimo sugerido. Este comportamento também foi verificado em 3 animais do grupo veículo (Tabela 20), sugerindo não ser uma consequência exclusiva da administração do EBD, nem estar relacionado à dose do mesmo. Da mesma maneira 1 animal fêmea com dose de 100mg/kg apresentou ureia abaixo do limite (Tabela 27). Apenas 1 animal fêmea da dose 100 mg/kg exibiu valor de ureia acima do limite máximo 84,7 mg/dL (limite de 40 a 77,2 mg/dL).

A ureia é gerada no fígado como um produto de catabolismo de aminoácidos e a proteínase atua como a principal fonte de excreção de compostos nitrogenados do organismo. Sua alteração para mais ou para menos no sangue pode ser influenciada por algumas variáveis como: a ingestão de alimentos proteicos, variação na concentração de amônia, o correto funcionamento hepático, bem como pela perfusão renal e taxa de filtração glomerular (Weiner et al., 2015).

Assim como hiperuremia (elevação na taxa de ureia sanguínea) pode estar relacionada à oferta de proteína na dieta do animal ou a uma possível redução da taxa de excreção da mesma na urina, a hipouremia (depleção na taxa de ureia sanguínea) pode ser causada por dieta pobre, hiper-hidratação ou pode ser encontrada em casos de insuficiência hepática devido a possíveis lesões no fígado, que se torna incapaz de metabolizar uréia a partir de compostos nitrogenados. Todavia, que alterações da uréia caracterizem um quadro de intoxicação, esta deve estar acompanhada por dosagem da creatinina (principal indicador de toxicidade renal) (Mariz et al., 2006).

Os níveis séricos de ureia e creatinina são dois importantes fatores para se avaliar o índice de filtração glomerular, níveis estes que podem estar elevados ou diminuídos em determinadas situações. A creatinina é um composto endógeno, obtido por meio do metabolismo muscular da creatina, sendo constante a sua produção pelo organismo. O valor sérico desse metabólito, além da função renal, depende da massa muscular, nutrição e ocorrência de edema (Pasupathy et al., 2011). Neste estudo, os níveis séricos de creatinina mantiveram-se normais em relação ao grupo satélitetanto para machos quanto para fêmeas.

Na tabela 23 observamos que 9 dos 10 animais pertencentes ao grupo EBD 500mg/kg exibiram valores da enzima TGP menores que o limite proposto (limite de 20,2 a 45 U/L). Embora esta enzima seja um dos principais marcadores de toxicidade hepática, apenas o seu aumento é indicativo de tal disfunção a detecção de uma menor expressão desta não se torna preocupante como sinal de dano hepático, mas é um dado importante pois pode indicar um desequilíbrio em sua síntese. Nível anormal de marcadores bioquímicos é definido como valores que excedem o limite superior de referência uma vez que não há nenhum significado clínico para a ocorrência de baixos níveis; com exceção para a albumina do soro (Giannini et al., 2005).

ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Ao final do teste (110º dia) os animais tratados com o extrato EBD nas doses de 50, 100 e 500mg/kg foram necropsiados e os cortes histológicos dos órgãos foram analisados pelo médico patologista Dr. Paulo Newton Danzi Salvia.

Todos os animais, machos e fêmeas, tratados com EBD e seus respectivos controles apresentaram as seguintes condições de normalidade para os órgãos abaixo:

Cérebro/Cerebelo: Substância branca acinzentada com arquitetura preservada. Neurônios com aspecto histológico habitual. Revestimento ventricular com epêndima típico.

Para os machos: Testículo/Epidídimo: Gônadas masculinas apresentando espermatogênese completa. Epidídimo sem particularidades histológicas

Para as fêmeas:Ovários/ Útero: Ovários com arquitetura preservada, sem particularidades histológicas. Útero constituído por feixes entrelaçados de musculatura lisa. Colo uterino com endocérvice revestida por epitélio cilíndrico típico. Ectocérvice revestida por epitélio escamoso típico.

Coração: Cardiomiócitos com aspecto histológico habitual. Sem particularidades histológicas

Glândulas adrenais: Camadas cortical e medular sem particularidades histológicas.

Baço:Cápsula revestida por mesotélio preservado, parênquima sem particularidades histológicas em polpa vermelha e polpa branca.

Intestino delgado / Intestino grosso: Dentro dos limites de normalidade

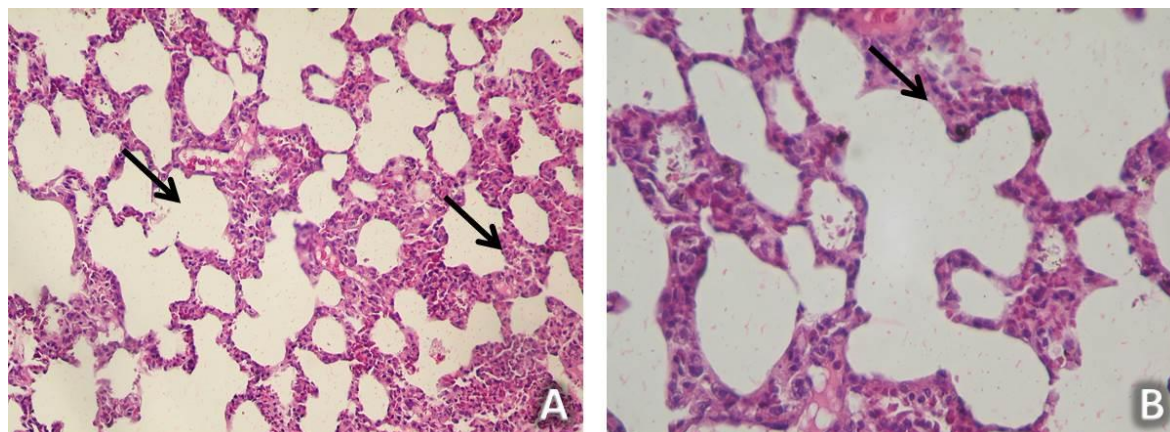
Rins: Arquitetura cortiço-medular preservada. Glomérulos normocelulares.

Pulmão:Sete fêmeas (3 do grupo veículo, 2 do grupo EBD 50mg/kg, 1 do grupo EBD 100mg/kg e 1 do grupo EBD 500mg/kg) e três machos (3 do grupo satélite), foram diagnosticados com enfizema pulmonar.

Os pulmões dos animais supracitados apresentavam arquitetura bronquíolo-pulmonar preservados com moderada congestão dos capilares alveolares, espaços aéreos contíguos e aumentados formando estruturas císticas e fibrose intersticial com colabamento da parede alveolar (Figura24).

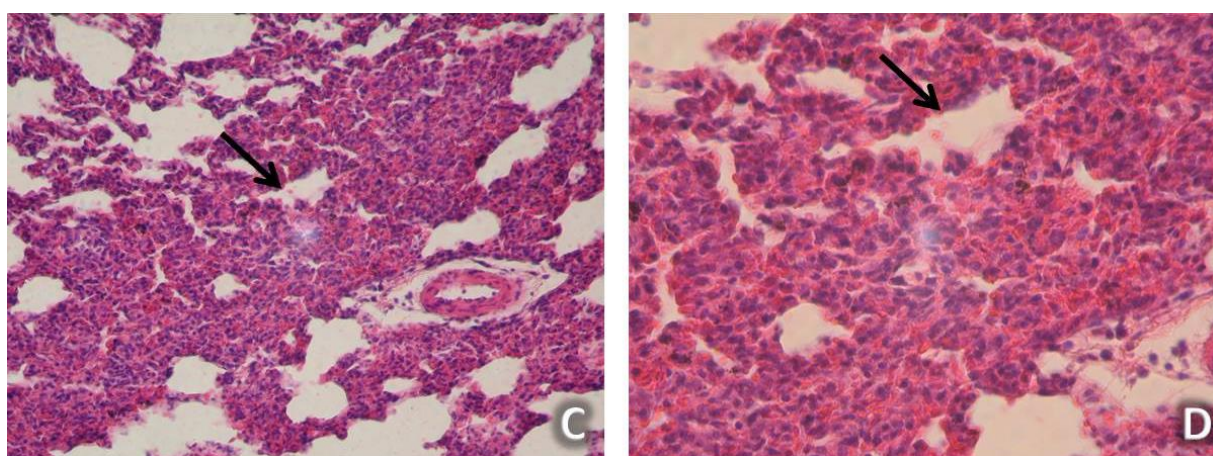
A Figura 23 refere-se à fotomicroscopia de corte histológico de pulmão sadio. Na imagem A, com o aumento de 200x, observam-se os espaços alveolares (setas) bem definidos e na imagem B as paredes alveolares preservadas.

Figura 23: Cortes histológicos dos pulmões demonstrando nas imagens A e B o órgão sadio



A- Pulmão sadio, aumento de 200x; **B-** Pulmão sadio, aumento de 400x; Coloração- Hematoxilina/eosina. paredes alveolares preservadas e bem definidas (setas)

Figura 24: Cortes histológicos dos pulmões demonstrando nas imagens A e B o órgão com fibrose intersticial com colabamento da parede alveolar.



C- Pulmão com pneumonia, aumento de 200x; **D-** Pulmão com pneumonia, aumento de 400x. Setas= colabamento alveolar

A lesão pulmonar crônica pode ter causas diversas e é frequentemente associada com o desenvolvimento de fibrose pulmonar caracterizada pela substituição da estrutura pulmonar normal por uma matriz colagenosa espessa com consequente redução na capacidade de troca gasosa (Wang et al., 2016). Nos seres humanos, as condições que conduzem à fibrose pulmonar variam muito, de infecções à exposição a agentes tóxicos ou material particulado, assim como animais de laboratório que também parecem desenvolver

uma resposta fibrótica pulmonar a muitos destes agentes incitadores, embora existam diferenças entre espécies.

Independentemente do agente incitador, o processo fibrogênico parece ser geralmente caracterizado por ruptura da estrutura alveolar-capilar normal, fuga de exsudado do compartimento vascular para os espaços aéreos, invasão subsequente por células inflamatórias e fibroblastos associados com formação de matriz em excesso. Estudos em animais de laboratório com diferentes agentes fibrogênicos sugeriram que a fibrose pulmonar aumentou as produções do factor de necrose tumoral TNFapoi macrófagos (Greaves, 2012)

O diagnóstico de enfisema pulmonar teve ocorrência inespecífica, acometendo animais tanto dos grupos controle como de grupos tratados, descaracterizando ser um resultado de intoxicação provocada pela administração do extrato EBD.

O enfisema pulmonar é caracterizado por um alargamento anormal e permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais, acompanhado pela destruição das paredes onde nem sempre a fibrose é óbvia. O enfisema tem sido relatado como uma alteração espontânea relacionada também com a idade em ratos de laboratório (Greaves, 2012).

Na natureza, os roedores se alimentam naturalmente com as fossas nasais voltadas para baixo, já na gaiola de manutenção a ração é colocada acima dos animais, sobre uma grade metálica e para alimentar-se o animal precisa voltar-se para cima, facilitando assim a broncoaspiração deste material particulado. Uma hipótese para o ocorrido é que material particulado como pó da maravalha (piso da gaiola) ou até mesmo pequenas partículas da ração possam ser agressores potenciais para provocar o enfisema diagnosticado (Haschek, et al. 2010)

Fígado:Na análise hepática as alterações foram diagnosticadas nos fígados dos animais. A primeira com ampla ocorrência comprometeu quase que a totalidade dos animais (grupo satélite:8 machos e 9 fêmeas; Grupo veículo: 8 machos e 10 fêmeas; Grupo EBD 50 mg/kg: 6 machos e 6 fêmeas; Grupo EBD 100mg/kg: 6 machos e 4 fêmeas; e Grupo EBD 500mg/kg: nenhum macho e 4 fêmeas). Estes animais foram diagnosticados com degeneração hidrópica

em zona3, centro-lobular. Esta é uma alteração idiopática (surgimento espontâneo e sem causa) que pode ser multifatorial caracterizadas pelo acúmulo de água dentro da matriz citosólica, aumento do citoplasma de coloração pálida, com estreitamento dos espaços sinusóides e perissinusoidais. Esta forma de lesão é reversível e pode ser atribuída a uma incapacidade de manter o equilíbrio do sódio intracelular (Haschek, et al. 2010).

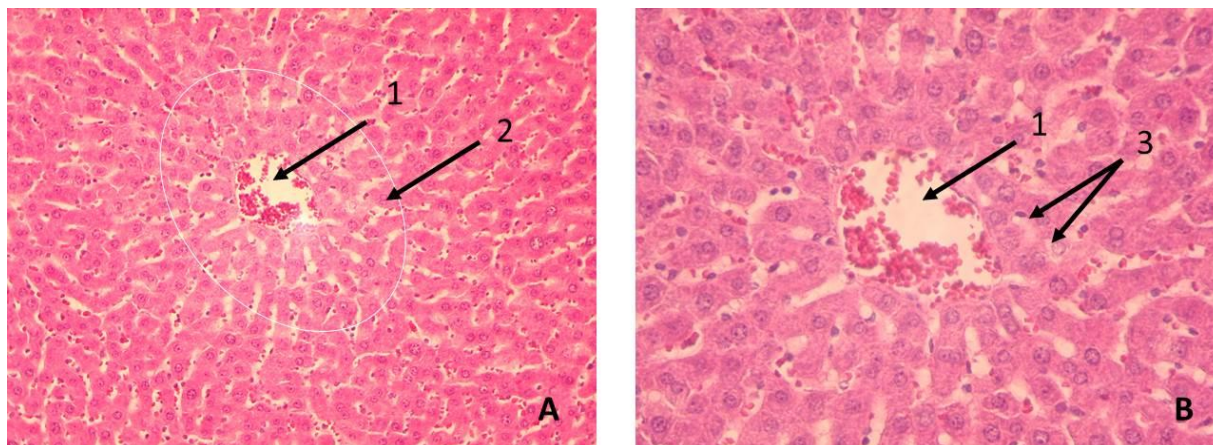
Para compreender a localização da lesão é necessário entender o conceito de lóbulo hepático. Histologicamente, este apresenta forma hexagonal, com uma veia centrolobular (chamada zona 3) com as tríades portais nas extremidades desse hexágono imaginário. As colunas de hepatócitos dispõem-se lado a lado, a partir da veia central e entre elas estão situados os sinusóides hepáticos, que transportam o sangue que chega pelos ramos da veia porta e da artéria hepática (McGavin & Zachary, 2011).

A degeneração hidrópica, ou tumefação celular aguda, é a expressão da lesão celular mais comum e fundamental. É caracterizada pelo acúmulo intracelular de água que ocorre pela incapacidade da célula de manter o equilíbrio iônico e a homeostasia de fluidos, em função de falha nas bombas dependentes de energia das membranas celulares sendo a primeira manifestação de quase todas as formas de dano celular (Robbins & Cotran, 2015).

Macroscopicamente, os fígados com degeneração hidrópica apresentaram-se discretamente empalidecidos, característica clássica de órgãos intumescidos. Microscopicamente (Figura 25) foram observadas células muito dilatadas, onde o citoplasma é um espaço claro (setas Figura 25). Essa alteração, muitas vezes, é diagnosticada como vacuolização do hepatócito ou balonização (McGavin & Zachary, 2011). Denny (2002) já havia observado que a administração subcutânea das mesmas doses do óleo da *Pterodon pubescens* provocou a mesma alteração nas duas maiores doses (100mg/kg e 300mg/kg).

O diagnóstico de degeneração hidrópica em zona centrolobular teve ocorrência inespecífica, acometendo animais tanto dos grupos controle como de grupos tratados, descaracterizando ser um resultado de intoxicação provocada pela administração do extrato EBD. Este resultado não está correlacionado aos baixos índices de TGP observados nos ratos machos tratados com EBD 500 mg/kg.

Figura 25: Cortes histológicos do fígado demonstrando degeneração hidrópica em zona centrolobular.



A- Aumento de 200x; **B-** Aumento de 400x; Coloração- Hematoxilina/eosina. Seta 1= Zona centrolobular, seta 2= zona clara de hepatócitos que se forma ao redor da veia centrolobular, setas 3= hepatócito balonizado (degeneração hidrópica)

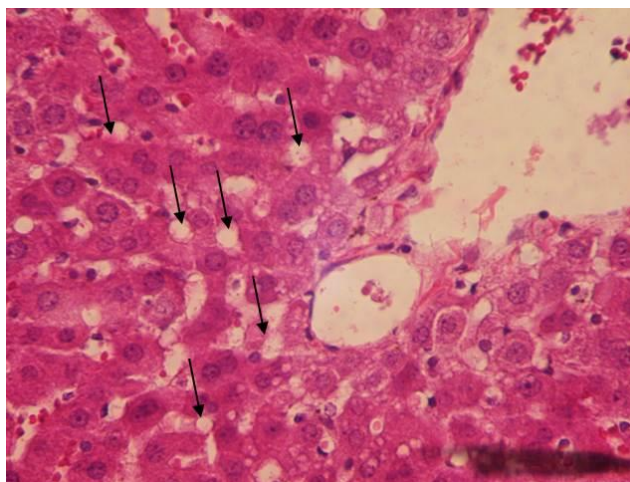
No fígado dos animais também foram encontradas alterações diagnosticadas como esteatose hepática microgoticular de grau leve comprometendo os seguintes animais: Grupo EBD 50mg/kg 1 fêmea, Grupo EBD 100mg/kg 3 machos e 2 fêmeas e Grupo EBD 500mg/kg 6 machos e 5 fêmeas.

A esteatose hepática, ou lipidose hepatocelular, não é uma doença, mas reflete uma disfunção metabólica, podendo ocorrer como sequela de uma variedade de perturbações do metabolismo lipídico normal e que tanto pode iniciar por um processo inflamatório que promove o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, como pode ser provocada pela ingestão excessiva de ácidos graxos (Laurence, et al., 2012).

A incidência de esteatose microgoticular (Figura 26) nos animais tratados com o EBD, nas três doses, foi maior à medida em que se aumentou a dosagem da amostra administrada, sugerindo que a amostra, por apresentar característica lipídica, possa contribuir para o surgimento desta disfunção. Porém estes animais não apresentaram qualquer alteração de colesterol ou triglicérides séricos.

Outros estudos deverão ser realizados, como a caracterização dos ácidos graxos que compõem a amostra EBD e avaliação de sua influência dietética no metabolismo dos animais.

Figura 26: Corte histológico do fígado demonstrando esteatose microgótica (setas) próximo ao espaço porta-hepático.



Aumento de 200x. Coloração: Hematoxilina/eosina

5.2.4. Avaliação da toxicidade com doses repetidas do *vouacapanosm/z404*

Para o teste de toxicidade de doses repetidas com o composto *m/z* 404, escolheu-se utilizar a espécie de camundongos não isogênicos *Swiss*, pois além de atender as exigências solicitadas nas diretrizes vigentes (ANVISA, 2013), possui menor peso corpóreo, necessitando de uma menor massa de amostra. Sabendo que o rendimento do composto é menor que o EBD e os ratos necessitam de 10x a quantidade de amostra frente aos camundongos, considerou-se esta escolha pertinente.

A utilização somente de fêmeas foi parte das orientações descritas nas novas orientações, pois são mais sensíveis a sinais de toxicidade (ANVISA, 2013).

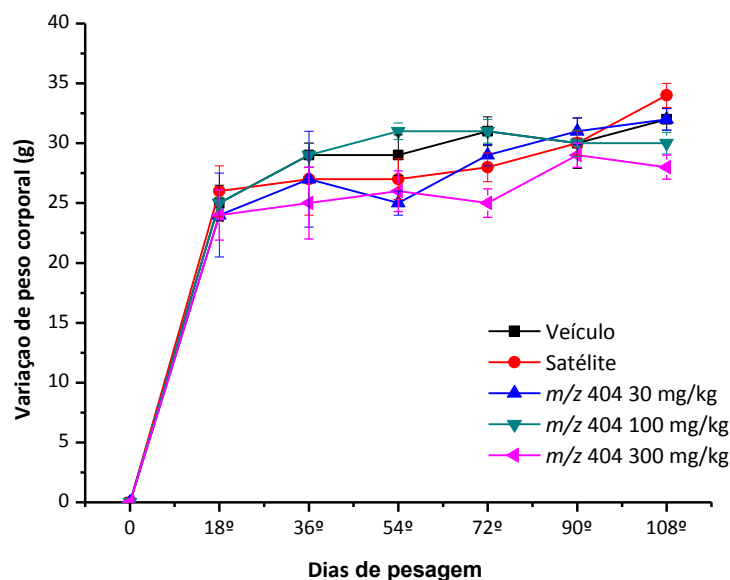
AVALIAÇÃO PONDERAL

Durante todo o experimento o peso dos animais foi monitorado individualmente a cada seis dias, até o 90º dia, em balança semi-analítica eletrônica, para determinação do ganho da massa corporal em gramas. Ao final do teste, os animais foram eutanasiados e as amostras de sangue coletadas para realização das análises hematológicas, bioquímicas e órgãos coletados para análises histopatológicas. Todas as avaliações diárias, bem como o peso de cada animal, foram registrados em ficha de acompanhamento individualizada e, para melhor visualização e compreensão, os pesos individuais compuseram o peso do grupo para o qual foram calculados média e desvio padrão da média.

Na figura 27 observou-se a evolução do peso em função do tempo para todos os grupos de camundongos fêmeas tratados com o vouacapano *m/z* 404 nas doses de 30, 100 e 300mg/kg (V.O.) e grupos controle (veículo e satélite). No 18º dia de avaliação, os animais já se encontravam com idade de 10 semanas, apresentando no peso do animal adulto e deste período até o final do experimento ganharam ou perderam pouco peso, variando de 2g a 8g por grupo, comportamento natural que não sugere nenhuma alteração. Os animais tratados não divergiram em quantidade de ração consumida em relação ao grupo satélite.

Os animais foram observados diariamente para anotação de quaisquer sinais de toxicidade, considerando que o vouacapano *m/z* 404 foi a única amostra a provocar injúrias no teste de dose aguda (Tabela 5). Todos os animais, incluindo camundongos tratados com a maior dose do vouacapano *m/z* 404, exibiram comportamento normal no decorrer do teste.

. **Figura 27:** Gráfico representando avariação de peso corporal dos grupos, tratados ao longo de 110 dias com doses-repetidas do vouacapano *m/z*404.



Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA).

VALORES DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOSE BIOQUÍMICOS

Os dados utilizados para calcular valores de referência hematológicos foram provenientes de dois testes com grupo satélite na mesma idade e para valores de referência bioquímica foram usados somente os dados do grupo satélite deste teste.

Foram utilizados valores de analitos de 20 camundongos fêmeas com idade entre 5 e 6 meses, integrantes de grupos controle satélite, sem administração de nenhuma amostra e com coleta realizada por punção retro-orbicular. Os valores foram tratados por distribuição de Gauss para descrever os limites que incluem 95% dos resultados do teste em uma população livre de doença (Evans, 2009) e realizou-se o cálculo da média somando duas vezes o desvio padrão para propor o limite máximo e subtraindo duas vezes o desvio padrão para propor limite mínimo.

Para os parâmetros bilirrubina (BIL), creatinina (CRE) e gama glutamiltransferase (GGT), não foram encontrados estudos de valores de referência para a espécie *Swiss*, portanto, utilizamos os valores de < 0,500, < 5,00 e < 0,500 respectivamente como limite máximo de leitura. Qualquer desvio para mais será sinalizado como indicativo para atenção.

Tabela 29: Valores de referência de Hemograma proposto para camundongos *Swiss* fêmeas oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) com idade aproximada de 6 meses

Parâmetros	Limite Min.	Limite Máx.
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1	4,7
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,3	12,2
HGB (g/dL)	12,9	15,7
HCT (%)	43,2	54,9
MCV (fL)	45,0	50,7
MCH (pg)	11,9	15,8
MCHC (g/dL)	26,9	29,4
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1280	2173

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. calculado a partir n=20

Os valores relacionados nas tabelas (31-35) representam valores brutos de cada parâmetro sanguíneo analisado, coletados de cada animal ao final do teste. Estes foram comparados aos valores de referência propostos na Tabela 29 e descritos em vermelho os valores que não permaneceram dentro da normalidade

Tabela 30: Valores de referência de análises bioquímicas propostos para Camundongos Swiss (Unib:SW) fêmeas oriundos do Biotério Central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) com idade=6 meses

Parâmetros	Limite Min.	Limite Máx.
BIL (mg/dL)	-	< 0,500
TGO (U/L)	18	369
TGP (U/L)	13,3	82,3
γ-GT (U/L)	-	< 5,00
ALP (U/L)	16	292
CREA (mg/dL)	-	< 0,500
UREIA (mg/dL)	20,2	44
AU (mg/dL)	1,27	2,73
COL (mg/dL)	105,2	166
TRIG (mg/dL)	120,8	169,2
GLIC (mg/dL)	79	158

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerides. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento. Calculado a partir n=10. Para os parâmetros BIL – bilirrubina, CRE – creatinina e GGT – gama glutamiltransferase, não foram encontrados estudos de valores de referência para a espécie Swiss.

Tabela 31: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **satélite**.

Parâmetros	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,6	2,2	3,3	1,7	2,9	2,4	3,8	3,5	3,2	2,2
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,77	10,00	10,44	9,84	10,33	10,76	9,19	10,99	10,29	9,95
HGB (g/dL)	14,4	14,4	14,2	13,5	13,9	14,2	12,8	14,5	14,0	13,5
HCT (%)	52,1	50,0	50,7	48,2	49,6	51,3	44,6	51,5	50,2	48,3
MCV (fL)	48,4	50,0	48,6	49,0	48,0	47,7	48,5	46,9	48,8	48,5
MCH (pg)	13,4	14,4	13,6	13,7	13,5	13,2	13,9	13,2	13,6	13,6
MCHC (g/dL)	27,6	28,8	28,0	28,0	28,0	27,7	28,7	28,2	27,9	28,0
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1809	1572	2009	1816	1723	2058	1487	1749	1531	1848

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 29

Tabela 32: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **veículo**

Parâmetros	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,4	2,2	3,0	3,2	2,3	2,7	3,5	2,9	4,4	5,5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,13	9,39	10,29	10,58	10,29	9,56	10,01	10,03	9,00	10,54
HGB (g/dL)	14,2	13,1	14,3	13,9	13,9	13,6	13,3	13,9	13,8	13,9
HCT (%)	49,7	43,3	50,5	49,8	48,7	48,0	48,1	48,7	46,2	49,9
MCV (fL)	49,1	46,1	49,1	47,1	47,3	50,2	48,1	48,6	51,3	47,3
MCH (pg)	14,0	14,0	13,9	13,1	13,5	14,2	13,3	13,9	15,3	13,2
MCHC (g/dL)	28,6	30,3	28,3	27,9	28,5	28,3	27,7	28,5	29,9	27,9
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1770	1589	1517	1645	1457	1651	2069	1917	1812	1493

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 29.

Tabela 33: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **m/z 404 30mg/kg**

Parâmetros	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,9	4,1	4,5	3,2	3,4	4,0	3,0	3,6	4,2	2,5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,44	10,23	10,72	10,26	9,63	9,07	9,61	10,17	10,14	9,95
HGB (g/dL)	13,5	13,4	13,9	13,7	13,7	14,8	13,2	13,4	13,6	13,5
HCT (%)	48,8	49,2	52,1	50,3	46,4	43,7	47,3	49,1	48,8	48,7
MCV (fL)	46,7	48,1	48,6	49,0	48,2	48,2	49,2	48,3	48,1	48,9
MCH (pg)	12,9	13,1	13,0	13,4	13,2	13,0	13,7	13,2	13,4	13,6
MCHC (g/dL)	27,7	27,2	26,7	27,2	27,4	27,0	27,9	27,3	27,9	27,7
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2189	1941	2368	1733	1801	1676	1890	2735	2334	2495

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 29.

Tabela 34: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **m/z 404 100mg/kg**

Parâmetros	4.0	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,7	4,6	2,6	1,9	3,0	4,8	3,5	3,7	5,8	3,0
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,23	10,41	10,08	11,00	10,32	10,67	10,58	10,91	9,92	10,21
HGB (g/dL)	13,7	13,6	13,7	14,1	13,9	13,5	13,9	14,2	13,7	13,4
HCT (%)	50,2	50,3	49,2	51,7	50,5	50,8	51,6	53,1	51,0	49,4
MCV (fL)	49,1	48,3	48,8	47,0	48,9	47,6	48,8	48,7	51,4	48,4
MCH (pg)	13,4	13,1	13,6	12,8	13,5	12,7	-	13,0	13,8	13,1
MCHC (g/dL)	27,3	27,0	27,8	27,3	27,5	26,6	26,9	26,7	26,9	27,1
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1894	2095	2061	2104	1741	1885	1950	2122	1528	2075

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 29.

Tabela 35: Valores absolutos de hemograma realizado após 110 dias em teste com amostras sanguíneas de camundongos **fêmeas** pertencentes ao grupo **m/z 404 300mg/kg**

Parâmetros	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4,3	3,8	5,3	5,5	3,3	4,5	5,1	2,4	3,7	5,3
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,81	11,38	10,75	11,04	11,16	9,98	11,01	10,37	11,32	10,29
HGB (g/dL)	14,4	14,7	13,4	13,9	15,2	13,8	13,9	13,4	14,9	13,9
HCT (%)	53,2	54,5	50,2	51,4	55,0	50,3	52,7	50,7	54,5	51,9
MCV (fL)	49,2	47,9	46,7	46,6	49,3	50,4	47,9	48,9	48,1	50,4
MCH (pg)	13,3	12,9	12,5	12,6	13,6	13,8	12,6	12,9	13,2	13,5
MCHC (g/dL)	27,1	27,0	27,7	27,0	27,6	27,4	26,9	27,4	27,3	27,8
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1521	2391	2919	2816	2912	2707	2668	4177	2475	1964

WBC – contagem total de leucócitos (*white blood cell*); RCB – contagem total de eritrócitos (*red blood cell*); HGB – concentração de hemoglobina; HCT – hematócrito; MCV – volume corpuscular médio, ou seja, é o volume do eritrócito médio, sendo calculado a partir da concentração de hemoglobina e eritrócitos totais (*mean corpuscular volume*); MCH – hemoglobina celular média, ou seja, concentração absoluta de hemoglobina por eritrócito (*mean corpuscular hemoglobin*); MCHC – concentração de hemoglobina celular média, ou seja, concentração média de hemoglobina num determinado volume de eritrócitos compactados. PLT – Plaquetas. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 29.

Tabela 36: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **satélite**

	Parâmetros	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	3,28	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	0,621	<0,500	0,999	0,900
	TGO (U/L)	94,9	188	200	163	247	161	242	367	184	366
	TGP (U/L)	37,3	46,2	86,6	43,7	49,5	32,1	55,4	59,0	30,3	67,8
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	74,4	296	246	111	106	193	311	98,1	94,9	86,4
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	28,6	20,0	38,8	24,6	33,6	30,4	30,6	36,8	36,7	35,7
	AU (mg/dL) ^b	<2,00	2,22	2,35	2,01	<2,00	2,14	3,16	<2,00	<2,00	<2,00
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	119	133	141	134	145	151	148	<100	130	137
	TRIG (mg/dL) ^f	139	144	149	138	146	141	175	144	148	166
	GLIC (mg/dL)	119	136	107	69	126	110	126	138	119	117

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerides. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 30.

Tabela 37: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **veículo**

	Parâmetros	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	0,582	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	169	208	237	321	295	229	148	---	147	188
	TGP (U/L)	36,3	46,0	50,7	36,1	49,1	38,6	35,0	41,1	36,3	59,8
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	104	137	374	107	135	277	75,1	95,4	101	102
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	31,8	21,7	23,0	23,6	20,0	35,0	33,2	33,8	24,2	21,2
	AU (mg/dL) ^b	2,52	2,39	2,20	2,48	2,91	2,84	<2,00	<2,00	3,06	2,15
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	118	<100	166	171	125	119	126	144	133	105
	TRIG (mg/dL) ^f	138	127	152	182	146	156	141	141	134	157
	GLIC (mg/dL)	123	114	116	116	127	111	108	100	128	116

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerides. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 30.

Tabela 38: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **m/z 404 30mg/kg**

	Parâmetros	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	111	211	108	380	180	169	147	126	146	164
	TGP (U/L)	33,3	40,4	43,0	38,9	40,3	40,7	27,5	26,2	42,2	25,5
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	70,1	65,2	71,0	103	191	198	69,3	97,3	75,3	85,4
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	26,3	24,7	26,8	29,4	33,6	29,3	28,6	29,4	24,2	29,3
	AU (mg/dL) ^b	2,19	2,48	2,88	2,97	3,48	4,39	2,05	2,34	2,06	2,36
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	140	141	113	111	119	120	111	123	101
	TRIG (mg/dL) ^f	151	142	-	187	146	151	141	200	152	143
	GLIC (mg/dL)	143	128	112	126	114	129	86	89	92	115

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerides. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 30.

Tabela 39: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **m/z 404 100mg/kg**

	Parâmetros	4.0	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	<0,500	<0,500	<0,500	0,616	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	132	145	255	197	221	225	113	154	148	177
	TGP (U/L)	51,9	70,2	36,9	31,7	94,2	56,5	30,2	36,6	35,1	62,7
	γ-GT (U/L) ^a	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	98,1	81,7	79,1	55,2	81,1	82,5	20,0	54,3	77,8	53,2
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	39,3	46,6	23,8	21,9	27,3	35,3	22,5	25,5	35,0	24,5
	AU (mg/dL) ^b	3,36	2,64	3,93	2,00	2,00	2,50	2,00	2,87	2,00	2,24
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	<100	<100	<100	<100	118	<100	<100	108	112	150
	TRIG (mg/dL) ^f	129	145	147	70,0	140	175	133	177	166	173
	GLIC (mg/dL)	76	90	89	108	79	132	99	95	130	96

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerides. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 30.

Tabela 40: Valores absolutos de análises bioquímicas realizado em amostra de soro e sangue total de camundongos **fêmeas**, coletados após 110 dias em teste. Amostras pertencentes ao grupo **m/z 404 300mg/kg**

	Parâmetros	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9
Função hepática	BIL (mg/dL) ^c	-	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	TGO (U/L)	-	388	187	347	275	217	362	122	554	648
	TGP (U/L)	-	117	47,0	162	97,6	82,0	150	32,5	241	197
	γ-GT (U/L) ^a	-	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00
	ALP (U/L)	-	79,2	113	99,0	53,9	34,6	30,4	46,2	39,5	39,5
Função renal	CREA (mg/dL) ^e	-	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500	<0,500
	UREIA (mg/dL)	-	23,2	26,0	22,0	20,0	25,4	25,3	27,3	21,9	20,0
	AU (mg/dL) ^b	-	2,00	2,05	2,58	2,60	2,82	2,00	3,16	--	2,28
Outras Análises	COL (mg/dL) ^d	-	<100	<100	<100	<100	<100	<100	105	107	<100
	TRIG (mg/dL) ^f	-	122	116	131	120	144	118	123	--	130
	GLIC (mg/dL)	-	85	111	113	109	126	117	90	112	112

TGO- Transaminase oxaloacética (AST- aspartatoaminotransferase), TGP – aminotransferase glutâmico-pirúvica (ALT- alanina aminotransferase), GGT – gama glutamiltransferase, URE – ureia, ALP – fosfatase alcalina, AU – ácido úrico, BIL – bilirrubina, COL – colésterol, CRE – creatinina, TG – triglicerídeos. Médias expressas com valores inferiores ao limite máximo de leitura imposta pelo equipamento ^a < 5,00 U/L, ^b < 2,00 mg/dL, ^c < 0,500 mg/dL, ^d < 100 mg/dL, ^e 0,500 mg/dL, ^f < 70,0 mg/dL. Valores destacados em vermelho permanecem fora da normalidade estabelecida na tabela 30.

O hemograma é um exame de grande importância tanto na área veterinária quanto para os humanos. Constitui um dos mais explorados recursos primários para apontamento de desequilíbrio orgânico que pode nortear uma investigação mais acertiva. A ingestão de substâncias tóxicas, inclusive plantas como outros produtos naturais, podem alterar as concentrações das células sanguíneas (Barros & Davino, 2014; Melo et al.; 2012). Baixas concentrações de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido (causado hemodiluição), bem como a elevação destes parâmetros caracteriza doenças de diversas etiologias (Oduola et al., 2007).

Os resultados obtidos com administração de doses repetidas do vouacapano *m/z* 404 demonstraram que o composto não provocou alterações significativas no hemograma dos animais, apontando apenas para uma discreta elevação dos Leucócitos para dois animais na dose de 100mg/kg e 3 animais na dose de 300mg/kg. Os leucócitos são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória, embora plaquetas e eritrócitos também participem. Os leucócitos são classificados em neutrófilos (40%-75%), linfócitos (20%-50%), monócitos (2%-10%), eosinófilos (1%-6%) e basófilos (<1%). Destes, os neutrófilos são os mais importantes na patogênese da inflamação. São as células predominantes nas primeiras 6 a 24 horas nas inflamações agudas (Hall & Bravo-Clouzet, 2013).

Observou-se, na Tabela 41, uma diferença significativa na incidência de neutrófilos para o grupo tratado na dose de 300mg/kg com aumento de 31% ($59,20 \pm 3,13$) em relação ao grupo satélite, resultado que corrobora com o apontamento verificado no hemograma com a elevação de WBC para três animais do grupo. A elevação dos neutrófilos pode apresentar diversas causas.

O grupo tratado com a maior dose (300 mg/kg), reúne resultados que podem ser indicativo de toxicidade. Na elevação dos neutrófilos, 4 animais com alteração de WBC maior que os valores de referência e 8 animais apresentando trombocitose.

A trombocitose, concentração de plaquetas no sangue acima dos valores normais de referência, embora a literatura a apresente como um dado inespecífico comum em medicina veterinária (McGavin & Zachary, 2011), na imensa maioria dos casos, é reativa a outro processo doentio, aparentemente não relacionado. Exemplos de condições associadas a essa trombocitose incluem doenças inflamatórias, deficiência de ferro, hemorragia, endocrinopatias e neoplasia. Os fatores que podem contribuir para a trombocitose reativa incluem o aumento na concentração do hormônio trombopoietina no plasma, citocinas inflamatórias como, exemplo, a IL-6 ou mesmo catecolaminas. Neste caso podemos citar a presença da adrenalina ou da noradrenalina produzidas em excesso em situações de estresse do animal. A trombocitose pode também ocorrer como parte de uma resposta regenerativa em organismos que se recuperam de trombocitopenia (Haschek et al., 2010).

Como citado anteriormente, alguns estudos citam a Trombopoitina como agente protagonista na variação da concentração de plaquetas (Laurence et al.2012).

Tabela 41: Contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo de animais tratados com vouacapanos *m/z* 404, analisado por microscopia. Média de células diferenciadas a cada 200 células contadas.

	Satélite	Veículo	<i>m/z</i> 404 30mg/kg	<i>m/z</i> 404 100mg/kg	<i>m/z</i> 404 300mg/kg
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Linfócitos	139,9 ± 9,84	142,0 ± 2,93	145,9 ± 3,51	136,4 ± 6,23	141,3 ± 3,32
Monócito	4,8 ± 1,05	5,00 ± 0,52	4,66 ± 0,52	5,40 ± 0,76	4,10 ± 0,84
Neutrófilo	45,10 ± 8,60	33,00 ± 3,04	36,20 ± 3,54	49,33 ± 5,21	59,20 ± 3,13*
Basófilo	0,6 ± 0,4	2,10 ± 0,56	0,20 ± 0,13	0,44 ± 0,17	0,73 ± 0,13
Eosinófilo	2,20 ± 0,69	1,80 ± 0,59	3,10 ± 0,62	2,11 ± 0,75	2,10 ± 0,31

* $p \leq 0,05$. Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA) DP=desvio padrão da média.

Outro resultado de suma importância para os animais tratados com *m/z*404 foi a elevação da transaminase TGP (ou ALT – alanina aminotransferase) para 2 de 10 animais tratados com a dose de 100mg/kg e 6 em 9 animais tratados com a dose de 300mg/kg.

A TGP – transaminase glutâmico pirúvica é uma enzima que catalisa a reação de transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α -cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico. É encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos, mas também no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e células vermelhas do sangue. Embora seja um marcador de dano hepático,

quando qualquer um desses tecidos é danificado, a TGP é liberada no sangue e sua concentração aumenta (Evans, 2009b).

De acordo com Kaplowitz (2001), uma lesão hepatocelular pode ser diagnosticada estabelecendo uma correlação simples entre duas enzimas ($TGP/ALP \geq 5$) ou se o resultado de TGP for duas vezes maior que o valor limítrofe ou se a razão for maior ou igual a cinco. Com base nesta teoria, dos animais que exibiram aumento relativo da transaminase hepática TGP, apenas um animal da dose de 300mg/kg demonstrou potencial dano hepatocelular por meio deste cálculo animal 5.8 ($TGP/ALP \geq 5$ $241/39,5=6,10$) (Tabela 40).

Outra observação realizada para os animais tratados com vouacapano *m/z* 404 foi a redução de colesterol total para 2 animais da dose de 30 mg/kg, 6 animais da dose de 100 mg/kg e 6 animais da dose de 300 mg/kg.

ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Ao final do teste (110º dia) os animais tratados com vouacapano *m/z* 404 nas doses de 30, 100 e 300mg/kg foram necropsiados e os cortes histológicos dos órgãos foram analisados pelo Médico patologista Dr. Paulo Newton Danzi Salvia.

Todos os animais, bem como seus respectivos controles apresentaram condições de normalidade para os seguintes órgãos: cérebro/cerebelo, ovários/ útero, coração, glândulas adrenais, baço, intestino delgado/intestino grosso, rins e estômago.

Três animais da dose de 300mg/kg e dois animais da dose de 100mg/kg apresentaram esteatose microgoticular hepática (Figura 26). Macroscopicamente, o fígado dos animais não apresentou qualquer alteração, no entanto, microscopicamente foi observado infiltrado linfocítico (células inflamatórias) do corte histológico do fígado do animal 5.8 em região centrolobular (Figura 28). Este encontrado, associado ao alto índice de TGP sistêmica deste animal, configura dano hepatocelular e hepatotoxicidade aguda.

O fígado é o principal órgão de eliminação de drogas. Parte da hepatotoxicidade de compostos esteróides, por exemplo, é decorrente da formação de metabólitos que

interferem na eliminação da bilirrubina podendo ocorrer acúmulo de bile nos capilares biliares da porção central dos lóbulos hepáticos. As células hepáticas geralmente sofrem apenas pequenas mudanças histológicas e continuam viáveis (Barros & Davino, 2014). As células deste órgão estão envolvidas em muitas vias metabólicas dos lipídios, tais como a oxidação de triglicérides para produzir energia, a produção de lipoproteína, a conversão do excesso de hidratos de carbono e proteínas em ácidos graxos e triglicerídeos, ou de síntese de colésterol e fosfolípidos (Suciu, et al., 2015).

Figura 28: Corte histológico do fígado demonstrando infiltrado linfocítico em região centrolobular (setas).



Aumento de 400x. Coloração: Hematoxilina/eosina 1- Veia centrolobular 2- Infiltrado linfocítico

A toxicidade hepática é um problema clássico citado como consequência do uso de muitos medicamentos, dentre os quais se destacam os anti-inflamatórios como a nimesulida, cujo mecanismo de toxicidade ainda não está bem esclarecido (Araújo, 2012), ou o paracetamol (acetaminofeno) que é citado como o maior causador de insuficiência hepática na Europa, Estados Unidos, Canadá e Austrália (Suciu, et al., 2015). Essa toxicidade pode ser desencadeada por vários mecanismos tais como a biotransformação de xenobióticos mediada por enzimas do citocromo P450(CYP), a depleção de ATP, a ligação a

constituintes citoplasmáticos e nucleares, interferências no RNA, estresse oxidativo e peroxidação lipídica, hipersensibilidade mediada pelo sistema imune, inflamação, apoptose de hepatócitos e desequilíbrio na homeostasia do cálcio (Tarantino, 2009).

Quando provocada pelo uso de medicamentos, a toxicidade hepática pode ser classificada como hepatocelular, quando os níveis séricos de TGP se elevam, ou mista caso ocorra à elevação concomitante de TGO; já a colestática é caracterizada pela elevação de bilirrubina e fosfatase alcalina simultaneamente a TGP. A toxicidade hepatocelular é a mais frequente que se manifesta de forma aguda, enquanto que as do tipo colestática e mista desenvolvem doença crônica mais frequentemente (Tajiri, 2008).

Vários mecanismos de defesa são ativados em caso de agressão aos hepatócitos como a hipertrofia do retículo endoplasmático, indução de sistemas de proteção enzimáticos, ou pela síntese de proteínas da fase aguda e proteínas 'heat shock' (choque térmico). Se persistente, a toxicidade hepática induzida por fármacos pode levar a necrose e/ou apoptose não só dos hepatócitos, como também dos colangiócitos, células de Kupffer, células de Ito e das células endoteliais sinusoidais, evoluindo para insuficiência deste órgão (Gattagliano, et al., 2009)

Foi observado para o animal 5.8, pertencente ao grupo da dose de 300mg/kg do vouacapano *m/z*404, administrada doses repetidas por via oral, elevação da TGP, principal marcador de dano hepático e a correlação desta com a fosfatase alcalina maior ou igual a 5; esteatose hepática microgoticular e infiltrado linfocítico em espaço centrolobular. Estes resultados são condizentes com dano hepatocelular.

No decorrer das análises clínicas diárias os animais permaneceram estáveis e não manifestaram qualquer sintoma de injúria. No entanto, este animal com diagnóstico de dano hepático representa 10% da população testada com esta dose do vouacapano, sugerindo que outros estudos de hepatotoxicidade sejam realizados para o composto *m/z*404.

O composto *m/z* 404, utilizado para tratamento dos animais é a mistura dos isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-

vouacapano-17 β -oato de metila, que apresentam-se como compostos majoritários nos extratos mais apolares da espécie *Pterodon pubescens* (Servat, 2012).

Tem sido postulado que a toxicidade das drogas está associada aos seus metabólitos reativos. Estudos demonstraram que compostos furânicos tem seu metabolismo mediado pela cadeia microssomal hepática com especificidade para o Citocromo P-450 gerando o metabólito tóxico cis-2-buteno-1,4 dial, citado como sendoprotagonista de hepatotoxicidade e carcinogenicidade. A intoxicação por furano é marcada pela elevação sérica de γ -GT, colésterol, triglicérides e bilirrubina (Junet al., 2008; Hamadeh et al. 2004), no entanto, não foi observado a elevação específica para as transaminases TGO e TGP e ao contrário, foi constatado uma redução para os níveis de colésterol.

Um exemplo de vouacapano tóxico é a Teucrina A, um diterpenóide encontrado na espécie *Chamaedrysteuchrium*, usado como um adjuvante para dietas de emagrecimento. O anel furânico presente na Teucrina é oxidado pela CYP3A4 à epóxido reativo que reage com as proteínas CYP3A e hidrolase. O epóxido reativo leva a transcrição da permeabilidade mitocondrial, ativação de caspases e apoptose de hepatócitos em ratos e camundongos. Ocorre também depleção da glutatona hepática o que aumenta o cálcio intracelular e isso pode levar a formação de enzimas e fragmentação do DNA (Zhou et al., 2004)

Com base nos dados da literatura e na possibilidade da participação deste anel furânico em qualquer evento tóxico, outros testes mais específicos são necessários a fim de investigar mecanismos de toxicidade em enzimas hepáticas e genotoxicidade. Para tanto se realizou ensaio do Cometa *in vitro* com o extrato EBD e com os vouacapanos m/z 404 para evidenciarmos possíveis danos ao material genético.

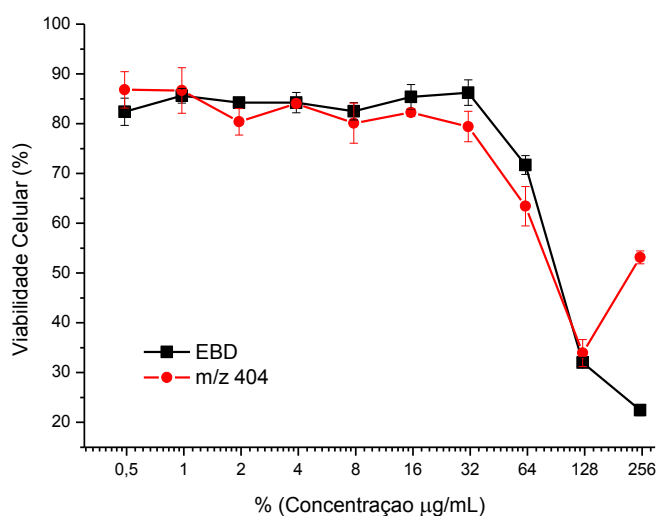
5.2.5. Determinação da concentração das amostras em teste de viabilidade celular

Inicialmente foi verificada a viabilidade celular pelo teste de atividade antiproliferativa, avaliando a atividade citotóxica de 10 concentrações das amostras do extrato EBD e vouacapano m/z 404. A partir de então, selecionou-se a maior concentração de

cada amostra que exibisse de 80 a 90% de viabilidade para a linhagem celular. Estas concentrações foram utilizadas como a maior concentração nos testes para verificação da genotoxicidade das amostras.

Observou-se através do gráfico de viabilidade (Figura 29) que a maior concentração, não citotóxica, para ambas as amostras que atendeu ao objetivo foi de aproximadamente 30µg/mL. Esta concentração foi então selecionada para a continuidade aos estudos de genotoxicidade e mutagenicidade.

Figura 29: Avaliação da viabilidade celular do extrato bruto diclorometânico e vouacapanos *m/z* 404, em cultura de células CHO-K1, correlacionando a viabilidade celular *versus* concentração das amostras, após 24 horas de exposição.



5.2.6. Teste do cometa – Avaliação de genotoxicidade

Esta técnica foi empregada para avaliar os danos no DNA de células individuais CHO-K1, causados pelas substâncias testadas (EBD e isômeros vouacapano *m/z* 404). Este teste é um dos recursos utilizados para detecção do potencial genotóxico de substâncias. As vantagens deste, frente a outros testes, está na sua aplicabilidade a vários tecidos e tipos

celulares específicos, sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos no DNA e necessidade de utilizar um pequeno número de células por amostra (Ribeiro et al., 2003)

O termo genotoxicidade é amplo e refere-se ao efeito potencial de causar danos no material genético, que não está necessariamente associado com mutagenicidade. O termo mutagenicidade refere-se a alterações permanentes na estrutura do material genético da célula ou de um organismo, que podem ser transmitidas e resultar em mudanças hereditárias nos organismos (SCCNFP 2003).

O método do cometa foi desenvolvida por Ostling e Johanson (1984) sendo baseado na eletroforese de células embebidas em gel de agarose. As células são previamente lisadas por um agente detergente e tem suas proteínas nucleares extraídas por altas concentrações de sais, expondo o DNA ao relaxamento. Em caso de quebra deste DNA, sua exposição à corrente elétrica resulta em uma migração proporcional ao número de quebras gerando uma imagem que lembra um cometa (Collins, 2004; Singh, 2015)

O potencial genotóxico *in vitro* foi avaliado por meio da detecção de quebras de fita única de DNA e de lesões em sítios alcali-sensíveis em células CHO-K1, foram expostas ao extrato bruto (EBD) e aos isômeros de aflatocina $m/z404$ nas concentrações de 0,3, 3 e 30 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 horas. As suspensões celulares, em lâminas de agarose, foram submetidas à eletroforese e posteriormente analisadas com brometo de etídio em microscópio de fluorescência. Para cada concentração da amostra testada realizou-se análise em triplicata. Foram analisados 70 nucleóides por lâmina, 3 lâminas por tratamento. O potencial genotóxico foi avaliado considerando a porcentagem de fragmentação de DNA de cada nucleóide e o *Tail Moment* (uma correlação matemática entre a % de fragmentação de DNA e comprimento relativo do cometa). Os resultados do ensaio cometa foram analisados por testes não paramétricos (quando a variável populacional analisada não segue distribuição normal) e cada descritor (nucleóide) foi analisado individualmente.

As amostras e suas respectivas concentrações foram comparadas ao controle de células CHO-K1 não tratadas (controle negativo) e controle de células tratadas com MMS (metilmetanosulfonato) determinado como controle positivo de fragmentação do DNA. Sua

escolha foi por ser um agente clastogênico de ação direta cujo mecanismo de ação acontece em especial pela sua capacidade de alquilar moléculas nucleofílicas do DNA. Células também foram tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido), solvente utilizado na solubilização das mesmas, com o objetivo de monitorar a participação deste em possíveis eventos de toxicidade.

Tabela 42: Resultado da atividade genotóxica em células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e *m/z* 404 nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µg/mL.

	FRAGMENTAÇÃO DO DNA (%)	TAIL MOMENT
	Média ± EP	Média ± EP
MMS(4,7µM)	94,17 ± 0,28	403 ± 4,88
CÉLULAS	7,69 ± 0,56	6,27 ± 0,75
DMSO	11,10 ± 0,76	6,96 ± 0,89
EBD 0,3µg/mL	11,49 ± 0,65*	7,86 ± 0,66
EBD 3µg/mL	12,10 ± 0,65**	10,67 ± 0,87
EBD 30µg/mL	13,12 ± 0,70***	7,86 ± 0,55
<i>m/z</i> 404 0,3µg/mL	6,63 ± 0,66	2,53 ± 0,28
<i>m/z</i> 404 3µg/mL	12,17 ± 0,78*	9,42 ± 0,86
<i>m/z</i> 404 30µg/mL	16,95 ± 1,25**	23,37 ± 3,44***

Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle Células (controle negativo). EP = erro padrão da média

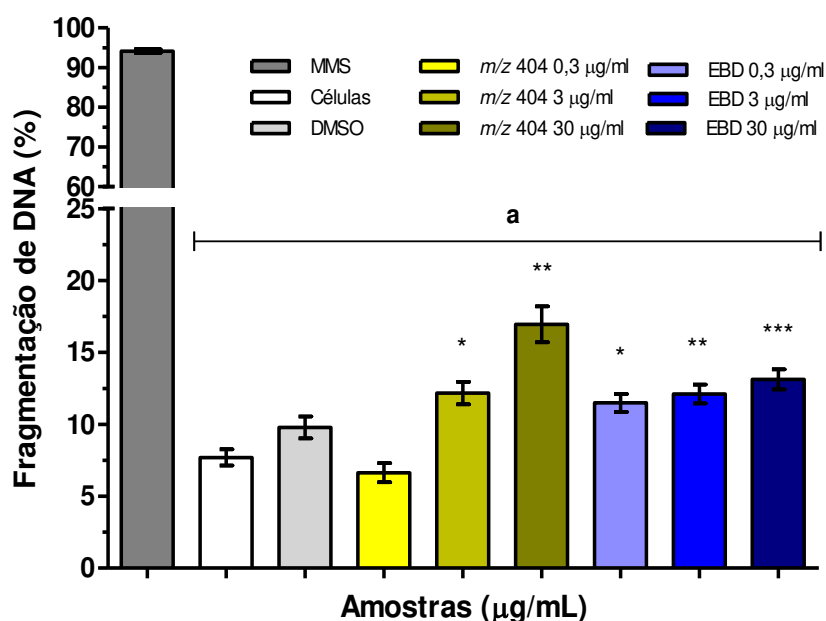
Os resultados de danos ao DNA são diversos e geralmente adversos. Efeitos agudos surgem de metabolismo perturbado do DNA, provocando a parada do ciclo celular e/ou a morte celular. Os efeitos em longo prazo resultam de mutações irreversíveis que contribuem para a oncogênese (Hoeijmakers, et al., 2001). Na Tabela 42, encontram-se relacionados os resultados expressos em média ± erro padrão da média para ambos os parâmetros analisados. As amostras EBD 30 µg/mL (13,12 ± 0,70), 3 µg/mL (12,10 ± 0,65) e 0,3 µg/mL (11,49 ± 0,65), bem como *m/z* 404 30 µg/mL (16,95 ± 1,25) e 3 µg/mL (12,17 ± 0,78)

foram estatisticamente diferentes do controle de células e exibiram uma maior porcentagem de fragmentação de DNA.

Para o parâmetro *Tail moment*, apenas a maior concentração do *m/z*404 30µg/mL ($23,37 \pm 3,44$)apresentou diferença estatisticamente significativa do controle de células. Os resultados também foram expressos nas Figuras 30 e 31.

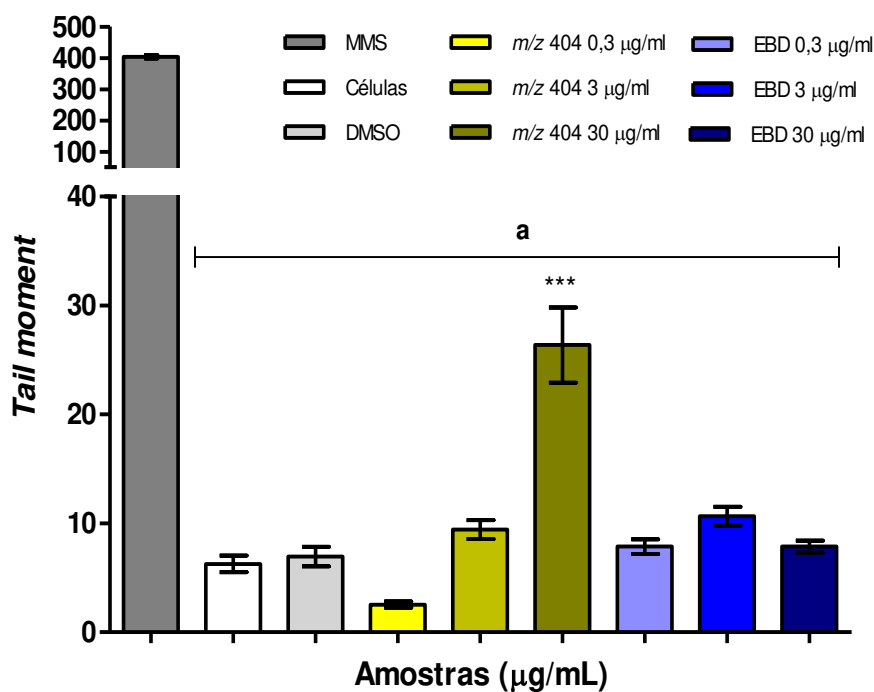
Ao compararmos esses valores, bem como os controles de célula ($7,696 \pm 8,236$) e DMSO ($9,775 \pm 11,10$), ao controle positivo com característica genotóxica MMS ($94,17 \pm 3,552$), pode-se sugerir que as amostras não apresentam fragmentação do DNA suficiente para serem classificadas como genotóxicas. Fato que pode ser confirmado pelo parâmetro *Tail moment*, demonstrando que apenas a amostra do vouacapano *m/z*404 em sua maior concentração apresentou cometas com maiores caudas após a corrida eletroforética.

Figura 30: Fragmentação de DNA (expresso em %) em células CHO-K1 expostas por 4 horas às amostras EBD e *m/z* 404 nas concentrações (0,3, 3 e 30µg/mL) .



Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle Células (controle-). ^a $p < 0,001$ comparado ao MMS (controle +) EP = erro padrão da média

Figura 31: *Tail moment* (Relação entre % de DNA fragmentado e comprimento do cometa) de células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e *m/z* 404 nas concentrações (0,3, 3 e 30 µg/mL).



Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle Células (controle-). ^a $p < 0,001$ comparado ao MMS (controle +) EP = erro padrão da média

5.2.7. Teste de indução de micronúcleos – Avaliação de mutagenicidade

Uma das grandes preocupações da toxicologia é atestar a segurança de substâncias utilizadas no tratamento de doenças e garantir que seu benefício seja exponencialmente menor que possíveis danos ao organismo (Azevedo et al., 2003). A mutagenicidade é comumente associada ao aparecimento do câncer e, embora não seja uma maneira de medir carcinogenicidade, por ser uma consequência do dano no DNA e significar um estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos, especialmente os químicos, iniciam a formação de um tumor (Kanai, 2008; Wenzel e Röthlisberger, 2008)

As concentrações testadas foram determinadas a partir do teste preliminar de viabilidade celular com o propósito de eleger a maior concentração não tóxica para as células (Figura 29). Nas análises das células binucleadas, evitou-se a contagem de células com formato irregular, núcleos com tamanhos muito diferentes. Cuidados tomados para não

confundí-las com células multinucleadas, células estas que podem apresentar alta frequência de micronúcleos (OECD 487, 2010).

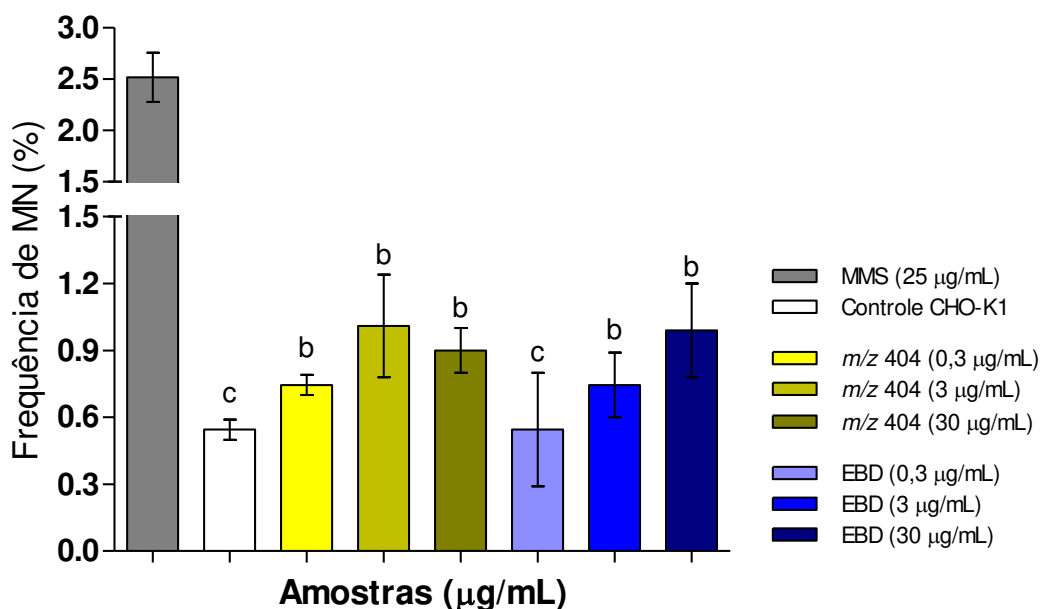
A escolha do controle positivo MMS foi baseada em sua capacidade de alquilar moléculas nucleofílicas como o DNA (agente clastogênico de ação direta), visto que todas as bases deste ácido possuem sítios susceptíveis à alquilação, especificamente no nitrogênio e oxigênio (Beranek, 1990; Moore et al., 1991; Tao et al., 1993; Jenkins et al., 2005).

O Índice de Proliferação Pós-Bloqueio da Citocinese (CBPI) indica o número médio de ciclos que cada célula sofre durante período de exposição à citocalasina B e pode ser utilizado para calcular a proliferação celular. RI indica o número relativo de núcleos nas culturas tratadas, em comparação com o controle negativo das culturas e pode ser usado para calcular a porcentagem de células citostáticas, que corresponde à inibição do crescimento celular (Kalweit et al., 1999; Fenech, 2000). Assim, o RI é uma forma de comparação do número de células binucleadas ou multinucleadas que se encontra em processo de divisão e quanto maior o seu valor, menor será a quantidade de células citostáticas, conseqüentemente, menor será a citotoxicidade da amostra.

Na Tabela 43 estão descritos os valores referentes à CBPI, RI e Frequência de MN. Observou-se que todas as amostras apresentaram RI superior a 90%, conseqüentemente citotoxicidade abaixo de 10% e CBPI acima de 1,7. Estes dados confirmam ausência de citotoxicidade para as concentrações e tempos de exposição testados.

Na Figura 32 e Tabela 43 observa-se que as amostras EBD e *m/z* 404 ainda que a frequência de MN tenha demonstrado ser concentração dependente, não foi estatisticamente diferente do controle negativo (células CHO-K1 sem exposição ao tratamento). Este resultado corrobora com dados da literatura que relatam a ausência de mutagenicidade para óleo extraído da *Pterodon pubescens* (Sabino et al., 1999b; Assunção et al., 2015)

Figura 32: Frequência de MNs (%) de células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e *m/z* 404 nas concentrações (0,3, 3 e 30 µg/mL)



Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA). b= $p < 0,05$ e c= $p < 0,01$ comparado ao MMS (controle +) EP = erro padrão da média

Tabela 43: CBPI, RI e Frequência de micronúcleos em células CHO-K1 expostas por 4 horas do EBD e *m/z* 404 nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µg/mL .

	CBPI	RI %	Frequência de MN (%)
	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP
MMS (4,7µM)	1,83 ± 0,02	100	2,52± 0,24
CÉLULAS	1,81 ± 0,01 ^c	98,7	0,54± 0,04
EBD 0,3µg/mL	1,90 ± 0,005 ^c	108,2	0,54 ± 0,25
EBD3µg/mL	1,86 ± 0,02 ^b	103,5	0,74 ± 0,14
EBD30µg/mL	1,85 ± 0,02 ^b	101,9	0,99 ± 0,21
<i>m/z</i> 404 0,3µg/mL	1,93 ± 0,01 ^b	111,8	0,74± 0,04
<i>m/z</i> 404 3µg/mL	1,92 ± 0,005 ^b	110,6	1,01± 0,23
<i>m/z</i> 404 30µg/mL	1,93 ± 0,02 ^b	111,3	0,90± 0,10

Teste de Tukey, $p \leq 0,05$ (ANOVA). comparado ao controle Células (controle negativo). b= $p < 0,05$ e c= $p < 0,01$ comparado ao MMS (controle +)

6 CONCLUSÃO

- Os isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metiladenominados vouacapano *m/z* 404, demonstraram toxicidade em teste de toxicidade aguda oral, sendo classificados quanto ao perigo (OECD 423) como GSH Categoria 4, ou seja substâncias com potencial de causar toxicidade nas doses entre 300 – 2000mg/kg.
- O EBD não provocou toxicidade aguda aos animais.
- Resultados bioquímicos e histopatológicos sugerem que a administração de doses repetidas dos isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de metila contribuiu para o aparecimento de lesão hepatocelular em um animal da maior dose testada.
- No teste do cometa, apenas a maior concentração dos vouacapanos *m/z* 404 demonstrou potencial genotóxico para as células em comparação ao controle celular. As demais concentrações tanto do EBD quanto vouacapanos *m/z* 404 alteraram apenas um dos parâmetros analisados quando comparados ao grupo controle negativo. Testes posteriores deverão ser realizados para avaliação de sítios alvos de clivagem do DNA. Resultados apontam para baixo potencial de genotoxicidade quando comparado ao controle MMS.
- EBD e vouacapanos *m/z* 404 não induziram a formação de micronúcleos, confirmando dados da literatura de ausência de mutagenicidade.
- Estes dados possibilitarão a continuidade com estudos clínicos e viabilizarão o desenvolvimento e registro de um medicamento fitoterápico a partir dessa espécie vegetal.

7 REFERÊNCIAS*

- ANVISA, 2004. Minist. Saúde- ANVISA. Resolução – RE nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- ANVISA, 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia. Brasil.
- ANVISA, 2013. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para com condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. Brasil.
- Araldi RP, Melo T, Mendes T, Júnior P, Nozima B, Ito E. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2015. v. 72: 74-82,.
- Araújo MAR. Nimesulide-induced liver injury: a brief review. *Rev. Bras. Farm.* 2012; 93(3): 283-289.
- Arriaga AMC, Castro MAB, Silveira ER, Braz-Filho R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *Journal of the Braz. Chem. Soc.* 2000; 11: 187-190
- Assunção LA, Lemes SR, Araújo LA, Costa CR, Magalhães LG, Moura KK, Melo-Reis PR. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of sucupira oil (*Pterodon emarginatus*). *Genet. Mol. Res.* 2015; 14 (2): 6323-6329
- Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo AM, Padovani CR, Ribeiro LR, Salvadori DM. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2003. 41: 1671-1676.
- Barros SBM, Davino SC. Avaliação da Toxicidade. In Oga, S; Camargo MMA, Batistuzzo JAO. *Fundamentos da Toxicologia*. Ed. Atheneu. 2014. Cap 1.4. 30-36
- Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*. 1990. 231: 11–30.
- Bochner R, Fizon JT, Assis MA, Avelar KES. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu*. 2012 v.14 n.3, p. 537-547.

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 96 p. : il
- Braz Filho, R., Gottlieb, O.R., Viegas Assumpção, R.M., 1970. A Química de Leguminosas Brasileiras. XXVIII - As isoflavonas de *Pterodon pubescens*. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 42 (Suppl.), 111–113.
- Cabral EC, Severt L, Spindola HM, Coelho MB, Sousa IM, Queiroz NC, et al. *Pterodon pubescens* oil: characterisation, certification of origin and quality control via mass spectrometry fingerprinting analysis. Phytochem Anal. 2013. Feb;24(2):184-92.
- Calixto NO, da Costa e Silva MC, Gayer CR, Coelho MG, Paes MC, Todeschini AR. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. Planta Med. 2007.73(5):480-3.
- Cardoso CC, Pinto AC, Marques PR, Gayer CR, Afel MI, Coelho MG, et al. Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. Pakistan J. of Biol Sciences. 2008. 1;11(19):2308-13.
- Carvalho ACB, Dos Santos LA, Silveira D. Regulation of plants and herbal medicines in Brazil Blacpma. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8, 2008. pp. 7–11
- Carvalho ACB, Perfeito JPS, Silva LVC, Ramalho LS, de Oliveira Marques RF, Silveira D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. 2011. Bras. J. Pharm. Sci., 47 , pp. 467–474
- Carvalho JCT, Sertié JAA, Barbosa MVJ, Patrício KCM, Caputo LRG, Sarti SJ, Ferreira LP, Bastos JK. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. J. Ethnopharmacology. 1999. 64: 127-133.
- Casey KL. Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. 96 914: 7668-74

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Coelho MGP, Marques PR, Gayer CRM, Vaz LCA, Neto JFN, Sabino KCC. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodonpubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis J. Ethnopharmacology. 2001. 77 159–164
- Coelho MGP, Reis PA, Castro FL, Gayer CRM, Lopes CS, Costa e Silva MC, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodonpubescens* Benth. Seeds .J. Ethnopharmacology. 2005. 98: 109–116
- Cragg GM & Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta. 2013. 1830 ; 3670–3695
- Cragg GM & Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. Phytoch Rev. 2009. 8: 313-331.
- Cunha ICC, Azeredo FSC, Mendonca ACV, Vieira MSC, Pucci ILC, Valadares MC, et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2009. v. 19, n. 2A, p. 403-411.
- Denny C. Atividade Anti-inflamatória do óleo de Sucupira *Pterodonpubescens* Benth. [dissertação] Piracicaba: FOP Piracicaba, 2002.
- dos Santos Filho D, Vichnewski W, Baker P M, Gilbert B. Prophylaxis of Schistosomiaris. Diterpenes from *Pterodon pubescens*. Acad. Bras. Ciênc. 1972. 44: 51-3.
- Dutra RC, Campos MM, Santos ARS, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacological Research. 2016. Volume 112, Pages 4-29
- Dutra RC, Pittella F, Ferreira AS, Larcher P, Farias RE & Barbosa NR. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. Latin American Journal of Pharmacy . 2009 - 28
- Evans GO, Animal Clinical Chemistry, A Practical Guide For Toxicologists And Biomedical Researchers. 2a.edição, Taylor & Francis Group, LLC Boca Raton, EUA. 2009(a), 338 p.
- Evans GO. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. CRC Press. 2009(b).

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- FDA Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2010.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Research*. 2000. 428: 271-283.
- Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*. 1997. 391: 11-18.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Research*. 2000. 20; 455(1-2):81-95.
- Ferreira RA, Vieira M, Von Pinho EVR, Tonetti OAO. Morfologia da semente e de plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. - Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. *Rev. Brasileira de Sementes*. 2001. V. 23 (1), p. 108-15.
- Ferri MG. Plantas do Brasil. Espécies do Cerrado. Ed. Edgard Blücher. São Paulo. 1969. p12-13
- Gad SC. Animal model in toxicology. CRC Press. Second edition 2006
- Galceran CB, Sertie JA, Lima CS, Carvalho JC. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. *Inflammopharmacology*. 2011. 19(3):139-43
- Grando R. *Pterodon pubescens* Benth.: avaliação da Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso e atividade anti-artrite reumatoide do extrato diclorometano em modelos animais. [dissertação], UNICAMP- FCM, 2013
- Grattagliano I, Bonfrate L, Diogo CV, Wang HH, Wang DQH, Portincasa P. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. *World J Gastroenterol*. 2009. 15(39): 48-65-4876.
- Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. Interpretation and relevance in drug safety evaluation. Fourth edition. Academic Press- Elsevier. 2012.

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Hall J & Bravo-Clouzet R. Anti-Inflammatory Herbs for Arthritis In: Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases Tucson: University of Arizona, 2013. 619–631
- Hansen D, Haraguchi M, Alonso A. Pharmaceuticals properties of Sucupira (*Pterodon* spp.). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010. vol. 46, n. 4
- Harvey AL. Natural products as a screening resource. Current Opinion in Chem. Biol. 2007, 11:480–484
- Haschek WM, Rousseaux CG, Walling MA. Fundamentals of toxicologic pathology. Second edition .Academic Press- Elsevier. 2010. p93-109
- Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.Nature. 2001. Vol 411
- Hoscheid J, Bersani-Amado CA, Rocha BA, Outuki PM, da Silva MA, Froehlich DL, Cardoso MLC. Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodonpubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation.Evid Based Complement Alternat Med. 2013 : 272.795
- <http://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-de-agentes-toxicos>. Acessado em 27/12/2016
- Jacobson TKB, Garcia J, Santos SC, Duarte JB, Farias JG, Kliemann HJ. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. Pesq.Agrop.Tropical.2005. 35(3):163-9.
- Jenkins GJ, Doak SH, Johnson GE, Quick E, Waters EM, Parry JM. Do dose responsethresholds exist for genotoxic alkylating agents? Mutagenesis.2005. 20: 389–398.
- Juiz PJJ, Alves RJC, Barros TF. Use of natural products as adjuvant in the treatment of periodontal disease. Braz. J. of Pharmacognosy. 2010. 20(1): 134-139.
- Jun H, Lee KG, Lee YK, Woo GJ, Park YS, Lee SJ. Correlation of urinary furan with plasma g-glutamyltranspeptidase levels in health men and women. Food and chemical toxicology. 2008. 46 1753-1759.

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Kalweit S, Utesch U, von der Hude W, Madle S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*. 1999. 439: 183-190.
- Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinical pathological diversity of humancancers. *Pathology International*. 2008. 58: 544-558.
- Kaplowitz. Causality Assessment Versus Guilt-by-Association in Drug Hepatotoxicity. *Hepatology*. 2001. v. 33, n. 1, p. 308-310.
- Lanini J, Duarte-Almeida JM, Nappo S, Carlini E. "Natural and therefore free of risks" - adverse effects, poisonings and other problems related to medicinal herbs by "raizeiros" in Diadema/SP. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2009. 19(1A): 121-129.
- Lapa, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões, C. M. O, Shenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2010.
- Laurence L., Ph.D. Brunton, Björn C. Knollman, Bruce A. Chabner .2012. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica -12ª Ed. ARTMED2012*
- Leonhardt V, Leal-Cardoso JH, Lahlou S, Albuquerque AAC, Porto RS, Celedônio NR, Oliveira AC, et al. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2010. 24 (6) , pp. 749-758
- Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 2009. 48 , 46–53.
- Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Doria GAA, Leite BLS, Serafini MR, Albuquerque-Jr RLC. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 2014. Vol. 10, NUM. 03
- Longhi D, Kalil NGN, Laks F. Trombocitopenia induzida por heparina. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2001. vol.23 no.2
- Lorenzi H & Matos FJA. *Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas*. 2ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 512p. 2008

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Lorenzi H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 368p. 2002.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga JRVF . Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova. 2002. 25: 429-438.
- Mariz SR, Cerqueira GS, Araújo WC, Duarte JC, MeloAFM, Santos HB. et al . Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. Rev. bras. farmacogn. 2006 Sep; 16(3): 372-378.
- Marques, D.D., Machado MIL, Carvalho MG, Meleira LAC, Braz-Filho R 1998. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. Journal of the Braz.Chem. Soc. 9: 295-301.
- McGavin, D, Zachary, F.J. 2011.Bases da Patologia Veterinária. Tradução da 4ª Ed. Mosby/Elsevier.
- Melo, MGD, Dória GAA, Serafini MR, AraújoAAS. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. Scientia Plena 20128, 049903
- Menna-Barreto RF, Laranja GA, Silva MC, Coelho MG, Paes MC, Oliveira MM, de Castro SL. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. Parasitol. Research2008103(1):111-7.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.
- Moore MM, Parker L, Huston J, Harrington-Brock K, Dearfield KL . Comparison of mutagenicity results for nine compounds evaluated by HGPRT locus in standard and suspension CHO assays. Mutagenesis. 1990. 6: 77–85.

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Moraes WF, Galdino PM, Nascimento MVM, Vanderlinde FA, Bara MT, Costa EA, Paula JR. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. *Journal Nat Med*. 2012. 66:202–207
- Mors WB, Fascio M, Gilbert B, Mahajan IR, Monteiro MB, Dos Santos Filho D, Vichnewski W,. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochem*. 1976. 15, 201–203.
- Mors WB, Pellegrino J, Santos Filho MF. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.) contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. *An. Acad. Bras. Ciênc*. 1996. suppl. 38, p.325-330.
- Newman DJ & Cragg GM. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010 *Phytoch Rev*. 2012. 75, 311-335
- Newman DJ, Cragg GM, Kingston DG. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. Fourth Edition. 2015. Chapter 5, Pages 101–139.
- Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos ARS, Martins DF. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *Journal of Ethnopharm*. 2012. V. 143, Issue 1, p. 170-8.
- Nunan EA, Carvalho MG, Piloveloso D. Furane diterpenes with anti-inflammatory and pro-inflammatory activity. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1982. V.15 (6), 450.
- Oduola T, Adeniyi FAA, Ogunyemi EO, Bello IS, Idowu TO, Subair HG. Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in Wistar albino rats. *Journal of Medicinal Plant Research*. 2007. v. 1, n. 1, p. 001-4
- OECD, 1998.(a) Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.
- OECD, 1998.(b) Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. Pasupathy, P.; Dhanalakshmi, G.; Ponnusha, B.D.; Ambika, A. Cystatin C: A novel marker for renal failure. *Int J Cur Bio Med Sci*., v. 1, n. 3, p. 120-125, 2011.
- Pasupathy P, Dhanalakshmi G, Ponnusha BD, Ambika A. Cystatin C: A novel marker for renal failure. *Int J Cur Bio Med Sci*. 2011.v. 1(3) 120-125

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Pavanellia MF, Spitzner FL. Heparin-Induced Thrombocytopenia: a Literature Review. *Ciênc Biol Saúde*. 2011. 13: 325-32
- Pereira MF, Martino T, Dalmau SR, Paes MC, Barja-Fidalgo C, Albano RM, Coelho MGP, Sabino KCC. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal-regulated protein Kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012. V. 12, 27.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Editora ULBRA. 2003. Pág 173-198
- Ribeiro SR, Wagner R, Klein B, Denardi C, Dal Forno A.. Caracterização dos compostos voláteis do óleo bruto da Sucupira (*Pterodon emarginatus*). Trabalho apresentado no 5º Simp de segurança alimentar, alimentação e Saúde. 2015.
- Sabino KCC, Castro FA, Oliveira JCR, Dalmau SRA, Coelho MGP. Successful Treatment of Collagen-induced Arthritis in Mice with a Hydroalcohol Extract of Seeds of *Pterodon pubescens* Phytotherapy. *Research* 1999;13, 613–615.
- Sabino KCC, Castro FA, Oliveira JCR, Dalmau SRA, Coelho MGP. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcohol extract of seeds of *Pterodon pubescens*. *Phytotherapy Research*. 1999 (a). V. 13, Issue 7, p 613-15.
- Sabino KCC, Gayer CRM, Vaz LCA, Santos LRL, Felzenszwalb I, Coelho MGP. In vitro and in vivo toxicological study of the *P. pubescens* seed oil Toxic. *Letters*. 1999 (b). 108 : 27–35
- Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Review - Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. 2010. 81, 462–471
- Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Foglio MA. *Pterodon pubescens* Benth. Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays. *J. Braz. Chem. Soc*. 2012. V. 00 (0), 1-10.

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Servat, L .Atividade Antinociceptiva e Anticâncer In Vitro de Microencapsulados Produzidos dom Extrato Bruto e Vouacapanos Obtidos das Sementes de *Pterodon pubescens* Benth. [dissertação], UNICAMP- FOP, 2010.
- Silva MCC, Gayer CRM, Lopes CS, Calixto NO, Reis PA, Passeas CPB, Paes MC, Dalmau SR, Sabino KCC, Todeschini AR, Coelho MGP. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. Pharmacy and pharmacology. 2004. V. 55, p. 135-41.
- Simões CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. 2010. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. da UFSC, p. 247-262.
- Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Rodrigues RAF, Denny C, Sousa IMO, Tamashiro JY, Foglio MA. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens*Benth with Selective *in vitro* Anticancer Activity for Prostate Cell Line.J. Braz. Chem. Soc.2009. 20: 3, 569-575.
- Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, Eberlin MN, Cabral E, Sousa IMO, Carvalho JE, Foglio MA.Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oate methyl éster isolated from *P.pubescens* BMC Pharm.2010. 10:1.
- Spindola HM. Atividade antinociceptiva do óleo das sementes de *Pterodonpubescens* Benth. [dissertação], UNICAMP- FOP, 2006.
- Spindola HM. Atividade antinociceptiva e antitumoral de compostos isolados da *Pterodon pubescens*Benth. (*Leguminosae- Papillonoidea*). [tese], UNICAMP- FOP 2010
- Stratton CF, Newman DJ, Tan DS. . Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015. 25 , 4802–4807
- Suciu M, Gruia AT, Nica DV, Azghadi SMR, Mic AA, Mic FA. Acetaminophen-induced liver injury: Implications for temporal homeostasis of lipid metabolism and eicosanoid signaling pathway. 2015. Vol 242. Pages 335–344
- Tajiri K, Shimizu Y. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. World J Gastroenterol. 2008. 14(44):6774-6785

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Tao KS, Urlando C, Heddle JA. Mutagenicity of methylmethane-sulfonate in vivo at the *dlb-1* locus and a *lac I* transgene. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1993.22: 293–296.
- Torrenegra R, Bauereib P, Achenbach H. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. *Phytochemistry* 1989. 28: 2219-2221.
- Túrmina JÂ. Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (Dissertação) Unicentro/Guarapuava, 2012.
- Veiga-Júnior VF, Pinto AC, Maciel MAM.. Plantas medicinais: Cura segura? *Quím. Nova*. 2005. vol.28 no.3
- Vieira CR, Marques MF, Soares PR, Matuda L, De Oliveira CMA, Kato L, Da Silva CC, Guillo LA. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth, seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine*. 2008 Jun;15(6-7):528-32.
- Wenzel F, Röthlisberger B. Impact of tumorcytogenetics in tumor diagnostics. *Therapeutische Umschau*. 2008. 65: 473-480.

* De acordo com as normas da FOP/UNICAMP, baseadas na padronização do *International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

ANEXO 1



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

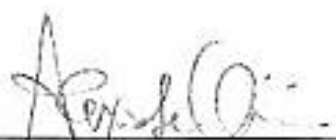
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação de toxicidade aguda oral e dose-repetidas de extrato bruto e diterpenos obtidos da espécie *Pterodon pubescens Benth*" (protocolo nº 3727-1), sob a responsabilidade de Dra. Mary Ann Foglio / Vanessa Helena Da Silva Souza, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

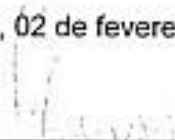
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de fevereiro de 2015.

Campinas, 02 de fevereiro de 2015.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva