

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE
PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO COM ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA.

VINÍCIUS PEREIRA ARANTES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE
PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO COM ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA.**

VINÍCIUS PEREIRA ARANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

ARARAQUARA - SP

2009

DEDICO,

Rabbi

“Ao Mestre e Senhor de todos os povos, aquele que não faz distinção de raça ou credo, Pai e Senhor de toda criatura que sobre a terra vive e habita. Meu Senhor e meu Deus”

“Aos meus pais, Agripino de Oliveira Arantes e Erude Pereira Arantes que durante estes anos renunciaram a vários sonhos, para que os meus pudessem ser realizados. A minha irmã Ana Célia Arantes dos Santos e Família. Palavras que expressam meus sentimentos de Amor e gratidão”.

“Aos homens de boa vontade que com livros e artigos, conseguem transformar e promover expectativas em saúde e qualidade de vida”

“Aos professores e amigos”.

**“Aos momentos de reflexão, cumplicidade, expectativas e esperanças.
Palavras importantes para todo pós-graduando”**

“Neste momento, gostaria de dedicar este trabalho a Patrícia Dolfini, companheira, amiga e fiel. Seus sorrisos abrilhantaram esta conquista. E para todos os homens que através de gestos, palavras ou um simples semblante de alegria acabaram por auxiliar nos propósitos aqui apresentados”

Muito Obrigado!

Breve relato de minha história:

Aos dezesseis dias do mês de julho de 1977 na cidade de Apucarana estado do Paraná, nascia Vinícius Pereira Arantes, filho de Agripino de Oliveira Arantes e Erude Pereira Arantes, pais comprometidos com a família e com a educação de seus filhos. O início dos estudos, as primeiras professoras, os amigos, as viagens, a primeira moradia longe da casa dos pais.

O primeiro grande desafio: O início do curso de Farmácia em 1998 Na Unipar - Paranavaí, neste momento foi possível formar as primeiras bases, os primeiros sonhos, os primeiros contatos com a ciência. Em 2001 a graduação e logo em seguida a Habilitação em Análises Clínicas.

O segundo grande desafio: O Mestrado em Análises Clínicas (MsC) 2003 - 2005, a UNESP- Araraquara foi a Universidade de escolha, momento ímpar em promover e alavancar um pouco das vontades em produzir ciência.

O terceiro grande desafio: Iniciar o Doutorado em 2006 também na UNESP – Araraquara-SP, dificuldades de transporte, a distância, os momentos de solidão, as reflexões no estudo laboratorial. Durante 6 anos foram percorridos 313.920 km para adicionar em minha história mais uma grande vitória.

Agripino, Erude e Ana Célia Arantes dos Santos. Feliz é o homem que pode contar com uma família. Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

“A Universidade Paranaense – Unipar, professores e funcionários”.

“A Universidade Estadual Paulista – UNESP, setor de pós-graduação e professores”.

“Aos colegas de trabalho laboratorial: Guilherme, Gabriela, as técnicas do PANT, Maria e Valéria”.

“Ao Professor Amauri Antiquera Leite e funcionários do laboratório de Análises Clínicas da UNESP-Araraquara”

“Aos funcionários da Biblioteca”

Obrigado.

AO ORIENTADOR:

Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

“Gostaria de agradecer o incentivo à investigação, o convívio, a orientação científica e os momentos de esclarecimentos. A evolução deste trabalho teve sua avaliação e seus ensinamentos, os meus mais sinceros e efusivos agradecimentos”.

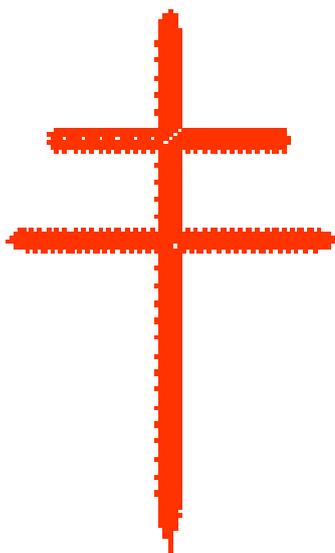
Muito Obrigado.

“Por um mundo sem tuberculose”

Segundo o relatório da OMS

“A OMS alerta que o patamar atual de multirresistência no mundo é o mais alto já registrado. O relatório da organização é baseado em dados coletados de 2002 a 2006, referentes a 90 mil pacientes de 81 países. A OMS estima que ocorra meio milhão de novos casos de tuberculose multirresistente por ano no mundo, o que equivale a 5% dos 9 milhões de novos casos da doença, de todos os tipos, registrados anualmente.”

(WHO. ANTI-TUBERCULOSIS- DRUG RESISTANCE IN THE WORLD. REPORT NO.4.2006)



Símbolo da luta contra a Tuberculose no mundo...

SUMÁRIO

	Página
<i>Lista de Abreviaturas</i>	08
<i>Lista de Tabelas</i>	10
<i>Lista de Figuras</i>	12
<i>Resumo</i>	20
<i>Abstract</i>	21
1.0 Introdução	22
2.0 Objetivos	35
3.0 Material e Métodos	36
3.1 Material	36
3.1.1 Extratos Vegetais	36
3.1.2 Controle dos extratos vegetais	38
3.2 Método	38
3.2.1 Toxicidade a curto prazo	38
3.2.2 Toxicidade a médio prazo	39
3.2.2.1 Teste de palatabilidade	39
3.2.2.2 Avaliação de toxicidade	40
3.2.2.3 Coleta do material	40
3.2.2.4 Análise do perfil bioquímico	41
3.2.2.5 Hemograma	41
3.2.2.6 Análises Histopatológicas	42

3.2.2.7 Análises de urina	43
3.2.2.8 Análise estatística	43
4.0 Resultados	44
5.0 Discussão	77
6.0 Conclusão	82
7.0 Referências Bibliográficas	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanino aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato aminotransferase
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BSP	Sulfobromoftaleína
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNEAO	Dose nenhum efeito adverso observado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E M B	Etambutol
ETH	Etionamida
FDA	Food and drugs administration
GL	Gay-Lusac
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HM	Hemácias
Ht	Hematócrito
INH	Isoniazida
Kg	Quilograma

LEU	Leucócitos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOTT	Micobactérias outras que não <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MS	Ministério da saúde
NOAEL	No observed adverse effect level
OMS	Organização mundial da saúde
OECD	Organização econômica e cooperação para o desenvolvimento
PCT	Plano de controle da Tuberculose
PLAQ	Plaquetas
PZA	Pirazinamida
RfD	Dose Referência
RMP	Rifampicina
S	Segundo
SM	Estreptomicina
TBMDR	Tuberculose multi-drogaresistente
TP	Tempo de protrombina
V/V	Volume/Volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
VCM	Volume corpuscular médio
γ-GT	Gama glutamiltransferase

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratos submetidos as concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL de extrato bruto de <i>Turnera ulmifolia</i> após 90 dias de exposição	46
Tabela 2 Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratos submetidos as concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL de extrato bruto de <i>Syngonhanthus macrolepsis</i> após 90 dias de exposição	49
Tabela 3 Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratos submetidos as concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL de extrato bruto de <i>Quassia amara</i> após 90 dias de exposição	52
Tabela 4 Perfil hematológico de ratos submetidos as concentrações de 200, 400 e 800µg/mL de extrato bruto de <i>Turnera ulmifolia</i> após período de 90 dias de exposição	55
Tabela 5 Perfil hematológico de ratos submetidos as concentrações de 200,400 e 800µg/mL de extrato bruto de <i>Syngonanthus macrolepsis</i> após 90 dias de exposição	56

Tabela 6	Perfil hematológico de ratos submetidos as concentrações de 200, 400 e 800µg/mL de extrato bruto de <i>Quassia amara</i> após 90 dias de exposição.	57
Tabela 7	Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratas submetidas as concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL de extrato bruto de <i>Turnera ulmifolia</i> após 90 dias de exposição	58
Tabela 8	Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratas submetidas às concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL de extrato bruto de <i>Syngonanthus macrolepsis</i> após 90 dias de exposição	61
Tabela 9	Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratas submetidas as concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL de extrato bruto de <i>Quassia amara</i> após 90 dias de exposição	64
Tabela 10	Perfil hematológico de ratas submetidas as concentrações de 200, 400 e 800µg/mL de extrato bruto de <i>Turnera ulmifolia</i> após 90 dias de exposição.	67
Tabela 11	Perfil hematológico de ratas submetidas as concentrações de 200, 400 e 800µg/mL de extrato bruto de <i>Syngonanthus macrolepsis</i> após de 90 dias de exposição.	68
Tabela 12	Perfil hematológico de ratas submetidas as concentrações de 200, 400 e 800µg/mL de extrato bruto de <i>Quassia amara</i> após de 90 dias de exposição.	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Concentrações de creatinina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de <i>Turnera ulmifolia</i> , em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.	46
Figura 2 Concentrações de uréia no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de <i>Turnera ulmifolia</i> , em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.	47
Figura 3 Concentrações de AST no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de <i>Turnera ulmifolia</i> , em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.	47
Figura 4 Concentrações de ALT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de <i>Turnera ulmifolia</i> em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição..	47
Figura 5 Concentrações de γ -GT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de <i>Turnera ulmifolia</i> , em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.	48

- Figura 6 Concentrações de ALP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia*, em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.. 48
- Figura 7 Concentrações de Bilirrubina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia*, em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.. 48
- Figura 8 Concentrações de TP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia*, em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 49
- Figura 9 Concentrações de creatinina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 50
- Figura 10 Concentrações de uréia no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 50
- Figura 11 Concentrações de AST no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 50

- Figura 12 Concentrações de ALT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 51
- Figura 13 Concentrações de γ -GT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 51
- Figura 14 Concentrações de ALP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 51
- Figura 15 Concentrações de TP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 52
- Figura 16 Concentrações de creatinina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 52
- Figura 17 Concentrações de uréia no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. . 53

- Figura 18 Concentrações de AST no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 53
- Figura 19 Concentrações de ALT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. . 53
- Figura 20 Concentrações de γ -GT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. . 54
- Figura 21 Concentrações de ALP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 54
- Figura 22 Concentrações de Bilirrubina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. . 54
- Figura 23 Concentrações de TP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 55

- Figura 24 Concentrações de creatinina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 58
- Figura 25 Concentrações de Uréia no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 59
- Figura 26 Concentrações de AST no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 59
- Figura 27 Concentrações de ALT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. . 59
- Figura 28 Concentrações de γ -GT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 60
- Figura 29 Concentrações de ALP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 60

- Figura 30 Concentrações de Bilirrubina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 60
- Figura 31 Concentrações de TP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 61
- Figura 32 Concentrações de creatinina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 61
- Figura 33 Concentrações de Uréia no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 62
- Figura 34 Concentrações de AST no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 62
- Figura 35 Concentrações de ALT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 62

- Figura 36 Concentrações de γ -GT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 63
- Figura 37 Concentrações de ALP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 63
- Figura 38 Concentrações de Bilirrubina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 63
- Figura 39 Concentrações de TP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 64
- Figura 40 Concentrações de creatinina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 64
- Figura 41 Concentrações de Uréia no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 65

- Figura 42 Concentrações de AST no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 65
- Figura 43 Concentrações de ALT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 65
- Figura 44 Concentrações de γ -GT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 66
- Figura 45 Concentrações de ALP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 66
- Figura 46 Concentrações de Bilirrubina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 66
- Figura 47 Concentrações de TP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição. 67

Avaliação pré-clínica de extratos vegetais de plantas do cerrado brasileiro com atividade antimicobacteriana.

As plantas medicinais sempre desempenharam papel importante na medicina, e modernamente, ainda são capazes de incrementar o arsenal terapêutico, fornecendo esperança de melhores condições de tratamento para inúmeras doenças. A Tuberculose (TB) é considerada a principal causa de morte em países em desenvolvimento, de grande população e baixo padrão sanitário. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade oral aguda e a médio prazo dos extratos vegetais de *Syngonhanthus macrolepsis*, *Turnera ulmifolia* e *Quassia amara*, em ratos. Para avaliação da toxicidade foram utilizados os protocolos 401 e 408 da “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD). Ênfase foi dada as alterações do perfil bioquímico e histopatológico de fígado e rins. Utilizando Kits avaliou-se a atividade da ALT, AST, γ -GT, ALP, além de uréia, creatinina, bilirrubina e tempo de protrombina. Os cortes de fígado e rins foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica. Mesmo quando se administrou 5000mg/kg, apenas alguns animais apresentaram piloereção e irritabilidade que não alcançaram 8 horas, caracterizando assim baixa toxicidade aguda. Para toxicidade a médio prazo as alterações mais significantes em relação aos respectivos controles foram os níveis de creatinina para o extrato de *T. ulmifolia*. Na avaliação da toxicidade a médio prazo observou-se que o extrato de *T. ulmifolia* apresentou maior toxicidade em comparação aos respectivos controles. As fêmeas foram mais sensíveis que os machos tanto para as análises de função renal quanto hepática. Em geral as fêmeas apresentaram maior toxicidade que os machos. Assim, considerando as DNEAO ao nível renal e hepático, tendo com “end point” alterações bioquímicas que foram as mais sensíveis, para as fêmeas seria 200 μ g/mL e para os machos 400 μ g/mL, gerando RfD respectivamente de 17,5 e 35mg/kg de massa corpórea por dia.

Palavras-chave: Plantas, Avaliação de toxicidade, DNEAO, RfD, Tuberculose.

SUMMARY

Preclinical evaluation of plant extracts of the Brazilian open pasture with antimicrobacteria activity.

The medicinal plants had always played important role in the medicine, and modernly, still are capable to develop the therapeutical armory, supplying hope of better conditions of treatment to innumerable illnesses. The Tuberculosis (TB) is considered the main cause of death in underdeveloped countries, great population and low sanitary condition. The objective of the present work was to evaluate the acute oral toxicidade and subchronic oral toxicity of vegetal extracts of *Syngonhanthus macrolepsis*, *Turnera ulmifolia* and *Quassia amara* in rats. For evaluation of the toxicity protocols 401 and 408 of the "Organization and Development will be Economic Cooperation" (OECD) had been used. Emphasis was given to the changes in the biochemist and histopathologic profile of liver and kidneys. Using Kits it was evaluated activity of the ALT, AST, γ -GT, ALP beyond urea, creatinina, bilirubin and prothrombin time. The cuts of liver and kidneys had been dyed with hematoxylin and eosin and analyzed in light microscopy. Even though when 5000mg/kg bw was given, only some animals had presented heir stand and irritability that had not later than 5h, having thus characterized low acute toxicity. For subchronic toxicity, the most significant changes in relation to the respective controls had been the levels of creatinina for the extract of *T. ulmifolia*. In the evaluation of the subchronic toxicity it was observed that the extract of *T. ulmifolia* presented greater toxicity in comparison to the respective controls. The females had been more sensible than the males as well hepatic as renal function. In general the females had presented greater toxicity that the males. Thus, considering the NOAEL to the renal and hepatic level, having with end point biochemical changes who had been most sensible, for the females would be 200 μ g/mL and for the males 400 μ g/mL which , generating RfD respectively of 17,5 and 35mg/kg of corporeal weight per day.

Key- word: Plants, Evaluation of toxicity, NOAEL, RfD, Tuberculosis.

1. Introdução

As plantas medicinais constituem fonte de importantes substâncias, capazes de auxiliar no arsenal terapêutico, fornecer esperança de melhores condições de tratamento para inúmeras doenças, onde fármacos em uso corrente não estejam expressando boa resolução. A Fitoterapia e Farmacognosia são ciências responsáveis por estudar as plantas com atividade terapêutica. Algumas plantas podem apresentar risco para a saúde, quando utilizadas sem o conhecimento da dose, forma de utilização, parte da planta e até mesmo quando não se conhece a indicação terapêutica (ALMEIDA, 1993).

Para avaliar as condições de uso, faz-se necessário o estudo das plantas comprovando os efeitos terapêuticos, administrando diferentes doses e também direcionando as pesquisas com o intuito de promover o uso com segurança. Para tanto não basta comprovar apenas o efeito terapêutico, é necessário comprovar a inocuidade avaliando os riscos e usos através de estudos de toxicidade, levando em consideração o perfil bioquímico, hematológico e patológico do animal em teste.

Existem inúmeros estudos científicos que comprovam que algumas plantas são tóxicas e mesmo assim são empregadas pela população, em algumas situações, sem restrições (STICKEL et al.,2003). O surgimento do conceito “natural” ou aquilo que pode ser inócuo deve ser comprovado através de testes laboratoriais que atestem segurança do composto a ser utilizado (MENGUE et al.,2001).

Segundo OLIVEIRA et al.(1994) A pesquisa de novas drogas tem por objetivo combater a evolução dos quadros de resistência microbiana. Em relação à Tuberculose, mesmo durante o decorrer do tratamento padronizado,

pode ser diagnosticados quadros de resistência microbiana aos fármacos. As plantas fornecem diferentes produtos ativos e inúmeros acabam sendo empregados como modelos para a pesquisa de novos fármacos. A biodiversidade associada a pesquisa, apresenta indispensável interesse para indústria Farmacêutica e no desenvolvimento de novos medicamentos (CUNHA et al.,1994).

Através de vias metabólicas secundárias os vegetais produzem compostos como os alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e substâncias oleosas, que por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Várias espécies de plantas têm sido pesquisadas e algumas classes de compostos como os terpenóides e fisalinas são responsáveis por atividade biológica contra micobactérias. Estudos evidenciam a importância de componentes de extratos vegetais na síntese de novos produtos farmacêuticos que são eficientes no combate às infecções (CALIXTO & YUNES, 2001)

O uso de plantas pode não ser considerado seguro, em decorrência da diversidade de substâncias encontradas em um organismo vegetal. Muitas vezes a administração ocorre sem orientação. Do ponto de vista toxicológico, é preciso considerar que uma planta medicinal ou um possível fitoterápico, possa apresentar não somente efeitos imediatos, o que é facilmente correlacionado após a ingestão, mas também efeitos não proeminentes após determinado período acarretando hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (YEONG et al.,1993;ABBOT,1988). Portanto, o uso popular e tradicional é insuficiente para validar a utilização de determinada planta ou composto químico obtido de produtos naturais, como eficazes e seguros.

Nesse sentido, efeitos farmacológicos das plantas medicinais devem ser fundamentados em evidências experimentais comprobatórias, bem como os riscos ao utilizá-las sejam devidamente avaliados (BRASIL. Ministério da Saúde,1995).

Assim, revestem de importância os estudos de avaliação toxicológica, garantindo dessa forma a segurança de utilização destes compostos. A legislação brasileira (Resolução 196/96 - CNS) regulamenta as pesquisas pré-clínicas e clínicas para registro de medicamentos, para a utilização de determinada planta medicinal como medicamento, tendo visto a comprovação científica das análises farmacológicas e toxicológicas (BRASIL. Ministério da Saúde,1995).

Em se tratando de planta, uma avaliação da toxicologia pré-clínica deve fornecer um grau de confiabilidade para o uso de um determinado extrato, através da execução dos testes com animais de laboratório, utilizando protocolos estabelecidos internacionalmente para este tipo de avaliação. A avaliação pré-clínica deve contemplar estudos histopatológicos associando as lesões em órgãos afetados com alterações bioquímica plasmática, urinária e hematológica (COBEA,1991).

A determinação dos níveis de toxicidade dos novos compostos vegetais se faz necessário, em virtude da necessidade de comparar estas informações às informações dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de muitas doenças,por exemplo a tuberculose (SIMÕES et al.,2000). A pesquisa de novos compostos ativos contra o bacilo de Koch, não pode abdicar do estudo da toxicidade pré-clínica, pois dada a necessidade de novas drogas mais eficazes contra o bacilo e menos tóxicas, intensifica-se a cada dia, a procura de

novos compostos para o tratamento desta enfermidade (GARRAFA,1983; ARRAIS et al.,1997)

De acordo com estudos de STANGARLIN et al, (1999) apenas 20% da população brasileira tem acesso a todos os tipos de medicamentos disponíveis dispensados nas farmácias e drogarias. Acrescenta ainda o autor que 25% dos medicamentos disponíveis em nossas farmácias possuem em sua composição produtos oriundos de plantas.

A pesquisa por produtos biologicamente ativos e capazes de combater o *M. tuberculosis* tem demonstrado novas opções terapêuticas com o intuito de minimizar o sofrimento da população doente (SWENSON et al.,1985; PIETRO et al., 2000; CANTRELL ET AL. 2001; CALIXTO & YUNES, 2001;JANÚARIO et al., 2002).

Devido aos efeitos colaterais provocados pelos quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose, vários pesquisadores têm saído à busca de alternativas terapêutica para a doença. Nos últimos anos, pesquisadores de inúmeras áreas têm dispensado atenção à pesquisa de princípios ativos em extratos brutos de plantas com atividade antibacteriana (ZACARIAS et al.,1994 GRINBAUM et al.,1995).

A pesquisa de alternativas terapêuticas para o tratamento da tuberculose desencadeou diferentes buscas por substâncias ativas contra micobactérias e que possam desta forma minimizar a dor da população doente. Os extratos de plantas empregados neste trabalho destacam-se entre as citações de uso popular como indicados para o tratamento de afecções respiratórias (*Syngonhanthus macrolepsis*, *Turnera ulmifolia*, *Quassia amara*).

Tuberculose

A Tuberculose (TB) continua sendo um grave problema de saúde pública, considerada a principal causa de morte em países subdesenvolvidos, de grande população e baixo padrão sanitário (BRASIL.Ministério da Saúde, 2002). O aumento do número de casos em países subdesenvolvidos e desenvolvidos está associado à queda da qualidade de vida, aglomerações, infecções pelo “*Human Immunodeficiency Vírus*” (HIV) e “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*” (AIDS) (LEITE & TELAROLLI JUNIOR, 1997; GRANGE, 1998; BRASIL. Ministério da Saúde, 2002; LIVANAINEN et al., 1999).

A tuberculose causada por *M. tuberculosis* inicialmente descrita por Robert Koch em 1882, vem afetando os homens ao longo da história da humanidade (SMITH, 2003). Esta doença é causada pelo gênero *Mycobacterium*, que compreende cerca de 100 espécies, 25 identificadas como sendo patogênicas ao homem. Além do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*) existem espécies saprófitas e outras que atuam como patógenos oportunistas causando enfermidades denominadas de micobacterioses (POZNIAK et al., 1996; RAYNAUD et al., 1998; CORTINAS et al., 2002).

A transmissão da tuberculose pulmonar ocorre a partir da expulsão de gotículas de saliva, ricas em micobactérias. A doença pulmonar é a forma mais comum de acometimento, porém a doença pode acometer outros órgãos, dentre eles os rins, coluna vertebral e sistema nervoso central (SOMMERS et al., 1985; WAYNE & KUBICA ,1986; GOODFELLOW & MAGEE,1998).

Apesar da eficácia dos esquemas terapêuticos utilizados , nos últimos anos tem-se observado um aumento na incidência de tuberculose causada pelo *M. tuberculosis* resistente aos esquemas preconizados para o tratamento da doença, o que pode refletir uma falha no emprego dos referidos programas pré-estabelecidos como eficazes (HOLT et al., 1994; WAYNE & KUBICA, 1986; GOODFELLOW & MAGEE, 1998).

Assim o número de casos da doença tem aumentado nos últimos 10 anos, associada aos três importantes fatores emergenciais, a pobreza enquadra-se como sendo o primeiro deles, o segundo é considerado a associação entre tuberculose e HIV/AIDS e o terceiro fator o aumento considerável nos casos de resistência a drogas antituberculosas. O HIV é fator de risco para a tuberculose, já que o vírus desencadeia fator de imunodeficiência no paciente infectado, acredita-se existir cerca de 4,4 milhões de pacientes infectados simultaneamente com HIV e tuberculose no mundo (FIGUEROA & LÓPEZ, 2000).

A co-infecção pelo HIV e *M. tuberculosis* vem sendo estudada em inúmeros países, onde as infecções ocorrem de forma simultânea e que naturalmente representa problemas para aos órgãos de saúde pública (FIUZA & AFIÚNE, 1993). Podemos admitir que as chances de um indivíduo HIV positivo em desenvolver a doença em comparação a um indivíduo normal é de 25 vezes maior (CHAISSON & STOKIN, 1989; BENETUCCI et al., 1992; BILLO, 1995).

A Organização Mundial da Saúde (2002) estima que ocorram anualmente 1,9 milhões de mortes por tuberculose, 98% delas em países em desenvolvimento, cerca de 350.000 mortes associadas com tuberculose e AIDS. O número anual de novos casos de tuberculose é estimado em 8,7 milhões,

80% estão concentrados em 22 países, dentre eles o Brasil. A TBMDR está presente em 63 países que participaram do inquérito mundial, realizado no período de 1994-1999 (FAIRCHILD & OPPENHEIMER,1998;WHO, 2002).

Os dados representam um grande desafio frente às metas da OMS, que até 2010 pretende detectar 75% dos casos, obter sucesso terapêutico em 85% deles e reduzir o abandono da terapêutica para 5%. Uma das modificações para alcançar tais resultados, foi implantar em 1993 a estratégia Directly Observed Treatment Short Course (DOTS). O programa DOTS, visa executar 5 componentes básicos: “Detecção de casos por baciloscopia entre sintomáticos respiratórios; tratamento padronizado de curta duração diretamente observado e monitorado em sua evolução; fornecimento regular de drogas do sistema de registro; e informação que assegure a avaliação do tratamento e compromisso do governo colocando o controle da TB como prioridade entre as políticas de saúde” (WHO,2006; RUFFFINO-NETO & VILLA,2006).

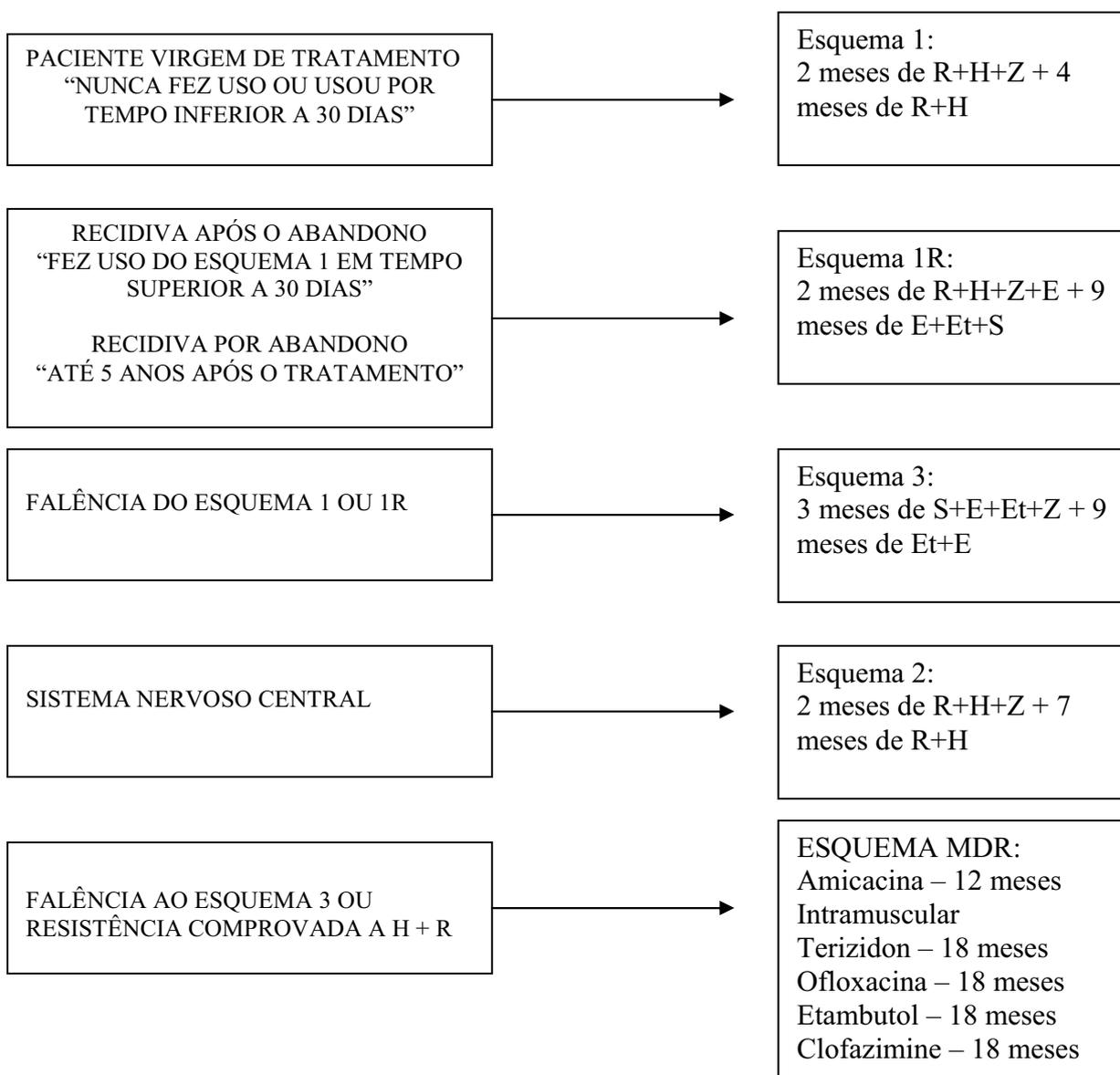
Segundo FUCHS *et al.*,(2004) a toxicidade inerente à utilização de antibacilares na terapêutica da tuberculose sempre foi de conhecimento do clínico. Para o tratamento desta doença, a “Food and Drug Administration” (FDA), cita 10 medicamentos, divididos em duas linhas de tratamento, cuja primeira é composta por: Isonizida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Rifabutina e a segunda, composta por: Cicloserina, Etionamida, Estreptomicina, capreomicina e ácido p-aminosalicílico (VILLAR, 2004).Embassado no FDA o MS preconiza o tratamento segundo o esquema a seguir.

QUIMIOTERAPIA DA TUBERCULOSE, TOXICIDADE E BIOQUÍMICA

Esquema de tratamento da Tuberculose no Brasil

Segundo FMUSP (2006).

O esquema de tratamento preconizado:



Rifampicina (R); Isoniazida (H); Pirazinamida (Z); Etambutol (E); Estreptomina (S); Etonamida (Et);

Multidroga resistência (MDR).

Como a isoniazida, segundo PARFITT et al., (1999), os demais integrantes da primeira linha apresentam toxicidade significativa com efeitos adversos tipo psicótico, convulsivo, elevação de atividade enzimática hepática, anemia, agranulocitose, trombocitopenia e eosinofilia. Pode ainda estar associada a casos de erupção cutânea, febre, hiperglicemia e retenção urinária. A rifampicina é citada como causadora de hepatite, leucopenia, além dos efeitos citados pelo uso da isonizida. O uso de rifampicina pode induzir atividade das enzimas microssomais hepática, aumento de billirrubina sérica, além de promover distúrbios gastrointestinais como náusea, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarréia. O uso freqüente desta droga pode causar nefrite intersticial aguda, glomerulonefrite e proteinúria. Os efeitos tóxicos mais comuns para isoniazida estão ligados à toxicidade hepática e neuropatia periférica (FMUSP, 2006)

A pirazinamida outro medicamento de elevada expressão toxicológica, pode causar hepatomegalia, esplenomegalia e aumenta o risco para hepatite fulminante em pacientes sob o uso associado com rifampicina e isonizida.

Administração de pirazinamida pode levar a danos hepáticos e aumento dos níveis séricos de ácido úrico, podendo causar poliartralgia como efeito colateral comum. Alergia e intolerância gástrica são efeitos comuns. Etambutol, outro fármaco presente no esquema terapêutico pode apresentar diminuição da acuidade visual, anafilaxia, disfunção hepática e neuropatia periférica. A etionamida por apresentar quadros de intolerância gástrica e hepatite tóxica. (FMUSP,2006).

Como os medicamentos conhecidos mais utilizados para o combate a tuberculose atacam tanto o sistema hepático como o sistema renal, julgamos

ser pertinente uma avaliação um pouco mais cuidadosa da integridade bioquímica e funcional do fígado e do rim.

Dano hepático não é uma entidade, a lesão observada depende não somente do xenobiótico envolvido, mas também do período de exposição. Após exposição aguda normalmente encontramos acúmulo de lipídios nos hepatócitos, disfunção hepatobiliar e necrose celular; enquanto cirrose hepática, alterações neoplásicas são resultados de exposições a longo prazo. A diversificada natureza da atividade funcional do fígado e as variadas respostas às injúrias provocadas pelos xenobióticos torna a seleção de apropriados testes para avaliar a hepatotoxicidade, uma tarefa muito difícil (PLAA & CHARBONNEAU, 1994). Assim, as alterações hepáticas podem estar associadas a um aumento das concentrações enzimáticas. Por exemplo, na hepatite tóxica geralmente ALT apresenta-se mais elevada que a AST e nos quadros de colestase extra-hepática e carcinoma hepatocelular, as concentrações podem apresentar elevações semelhantes. Em situações de monitoramento de drogas hepatotóxicas a detecção de AST e γ -GT são fortes indicadores de lesões hepatocelulares em virtude de AST indicar lesão mitocondrial e γ -GT ser extremamente sensível a presença de substâncias hepatotóxicas (MOTTA,1989).

A ALP é uma enzima capaz de realizar a hidrólise do grupo fosfato terminal de vários fosforo monoésteres em pH alcalino. A enzima é amplamente distribuída no tecido hepático, rins, baço, intestinos e ossos. Níveis de atividade da fosfatase alcalina acima dos valores de referência podem ser atribuídos principalmente a comprometimentos hepatocelulares e ósseos. Durante a colestase hepática a síntese da enzima é aumentada, outras situações

freqüentes quanto a elevação desta enzima são associadas à icterícia, fluxo biliar interrompido e lesões expansivas (MOTTA,1989).

Contudo, nem sempre as enzimas mais usualmente alteradas em várias patologias hepáticas são as mais indicadas para avaliação da toxicidade de um xenobiótico desconhecido, muito menos para avaliar a toxicidade de um extrato de planta onde temos várias substâncias. Entretanto, a atividade da ALT sérica é provavelmente o parâmetro enzimático mais utilizado para avaliar a toxicidade hepática em animais de laboratório. Devido a alta sensibilidade da Ornitina carbamil transferase e da Sorbitol desidrogenase parece razoável que uma destas duas enzimas possam ser usadas em conjunto com a ALT quando da avaliação do potencial hepatotóxico de um xenobiótico desconhecido. Complementando, a ALP é o protótipo das enzimas que reflete a redução patológica do fluxo biliar. No que tange ao aspecto funcional, a remoção de Sulfobromoftaleína (BSP) é dependente de operações simultâneas de vários processos hepáticos, e o passo mais crítico desse processo é pensado ser a transferência do BSP para bile. Desta forma, o “Clearance” plasmático da BSP poderia ser de grande utilidade na avaliação da integridade funcional do sistema hepatobiliar. (PLAA & CHARBONNEAU, 1994).

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima de localização citoplasmática e mitocondrial. Para aumentos entre 15 a 100 vezes em relação aos níveis normais pode indicar quadro de hepatite, a presença de elevações simultâneas de ALT e AST normalmente relata-se quadros de hepatite fulminante (ALVAREZ et al., 2002)

A γ -glutamilttransferase (γ -GT) aparece no fígado (ductos biliares e fração microsomal). Emprega-se o doseamento desta enzima para diagnosticar comprometimento da função biliar (ALVAREZ et al., 2002).

A bilirrubina é formada a partir de eritrócitos velhos seqüestrados por células reticuloendoteliais do baço, medula óssea e fígado. O grupo heme da hemoglobina é a principal fonte de bilirrubina cerca de 70 a 80%. A determinação contribui para o diagnóstico da função hepática e renal (ROBERTS et al.,2002)

O Tempo de protrombina (TP) é utilizado para diagnóstico da função hepática, quando levamos em consideração que é produzido exclusivamente no parênquima hepático. O aumento do tempo de coagulação é efeito facilmente observado quando existe comprometimento da função hepática (NCCLS,2003)

Disfunção renal

Para avaliar a disfunção renal quando associada a efeito tóxico produzido por xenobiótico faz-se necessário utilizar uma bateria de testes. A complexidade e diversidade funcional nos vários sítios ao longo do néfron impedem que o uso de uma única e simples técnica possa avaliar se a função fisiológica esta normal ou não. Um procedimento fundamental quando se estuda o animal como um todo é a técnica de "Clearance" ou "Depuração".

Outra maneira de avaliar a função glomerular envolve a medida de alguns constituintes de ocorrência normal no sangue, entre eles, creatinina e uréia. A creatinina é um produto normal do metabolismo animal, sendo sua depuração proporcional a massa corporal. Situações em que ocorre elevação

de creatinina no plasma pode-se associar a uma deficiência no processo de filtração glomerular (LEHNINGER et al., 1995).

A determinação da concentração de uréia no sangue é justificada na avaliação da função renal, em virtude desta substância ser produzida no fígado e ser transportada até os rins para ser rapidamente filtrada e excretada na urina. As concentrações de uréia são facilmente alteradas na presença de dieta rica em proteínas, catabolismo protéico e função renal deficiente (MOTTA, 1989). Em geral, elevação das concentrações de creatinina e uréia no sangue podem ser usadas como índice de decréscimo da filtração glomerular (DAVIS E BERNDT, 1994).

Alguns pesquisadores têm sugerido que algumas enzimas presentes no sistema renal podem ser úteis na detecção precoce da nefrotoxicidade induzida por compostos exógenos, mais especificamente a maltase e fosfatase alcalina (BERNARD & LAUWERYS 1991).

Papel dos estudos morfológicos

É de suma importância que estudos bioquímicos e funcionais em toxicologia renal sejam seguidos de apropriados testes de histopatologia. Ao final do período de exposição incluem-se as análises de química clínica como: determinação da concentração de uréia, creatinina, determinação das enzimas indicadoras de agressão renal, densidade da urina, sedimentação na urina e outros. Ainda é importante realizar análises microscópicas do rim para investigação rotineira, imersão e fixação em tampão neutro de formalina de cortes seccionados sagital central do rim esquerdo e seção transversal do rim

direito representa uma boa abordagem prática para triagem nefrotóxica de xenobióticos.

Estes estudos devem ser delineados para estabelecer ou confirmar organelas subcelular alvo para estabelecer o inter-relacionamento das lesões renais e perturbações de parâmetros bioquímicos e funcionais para diferenciar injúria pré-renal e pós-renal de ataque da substância nefrotóxica e para pesquisar os precoces biomarcadores de nefrotoxicidade. Em suma, o método primário para identificação de toxicidade renal no desenvolvimento de novos produtos é o exame de microscopia light do rim,exame este que leva em consideração uma análise geral do tecido destacando aspectos do corte histológico, suplementado pela análise do soro e urina.

2.0 Objetivos

Como vários medicamentos citados pelo FDA, para o tratamento da tuberculose apresentam forte efeito adverso sobre o fígado e rim, o objetivo deste trabalho é determinar a toxicidade pré-clínica de extratos de plantas do cerrado brasileiro ativos contra *M. tuberculosis*, dando especial atenção para os sistemas hepatobiliar e renal.

Para atender este objetivo foi proposto:

- a) Determinação da Toxicidade aguda oral dos extratos vegetais em ratos machos e fêmeas, seguindo de perto, mais rigorosamente possível os protocolos da “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD), protocolos 401 e 408 determinando inclusive a DL 50, caso algum dos extratos apresente esta necessidade.
- b) De acordo com os resultados dos experimentos da Toxicidade oral aguda, subdividir as doses para estudos da Toxicidade oral a médio prazo (90 dias), também em ratos, seguindo de perto, as recomendações da ANVISA Resolução - RE N° 90 de março de 2004.
- c) Avaliar mais cuidadosamente o perfil hepatobiliar e renal dos ratos, segundo o período e via de administração proposto para utilização terapêutica, determinando inclusive a dose referência (RfD) para estudos clínicos posteriores.

3.0 Material e Método

3.1 Material

3.1.1 Extratos Vegetais

Os extratos vegetais foram produzidos no laboratório de Farmacognosia e Fitoterapia da Universidade Paranaense – Unipar- Paranavaí-Pr. O processo empregado para a realização dos extratos foi extração exaustiva.

O material vegetal empregado neste trabalho foi coletado na região de cerrado do estado de Mato Grosso do Sul (Região de Bataguassu – Latitude 21° 42' 51" Sul e Longitude 52° 25' 20" Oeste), Campo Grande (Latitude 20° 24' Sul e Longitude 54° 35' Ocidental) e Rio Verde- Goiás (Latitude 17° 47' 53" Sul e Longitude 51° 55' 53" Oeste). As coletas aconteceram no período de Março a Junho de 2006.

Os materiais vegetais utilizados neste trabalho foram: *Syngonanthus macrolepsis* (parte da planta: escapos; agente extrator: clorofórmio) *Turnera ulmifolia* (parte da planta: folhas; agente extrator: diclorometano) e *Quassia amara* (parte da planta: cascas; agente extrator: diclorometano). Essas plantas são conhecidas popularmente respectivamente por Sempre viva, Damiana e pau-tenente.

O material vegetal foi coletado e acondicionado temporariamente em sacos plásticos, transferidos para caixa de isopor com gelo, com a finalidade de impedir alterações; posteriormente congelados e armazenados até o momento do uso.

Para a produção dos extratos, toda sujidade e material particulado não pertencente a planta foram removidos, o material vegetal foi lavado com água corrente, a seguir, colocados em estufa de secagem a temperatura de 40°C, com constante movimentação.

A amostra de droga vegetal referente a *T.ulmifolia* (folhas) foram trituradas em moinho de facas; *S. macrolepsis* (escapos); *Q. amara* (cascas) foram trituradas e fragmentadas respectivamente. As drogas vegetais trituradas foram transferidas para béqueres de vidro, e o agente extrator prontamente adicionado, toda a operação foi intercalada com agitação mecânica/diariamente. Os frascos foram tampados com papel alumínio e acondicionados ao abrigo da luz com tempo de permanência de no mínimo 48 e máxima de 96 horas de contato entre o agente extrator e a droga vegetal. Após este período, a fração líquida foi filtrada e transferida para evaporador rotativo sob pressão reduzida. Os agentes extratores isolados foram novamente adicionados aos frascos contendo a droga vegetal, repetindo mais cinco vezes este ciclo de extração para cada planta em estudo.

Os extratos foram transferidos para chapa aquecedora a temperatura de 40°C por período de 4 horas, com a finalidade de evaporar o conteúdo remanescente de agente extrator. Os frascos contendo o extrato vegetal receberam solução de Tween 80 a 5% (V/V), o que permitiu a dissolução dos extratos vegetais em água destilada, a partir deste momento denominou-se “Solução Mãe”, estas permaneceram congeladas até o momento do uso.

A partir das soluções mãe, foram preparadas diluições nas concentrações de 2400, 1200, 800, 400 e 200 µg/ml para administração oral nos animais em estudo. As diluições de uso apresentavam concentração de Tween

80 nas seguintes concentrações: 2400 µg/ml (5%); 1200 µg/ml (2,5%); 800 µg/ml (1,7%); 400 µg/ml (0,8%); 200 µg/ml (0,4%).

3.1.2 Controle dos extratos vegetais

Os extratos vegetais de *S. macrolepsis*, *T. ulmifolia* e *Q. amara*, foram analisados frente a mesma cepa padrão de *Mycobacterium fortuitum* empregada nos estudos descritos por ARANTES et al (2005), a técnica do Microplate Alamar Blue Assay - MABA foi utilizada, assim como descritos nos estudos do autor acima. Os resultados obtidos neste experimento foram similares aos obtidos por ARANTES et al (2005), confirmando a eficácia dos extratos e a concentração dos princípios ativos.

3.2 Método

3.2.1 Toxicidade a curto prazo

Observação: Comitê de ética

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética- Unesp prot. CEP/ FCF/CAr n. 19/2006.

Os ratos albinos Wistar foram aclimatados em sala controlada com temperatura entre 24°C ± 2, umidade relativa entre 55% ± 10% e ciclo claro e escuro 12 horas, alternando às 07h: 30 min. Os ratos (as) foram separados (as) em grupos de 6 machos/fêmeas e alojados em gaiolas de 30x40x20cm, água e ração *ad libitum*.

Após jejum de 12 horas, mantendo somente água de bebida, os ratos receberam dose inicial de 2000mg/kg/peso de extrato via gavagem e observados em períodos programados de 30 minutos 1h, 2h, 4h, 8h e 24 horas e diariamente até o 14º dia, os experimentos foram programados para iniciarem

às 08:00horas. Durante este período, os ratos foram avaliados quanto: Alteração de pêlos, alteração de pele, alteração de mucosas, tremores, convulsões, resposta ao toque, coma, irritabilidade, lacrimação, letargia, piloereção, diarréia, defecação, salivação, micção, os animais que apresentaram respostas agressivas ao toque por um tempo após administração foram considerados como irritados; respostas estas, sempre comparadas às dos animais controle.

Após o período de estudo os ratos foram eutanasiados e analisados quanto morfologia e peso dos seguintes órgãos: coração, fígado, rins, pulmão e baço.

Como os extratos não provocaram nem morte e nem efeitos graves com a dose de 2000mg/kg, outros 2 grupos de 6 machos e fêmeas foram submetidos à dose de 5000mg/kg/peso e analisados quanto aos mesmos parâmetros citados para a dose de 2000mg/kg.

3.2.2 Toxicidade a médio prazo

3.2.2.1 Teste de Palatabilidade

Para a realização do teste de palatabilidade foram empregados 20 ratos albinos Wistar, aclimatados e acondicionados individualmente em gaiolas metabólicas, todos receberam ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro subgrupos de 5. Para cada grupo foi administrado o extrato de uma planta; *S. macrolepis*, *T. ulmifolia*, *Q. amara* e para o quarto grupo foi destinado apenas água de torneira, caracterizando o grupo controle.

Para avaliação do volume de ingestão, os extratos das três plantas as foram mantidos por período de 7 dias em substituição a água de bebida, em concentrações crescentes. Não se observou diferenças entre a ingestão do controle e a ingestão dos extratos analisados, até a concentração de 800 µg/ml. Em concentração superior (1200µg/ml) houve redução dos extratos comparando com a água de bebida, caracterizando a não aceitabilidade da palatabilidade.

3.2.2.2 Avaliação de toxicidade

Os ratos Wistar foram aclimatados em sala controlada com temperatura entre 24°C ± 2, umidade relativa entre 55% ± 10% e ciclo claro e escuro 12 horas alternando às 07h30min. Alojados individualmente em gaiolas metabólicas (Nalgene[®]), os ratos Wistar receberam extratos vegetais adicionados em água de bebida, nas concentrações de 200 µg/ml grupo 1 (animais de 1 a 5); 400 µg/ml grupo 2 (animais de 6 a 10); e 800 µg/ml grupo 3 (animais de 11 a 15) e os animais de 16 a 20 receberam apenas água (Controle), todos os animais receberam ração *ad libitum*.

Durante 90 dias os animais foram avaliados em relação ao volume de ingestão do extrato e produção de urina. Estes foram submetidos a jejum de 12 horas, mantendo apenas a água de bebida, pesados, anestesiados para coleta de sangue para avaliação bioquímica e hematológica, e para coleta de órgãos.

3.2.2.3 Coleta do Material

Os ratos albinos Wistar foram individualmente transferidos para cuba de vidro, contendo éter etílico embebido em algodão.

Após anestesia os ratos foram pesados, transferidos para mesa cirúrgica e realizada coleta de sangue através de punção cardíaca, empregando seringa descartável de 10 ml e agulha 27 X 0,5. O sangue foi dividido em dois tubos para obtenção de soro e plasma.

O sangue total foi dividido em dois tubos plásticos, em um primeiro tubo, rotulado contendo EDTA a 10% na proporção de 50µl para cada ml de sangue, o segundo tubo recebeu o mesmo volume de sangue que o primeiro, porém sem adição de anticoagulante.

No sangue contendo EDTA foi realizado hemograma com auxílio de contador de células hematológicas e confecção de lâmina para contagem diferencial. Depois da leitura, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min, para obtenção do plasma.

Para o tubo sem anticoagulante, após a retração do coágulo centrifugou-se a 2500 rpm por 10 min, para proporcionar melhor separação do soro. O soro então foi dividido em alíquotas e congelado até o momento do uso.

3.2.2.4 Análise do perfil bioquímico

Foram realizadas análises das seguintes enzimas ALT, AST, γ -GT, ALP e de produtos intermediários do metabolismo: Bilirrubina, uréia, creatinina e TP. As dosagens foram realizadas com kits Labtest[®] (ALT, γ -GT, ALP, Bilirrubina, Uréia, creatinina e TP) exceto para AST, onde se empregou Kit Gold Analyza[®]. Os valores referenciais foram comparados segundo MITRUKA & RAWNSLEY (1981).

3.2.2.5 Hemograma

O hemograma é dividido em duas partes, a contagem total e diferencial. Para a realização de contagem total foi empregado equipamento automatizado (Coulter[®]) e a contagem diferencial foi realizada empregando metodologia tradicional, que consiste em corar a lâmina e contar as diferentes células presentes em diferentes campos visuais até totalizar a centésima célula.

Para realização do hemograma, as lâminas de vidro foram cuidadosamente lavadas e submersas em álcool 70% até o momento do uso. Para a confecção da lâmina sanguínea permanente (esfregaço) foi adicionado pequeno volume de sangue total em uma das extremidades da lâmina e realizado o esfregaço hematológico utilizando lâmina distensora (arestas aparadas).

Após 5 (cinco) minutos a lâmina foi transferida para plataforma de coloração, coberta completamente por metanol, agente fixador do esfregaço. O fixador permaneceu em contato com o esfregaço por 3 minutos, removido o excesso, cobriu-se o esfregaço com Giemsa (Diluição 1:10), permanecendo durante 15 minutos, Todo o excesso de corante foi removido, lavado com água destilada e analisado em microscopia com objetiva de 100 X para contagem diferencial.

3.2.2.6 Análises histopatológicas

Para realização de análise morfológica, os seguintes órgãos foram removidos: coração, fígado, rins, pulmão e baço. O fígado e os rins foram analisados posteriormente quanto ao perfil histológico e patológico.

O fígado e os rins foram cuidadosamente dissecados, lavados em salina e transferidos para papel de filtro e pesados. Estes órgãos foram transferidos para béqueres individuais contendo solução de formaldeído (fixador) a 10% permanecendo por período de 7 dias. Após este período, o fixador removido e adicionado álcool 70% por período de 24 horas, a seguir álcool a 90% por 2 horas e finalmente, álcool 100% por 24 horas, para promover a desidratação das peças. Como clareador foi empregado xilol/álcool na proporção de (1/1) por 3-4 horas. Após inclusão em parafina foram feitos os cortes em micrótomo rotativo com espessura entre 4 a 6 μm .

Os cortes recém produzidos foram transferidos para banho-maria a 40°C por período de 1 min, para promover a dilatação da peça e facilitar a coloração. Os cortes foram transferidos para lâminas de vidro devidamente rotuladas e posteriormente coradas por Hematoxilina e eosina. Para evitar a degradação e deterioração foi utilizado bálsamo do Canadá e lamínulas de vidro para tornar as lâminas permanentes.

3.2.2.7 Análises da Urina

A urina dos animais foi analisada na primeira e penúltima semana do experimento. A coleta ocorreu na manhã do sétimo dia de aclimação e sete dias antes do sacrifício, as amostras foram colhidas às 08:00 após período de 12 horas de jejum e água ad libitum. Para análise de urina, foi empregado proveta de vidro, avaliou-se a volumetria urinária no período de 12 horas, coloração e características físico-químicas. Para avaliação físico-química foi empregando fita reativa Macromedia®.

Os parâmetros de análise foram: Densidade, pH, glicose, hemáceas, bilirrubina, cetonas, leucócitos, nitrito, uréia, urobilinogênio.

3.2.2.8 Análises Estatísticas

Para os experimentos de variável tipo comparação de médias de atividade enzimática ou quantidade de metabólitos no plasma ou urina, foi usado ANOVA seguido pelo teste de Tuckey. O nível crítico de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de $p < 0,05$ em todos os testes.

4.0 RESULTADOS

Toxicidade a curto prazo

Para o extrato de *T.ulmifolia*, foi possível observar após administração de 2000 mg/kg/peso, alterações de irritabilidade, e piloereção, em dois animais machos e duas fêmeas com permanência dos sinais até 60 minutos após a administração. Para a dose de 5000mg/Kg/peso, foi observado às mesmas alterações para o mesmo numero de animais tanto machos quanto para fêmeas.

As observações dos órgãos (coração, fígado, rim pulmão e baço) apresentaram morfologia e coloração dentro dos padrões de normalidade.

Syngonanthus macrolepis

Após administração de extrato de *S. macrolepis* na dose de 2000 mg/kg/peso foi possível constatar irritabilidade em uma fêmea, e o efeito se manteve por 8 horas, o mesmo efeito não foi observado em machos. Com relação à administração referente à dose 5000mg/kg/peso, foi possível observar maior irritabilidade apenas em duas fêmeas, efeito este ausente nos machos. As observações dos órgãos (coração, fígado, rim pulmão e baço) apresentaram morfologia e coloração dentro dos padrões de normalidade.

Quassia amara

Na avaliação do extrato de *Q. amara* 2000mg/Kg/peso, foi possível observar a presença de irritabilidade em dois machos e três fêmeas após administração por um período de 60 minutos. Para as doses de 5000mg/Kg/peso, foi observado irritabilidade em três animais machos e duas fêmeas.

Também para este extrato, as observações dos órgãos (coração, fígado, rim pulmão e baço) apresentaram morfologia e coloração dentro dos padrões de normalidade.

Toxicidade a médio prazo – Experimento I (Machos)

Ao iniciar os experimentos dos animais pesavam em média $202g \pm 5$ e após 90 dias de exposição de fêmeas estavam pesando em torno de 296g e os machos 417g. Em média os animais ingeriram em torno de 26,5mL por dia de água ou extrato diluído independente da concentração do extrato.

Avaliação Bioquímica:

Tabela 1. Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratos submetidos a concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$ de extrato bruto de *Turnera ulmifolia* na água de bebida após 90 dias de exposição

Avaliações	Controle	200 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$
Creatinina (mg/dl)	0,45 \pm 0,01	0,46 \pm 0,02	0,49 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01
Uréia (mg/dl)	11,85 \pm 0,22	14,84 \pm 0,26	14,20 \pm 1,02	16,93 \pm 0,91#
AST (I.U./L)	66,40 \pm 2,16	69,20 \pm 3,03	70,00 \pm 2,37	70,00 \pm 1,30
ALT (I.U./L)	15,71 \pm 1,74	19,21 \pm 3,27	20,95 \pm 2,14	20,95 \pm 2,14
γ -GT (I.U./L)	1,70 \pm 0,26	1,70 \pm 0,26	1,70 \pm 0,26	1,91 \pm 0,21
ALP (I.U./L)	33,17 \pm 5,51	35,93 \pm 3,39	38,70 \pm 2,70	38,70 \pm 2,76
Bilirrubin (mg/dl)	0,35 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01*
TP (s)	6,00 \pm 0,32	6,20 \pm 0,20	6,40 \pm 0,40	6,00 \pm 0,32

N=5

Erro padrão da média

*Média Diferente da dose de 200 $\mu\text{g/ml}$

Médias diferentes do grupo controle

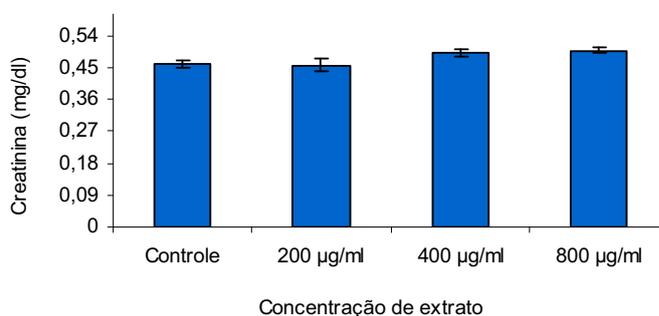


Figura 1. Concentrações médias de creatinina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

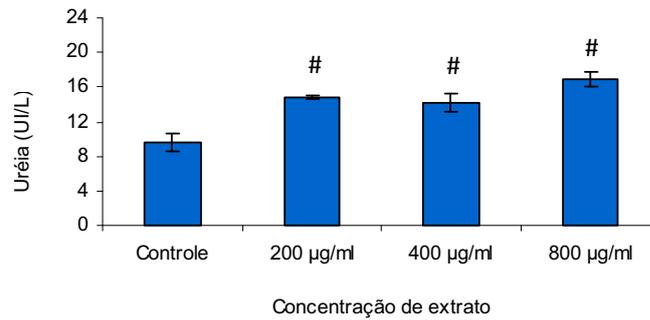


Figura 2. Concentrações médias de uréia no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

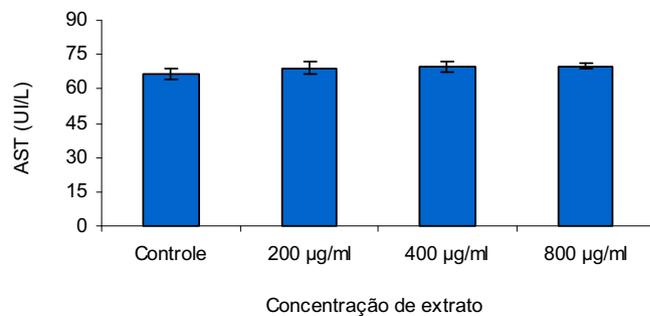


Figura 3. Concentrações médias de AST no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

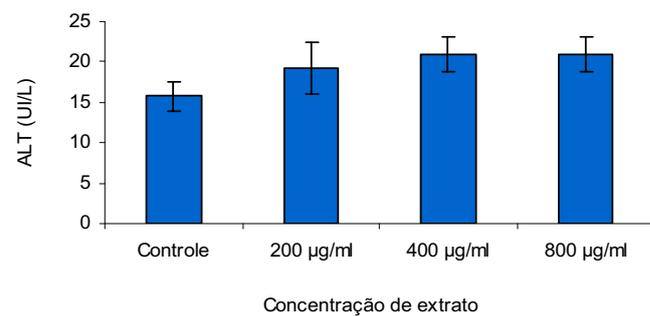


Figura 4. Concentrações médias de ALT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

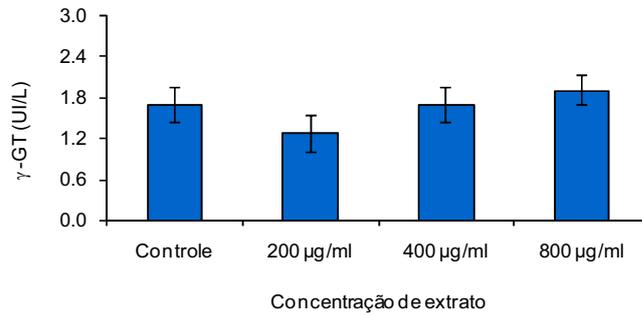


Figura 5. Concentrações médias de γ -GT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

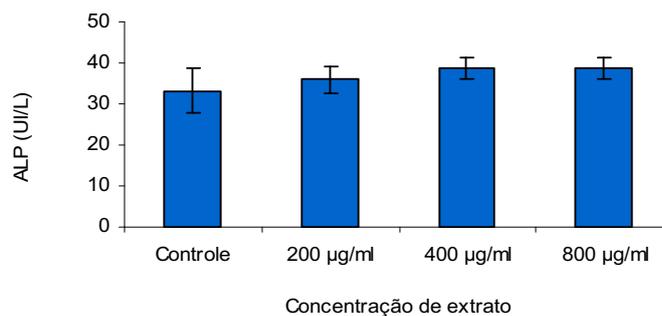


Figura 6. Concentrações médias de ALP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

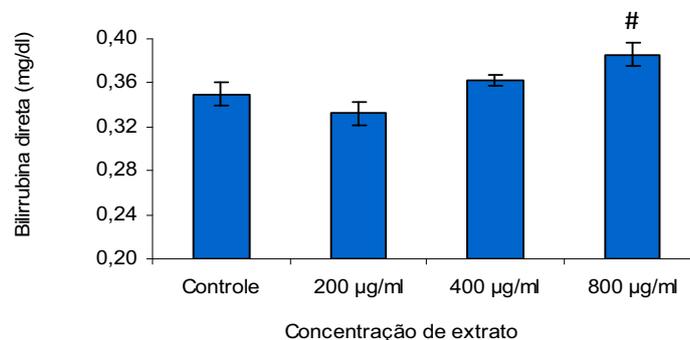


Figura 7. Concentrações médias de Bilirrubina direta no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

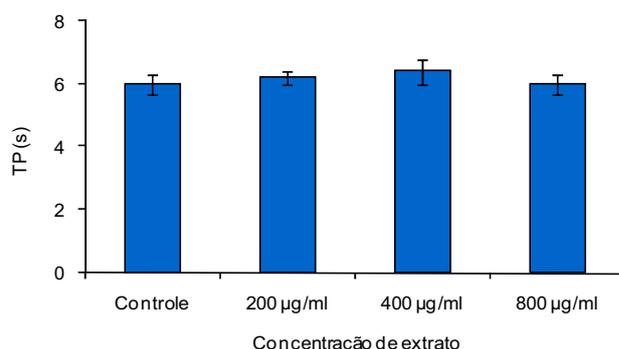


Figura 8. Concentrações médias de TP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações. em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

Tabela 2. Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratos submetidos às concentrações de 200, 400 e 800 µg/ml de extrato bruto de *Syngonhanthus macrolepsis* após 90 dias de exposição

Avaliações	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
Creatinina (mg/dl)	0,41±0,02	0,41±0,02	0,42±0,02	0,48±0,03
Uréia (mg/dl)	12,52±1,47	14,73±1,65	15,47±2,95	16,95±1,47
AST (I.U./L)	64,80±0,73	64,00±2,38	65,40±1,63	66,60±0,68
ALT (I.U./L)	13,97±2,14	15,71±3,27	19,21±1,75	19,21±1,75
γ-GT (I.U./L)	1,63±0,57	1,48±0,26	2,76±0,72	3,18±1,11
ALP (I.U./L)	33,17±3,39	36,56±3,04	40,47±3,40	49,75±8,29
Bilirrubin (mg/dl)	0,30±0,03	0,32±0,03	0,35±0,03	0,38±0,01
TP (s)	6,80±0,37	6,80±0,58	7,00±0,45	7,20±0,58

N=5

Erro padrão da média

*Média Diferente da dose de 200 µg/ml

Médias diferentes do grupo controle

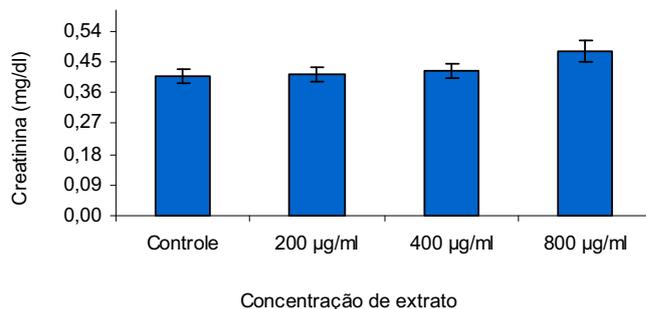


Figura 9. Concentrações médias de creatinina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

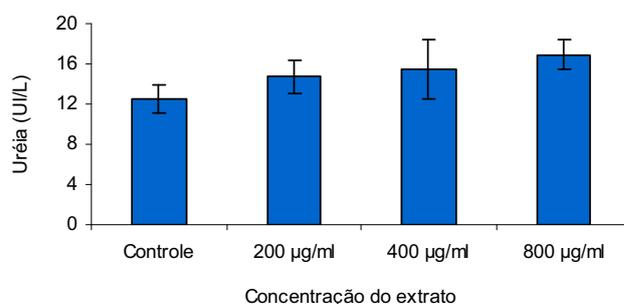


Figura 10. Concentrações médias de Uréia no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

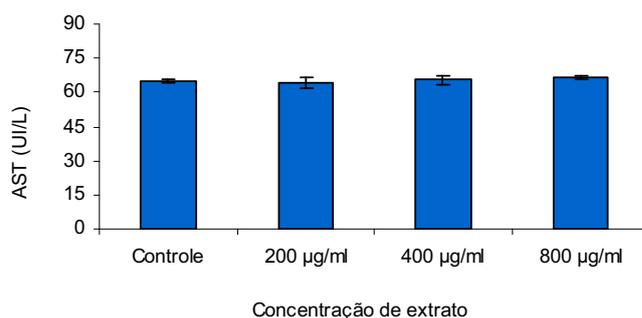


Figura 11. Concentrações médias de AST no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

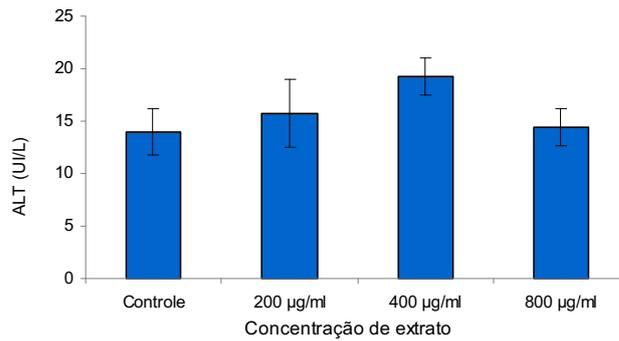


Figura 12. Concentrações médias de ALT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

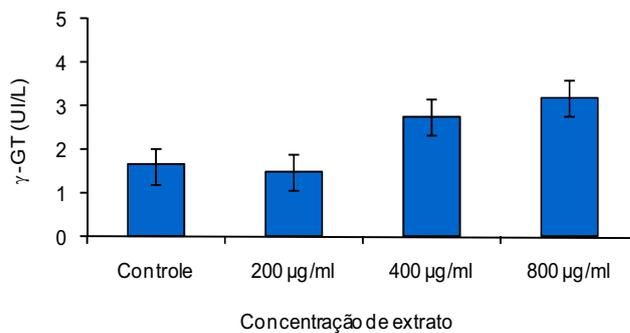


Figura 13. Concentrações médias de γ -GT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

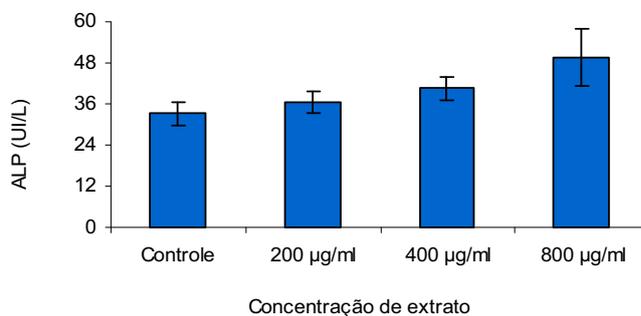


Figura 14. Concentrações médias de ALP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

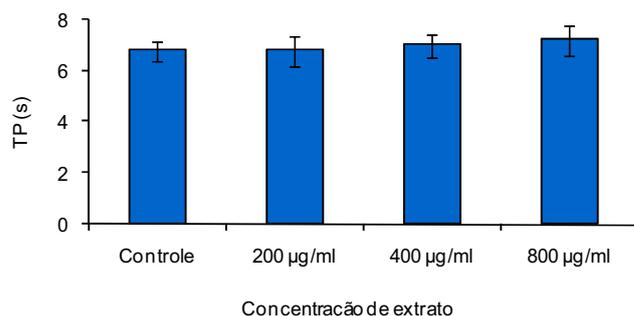


Figura 15. Concentrações médias de TP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Syngonhanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

Tabela 3. Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratos submetidos às doses de 200, 400 e 800 µg/ml de extrato bruto de *Quassia amara* após 90 dias de exposição

Avaliações	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
Creatinina(mg/dl)	0,40±0,01	0,44±0,05	0,44±0,03	0,48±0,02
Uréia (mg/dl)	13,44±2,53	14,52±1,87	14,91±1,66	14,91±1,66
AST (I.U./L)	63,40±1,03	64,80±1,46	64,20±2,20	66,80±1,11
ALT (I.U./L)	13,97±2,14	15,71±1,75	15,71±3,27	17,46±2,76
γ-GT (I.U./L)	1,48±0,26	1,70±0,26	1,70±0,26	1,91±0,21
ALP (I.U./L)	30,40±2,76	33,17±3,39	35,93±3,39	35,93±3,39
Bilirrubina (mg/dl)	0,32±0,01	0,35±0,01	0,35±0,02	0,38±0,01**
TP (s)	6,20±0,37	6,80±0,37	6,80±0,37	6,60±0,51

N=5

Erro padrão da média

** Média diferente do grupo controle e da dose de 200 µg/ml

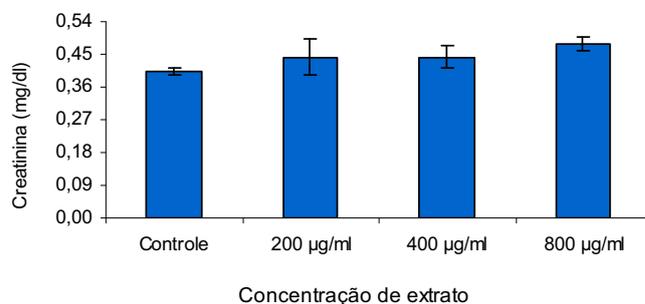


Figura 16. Concentrações médias de creatinina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

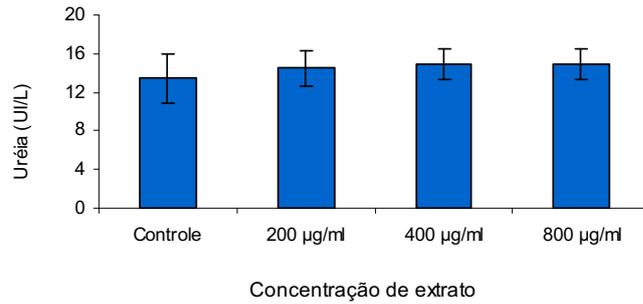


Figura 17. Concentrações médias de Uréia no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

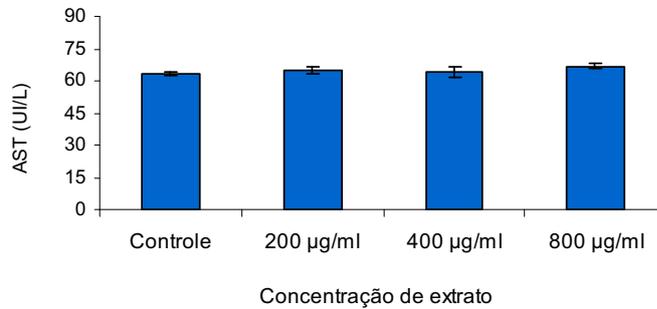


Figura 18. Concentrações médias de AST no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

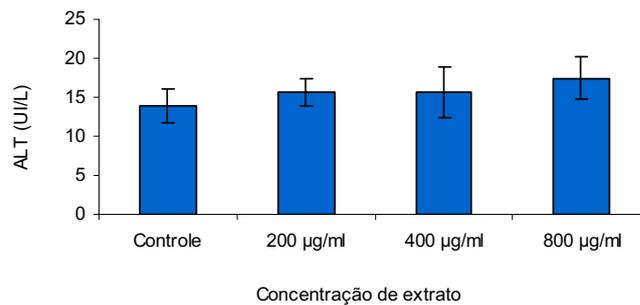


Figura 19. Concentrações médias de ALT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

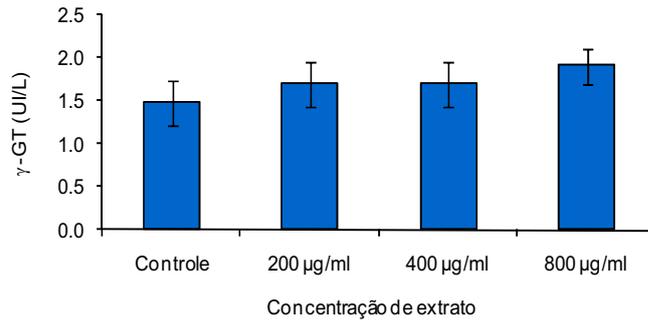


Figura 20. Concentrações médias de γ -GT no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

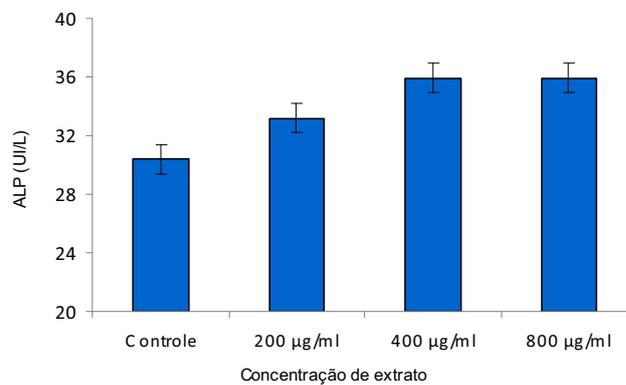


Figura 21. Concentrações médias de ALP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

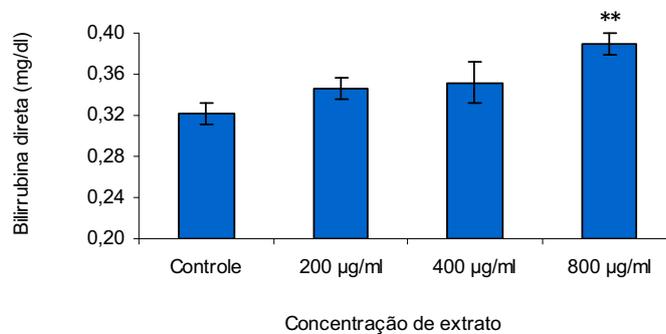


Figura 22. Concentrações médias de Bilirrubina no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

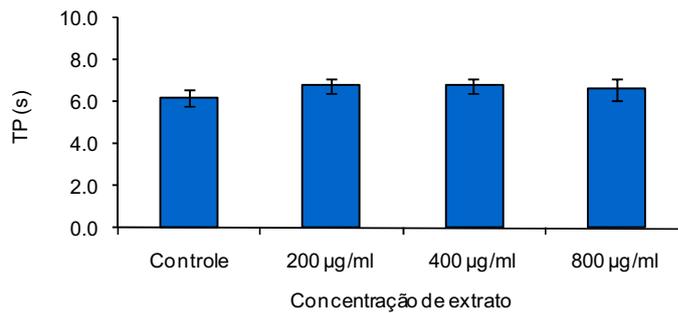


Figura 23. Concentrações médias de TP no soro de ratos (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações. em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

Avaliação Hematológica:

Tabela 4. Perfil hematológico de ratos submetidos a dose de 200,400 e 800µg/ml de extrato bruto de *Turnera ulmifolia* após 90 dias de exposição.

Índices/Células	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
HM (x10 ⁶ µL)	6,02±0,38	6,57±0,31	6,13±0,26	7,41±0,18**
Hb (dl)	10,88±0,82	11,46±0,54	11,24±0,41	13,24±0,41*
Ht (%)	31,22±2,36	33,41±1,60	31,64±1,46	38,10±0,81*
VCM (fl)	51,72±0,97	50,90±0,29	51,56±0,54	51,44±0,22
HCM (pg)	18,04±0,33	17,46±0,04	18,38±0,33	17,88±0,13
CHCM (g/dL)	34,86±0,26	34,34±0,30	35,64±0,40	34,78±0,16
PLAQ (x10 ³ µL)	5,58±0,75	6,87±1,23	6,48±0,40	7,99±0,06
<i>Contagem Diferencial</i>				
Mielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metamielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Bastonetes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Segmentados	16,20±0,37	16,60±0,40	16,40±0,25	17±0,32
Eosinófilos	0,60±0,25	0,20±0,20	0,40±0,25	0,60±0,25
Basófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Linfócitos	82,80±0,80	82,60±0,81	82,80±0,73	28,40±3,99
Monócitos	0,40±0,25	0,60±0,25	0,40±0,25	0,40±0,25

N= 5 animais por dose

EPM= Erro padrão da média

*Média estatisticamente diferente do grupo controle

** Média estatisticamente diferente do grupo controle e da dose de 400 µg/ml

Tabela 5. Perfil hematológico de ratos submetidos a dose de 200,400 e 800µg/ml de extrato bruto de *Syngonanthus macrolepsis* após 90 dias de exposição

Índices/Células	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
HM (x10 ⁶ µL)	6,94±0,29	7,07±0,28	6,64±0,42	6,22±0,26
Hb (dl)	12,46±0,60	13,26±0,66	12,12±0,94	11,32±0,63
Ht (%)	37,36±1,57	37,78±1,73	34,22±2,40	32,54±1,74
VCM (fl)	53,84±0,22	53,42±0,54	51,40±0,63	52,38±0,65
HCM (pg)	17,90±0,23	18,72±0,26	18,16±0,36	18,22±0,27
CHCM (g/dL)	33,30±0,34	35,04±0,18	35,34±0,30	34,78±0,14
PLAQ (x10 ³ µL)	7,53±0,92	8,70±0,91	8,23±0,50	64,08±0,42
<i>Contagem Diferencial</i>				
Mielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metamielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Bastonetes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Segmentados	12,80±0,60	16,80±0,58	17,40±0,40	14,40±0,75
Eosinófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,60±0,25	0,60±0,25
Basófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,20±0,20	0,0±0,0
Linfócitos	86,80±1,07	83,20±0,58	81,40±0,58	84,60±1,33
Monócitos	0,20±0,20	0,0±0,0	0,40±0,40	0,20±0,20

N=5 animais por dose

EPM= Erro padrão da média

Tabela 6. Perfil hematológico de ratos submetidos às doses de 200, 400 e 800µg/ml de extrato bruto de *Quassia amara* após 90 dias de exposição.

Índices/Células	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
HM (x10 ⁶ µL)	6,08±0,67	6,08±0,26	6,82±0,25	5,91±0,49
Hb (dl)	10,78±1,09	10,76±0,69	11,96±0,51	10,62±0,98
Ht (%)	31,78±3,27	32,14±1,85	35,44±1,53	30,74±2,62
VCM (fl)	52,58±0,89	52,80±0,94	51,96±0,46	51,98±0,62
HCM (pg)	17,82±0,43	17,64±0,40	17,50±0,21	17,90±0,43
CHCM (g/dL)	33,94±0,50	33,48±0,36	33,70±0,18	34,44±0,23
PLAQ (x10 ³ µL)	6,37±1,26	6,86±0,56	8,24±0,55	7,07±0,64
<i>Contagem Diferencial</i>				
Mielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metamielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Bastonetes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Segmentados	13,00±0,45	13,20±0,80	12,6±0,40	12,80±0,37
Eosinófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,20±0,20	0,20±0,20
Basófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Linfócitos	86,60±1,03	86,60±0,51	86,40±0,68	86,60±1,03
Monócitos	0,40±0,25	0,20±0,20	0,40±0,25	0,40±0,25

N= 5 animais por dose

EPM= Erro padrão da média

Fêmeas – Experimento 2

Avaliação Bioquímica

Tabela 7. Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratas submetidas às doses de 200, 400 e 800 µg/ml de extrato bruto de *Turnera ulmifolia* após 90 dias de exposição

Avaliações	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
Creatinina (mg/dl)	0,46±0,01	0,46±0,01	0,49±0,01**	0,49±0,01**
Uréia (mg/dl)	11,96±0,91	11,96±0,91	12,87±1,11	18,60±3,78*
AST (I.U./L)	68,40±0,5	69,80±0,49	70,20±0,49*	70,20±0,49*
ALT (I.U./L)	15,71±1,5	20,95±2,14	20,95±2,14	22,70±2,14
γ-GT (I.U./L)	1,48±0,26	1,48±0,26	1,70±0,26	1,90±0,21
ALP (I.U./L)	30,40±2,6	33,06±3,43	38,66±2,80	38,66±2,80
Bilirrubina (mg/dl)	0,32±0,01	0,34±0,01	0,35±0,01*	0,38±0,01***
TP (s)	6,60±0,25	6,60±0,25	7,20±0,20	7,60±0,40

N=5

Erro padrão da média

*Média diferente em relação ao controle, $p < 0,05$, Teste de Tuckey.

** Média diferente em relação ao controle e a dose de 200 µg/ml, $p < 0,05$, Teste de Tuckey

*** Média diferente em relação ao controle e a dose de 200 e de 400 µg/ml, $p < 0,05$, Teste de Tuckey

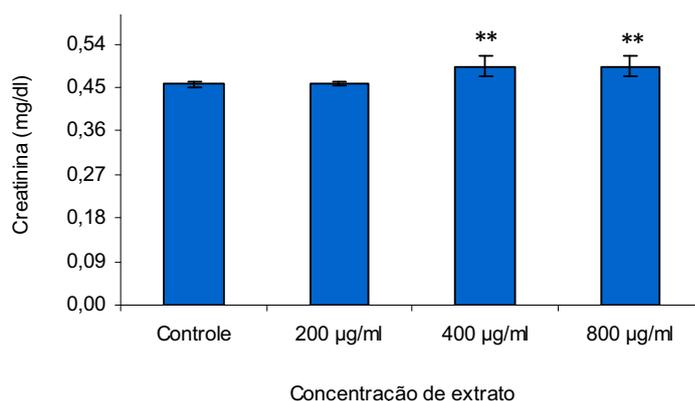


Figura 24. Concentrações médias de creatinina no soro de ratas (n=5) tratados com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

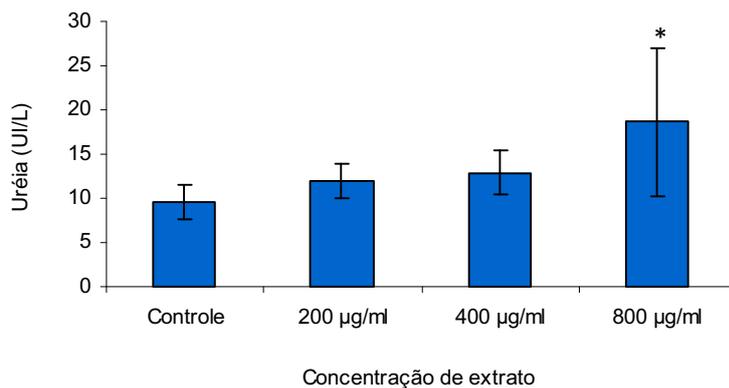


Figura 25. Concentrações médias de Uréia no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

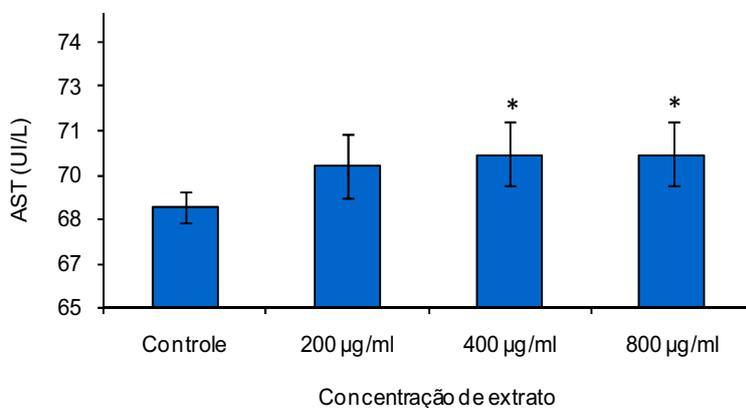


Figura 26. Concentrações médias de AST no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

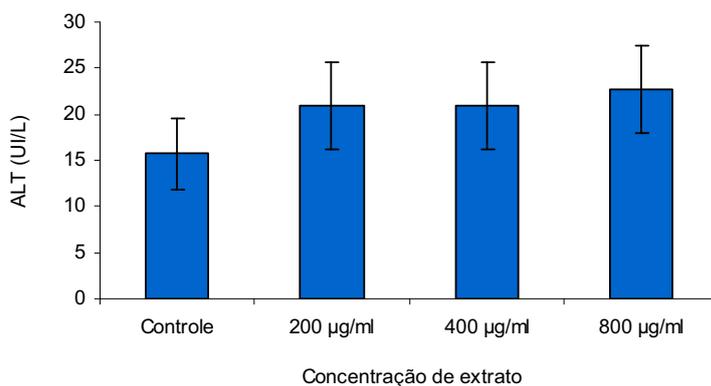


Figura 27. Concentrações médias de ALT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

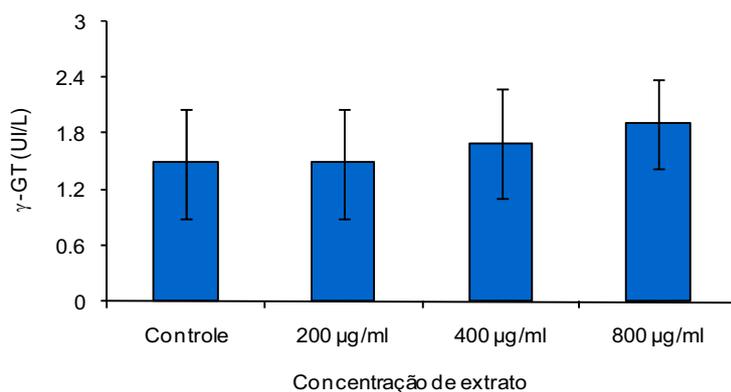


Figura 28. Concentrações médias de γ -GT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

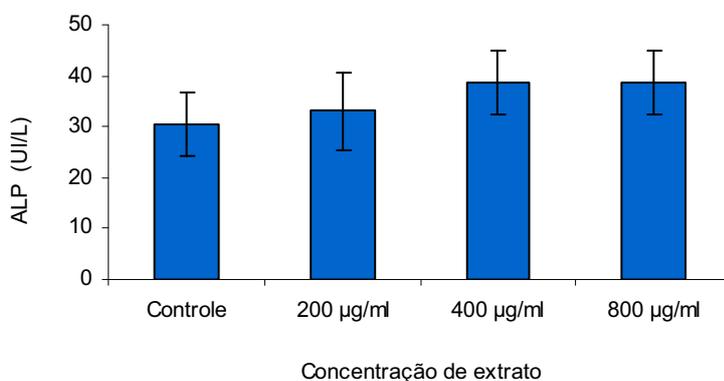


Figura 29. Concentrações médias de ALP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

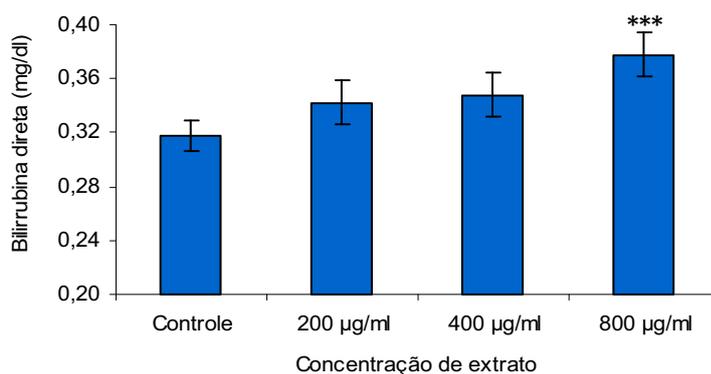


Figura 30. Concentrações médias de Bilirrubina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

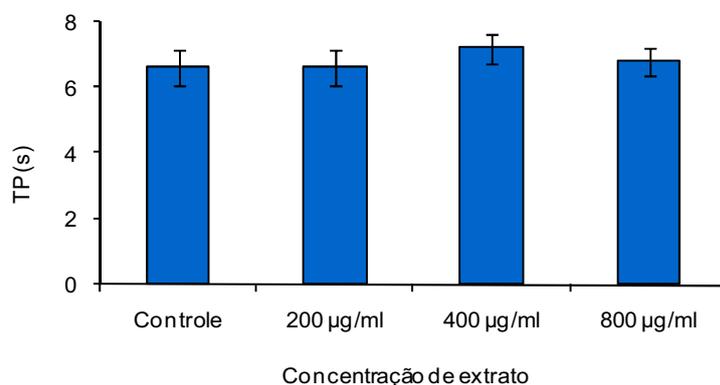


Figura 31. Concentrações médias de TP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Turnera ulmifolia* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

Tabela 8. Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratas submetidas às doses de 200, 400 e 800 µg/ml de extrato bruto de *Syngonanthus macrolepis* após 90 dias de exposição.

Avaliações	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
Creatinina (mg/dl)	0,40±0,02	0,43±0,02	0,46±0,02	0,46±0,03
Uréia (mg/dl)	13,24±0,9	13,24±0,89	16,95±3,61	19,89±3,61
AST (I.U./L)	60,40±2,2	63,20±2,31	67,80±2,76	70,40±2,01
ALT (I.U./L)	15,71±1,5	19,21±4,28	22,70±3,49	22,70±3,49
γ-GT (I.U./L)	1,27±0,21	1,70±0,26	1,91±0,21	2,12±0,21*
ALP (I.U./L)	22,11±3,9	27,64±6,18	30,40±5,17	33,17±5,53
Bilirrubina (mg/dl)	0,34±0,01	0,34±0,01	0,35±0,02	0,36±0,02
TP (s)	6,40±0,25	6,60±0,25	6,60±0,25	7,40±0,25*

N=5

Erro padrão da média

*Média diferente em relação ao controle, $p < 0,05$, Teste de Tuckey

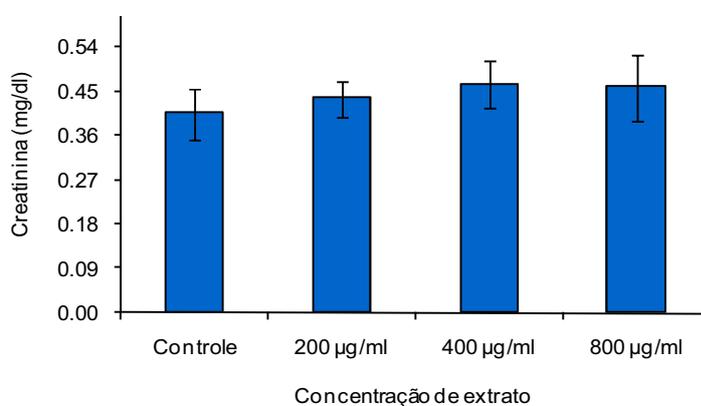


Figura 32. Concentrações médias de creatinina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

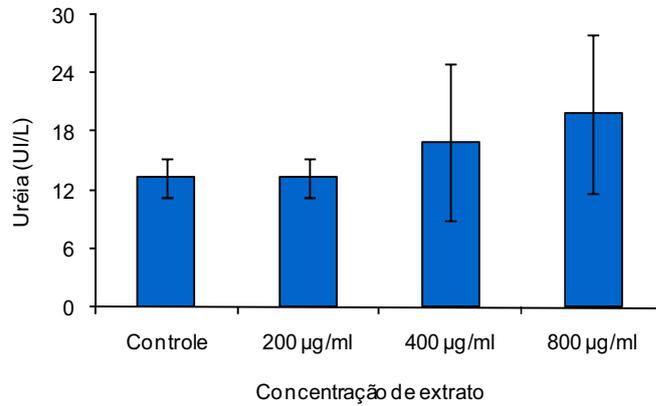


Figura 33. Concentrações médias de Uréia no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

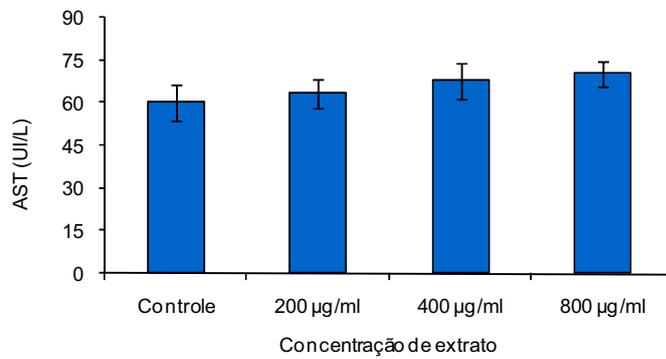


Figura 34. Concentrações médias de AST no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

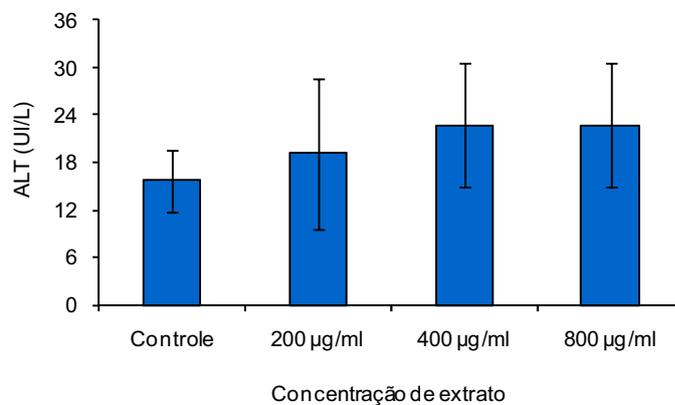


Figura 35. Concentrações médias de ALT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

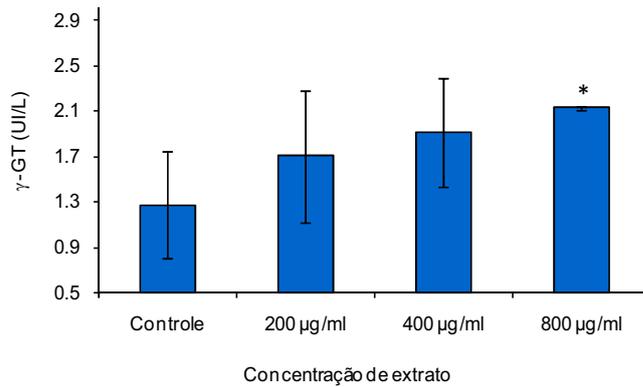


Figura 36. Concentrações médias de γ -GT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

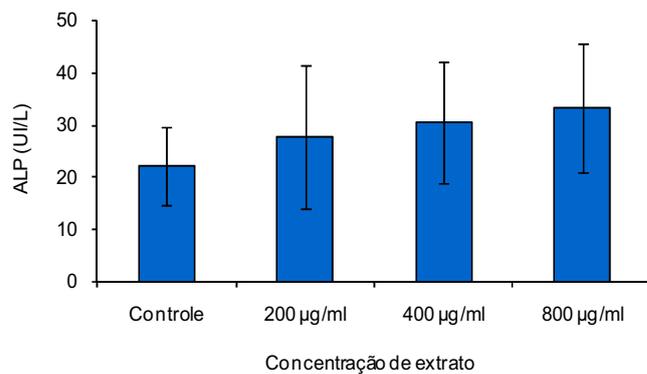


Figura 37. Concentrações médias de ALP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

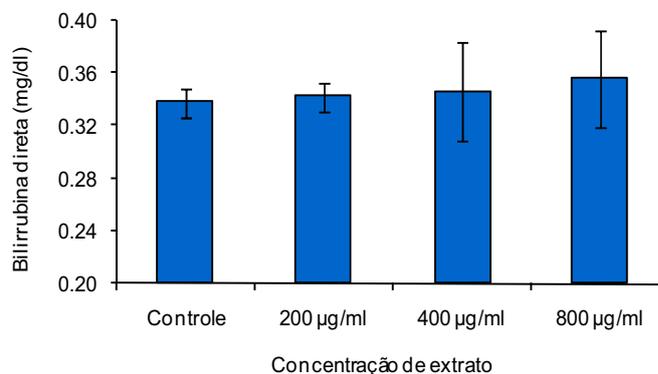


Figura 38. Concentrações médias de Bilirrubina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepsis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

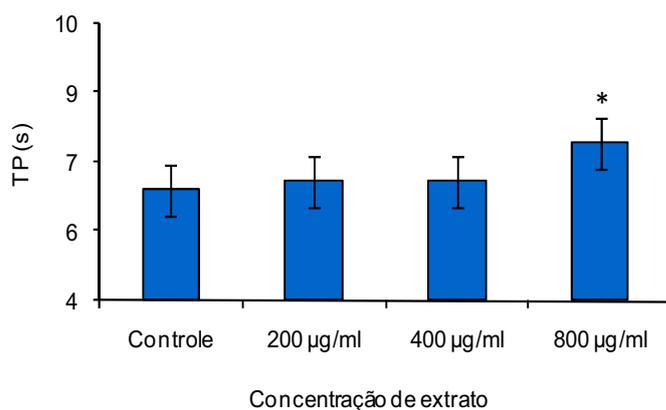


Figura 39. Concentrações médias de TP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Syngonanthus macrolepis* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

Tabela 9. Avaliação do perfil Bioquímico do soro de ratas submetidas às doses de 200, 400 e 800 µg/ml de extrato bruto de *Quassia amara* após 90 dias de exposição

Avaliações	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
Creatinina(mg/dl)	0,42±0,01	0,42±0,01	0,42±0,01	0,42±0,02
Uréia (mg/dl)	12,52±1,47	15,82±1,35	15,82±1,35	16,94±1,47
AST (I.U./L)	68,00±1,23	73,00±1,23	75,00±2,74	78,00±3*
ALT (I.U./L)	13,97±2,14	24,44±4,28	24,44±4,28	29,68±2,14*
γ-GT (I.U./L)	1,29±2,14	1,52±0,28	1,52±0,28	1,98±0,23
ALP (I.U./L)	30,40±5,17	30,40±5,17	33,17±3,38	38,70±2,76
Bilirrubina (mg/dl)	0,36±0,001	0,37±0,01	0,37±0,01	0,37±0,01
TP (s)	6,80±0,20	6,80±0,37	7,20±0,37	7,40±0,51

N=5

Erro padrão da média

*Média diferente em relação ao controle, p< 0,05, Teste de Tuckey.

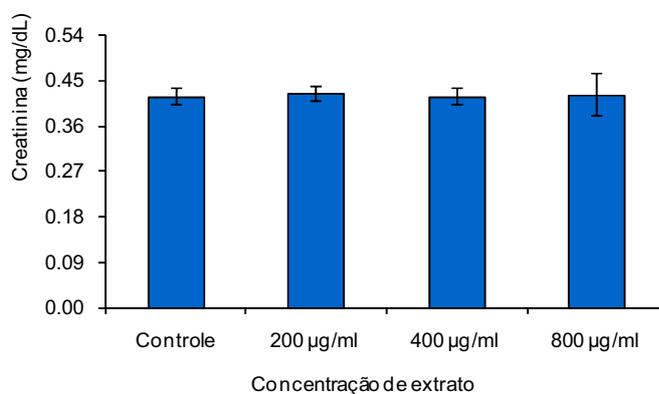


Figura 40. Concentrações médias de creatinina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

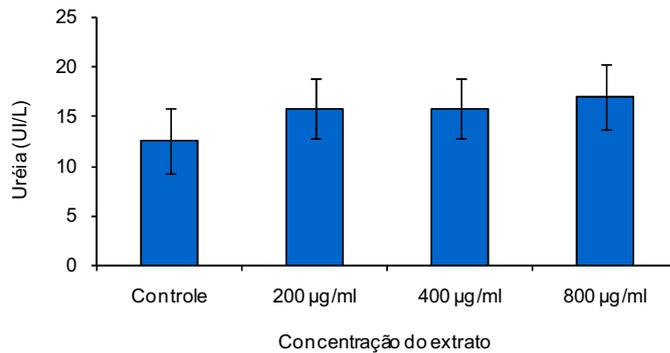


Figura 41. Concentrações médias de Uréia no soro de ratas (n=5) tratados com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

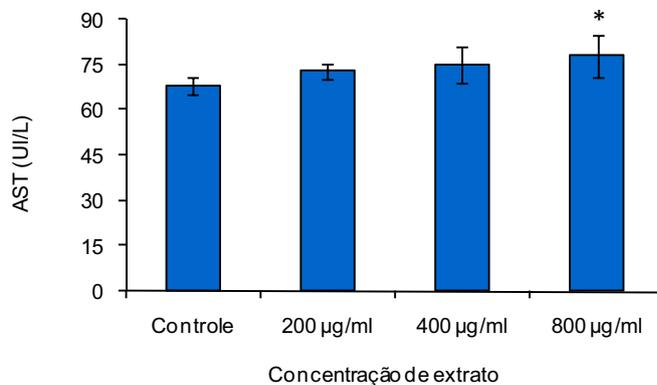


Figura 42. Concentrações médias de AST no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

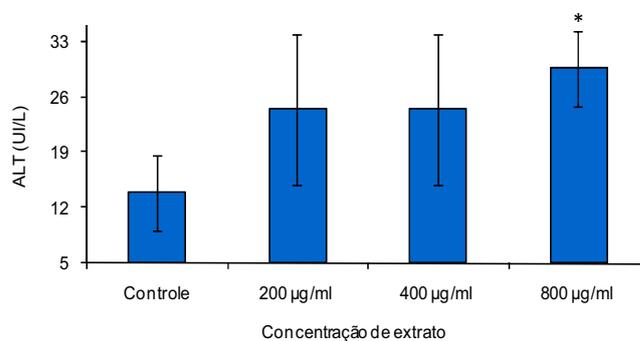


Figura 43. Concentrações médias de ALT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

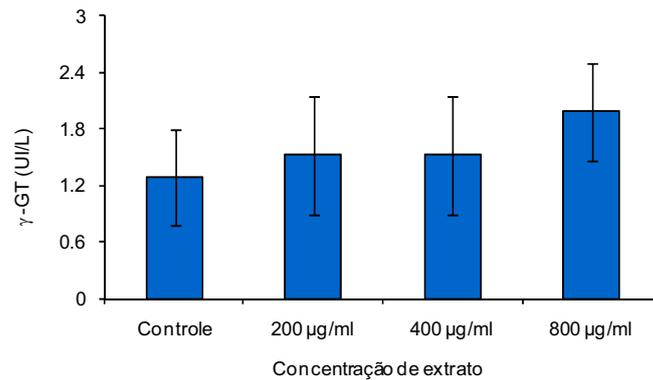


Figura 44. Concentrações médias de γ -GT no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

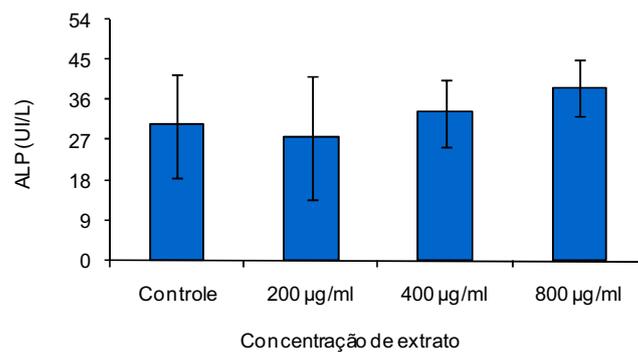


Figura 45. Concentrações médias de ALP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

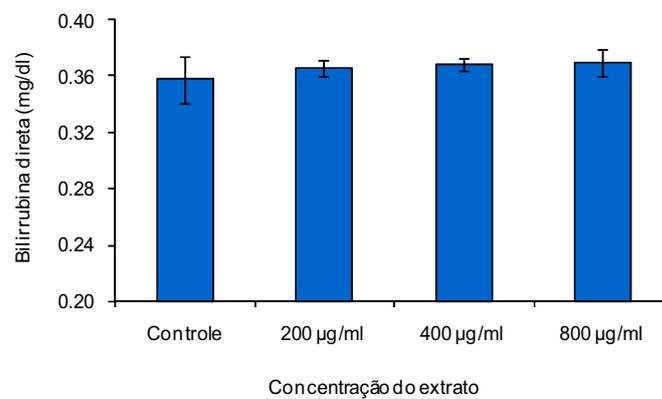


Figura 46. Concentrações médias de Bilirrubina no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

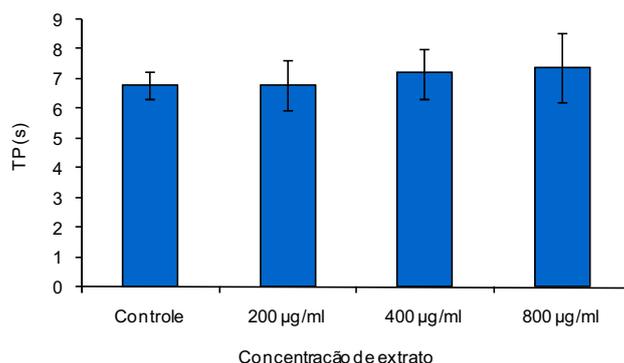


Figura 47. Concentrações médias de TP no soro de ratas (n=5) tratadas com extrato de *Quassia amara* em diferentes concentrações na água de bebida após 90 dias de exposição.

Avaliação Hematológica:

Tabela 10. Perfil hematológico de ratas submetidas à dose de 200, 400 e 800µg/ml de extrato bruto de *Turnera ulmifolia* após 90 dias de exposição.

Índices/Células	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
HM (x10 ⁶ µL)	6,00±0,12	7,01±0,24*	6,98±0,17*	6,82±0,21*
Hb (dl)	11,70±0,49	12,08±0,45	12,28±0,32	11,30±1,20
Ht (%)	32,44±2,20	33,60±2,42	35,26±2,64	35,34±1,29
VCM (fl)	52,34±2,04	52,74±0,32	53,50±1,22	54,18±0,97
HCM (pg)	18,06±0,43	18,38±0,18	18,44±0,29	18,62±0,20
CHCM (g/dL)	33,80±0,18	33,94±0,04	34,68±0,25**	34,68±0,17**
PLAQ (x10 ³ µL)	8,34±0,91	8,73±0,79	8,73±0,74	9,06±0,51

Contagem Diferencial

Mielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metamielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Bastonetes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Segmentados	12,80±0,49	12,60±0,40	13,20±0,58	13,00±0,45
Eosinófilos	0,0±0,0	0,20±0,20	0,0±0,0	0,0±0,0
Basófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Linfócitos	87,00±0,45	87,20±0,58	86,80±0,58	86,80±0,58
Monócitos	0,20±0,20	0,20±0,20	0,0±0,0	0,20±0,20

N= 5 animais por dose

EPM= Erro padrão da média

*Média diferente em relação ao controle, p<0,05, Teste de Tuckey

** Média diferente em relação ao controle e a dose de 200µg/ml

Tabela 11. Perfil hematológico de ratas submetidas às doses de 200, 400 e 800µg/ml de extrato bruto de *Syngonanthus macrolepis* após 90 dias de exposição

Índices/Células	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
HM (x10 ⁶ µL)	6,10±0,10	6,83±0,26	6,80±0,18	6,37±0,73
Hb (dl)	11,48±0,61	12,46±0,37	11,98±0,40	9,86±1,39
Ht (%)	34,78±1,43	37,08±0,85	31,10±2,83	34,62±1,12
VCM (fl)	52,34±1,04	52,46±0,45	52,12±0,56	53,04±0,80
HCM (pg)	17,70±0,35	17,82±0,24	18,08±0,12	18,38±0,46
CHCM (g/dL)	33,76±0,17	33,94±0,04	34,50±0,26	34,44±0,34
PLAQ (x10 ³ µL)	8,18±0,80	9,02±0,34	8,80±0,51	7,39±0,32
<i>Contagem Diferencial</i>				
Mielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metamielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Bastonetes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Segmentados	12,00±0,56	13,40±0,51	12,40±0,68	13,80±0,73
Eosinófilos	0,0±0,0	0,20±0,20	0,20±0,20	0,40±0,25
Basófilos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Linfócitos	87,80±0,58	85,40±0,51	86,60±0,25	85,20±0,0,97
Monócitos	0,20±0,20	1,0±0,45	0,60±0,25	0,60±0,25

N= 5 animais por dose EPM= Erro padrão da média

Tabela 12. Perfil hematológico de ratas submetidas às doses de 200, 400 e 800µg/ml de extrato bruto de *Quassia amara* após 90 dias de exposição.

Índices/Células	Controle	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
HM ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	6,08±0,23	6,81±0,25	6,48±0,45	6,24±0,70
Hb (dl)	11,02±0,85	12,06±0,46	11,68±0,38	10,84±1,12
Ht (%)	35,10±1,27	35,64±1,43	30,74±2,63	34,42±1,15
VCM (fl)	53,38±1,27	51,96±0,46	51,98±0,62	52,34±0,76
HCM (pg)	18,06±0,43	17,72±0,22	17,92±0,25	18,04±0,43
CHCM (g/dL)	33,72±0,16	33,78±0,18	34,28±0,25	33,86±0,48
PLAQ ($\times 10^3 \mu\text{L}$)	7,52±0,73	8,34±0,56	7,93±0,76	6,27±1,25
<i>Contagem Diferencial</i>				
Mielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metamielócitos	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Bastonetes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Segmentados	12,00±0,32	12,80±0,58	12,80±0,58	12,00±0,32
Eosinófilos	0,0±0,0	0,00±0,00	0,40±0,25	0,40±0,25
Basófilos	0,0±0,0	0,20±0,20	0,0±0,0	0,0±0,0
Linfócitos	88,00±0,63	86,00±0,86	87,6±0,51	87,20±0,58
Monócitos	0,0±0,0	0,20±0,20	0,0±0,0	0,40±0,25

N= 5 animais por dose EPM= Erro padrão da média

CORTES HISTOLÓGICOS

Segue fotos de cortes histológicos de ratos machos e Fêmeas submetidas a dose de 800µg/mL de extratos brutos de *S. macrolepis*, *T. ulmifolia* e *Q. amara*, em água de bebida após 90 dias de exposição.

Experimento I- Machos (Rins)

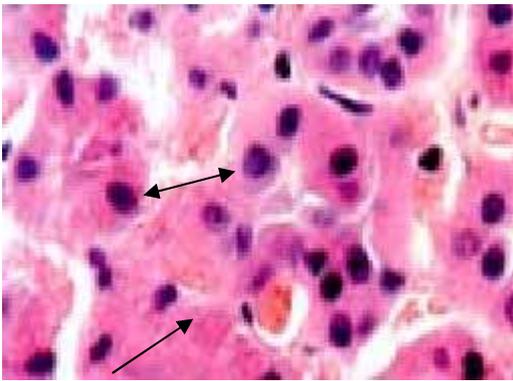


Figura A. Controle. Córtex renal de ratos, mostrando células normais, sem alterações na estrutura tecidual. Coloração H&E, 400X. A seta simples indica contornos celular normal e a seta dupla os núcleos delimitados e com morfologia normal.

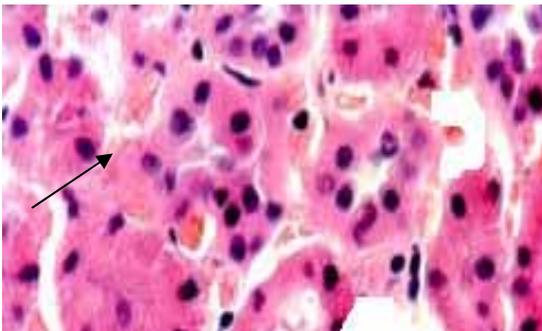


Figura B. Córtex renal de ratos tratados com extrato de *S. macrolepis* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina acúmulo de células polimorfonucleares, porém com limites normais. Coloração H&E, 400X. A seta indica morfologia celular normal quando comparado ao controle.

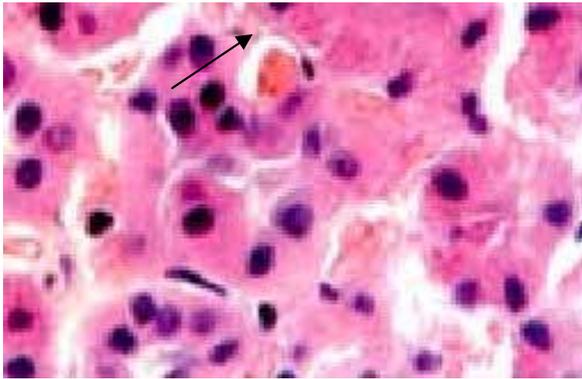


Figura C. Córtex renal de ratos tratados com extrato de *T. ulmifolia* 800 μ g/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. A lâmina apresenta células com limites dentro dos padrões de normalidade sem alterações na estrutura tecidual. Coloração H&E, 400X. A seta indica artefato de coloração.

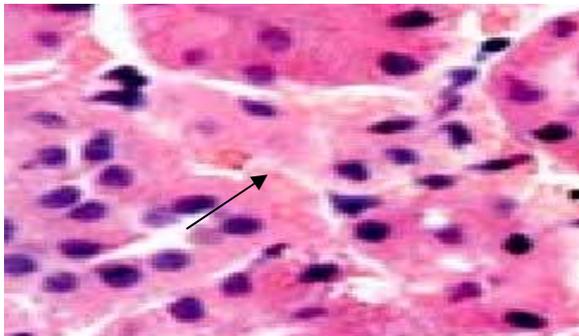


Figura D. Córtex renal de ratos tratados com extrato de *Q. amara* 800 μ g/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina células com morfologia normal, sem alterações nas extremidades. Coloração H&E,400x. A seta indica membrana celular e morfologia normal

Experimento II - Fêmeas

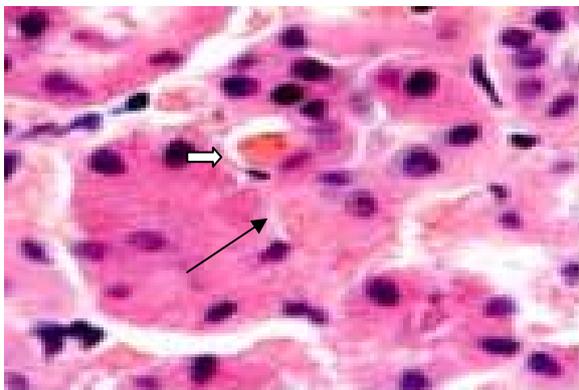


Figura E. Controle. Córtex renal de ratas, mostrando células normais, sem alterações na estrutura tecidual. Coloração H&E, 40X. A seta simples indica contornos celulares normais e a seta curta indica artefato de coloração.

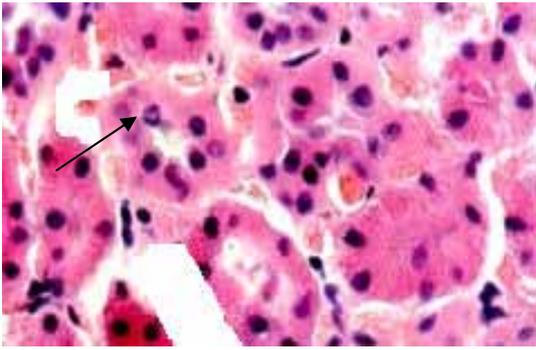


Figura F. Córtex renal de ratas tratadas com extrato de *S. macrolepis* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina apresenta um aglomerado de células polimorfonucleares, corado por H&E, 400x. A seta indica presença de núcleos bem delimitados e com morfologia normal

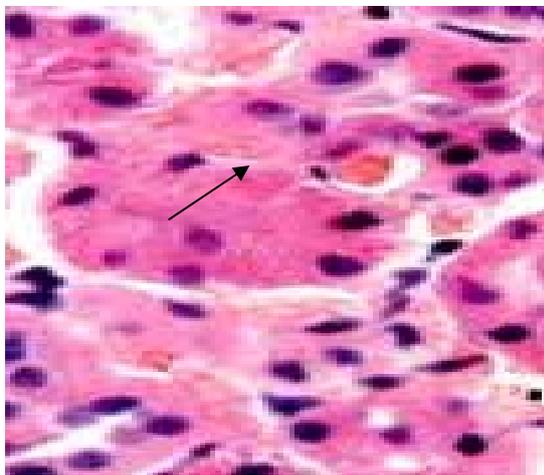


Figura G. Córtex renal de ratas tratadas com extrato de *T. ulmifolia* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina células com morfologia normal, sem alterações nas extremidades. Coloração H&E,400x.A seta indica contorno celular normal.

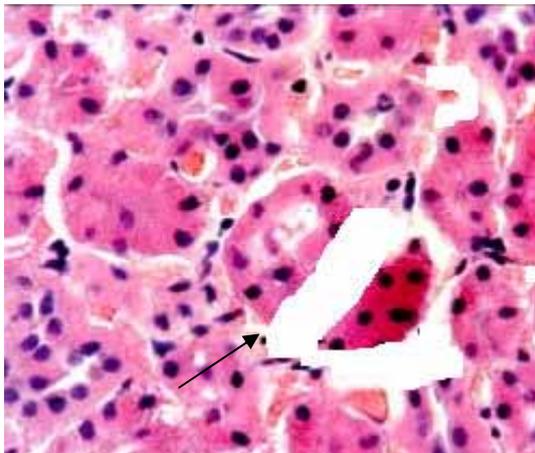


Figura H. Córtex renal de ratas tratadas com extrato de *Q. amara* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina células com morfologia normal, sem alterações nas extremidades. Coloração H&E,100x.A seta indica artefato de corte.

CORTES HISTOLÓGICOS

Experimento I- Machos (Fígado)

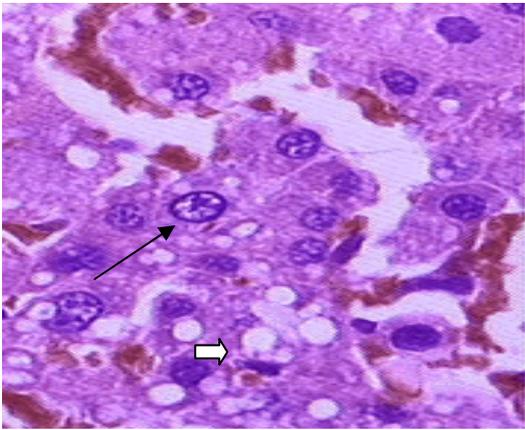


Figura I. Corte de fígado de em rato, animais normais (Controle), corado por H&E,400x. A seta simples indica núcleo bem delimitado e com morfologia normal a seta curta indica leve acúmulo de lipídios.

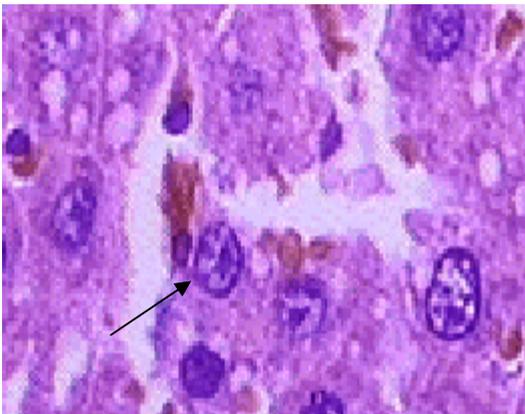


Figura J. Corte de fígado de ratos tratados com extrato de *S. macrolepsis* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina células com morfologia normal. Coloração H&E,400x.A seta indica núcleo bem delimitado e célula com morfologia normal.

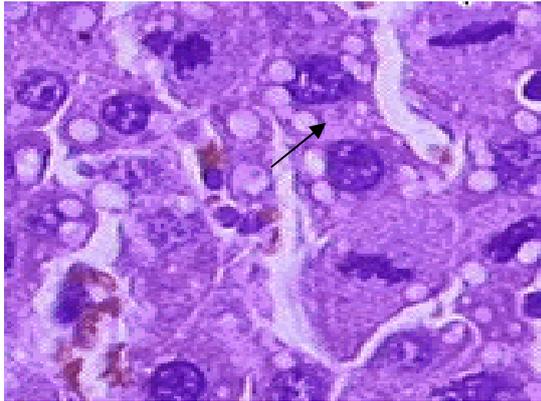


Figura K. Corte de fígado de ratos tratados com extrato de *T. ulmifolia* 800 μ g/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Células normais do córtex, corados por H&E,400x. A seta indica núcleo e nas proximidades leve acúmulo de lipídios.

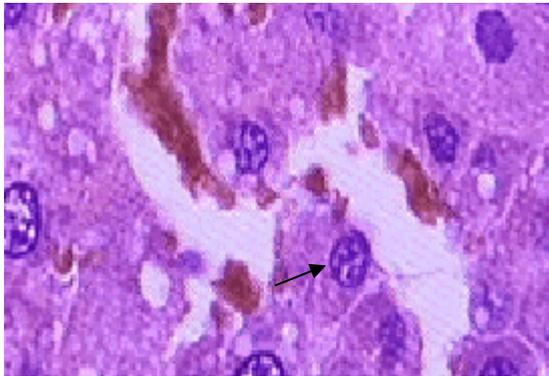


Figura L. Corte de fígado de ratos tratados com extrato de *Q. amara* 800 μ g/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Células normais do córtex, corados por H&E,400x. A seta indica núcleo normal e célula com morfologia normal.

Experimento II- Fêmeas (Fígado)

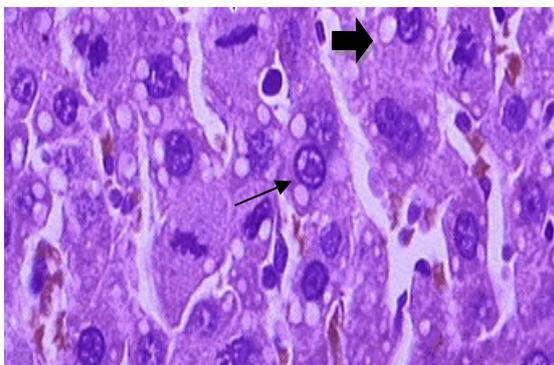


Figura M. Corte de fígado de rata controle. A visão tecidual revela células com morfologia normal, o tecido não apresenta esteatose, mas com leve acúmulo de lipídios, corado por H&E 400x. A seta simples indica núcleo norma e a seta larga indica leva acúmulo de lipídios.

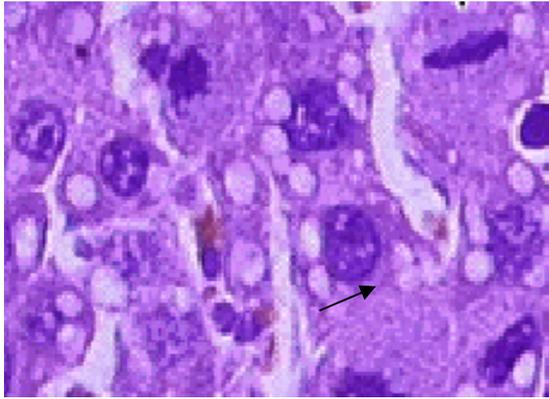


Figura N. Corte do Fígado ratas, tratadas com extrato de *S. macrolepis* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Visualização de leve acúmulo de lipídios, células normais, sem alterações, corados por H&E, 400x. A seta indica o parênquima hepático, coloração normal e morfologia celular normal.

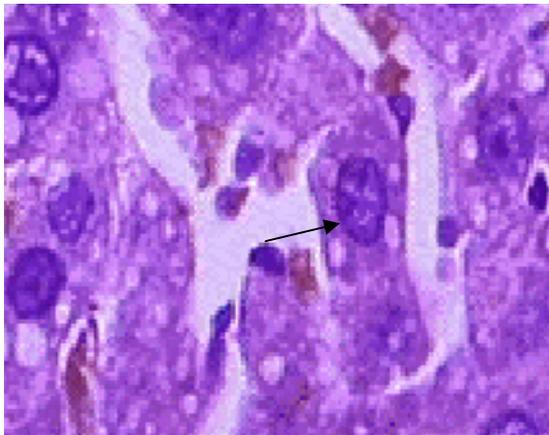


Figura O. Córtex do Fígado de ratas, tratadas com extrato de *T. ulmifolia* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina células com extremidades normais, núcleos bem delimitados e leve acúmulo de lipídios, corados por H&E, 400X. A seta indica núcleo normal.

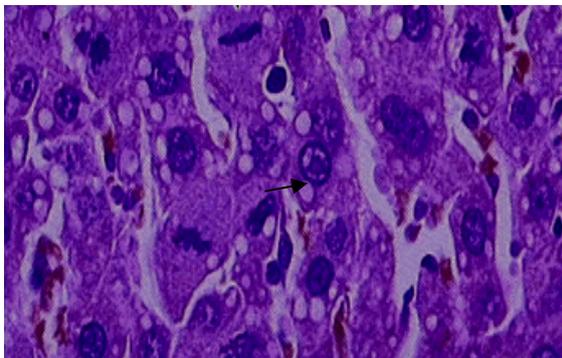


Figura P. Corte do Fígado de ratas, tratadas com extrato de *Q. amara* 800µg/mL na água de bebida após 90 dias de exposição. Observa-se na lâmina células com limites normais, sem alterações visíveis, corados por H&E, 400x. A seta indica núcleo normal e nas proximidades leve acúmulo de lipídios.

Análise de Urina

As urinas de todos os animais expostos aos extratos (*S. macrolepsis*, *T. ulmifolia* e *Q. amara*) foram analisadas durante a primeira e penúltima semana dos experimentos a médio prazo. Entretanto, não foi constatada nenhuma alteração na urina dos animais expostos as diferentes concentrações dos extratos nos dois momentos dos experimentos.

5.0 DISCUSSÃO:

A partir de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso de plantas medicinais. Métodos populares de cura, praticados pelos povos da região do mediterrâneo e do oriente, encontraram expressão no primeiro compêndio de plantas medicinais europeu de matéria médica, escrito pelo médico grego Pedanios Dioscorides no século I d.C.(SCHULZ et al.,2001). Hoje em dia, as vendas de produtos de ervas têm crescido assustadoramente nos últimos 5 anos. Infelizmente, o conhecimento básico devotado aos efeitos adversos desses produtos não tem crescido em importância na mesma proporção de seu uso. Dados questionáveis de acurácia, freqüentemente desenhados para vender produtos mais do que para prover informações objetivas podem ser encontrados impressos e na mídia eletrônica, mais notavelmente na internet. Mesmo em alguns jornais da área médica desencaminhando informações a respeito do benefício e do efeito adverso de ervas pode ser encontradas (CUPP et al., 2000).

Para avaliação da toxicidade de extratos vegetais e garantir a inocuidade ou mesmo conhecer os possíveis efeitos adversos, faz-se necessário estudo padronizado através de protocolos internacionais, levando em consideração a análise da substância a ser testada administrada em doses crescentes. Dentro deste universo foram analisados dados de toxicologia descritiva, bioquímicos hematológicos e histopatológicos de extratos vegetais, após administração via oral, que é uma prerrogativa da própria utilização do candidato a ser usado como medicamento.

Com relação aos efeitos adversos dos extratos administrados aos animais nos experimentos de toxicidade aguda, observou-se irritabilidade tanto de machos quanto de fêmeas em aproximadamente 30% dos animais na dose de 2000mg/kg. Para as doses de 5000mg/kg os efeitos foram praticamente os mesmos para os extratos *T. ulmifolia* e *Q. amara*, enquanto para o extrato de *S. macrolepis* estes efeitos foram observados somente em fêmeas. As Observações macroscópicas dos órgãos como coração, pulmão, baço, rim e fígado não apresentaram qualquer alteração visível. Estes dados mostram que estes extratos apresentaram baixa toxicidade aguda via oral para ratos.

Com relação aos efeitos adversos dos extratos administrados aos animais nos experimentos de toxicidade a médio prazo, começamos com os aspectos bioquímicos, visto que as concentrações foram subdivididas a partir do teste de palatabilidade, cuja maior concentração 800µg/mL, não levou a nenhum efeito visível. A elevação das concentrações de creatinina e uréia no sangue podem ser usadas como índice de decréscimo da filtração glomerular (DAVIS E BERNDT, 1994). No presente trabalho os resultados de creatinina revelaram-se normais para os machos, independente das concentrações dos extratos das plantas (Fig.1, Fig. 9 e Fig.16). Para o estudo das fêmeas houve aumento dos níveis de creatinina no soro somente para as concentrações de 400 e 800µg/mL do extrato de *T. ulmifolia*, conforme Fig. 24. Por outro lado, os níveis de uréia dos animais submetidos aos testes apresentaram alterações somente para a concentração de 800µg/mL com o extrato de *T. ulmifolia*, tanto para os machos quanto para as fêmeas, conforme Fig. 2 e Fig. 25. AKDOGAN et al., (2003) avaliando a função renal de extratos de *Mentha* sp constataram alterações respectivamente de ate 35% e 28% do valor normal para uréia e creatinina. Para SWENSON (1988) a excreção de uréia se

eleva com o aumento do teor de proteína digestível da dieta, quando analisamos o estudo de VALADARES et al (1997) pode-se concluir que a excreção de uréia é variável, possibilitando maior conservação de uréia e baixas ingestões e maior excreção a altas ingestões de N. No presente trabalho só se verificou elevação nos níveis de uréia em até 30% com o extrato de *T. ulmifolia* em machos. Entretanto, para as fêmeas verificou-se elevação respectivamente de até 36% e 7% de uréia e creatinina. Embora haja significância ao nível de $p < 0,05$ as porcentagens mostram que as elevações não foram acentuadas.

Vários autores utilizam atividade de enzimas com AST, ALT, γ -GT, para avaliação de dano hepatobiliar (SMINK et al., 2006; VETELAINEN et al., 2006). No presente trabalho para a avaliação da toxicidade hepática foram determinados níveis de atividade das AST, ALT, γ -GT e TP. Com relação à AST, os machos não apresentaram alteração alguma para os três extratos, conforme Fig.3, Fig.11 e Fig.18; as fêmeas apresentaram alterações para os extratos de *T. ulmifolia* e *Q. amara*, conforme Fig.26, e Fig.42. Contudo estas elevações de atividades não foram dose dependente. Com relação às ALT e γ -GT, os machos não apresentaram nenhuma alteração conforme Fig.4, Fig.12 e Fig.19, enquanto as fêmeas com as concentração de 800 μ g/mL de *Q. amara* (Fig 43) e *S. macrolepsis* (Fig.35) apresentaram elevação de atividades respectivamente para ALT e γ -GT. O tempo de protrombina que também foi utilizado na avaliação da função hepática, não apresentou nenhuma alteração com relação aos machos, enquanto para as fêmeas este parâmetro foi alterado somente com *S. macrolepsis* 800 μ g/mL. Em se tratando de hepatotoxicidade, estes resultados, de uma maneira geral,

mostraram que as fêmeas foram mais sensíveis que os machos para todos os extratos.

Para Kuroiwa et al., (2005) em estudo de toxicidade subcrônica realizado com extratos de *Agaricus blazei*, observou maior sensibilidade de fêmeas quando comparado aos machos.

A colestase bioquimicamente consiste numa alteração de constituinte do soro como hiperbilirrubinemia, bile acida e elevação de atividades das enzimas ALP e γ -GT (HASCHEK & ROUSSEAU 1998). No presente trabalho a função hepatobiliar foi avaliada através da atividade da ALP, γ -GT e bilirrubina no soro.

Nenhum dos três extratos provocou alteração dos níveis de ALP, tanto para machos quanto para fêmeas. No entanto, o extrato de *S. macrolepis* elevou a atividades da γ -GT em fêmeas, mas não em machos. Por outro lado a bilirrubina foi aumentada tanto em machos quanto em fêmeas pelo extrato de *T. ulmifolia* e pela *Q. amara* este aumento foi verificado somente em machos. Apesar do aumento dos níveis de bilirrubina pelos animais o que poderia caracterizar colestase, níveis normais de ALP não corrobora esta hipótese. Além do mais o aumento de bilirrubina não foi dose dependente, contudo ele foi observado com a concentração mais elevada dos extratos de *T. ulmifolia* e *Q. amara* o que pode ser um sinal de menor nível de concentração que provoca efeito adverso.

Na avaliação hematológica dos machos expostos ao extrato de *T. ulmifolia* 800 μ g/mL foi constatado aumento de 18% para HM, Ht e Hb conforme Tabela 7. Para as fêmeas, houve um aumento, não dose dependente, de HM, para as três concentrações, e para 400 e 800 μ g/mL aumento de CHCM também não dose dependente conforme Tabela 13. Para os extratos de *S. macrolepis* e *Q. amara*,

tanto para machos quanto para fêmeas não houve alteração em nenhum parâmetro hematológico conforme Tabelas 8, 9, 14 e 15. Estes resultados mostram que os animais foram mais sensíveis ao extrato de *T. ulmifolia* em comparação aos outros extratos em relação aos parâmetros hematológicos.

Quanto à avaliação histopatológica não houve alterações dignas de nota em relação aos controles com nenhum dos três extratos, conforme pode ser observadas nas lamínas de córtex renal machos e fêmeas Fig. de A até H e parênquima hepático Fig de I até O.

Como era de se esperar, as análises dos parâmetros urinários (pH, cetonas, bilirrubina, sangue, leucócitos, glicose, densidade) não apresentaram alterações em relação aos controles em nenhum dos extratos, mesmo porque nenhuma alteração histopatológica foi encontrada ao nível renal.

Considerando dose nenhum efeito observado (DNEAO) ao nível renal e hepático, tendo com “end point” alterações bioquímicas que foram as mais sensíveis, para as fêmeas seria 200µg/mL e para os machos seria 400µg/mL.

Considerando que os animais em média ingeriam 26,5mL de extrato por dia e pesavam em média 303 g ($\text{Massa inicial} + \text{massa final} = \text{Total}/2$) para a concentração de 200µg/mL a dose seria 17,5mg/kg de massa corpórea por dia.

Segundo ARANTES et al., (2005) os extratos de *Q. amara*, *S. macrolepsis* e *T. ulmifolia* apresentaram naquele estudo um CIM inferior a 200µg/mL, resultado muito promissor pois a recomendação para testes *In vitro* é que os extratos brutos apresentem CIM inferior a 250µg/mL. Portanto, salientamos que futuros estudos empregando estes extratos em seres humanos e a elaboração de novos fitoterápicos podem significar um importante avanço no estudo destas

plantas,principalmente quando comparamos aos resultados do estudo de avaliação toxicológica no presente trabalho.

6.0- CONCLUSÃO

Os extratos de *T. ulmifolia*, *S. macrolepsis* e *Q. amara*, apresentam baixa toxicidade oral aguda, pois mesmo com dose de 5000mg/kg não provocou nenhuma morte. Além do mais, efeitos apresentados como piloereção e irritabilidade não foram além de 8 horas.

Com relação à toxicidade a médio prazo o extrato de *T. ulmifolia* apresentou maior toxicidade renal que os outros dois extratos em especial para as fêmeas.

Levando-se em consideração a toxicidade renal e hepática as fêmeas foram mais sensíveis que os machos.

Estes dados tomados em conjunto, mostraram que o extrato de *T. ulmifolia* apresentou maior toxicidade que os outros dois e que as fêmeas foram mais sensíveis que os machos.

Tomando como base a dose nenhum efeito adverso observado podemos inferir que a dose referencia (RfD) seria 0,175mg/kg/dia, o que nos encoraja a prosseguir este trabalho em termos de purificação destes extratos para que possam ser utilizados como antimicobacteriano. Lembrando que a dose referência para ser considerada segura é inferida como 100 X menor que a DNEAO.

7.0 REFERÊNCIAS:

ABBOT,P.J. Comfrey: assessing the low cost health risk. **Med. J. Aust.**, v.149,n.1, p- 678-682,1988.

AKDOGAN,M.; KILINÇ,I.; ONCU,M.; KARAOZ,E.; DELIBAS,N.Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on Kidney tissue in rats. **Human & Experimental Toxicology**,v.22,n.1,p-213-219,2003.

ALMEIDA, R. **Plantas medicinais Brasileiras – Conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus Editora Ltda,341p, 1993.

ALVAREZ,F.; BERG,P.; BIANCHI,F.B. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. **J. Hepatology**, v.31, n.1, p. 929-938,2002.

ANDRADE,C.; DEZOTI,C.; SHIBUYA,C.A.; WATANABE,M.; VATTIMO,M.F.F. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do Alopurinol e N-acetilcisteína como antioxidantes.**Jornal Brasileiro de nefrologia**. v.XXVI, n.2, 2004.

ARANTES,V.P.In: Estudo da Atividade Antimicobacteriana de Extratos Vegetais do Cerrado Brasileiro. **Dissertação de Mestrado** – Unesp – Araraquara,2005

ARRAIS,P.S.D.; COELHO,H.L.L.; BATISTA,M.C.D.; CARVALHO,M.L.; RIGHI,R.E.; ARNAU,J.M. Perfil de automedicação no Brasil. **Rev.Saúde Pública**. v.31, n.1, p. 71-77, 1997.

BAIN, BÁRBARA J. **Células sanguíneas: um guia prático/Bárbara J. Bain trad. Renato Failace**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BENETUCCI, J. A.; BOUZA, J. .; COMPAGNUCCI, M. A.; CORTI, M.; ORTEGA, G.; BAJA, C. D.; LONARDO, M. D.; MONTANDER, L. J. G. and ASTARLOA, L. La tuberculosis como infección oportunista en el SIDA. **Infectologia y Microbiologia Clinica**, vol. 4, nº 3, 61-66.1992.

BILLO, N.E. Programa de controle da tuberculose nos tempos da infecção pelo HIV. In: Seminário interprogramas HIV/ tuberculose. Brasília, 1994.**Anais**. Fortaleza, p.25-29,1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, secretaria de vigilância sanitária portaria nº6/95 de 31.1.95. **Diário Oficial da União**, v.200, seção I, p- 1523-1524,1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**. Brasília, 2002, 64 p. (Cadernos de Atenção Básica nº 6. série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 148).

CALIXTO,J.B.;YUNES,R.A. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**.Editora Argos, ChALPecó, 2001

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Tradução de H. B. Fenema et al. Porto Alegre: Artmed, 751 p., 2000.

CANTRELL C L, FRANZBLAU S G, FISCHER N H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**,v.67,n.1,p.1-10,2001.

CECHINEL FILHO V, YUNES R A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova.**, v. 21,n.1,p. 99 – 105,1998.

CHAISSON,R.E.;STOKIN,G. Tuberculosis and human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.** V.159, p. 96-100, 1989.

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). **Os princípios éticos da experimentação animal**. São Paulo,1991

CORTINAS, M.N.; FERNANDEZ, M.; VALETA. M.I.; URIARTE, M.R.;MOGDASY,M.C.Characterización genotípica de 80 cepas Del género Mycobacterium en Uruguay.**Rev Med Uruguay.**;n.18,v.1, p.230-238,2002.

CUNHA,G.M.A.; VIANA.G.S.B.; RAO,V.S.N.; MAFEZOLI,J.; OLIVEIRA,M.C.F.; LIMA,M.A.S.; SILVEIRA,E.R. Atividade antimicrobiana de oleos essenciais de espécies de *Cróton* e *Psidium*. In: **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil,13, Fortaleza, Ceará, Anais**.1994

CUPP,M.J. **Toxicology and pharmacology of herbal products**.3ed. Humana Press,2000.

DAVIS,E.M; BERNDT,W.O. **Renal Methods for Toxicology**. In: **Principles and Methods of Toxicology**. 3ªed.Raven Press,1994.

FAIRCHILD, A. L. and OPPENHEIMER, G. M. Public health nihilism vs pragmatism: History, politics and the control of tuberculosis. **American Journal of Public Health**,vol. 88, nº 7, 1105-1117.1998

FALKINHAM I J O. Epidemiology of infection by nontuberculous micobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9,n.1,p. 177-215,1996.

FIGUEROA, M.L.; LOPEZ,V.C.S. Descripción de la resistência adquirida Del *Mycobacterium tuberculosis* a los antibióticos contra la tuberculosis en Bogotá entre octubre de 1996 y diciembre de 2000. **Calle**, V.13, p.32-69, 2000

FIUZA DE MELLO, F.A.; AFIÚNE,J.B.Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **J. Pneumol.**, Porto Alegre, v.19. n.1, p. 19-24, 1993

FMUSP: Normas para o diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose.- São Paulo: **Hospital das Clínicas**,2006.

FUCHS,F.D.; WANNMACHER,L.; FERREIRA,M.B.C. **Farmacologia clinica: Fundamentos da terapêutica racional**.3 ed. , Rio de Janeiro, Guanabara koogan,2004.

GARRAFA, V. **Contra o monopólio da saúde: temas para debate**. Rio de Janeiro: Ed. Achiami,1983.

GILLESPIE,S.H.;BILLINGTON,O. Activity of moxifloxacin against mycobacteria. **Journal of Antimicrobial ChemoterALPhy**, v.44,n.1, p.393-395,1999.

GOODFELLOW M, MAGEE J G. Taxonomy of mycobacteria. In: Gangadharam P R J, Jenkins P A. **Mycobacteria I. Basic aspects**. *New York: Champman & Hall*, p.1-71,1998.

GRANGE J M. Pathogenesis of mycobacterial disease. In Gangadharam P R J. and Jenkins P A. **Mycobacteria vol. I Basic aspects**, v.1, 145-175,1998.

GRINBAUM,R.S.; DAHER,M.; MEDEIROS,E.AS.; MENDONÇA,J.S.; BEU.M.F.; KUSANO,E.; TELLES,M.AS.; EUKI,S.Y.M. Infecção casuada por *Mycobacterium tuberculosis* com resistência primária a múltiplas drogas:relato de um caso em pacientes com AIDS. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.41,n.1, p- 255 –256, 1995.

HASCHEK,W.M.; ROUSSEAU,C.G. **Fundamentals of toxicology pathology**. Academic Press,1996

HOLT, J.G; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins,: The mycobacteria, p. 597-603, 1994.

JANUÁRIO, A.H.;FILHO, E. R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res**,v. 16, n.5,p. 445-448, 2002.

KUROIWA,Y.; NISHIKAWA,A.; IMAZAWA,T.; KANKI,K.; KITAMURA,Y.; UMEMURA,T.; HIROSE,M. Lack of subchronic toxicity of na aqueous extract of *Agaricus blazei* Murril in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, V.43, n.1, p.1047-1053, 2005.

LEITE, C. Q. F.; BARRETO, A. M. W. and LEITE, S. R. A. Thin-layer chromatogrALPhy of mycobactins and mycolic acids for the identification of clinical mycobacteria. **Revista Microbiologia**, São Paulo,v.26,n.3,p.192-199,1995.

LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JR.,R.Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose.**Rev.Ciênc. Farm.**São Paulo, v.18, n.1,p.17-28,1997.

LEITE, C. Q. F.; SOUZA, C. W. O. and LEITE, S. R. A. Identification of mycobacteria by thin layer chromatogrALPhic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: Four years of experience. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, nov./dec.v. 93,n.6,p.801-805.1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo, Sarvier,839p., 1995.

LIVANAINEN,E.; MARTIKAINEN,P.J.; VAANANEN,P.; KATILA,M.L. Environmental factors affecting the occurence of mycobacteria in brook sediments. **J. Microbiol**,v.86,n.4,p.673-681. 1999.

MENGUE,S.S.; MENTZ,L.A.; SHENKEL,E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.11, n.1, p.21-35,2001.

MITRUKA,B.M.;RAWNSLEY,H.M. **Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans**. 2 ed.Masson Publishing,p.150-158,1981.

MOTTA,V.T. **Bioquímica clínica: técnica laboratorial**. Porto Alegre: 2º ed. Médica Missau,1989.

NCCLS. **Procedures for the collection of diagnostic blood specimens for testing plasma-based coagulation assays**; approved guideline fourth edition. NCCLS,2003.

NOGUEIRA,J.A.; NETTO,R.A.; VILLA,T.C.S.; MONROE,A.A.; LUCCA,M.E.S. Implantação da estratégia DOTS no controle da tuberculose em Ribeirão Preto, São Paulo (1998-2004).**Bol. Pneumol Sanit**, v.14, n.3, p.141-144,2006.

OLIVEIRA, C.C.; SIQUIERA,J.M.; SOUZA,K.C.B.; RESENDE,U.M. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de plantas do cerrado. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL,13, Fortaleza, Ceará. **Anais,1994**.

PARFITT,K.;SWEETMAN,S.C.;BLAKE,P.S.;PARSONS,A V. **Martindale:the complete drug reference**. Thirty-second edition,Pharmaceutical Press,1999.

PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G. A. Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate. **Pharmacol Ver.**, v.3, n.2, p 161-176, 2001.

PIETRO R C L R, KASHIMA S, SATO D N, JANUÁRIO A H, FRANÇA S C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine.**, v.7,n.4,p. 335-338,2000.

PLAA,L.G.; CHARBONNEAU,M. **Detection and Evaluation of chemically Induced Liver Injury. In: Principles and Methods of Toxicology.** 3^aed.Raven Press,1994.

POZNIAK, A. L.; UTTLEY, A. H. C. and KENT, R. J. *Mycobacterium avium* Complex in AIDS: Who, when, where, why and how? **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**,81, 40S-46S.1996

RAYNAUD, C.; ETIENNE, G.; PEYRON, P. LANÉELLE, M. A. and DAFFÉ, M. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, 144: 577-587.1998

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; FILHO,S.C.V.; LEÃO, M.I.;SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; GONÇALVES, L. C.; DIAS, H.L.; LINHARES, R. S. Concentração Plasmática de Uréia e Excreção de Uréia e Creatinina em Novilhos. **Revista Bras. Zootec.**, v.29,n.4, p- 1235-1243,2000.

ROBERTS,M.S.; MAGNUSSON, B.M.; BURCZYNSKI, F.J. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. **Clin. Pharmacokinet**, v.41,n.1, p. 751-790, 2002.

RUFFINO-NETO,A.; VILLA, T.C.S. **Tuberculose: implantação do DOTS em algumas regiões do Brasil, histórico e peculiaridades regionais.** Ribeirão Preto FMRP/REDE TB-USP,p.204,2006.

SCHULZ,V.; HANSEL,R.; TYLER,V.E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde.** 4 ed. – Barueri,Manole,2001.

SIMÕES,M.O.C; SCHENKEL,E.P.; GOSMANN,G.; MELLO,J.C.P; MENTZ,L.A; PETROVICK,P.R.;**Farmacognosia da planta ao medicamento.** 2ed – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/ ed; UFUSC, 2000.

SMINK,F.;HOEK,B.V.;RINGERS,J.;ALTENA,R.V.;AREND,S.M. **Caso report: Risk factors of acute hepatic failure during antituberculosis treatment: two cases and literature review.** Journal of medicine, 2006

SMITH,I.*Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16,n.3, p.463-496,2003.

SOMMERS, H.M.; GOOD,R.C.;*MYCOABCTERIUM* IN:LENETTE, E.H.;BALOWS,A; HAUSLER JR.;W.J.,EDS. **Manual of Clinical Microbiology.** 4 ed. Washington : American Society of Microbiology,p.216-248,1985.

STANGARLIN et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos.**Rev Ciência & Tecnologia**,v.1,n.1,p.12-15,1999.

STICKEL, F.; BAUMULLER,H.M.; SEITZ,K.; VASILAKIS, D.; SEITZ, G.; SEITZ.H.K.
Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum* rizoma). **Journal of hepatology.**,
v.39,n.1, p-62-67, 2003.

SWENSON JM, WALLACE JR R J, SILCOX VA, THORNSBERRY A C.
Antimicrobial susceptibility of five subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and
Mycobacterium chelonae. **Antimicrobial Agents and Chemotherap.**,v. 28,n.6,p.
807-811.1985.

SWENSON,M.J. In: DUKES,H.J. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de
Janeiro. Guanabara Koogan, 10 ed, 1988, p.799.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. THE MYCOBACTERIA. IN: SNEATH, P.H.A.; MAIR,
N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (ED.). **Bergey's manual of systematic
bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins,. p.1435-1457,1986

WINTROBE. **CLINICAL HEMATOLOGY**. Editora Intermédica, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report on the Tuberculosis Epidemic.**
Tuberculosis (TB) Annual Report - DOTS (Directly Observed Treatment, Short-
course) - A Breakthrough in TB Control, 40 p., 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report – Global Tuberculosis Control**
– **Surveillance Planning, Financing**. 2002 ([http:// www. Who.org](http://www.who.org))

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing**. Geneva:WHO,204P.,2006.

YEONG,M.L.; WAKEFIELD,S.J.; FORD,H.C. Hepatocyte membrane injury and bled formation following low dose comfrey toxicity in rats. **Ind.j.exp. Pathol**, v.74,n.1, p.211-217, 1993.

YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. **AACC Press**, 1997.

VALADARES,R.F.D.;GONÇALVES,L.C. SAMPAIO, I.B. Níveis de proteína em dietas de bovinos, consumo, digestibilidade e balanços de compostos nitrogenados. **Rev. Bras. Zootecnia**, v.26,n.6, p. 1259-1263,1997.

VETELAINEN,R.L.; BENNINK,R.J.; BRUIN,K.; VILET,A.V.; GULIK,T.M.V.; **Hepatobiliary function assessed by ⁹⁹Tc-mebrofenin cholescintigraphy in the evaluation of severity of steatosis in a rat model**. European Journal of nuclear medicine and molecular imaging. v.33,n.10,p-1107-114,2006.

ZACARIAS, F.; GONZALES, R.S.; CUCHI,P. El Sida y su interacción con la tuberculosis en América Latina y el Caribe. **Bol. Of. Sanit. Panam**. v.116, n.3, p.250-262, 1994.

Tempo para tudo

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu;

Há tempo de nascer e tempo de morrer;

Tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar e tempo de curar;

Tempo de derribar e tempo de edificar;

Tempo de chorar e tempo de rir;

Tempo de prantear e tempo de saltar de alegria;

Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras;

Tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar e tempo de perder;

Tempo de guardar e tempo de deitar fora;

Tempo de rasgar e tempo de coser;

Tempo de estar calado e tempo de falar;

Tempo de amar e tempo de aborrecer;

Tempo de guerra e tempo de paz.

Eclesiastes 3, 1-6

Página 666 – Bíblia Sagrada.