

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS
DE USO ODONTOLÓGICO COM PROPRIEDADE
REMOVEDORA DE BIOFILME A PARTIR DE ESPÉCIES
VEGETAIS AMAZÔNICAS

RENILTO FROTA CORRÊA

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

RENILTO FROTA CORRÊA

ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS
DE USO ODONTOLÓGICO COM PROPRIEDADE
REMOVEDORA DE BIOFILME A PARTIR DE ESPÉCIES
VEGETAIS AMAZÔNICAS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia para a Saúde.

ORIENTADOR: Prof.Dr. Luiz Antonio de Oliveira (PhD)

CO-ORIENTADORA: Prof^a.Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C825e Corrêa, Renilto Frota
Estudo e desenvolvimento de fitoterápicos de uso odontológico
com propriedades removedoras de biofilme a partir de espécies
vegetais Amazônicas / Renilto Frota Corrêa. 2011
235 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira PhD
Coorientador: Prof. Dr. Antônio José Lapa PhD
Coorientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Removedor de biofilme. 2. Biofilme. 3. Streptococcus mutans.
4. Cárie Dentária. 5. Fitoterápicos odontológicos. I. PhD, Prof. Dr.
Luiz Antonio de Oliveira II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação de glicoproteínas derivadas do hospedeiro com a superfície carregada do esmalte.....	21
Figura 2 - A - <i>Streptococcus sanguis</i> - Dextrana contendo no esqueleto α (1,6)-glicose e cadeia lateral típica de dextranas insolúveis. B - <i>Streptococcus mutans</i> - Dextrana com cadeias laterais de α (1,3)-glicose.	25
Figura 3 - <i>Streptococcus mutans</i> em placa bacteriana ou biofilme.	26
Figura 4 - Tiririca (<i>Cyperus rotundus</i> L.) e seus tubérculos	34
Figura 5 - Principais constituintes do óleo essencial dos tubérculos de <i>C. rotundus</i> encontrados em espécies brasileiras: A = cipereno, B = α -ciperona, C = epoxicariofileno, D = β -selineno, E = ciperotundona	36
Figura 6 - <i>Guatteria citriodora</i> - Galho com frutos e folha da espécie.....	39
Figura 7 - Principais constituintes do óleo essencial das folhas de <i>G. citriodora</i> : A = citronelal, B = citronelol, C = neo-isopulegol, D = isopulegol, E = óxido de cariofileno.	40
Figura 8 - Árvore e caule com resina de breu branco.....	42
Figura 9 - Principais constituintes do óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i> : A = terpinoleno, B = p-cimen-8-ol, C = limoneno, D = p-cimeno e E = α -felandreno.	43
Figura 10 - Sistema de Clevenger modificado para extração de óleo essencial.....	73
Figura 11 – Microplaca para determinação da CIM.....	76
Figura 12 – Placa de Petri com meio sólido e repique do conteúdo dos poços com inibição de crescimento.....	77
Figura 13 - Teste do Campo-Aberto (<i>Open-Field</i>).....	81
Figura 14 - Teste do Rota-Rod	81
Figura 15 - Teste do Arame (<i>wiring test</i>)	82
Figura 16 - Biotério do CBA com a manutenção dos ratos Wistar em condições controladas	85
Figura 17 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial dos tubérculos de <i>Cyperus rotundus</i> do INPA.....	94
Figura 18 - Espectro de massas da α -ciperona	96
Figura 19 - Espectro de massas da ciperotundona.....	96
Figura 20 - Espectro de massas do cipereno.....	96
Figura 21 - Espectro de massas do óxido de cariofileno	96
Figura 22 - Espectro de massas do β -selineno.....	96
Figura 23 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da resina de <i>Protium heptaphyllum</i>	97
Figura 24 - Espectro de massas do p-cimeno	99
Figura 25 - Espectro de massas do α -felandreno.....	99
Figura 26 - Espectro de massas do limoneno	99
Figura 27 - Espectro de massas do canfeno.....	99
Figura 28 - Espectro de massas do <i>trans</i> -diidro- α -terpineol	99
Figura 29 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria citriodora</i>	100
Figura 30 - Espectro de massas do citronelal	102
Figura 31 - Espectro de massas do citronelol.....	102
Figura 32 - Espectro de massas do acetato de citronelila.....	102
Figura 33 - Espectro de massas do geraniol	102
Figura 34 - Espectro de massas do β -pineno	102
Figura 35 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da mistura RF-11MAO.....	103
Figura 36 – Número de cruzamentos e levantares no Teste do Campo Aberto, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO	106

Figura 37 - Tempos de latência e permanência no Rota-Rod, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO	108
Figura 38 - Tempo para segurar o arame no Teste do Arame, dos camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO	109
Figura 39 - Número de cruzamentos e levantares no Teste do Campo Aberto, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO (segunda dose)	111
Figura 40 - Tempos de latência e permanência no Rota-Rod, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO (Segunda dose)	113
Figura 41 – Tempo para segurar o arame no Teste do Arame, dos camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO (Segunda dose)	114
Figura 42 – Latência e duração do Sono induzido por Barbitúrico, Controle (água) e Veículo (água+tween)	116
Figura 43 - Peso dos ratos machos e fêmeas em resposta à administração da amostra RF-11MAO diluída	119
Figura 44 - Consumo de Ração dos ratos machos e fêmeas em resposta à administração RF-11MAO diluída	120
Figura 45 - Consumo de água dos ratos machos e fêmeas em resposta à administração de RF-11MAO diluída	121
Figura 46 - Peso dos ratos fêmeas em 28 dias	123
Figura 47 - Consumo de ração dos ratos machos e fêmeas em 28 dias	124
Figura 48 - Consumo de água dos ratos machos e fêmeas em 28 dias	125
Figura 49 - Concentração de ácido úrico em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	135
Figura 50 - Concentração de Albumina em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	136
Figura 51 - Concentração plasmática de Alanina amino transferase em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	137
Figura 52 - Concentração plasmática de aspartato amino transferase em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	138
Figura 53 - Concentração plasmática de bilirrubina em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	139
Figura 54 - Concentração plasmática de colesterol em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	140
Figura 55 - Concentração plasmática do reagente creatinina K em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	141
Figura 56 - Concentração plasmática de fosfatase alcalina em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	142
Figura 57 - Concentração de Glicose em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	143
Figura 58 - Concentração plasmática de proteínas totais em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	144
Figura 59 - Concentração plasmática de triglicérides em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	145
Figura 60 - Concentração plasmática de uréia em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	146
Figura 61 - Concentração plasmática de ácido úrico em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	148
Figura 62 - Concentração plasmática de albumina em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	149

Figura 63- Concentração plasmática de alanina amino transferase em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	150
Figura 64 - Concentração plasmática de aspartato amino transferase em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	151
Figura 65 - Concentração plasmática de bilirrubina em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	152
Figura 66 - Concentração plasmática de colesterol em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	153
Figura 67 - Concentração plasmática do reagente creatinina K em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	154
Figura 68 - Concentração plasmática de fosfatase alcalina em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	155
Figura 69 - Concentração plasmática de glicose em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	156
Figura 70 - Concentração plasmática de proteínas totais em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	157
Figura 71 - Concentração plasmática de triglicérides em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	157
Figura 72 - Concentração plasmática de uréia em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO	158
Figura 73 - Concentração plasmática de ácido úrico em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	160
Figura 74 - Concentração plasmática de albumina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	161
Figura 75 - Concentração plasmática de alanina amino transferase em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	162
Figura 76 - Concentração plasmática de aspartato amino transferase em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	163
Figura 77 - Concentração plasmática de bilirrubina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	163
Figura 78 - Concentração plasmática de colesterol em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	164
Figura 79 - Concentração plasmática de creatinina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	165
Figura 80 - Concentração plasmática de fosfatase alcalina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	166
Figura 81 - Concentração plasmática de glicose em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	167
Figura 82 - Concentração plasmática de proteínas totais em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	168
Figura 83 - Concentração plasmática de triglicérides em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	168
Figura 84 - Concentração plasmática de uréia em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO	169
Figura 85 - Fígado de ratos machos 33 e 31 com aumento de 100x e 400x, em detalhe Esteatose Difusa Microgoticular, após 24 horas com tratamento 1/3 e no controle, respectivamente.	179
Figura 86 – Pulmão de ratos fêmeas 41 e 39 com aumento de 200x, em 24 horas com tratamento 1/3 e no controle demonstraram presença de Enfisemas, Focos de Colapso e Foco de Colapso/granulomatoso.	181

Figura 87 – Rim de ratos macho 38 e fêmea 44 com aumento de 400x e 200x, em 24 horas com tratamento 1/3, com presença de Nefrite Intersticial Discreta e o controle com Congestão, respectivamente.	182
Figura 88 – Baço de ratos machos 33 e 38 com aumento de 200x e 100x, em 24 horas com tratamento 1/3, com presença de Hemossiderina e Hemossiderina/Megacariócito no controle respectivamente.	183
Figura 89 – Gônadas de rato macho 31 à esquerda e fêmea 44 à direita, com aumento de 100x e 200x, após 24 horas. Testículo normal e ovário com presença de Congestão no controle..	184
Figura 90 – Adrenais de ratos fêmeas 98 e 39 com aumento de 200x e 100x, em 14 dias de tratamento com 1/3 apresentou Hiperplasia Trabecular/Aumento de Tamanho e controle normal respectivamente.	185
Figura 91 – Linfonodos de rato fêmea 49 e 98 com aumento de 100x e 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle apresentaram Histiocitose e Hemofagocitose respectivamente.	187
Figura 92 – Timo de rato macho 83 e 36 com aumento de 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle apresentaram parâmetros de normalidade respectivamente.	188
Figura 93 – Próstata de rato macho 83 e 36 com aumento de 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle demonstraram histologia normal respectivamente.	189
Figura 94 - Vesícula seminal de rato macho 83 e 36 com aumento de 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle com parâmetros histológicos de normalidade respectivamente.	189
Figura 95 – Esôfago de ratos macho e fêmea 31 e 39 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	191
Figura 96 – Estômago de rato macho 31 e 39 com aumento de 100x e 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	192
Figura 97 – Intestino delgado de ratos macho e fêmeas 31 e 39 com aumento de 200x e 100x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	193
Figura 98 – Intestino grosso de ratos macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	194
Figura 99 - Fígado de ratos machos 181 e 151 com aumento de 400x e 100x, em detalhe Esteatose Focal Difusa e Hiperplasia Linfóide Focal, após 28 dias com tratamento 1/10 e Esteatose Difusa Microgoticular no controle, respectivamente.	196
Figura 100 – Pulmão de ratos fêmeas 167 e 174 com aumento de 400x e 200x, em 28 dias com tratamento 1/10 com Hiperplasia Linfóide Focal/granulomatosa e no controle demonstraram presença de Focos de Colapso, respectivamente.	197
Figura 101 – Rim de ratos fêmeas 172 e 174 com aumento de 200x e 100x, em 28 dias com tratamento 1/10, com presença de Nefrite Intersticial Discreta, no animal tratado e no controle, respectivamente.	199
Figura 102 – Baço de ratos machos 167 e 188 com aumento de 400x e 200x, em 28 dias com tratamento 1/10, com presença de Hemossiderina/Megacariócito nos animais tratados e no controle, respectivamente.	200
Figura 103 – Gônadas de rato macho 151 à esquerda e fêmea 169 à direita com aumento de 200x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e no controle os testículos e ovários permaneceram normais	201
Figura 104 – Adrenais de ratos macho e fêmea 151 e 169 com aumento de 200x e 100x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle apresentaram parâmetros histológicos normais, respectivamente.	202
Figura 105 – Linfonodos de rato macho 186 e 156 com aumento de 100x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle apresentaram Histiocitose e Hemofagocitose, respectivamente.	203

Figura 106 – Timo de rato macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 200x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle apresentaram parâmetros de normalidade, respectivamente.	204
Figura 107 – Próstata de rato macho 156 e 176 com aumento de 200x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle demonstraram histologia normal, respectivamente.	205
Figura 108 – Vesícula seminal de rato macho 156 e 176 com aumento de 200x e 100x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	205
Figura 109 – Esôfago de rato macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	207
Figura 110 – Estômago de rato macho 151 e 174 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	207
Figura 111 – Intestino delgado de ratos macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 100x e 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	208
Figura 112 – Intestino grosso de ratos macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 100x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.	209

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Associação entre as bactérias e os tipos de cárie dentária.....	24
Tabela 2 - Atividades de coleta do material botânico	72
Tabela 3. Características dos óleos essenciais das espécies selecionadas e da mistura	93
Tabela 4 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Cyperus rotundus</i>	95
Tabela 5 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Protium heptaphyllum</i> . ..	98
Tabela 6 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Guatteria citriodora</i> ..	101
Tabela 7 - Constituintes majoritários identificados na amostra RF-11MAO	103
Tabela 8 - Tratamento para determinação da DL ₅₀ em camundongos Swiss	117
Tabela 9 – Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos machos após 24 horas	127
Tabela 10 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos fêmeas após 24 horas	128
Tabela 11 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos machos após 14 dias	129
Tabela 12 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos fêmeas após 14 dias	130
Tabela 13 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos machos após 28 dias	131
Tabela 14 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos fêmeas após 28 dias	132
Tabela 15 – Bioquímica plasmática dos ratos machos, após 24 horas tratados com a amostra RF-11MAO.....	134
Tabela 16 - Bioquímica plasmática dos ratos machos, após 14 dias tratados com a amostra RF-11MAO.....	134
Tabela 17 - Bioquímica plasmática dos ratos fêmeas após 24 horas tratadas com a amostra RF-11MAO.....	147
Tabela 18 - Bioquímica plasmática dos ratos fêmeas após 14 dias tratadas com a amostra RF-11MAO.....	147
Tabela 19 - Bioquímica plasmática dos ratos machos, após 28 dias tratados com a amostra RF-11MAO.....	159
Tabela 20 - Bioquímica plasmática dos ratos fêmeas, após 28 dias tratadas com a amostra RF-11MAO.....	159
Tabela 21 - Pesos corporais e dos órgãos de ratos machos tratados em 24 horas	171
Tabela 22 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos machos tratados em 24 horas ..	171
Tabela 23 - Pesos corporais e dos órgãos de ratas fêmeas após 24 horas da ingestão da RF-11MAO.....	172
Tabela 24 - Relação peso dos órgãos/peso cerebral de ratas fêmeas após 24 horas da ingestão da RF-11MAO.....	172
Tabela 25 – Pesos corporais e dos órgãos de ratos machos após 14 dias da ingestão da RF-11MAO.....	173
Tabela 26 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos machos após 14 dias da ingestão da RF-11MAO.....	174
Tabela 27 - Pesos corporais e dos órgãos de ratos fêmeas após 14 dias da ingestão da RF-11MAO.....	175
Tabela 28 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos fêmeas após 14 dias da ingestão da RF-11MAO.....	175

Tabela 29 - Pesos corporais e dos órgãos de ratos machos após 28 dias da ingestão da RF-11MAO.....	176
Tabela 30 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos machos após 28 dias da ingestão da RF-11MAO.....	176
Tabela 31 – Pesos corporais e dos órgãos de ratos fêmeas após 28 dias da ingestão da RF-11MAO.....	177
Tabela 32 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos fêmeas após 28 dias da ingestão da RF-11MAO.....	178
Tabela 33 – Resultados da avaliação histopatológica na fase aguda em ratos machos.....	194
Tabela 34 – Avaliação Histopatológica na fase aguda em ratos fêmeas.....	195
Tabela 35 - Avaliação histopatológica da fase subcrônica dos ratos machos	210
Tabela 36 – Avaliação histopatológica da fase subcrônica dos ratos fêmeas	210

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
AAALAC	<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
ABC	Academia Brasileira de Ciências
ALT	alanine aminotransferase
AMH	Ágar Mueller-Hinton
ANOVA	Análise of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartate aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CDL	Concentração Diferencial de Leucócitos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CI ₅₀	Concentração Inibitória a 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cm	Centímetro
CMC	<i>Chemistry-Manufacturing-Control</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPOD	Índice de Dentes, Cariados, Perdidos, e Obturados
CTL	Contagens Total de Leucócitos
DAP	Diâmetro a Altura do Peito
dL	Decilitros
DL ₅₀	Dose Letal de 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E	Enfisemas
EDM	Esteatose Difusa Microgoticular
EFD	Esteatose Focal Discreta
eV	Eletrovolts
FAC	Fosfatase ácida
FALC	Fosfatase alcalina
FC	Foco de Colapso
FDA	Food and Drug Administration
FESBE	Federação de Sociedades de Biologia Experimental
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fL	Fentolitros
FC	Focos de Colapso
FC/gra	Focos de Colapso granulomatoso
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
He	Hélio
HE	Hematoxilina e Eosina

HEMO	Hemofagocitose
HLF	Hiperplasia Linfóide Focal
H/M	Hemossiderina/Magacariócitos
Hm	Hemácias
HIS	histiocitose
Ht	Hematócrito
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Kg	Kilograma
L1210	Linhagem de células leucêmicas
MERCOSUL	Mercado Comum da América do Sul
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligrama
MH	Müller-Hinton
Mm	Milímetros
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NID	Nefrite Intersticial Discreta
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OAB	Ordem dos Advogados do Brasil
°C	grau Celsius
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	agar batata dextrose
PDW	amplitude de distribuição das plaquetas
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PLT	Plaquetas
RCGP	Razão de Células Grandes de Plaquetas
RDW	Red Blood cell Distribution Width
RF-11MAO	Codificação da Mistura de óleos essenciais
Rpm	Rotação por minuto
SBPC	Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência
DAS	sabourand dextrose Agar
SDB	sabourand dextrose broth
SNC	Sistema Nervoso Central
SOZED	Sociedade Zoófila Educativa
TSA	Tripcase Soy Agar
TSB	Tripcase Soy Broth
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UNESCO	United Nations Educational Scientific and Cultural Organization
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume Corpuscular Médio
VG	Volume Globular
VMP	Volume Médio das Plaquetas
WHO	World Health Organization
WSPA	Sociedade Mundial para a Proteção dos Animais

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
SUMÁRIO.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 BIOFILME	20
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA	22
3.3 O MICRORGANISMO CARIOGÊNICO: <i>S. mutans</i>	23
3.4 ADERÊNCIA <i>in vitro</i> de <i>S. mutans</i>	28
3.5 APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	29
3.6 A VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DOS INSUMOS	32
3.7 AS ESPÉCIES SELECIONADAS PARA VERIFICAÇÃO DA SEGURANÇA	33
3.7.1 <i>Cyperus rotundus</i> (CYPERACEAE).....	33
3.7.1.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DOS TUBÉRCULOS DE <i>C. rotundus</i>	35
3.7.1.2 PERFIL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DOS TUBÉRCULOS DE <i>C. rotundus</i>	37
3.7.2 <i>Guatteria citriodora</i> Ducke (ANNONACEAE)	38
3.7.2.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>G. citriodora</i>	40
3.7.2.2 PERFIL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>G. citriodora</i>	40
3.7.3 <i>Protium heptaphyllum</i> March (BURSERACEAE)	41
3.7.3.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE <i>P. heptaphyllum</i>	42
3.7.3.2 PERFIL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. heptaphyllum</i>	43
3.8 A IMPORTÂNCIA MICROBIOLÓGICA DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E REMOVEDORA DE BIOFILME NA ODONTOLOGIA.....	44
3.8.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	45
3.8.2 FATORES INTERFERENTES.....	49
3.8.2.1 MEIOS DE CULTURA	49

3.8.2.2 pH	50
3.8.2.3 DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO	51
3.8.2.4 INÓCULO	51
3.8.2.5 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO	52
3.9 NORMATIZAÇÃO DE FITOTERÁPICOS	52
3.10 CONTROLE DE QUALIDADE PARA FITOTERÁPICOS	54
3.11 A IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO DOS FITOTERÁPICOS	57
3.12 A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO	58
3.13 REGULAMENTAÇÃO DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO BRASIL	60
3.14 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICIDADE COM FITOTERÁPICOS	63
3.14.1 PARÂMETROS HEMATÓLOGICOS EM RATOS WISTAR	68
3.14.2 PARÂMETROS DA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA EM RATOS WISTAR	70
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	71
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	72
4.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	72
4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	73
4.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	74
4.5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM) EM MEIO LÍQUIDO	74
4.5.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MINIMA (CBM) EM MEIO SÓLIDO	77
4.6 CÁLCULO DA DOSE EM FUNÇÃO DO VOLUME ADMINISTRADO	77
4.7 TESTES PRELIMINARES AO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO	78
4.8 O ESTUDO PRÉ-CLÍNICO	79
4.9 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	79
4.9.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (<i>Open-Field</i>)	80
4.9.2 TESTE DO ROTA-ROD	81
4.9.3 TESTE DO ARAME (<i>WIRING TEST</i>)	82
4.9.4 TESTE DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICO	82
4.9.5 TESTE PARA DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL DE 50% (DL ₅₀)	83
4.10 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICIDADE AGUDA ORAL EM RATOS - DOSE ÚNICA	84
4.10.1 FASE EXPERIMENTAL DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	84
4.10.2 VARIÁVEIS AVALIADAS EM MACHOS E FÊMEAS	87
4.11 ESTUDO DA TOXICIDADE CRÔNICA PRÉ-CLÍNICA – DOSES REPETIDAS	88
4.12 AVALIAÇÃO HEMATOLOGICA DOS RATOS WISTAR	89
4.13 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DOS RATOS WISTAR	90
4.14 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	93
5.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cyperus rotundus</i>	93

5.3 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Protium heptaphyllum</i>	96
5.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Guatteria citriodora</i>	100
5.5 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA RF-11MAO	103
5.6 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA.....	104
5.7 TESTES PRELIMINARES PRÉ-CLÍNICOS (PRIMEIRA DOSE)	105
5.7.2 TESTE DO ROTA-ROD.....	107
5.7.3 TESTE DO ARAME (<i>WIRING TEST</i>)	108
5.8 TESTES PRELIMINARES PRÉ-CLÍNICOS (SEGUNDA DOSE)	109
5.8.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (<i>OPEN-FIELD</i>)	110
5.8.2 TESTE DO ROTA-ROD.....	112
5.8.3 TESTE DO ARAME (<i>WIRING TEST</i>)	113
5.8.4 TESTE DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICO	115
5.8.5 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL DE 50% (DL_{50})	117
5.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	118
5.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA	122
5.11 HEMOGRAMA DOS RATOS WISTAR TRATADOS.....	126
5.11.1 ANÁLISE HEMATOLÓGICA AGUDA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 24 HORAS.....	126
5.11.2 ANÁLISE HEMATOLÓGICA AGUDA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 14 DIAS.....	128
5.11.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA SUBCRÔNICA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 28 DIAS.....	130
5.12 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DO SORO DE RATOS MACHOS FASE AGUDA.....	133
5.13 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DO SORO DE RATOS FÊMEAS FASE AGUDA	146
5.14 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DO SORO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS FASE SUBCRÔNICA	158
5.15 DETERMINAÇÃO DAS MASSAS DOS ÓRGÃOS.....	169
5.15.1 TRATAMENTO AGUDO 24 HORAS EM RATOS MACHOS	170
5.15.2 TRATAMENTO AGUDO 24 HORAS EM RATOS FÊMEAS.....	171
5.15.3 TRATAMENTO AGUDO 14 DIAS EM RATOS MACHOS.....	173
5.15.4 TRATAMENTO AGUDO 14 DIAS EM RATOS FÊMEAS	174
5.15.5 TRATAMENTO SUBCRÔNICO EM RATOS MACHOS.....	175
5.15.6 TRATAMENTO SUBCRÔNICO EM RATOS FÊMEAS	177
5.16 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA	178
5.16.1 HISTOPATOLOGIA DOS ÓRGÃOS NA FASE AGUDA	178
5.16.2 HISTOPATOLOGIA DOS ÓRGÃOS NA FASE SUBCRÔNICA.....	195
6 CONCLUSÕES	211
7 REFERÊNCIAS	213
8 ANEXOS	232

RESUMO

A cárie dentária é uma patologia multifatorial, considerada a mais antiga das doenças da humanidade, a gênese do processo carioso necessita da estabilidade dos microrganismos por aderência no esmalte dentário para a formação do biofilme. A interferência em algum desses mecanismos pode prevenir a formação da cárie dentária. Com a descoberta pelo autor dessa pesquisa da eficácia na remoção do biofilme e de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das plantas oriundas da flora amazônica brasileira, foram selecionadas as espécies *Cyperus rotundus* (tiririca), *Protium heptaphyllum* (breu-branco) e *Guatteria citriodora* (laranjinha). A análise da composição química dos óleos essenciais foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Para a avaliação microbiológica da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima, os métodos escolhidos foram a microdiluição em caldo e cultivo em meio sólido respectivamente, utilizando uma cultura de referência de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Com o objetivo de avaliar a toxicidade pré-clínica em roedores, os óleos essenciais foram misturados na proporção descrita na patente US 2010/0284943 compondo a amostra RF-11MAO. O estudo foi realizado em convênio e parceria entre a UFAM, INPA, CBA e UFRR, visando elaborar o portfólio pré-clínico da amostra para compor produtos odontológicos como bochechos e pastas de dentes, adequando às exigências da legislação brasileira para registro de novos medicamentos fitoterápicos. A análise toxicológica seguiu os protocolos nacionais e internacionais recomendados pelos órgãos controladores da saúde pública, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos da América e a Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) da Comunidade Européia. A amostra RF-11MAO apresentou como constituintes majoritários o p-cimeno, α -ciperona, ciperotundona, cipereno e citronelal, considerados como seus marcadores químicos. A amostra revelou CIM de 1,2 mg/mL e CBM 1,2 mg/mL sobre *S. mutans*. O estudo na fase aguda em dose única e sub-crônica em doses repetidas, demonstraram que a RF-11MAO diluída em 1/3, 1/10, 1/30 e 1/100, na dose (~1,5 mg/Kg) não produziu sinais de toxicidade em ratos nas primeiras 24 horas, 14 dias e 28 dias, não interferiu com o ganho de peso dos animais tratados, não alterou a bioquímica plasmática e não modificou os parâmetros hematológicos. A dose máxima (NOAEL-Dose) estabelecida para realização dos testes clínicos em humanos é de aproximadamente de 1,5 mg/Kg.

ABSTRACT

The dental caries is the multifactorial pathology, considered oldest the illnesses of the humanity; beginning of the cariogenic process needs the stability of the microorganisms for tack in the dental enamel for the formation of biofilm. The interference in some of these mechanisms can prevent the formation of the dental caries. With the discovery for the author of this research of the effectiveness in the biofilm removal and of antimicrobial activity of essential oils of the deriving plants of the Brazilian Amazonian flora, they had been selected species *Cyperus rotundus* (tiritica), *Protium heptaphyllum* (breu-branco) and *Guatteria citriodora* (laranjinha). The analysis of the chemical composition of essential oils was determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). For the microbiological evaluation of Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bactericidal Concentration, the methods chosen they had been the microdilution in broth and culture in half solid respectively, using a reference culture of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). The objective to evaluate the preclinical toxicity in rodents, the essential oils had been mixed in the described patent US 2010/0284943 composing sample RF-11MAO. The study it was carried through in accord and partnership between UFAM, INPA, CBA and UFRR, having aimed at to elaborate the portfolio of the odontologic products as mouths washing and dental cream, adjusting to the requirements of the Brazilian legislation for phytotherapeutic medicine register new. The toxicological analysis followed the national and international protocols recommended for the agencies controlling of the public health, as the A of Vigilância Sanitária (ANVISA) in Brazil, Food and Drug Administration (FDA) in the United States of America and the Organization will be Economic Co-operation and Development (OECD) of the European Community. Sample RF-11MAO presented as constituent majority the p-cymeno, α -cyperone, cyperotundone, cyperene and citronelal, considered as its chemical markers. The sample disclosed CIM of 1.2 mg/mL and CBM 1.2 mg/mL on *S. mutans*. The study in the preclinical phase in dose only e subchronic in repeated doses, they had demonstrated that the RF-11MAO diluted in 1/3, 1/10, 1/30 and 1/100, in the dose (~1,5 mg/Kg) did not produce signals of toxicity in rats in first the 24 hours, 14 days and 28 days, it did not intervene with the profit of weight of the treated animals, did not modify the plasmatic biochemical and it did not modify the hematologies parameters. The maximum dose (NOAEL-Dose) established for accomplishment of the clinical tests in human beings is of approximately of 1,5 mg/Kg.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas há milhares de anos. Seu uso popular foi propagado de geração em geração e descrito nas diversas farmacopéias. A partir da década de 1980, tornou-se possível identificar substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, que pudessem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular bem estabelecido (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A literatura médica medieval da Inglaterra dos séculos XII e XIV relata que os cuidados com os dentes era em grande parte limitado aos tratamentos não invasivos, que em sua maioria, envolviam as ervas medicinais (ANDERSON, 2004).

O crescimento mundial da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação dos extratos de plantas para o uso na odontologia como controle do biofilme dental e outras afecções bucais. Sendo assim, a odontologia é beneficiada pela riqueza em recursos naturais oferecidos pela flora brasileira, pois os produtos naturais estão cada vez mais presentes nos consultórios médicos e odontológicos, apesar da fitoterapia ser pouco difundida fora do meio acadêmico (SOYAMA, 2007; BUFFON *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Nesse sentido, as pesquisas com produtos naturais no meio odontológico tem aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população no Brasil. A aceitação popular da fitoterapia, com boas

perspectivas no mercado, de produtos odontológicos que contém substâncias naturais, e permite que sejam introduzidos no mercado desde que, estudos laboratoriais e clínicos específicos comprovem sua eficácia (AGRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2005).

Além de serem utilizadas por sua ação antisséptica e antibacteriana, as plantas medicinais tem outras aplicações, como é o caso do açaí (*Euterpe oleracea*), que produz um evidenciador de placa dental com eficiência de 90% superior a produtos comercializados, tais como o verde de malaquita, a fucsina e a eritrosina. Além disso, com substâncias que podem ser utilizadas como bioestimulantes (SOYAMA, 2007).

Groppa *et al.* (2008), ao estudar o uso da fitoterapia na odontologia, relatam que há uma crescente utilização de agentes fitoterápicos em odontologia. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a sua segurança e eficácia para a utilização clínica.

Na Odontologia, assim como nas demais áreas da Saúde, várias pesquisas são realizadas com o intuito de solucionar as patologias e de melhorar as condições de vida do paciente. Desta forma, estudos visam elucidar as propriedades físico-químicas dos materiais, ou ainda, descobrir novas alternativas que ofereçam melhores condições e menores custos aos pacientes (FRANCISCO, 2010).

Embora muitos trabalhos demonstrem a eficácia dos fitoterápicos na odontologia, o uso dos mesmos deve ser feito sob conhecimento e responsabilidade do cirurgião dentista, pois se trata de um contra-senso o uso indiscriminado de produtos naturais sem a consciência de sua comprovação cientificamente. Por isso, alguns profissionais acreditam que há a necessidade da inserção do estudo da fitoterapia na academia, gerando novos produtos de prescrição odontológica (LIMA JR; DIMENSTEIN, 2006; SOYAMA, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico dos óleos essenciais e sua mistura com propriedade removedora de biofilme formado em dentes humanos e avaliar a toxicidade referente ao estudo pré-clínico na busca do índice terapêutico para posterior desenvolvimento de fitoterápicos de interesse odontológico na prevenção da cárie dentária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter os óleos essenciais de *C. rotundus*, *P. heptaphyllum*, *G. citriodora*;
- ✓ Identificar o perfil químico dos óleos essenciais e da mistura proposta na pesquisa a partir de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM);
- ✓ Verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais e da mistura proposta na pesquisa;
- ✓ Realizar os testes pré-clínicos em camundongos Swiss e ratos Wistar nas fases aguda e subcrônica com a mistura de óleos essenciais;
- ✓ Determinar a dose letal de 50% (DL₅₀) em camundongos Swiss;
- ✓ Avaliar o índice terapêutico da mistura com a NOAEL-Dose (No Observed Adverse Effect Level-Dose).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOFILME

Segundo Leite *et al.* (2001), o termo biofilme é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias e/ou fungos) aderidas sobre uma superfície e sob a ação contínua de um fluxo. A formação do biofilme dental é a etapa inicial no desenvolvimento da cárie dentária e pode ser formado por uma única ou por diferentes espécies de microrganismos. No seu processo de formação, uma comunidade microbiana multi-espécie, com um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros organismos oportunistas.

O biofilme garante a vida da colônia em ambientes não estáveis, com fluxo constante de líquidos. Pode-se atribuir ao biofilme uma série de vantagens para a colônia, como melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas, melhor proliferação, defesa coletiva contra fatores antagônicos, com acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas (LEITE *et al.*, 2001).

A formação ocorre em duas fases distintas. A primeira fase, bactérias que possuem carga negativa podem alcançar, por energia cinética, uma superfície natural que possui carga positiva (Figura 1). A segunda fase, o biofilme é caracterizado pelo acúmulo de bactérias por co-agregação com a mesma espécie ou com outras espécies utilizando mecanismos e estruturas como glicocálice (camada externa à parede bacteriana, amorfa de polissacarídeos), adesinas (estruturas de aderência da superfície bacteriana) e pili (estruturas funcionais para troca do material genético entre as bactérias, assim como as adesinas), além da produção de matriz polissacarídica extracelular (JORGE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

O ciclo de desenvolvimento do biofilme pode ser resumido em quatro fases: a iniciação, a maturação, a manutenção e a dissolução. A plasticidade fenotípica permite que as bactérias se adaptem às alterações impostas pelo ambiente ao qual estão submetidas. A transição entre um estado e outro é feita de maneira controlada e é altamente complexa sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O' TOOLE *et al.*, 2000).

A formação do biofilme na superfície do esmalte dental é um fenômeno complexo, e possivelmente a chave para o esclarecimento das patologias bucais de origem bacteriana. O entendimento preciso da formação e virulência do biofilme em função do tempo, dependem de múltiplos fatores imunológicos, microbianos, hábitos de higiene, entre outros pesquisados por muitos autores, e vêm sendo gradativamente esclarecidos (MONTANARO *et al.*, 2004).

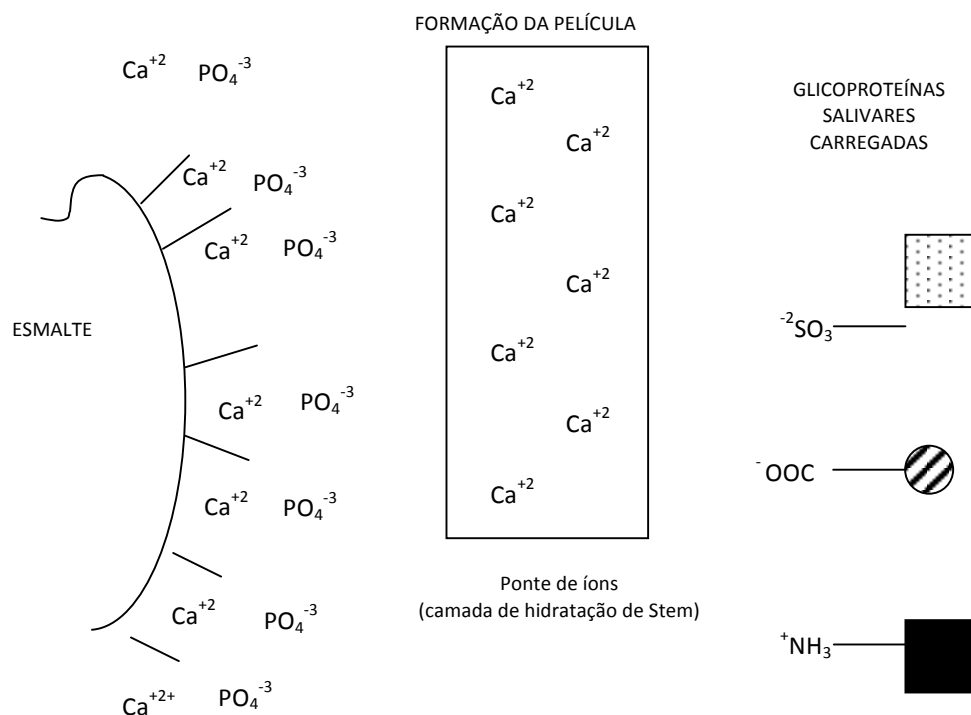


Figura 1 - Interação de glicoproteínas derivadas do hospedeiro com a superfície carregada do esmalte.

FONTE: NISENGARD; NEWMAN (1997).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA

Os estreptococos, do grupo mutans, encontram-se em praticamente todos os indivíduos independente da prevalência de cárie. Porém, a simples detecção desses microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento da lesão cariosa, devendo-se levar em consideração, a concepção da natureza multifatorial da cárie como doença, a qual está sujeita às próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população. Dos fatores fundamentais para a ocorrência da cárie destacam-se a dieta com alto teor de sacarose e a qualidade e frequência de higiene bucal (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; BRATTHALL, 1992).

A lesão cariosa é a manifestação de um processo patológico que ocorre em consequência de uma interação entre bactérias presentes na cavidade bucal, superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose. Com relação à microbiota bucal, a colonização precoce dos dentes por *Streptococcus mutans*, é fator de risco conhecido e que predispõe à cárie na dentição decídua conhecida como primeira dentição em crianças ou simplesmente dentes de leite (MATTOS-GRANER *et al.*, 2000).

Atualmente, com a mudança do paradigma de erradicar as bactérias que causam a cárie dentária, para inativar a ação cariogênica bacteriana na superfície dentária, cria-se uma nova era de pesquisas, voltadas para os princípios bioativos capazes de promover a remoção do biofilme. A Amazônia brasileira destaca-se como a maior floresta tropical do mundo, com sua biodiversidade vegetal capaz de fornecer substâncias viáveis e biotecnologicamente compatíveis, para solucionar a problematização supracitada.

As pesquisas realizadas, principalmente na área da odontologia, são incipientes, visto que o índice de CPOD (índice de Dentes, Cariados, Perdidos, e Obturados) encontra-se em aproximadamente 4,0 na Região Amazônica, isso demonstra que essa região encontra-se

acima do estabelecido pela OMS (Organização Mundial de Saúde) cujo valor é de 2,5 para população na faixa etária de 18 anos (YURTSEVER *et al.*, 2004).

3.3 O MICRORGANISMO CARIOGÊNICO: *S. mutans*

Segundo Tortora *et al.* (2004), as bactérias orais são sacarolíticas, convertendo a sacarose e demais carboidratos em ácido lático e outros ácidos orgânicos, os quais atacam o esmalte dos dentes. A população microbiana sobre e em torno dos dentes é muito complexa, mais de 300 espécies foram descritas.

A bactéria cariogênica mais importante, responsável pela formação da cárie, é a *Streptococcus mutans*, caracterizada como um estreptococo gram-positivo, não hemolítico, não agrupado sorologicamente, capaz de produzir um polissacarídeo aderente de moléculas de glicose denominado de dextrana extracelular (Figura 2), que adere firmemente à superfície lisa do esmalte dental. Algumas outras espécies de estreptococos também são cariogênicas; contudo, desempenham papéis de menor relevância na iniciação do processo carioso (TRABULSI *et al.*, 2002).

Os estreptococos, do grupo *viridans*, incluem várias espécies de estreptococos α -hemolíticos e não hemolíticos, a maioria dos quais é parte da microbiota normal do trato respiratório superior, orofaringe e genital. Os estreptococos *viridans* podem ser divididos em grupo *mutans* (os isolados de origem humana *S. mutans* e *S. sobrinus*, mais algumas espécies de origem animal como *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. macacae*), grupo *salivarius* (*S. salivarius* e *S. vestibularis*), grupo *mitis* (*S. mitis* e *S. oralis*) e grupo *sanguis* (*S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* e *S. crista*) (FRANDSEN *et al.*, 1991).

A identificação por análise de DNA de quatro grupos geneticamente distintos resultou na reclassificação do grupo *mutans*, a cada grupo foi dado um nome de espécie individual:

S. mutans, *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. sobrinus* (SLOTS; TAUBMAN, 1999). O estudo de Newbrun (1983) demonstrou a localização das bactérias no dente e o tipo de cárie promovido por sua significância, em destaque a presença do *Streptococcus mutans* (Tabela 1).

Os estreptococos do grupo *mutans* foram isolados no início do século XX, em crianças inglesas, e descritos como estreptococos “mutantes”. Visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros estreptococos, na cavidade bucal emergiram como importantes agentes patogênicos predominantemente associados com o início e a patogenia da cárie dental (MATTOS-GRANER, 2000).

Tabela 1 - Associação entre as bactérias e os tipos de cárie dentária

TIPOS DE CÁRIE	ORGANISMOS ISOLADOS	SIGNIFICADO POSSÍVEL NAS CÁRIES
Sulcos e fissuras	<i>Streptococcus mutans</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. mitis</i> <i>Lactobacillus</i> sp <i>Actinomyces</i> SP	Altamente significativo Levemente significativo Não significativo Altamente significativo Pode ser significativo
Superfície lisa	<i>Streptococcus mutans</i> <i>S. salivarius</i>	Altamente significativo Pequena significância
Cáries de dentina	<i>Lactobacillus</i> sp <i>Actinomyces viscosus</i> <i>A. naeslundii</i> <i>Streptococcus mutans</i> Bacilos filamentosos	Altamente significativo Significativo Altamente significativo Pode ser significativo Significativo
Cáries de raízes	<i>A. viscosus</i> <i>A. naeslundii</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. salivarius</i> Bacilos filamentosos	Altamente significativo Altamente significativo Alguma significância Significado não claro Significado não claro Altamente significativo

FONTE: NEWBRUN (1983)

A inicialização da cárie dentária depende da fixação do *S. mutans*, ou outro estreptococo ao esmalte dental. Vale ressaltar que estas bactérias não aderem a um dente limpo, mas dentro de minutos o dente recém-escovado é revestido com uma película de mucina, glicoprotéina salivar. Em algumas horas, as bactérias cariogênicas se estabelecem

nesta película e começam a produzir um polissacarídeo aderente de moléculas de glicose, denominada dextrana (GIBBSONS; NYGAARD, 1968). Contudo, a interferência em algum desses mecanismos pode prevenir a formação da cárie dentária (CIARDI *et al.*, 1981).

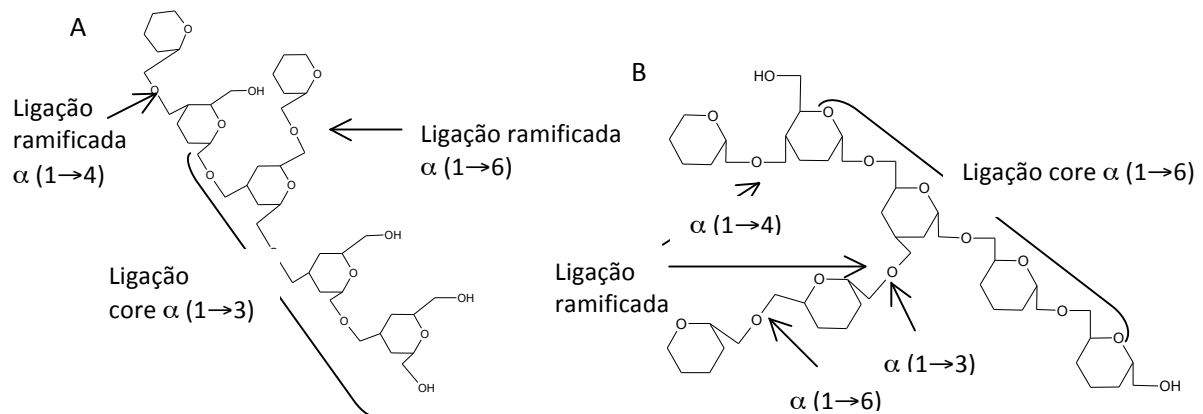


Figura 2 - A - *Streptococcus sanguis* - Dextrana contendo no esqueleto $\alpha(1,6)$ -glicose e cadeia lateral típica de dextranas insolúveis. B - *Streptococcus mutans* - Dextrana com cadeias laterais de $\alpha(1,3)$ -glicose. FONTE: NISENGARD & NEWMAN (1997).

Durante a produção de dextrana, as bactérias primeiramente hidrolisam a sacarose em seus componentes monossacarídeos, frutose e glicose. Enzimas como a glicosiltransferase convertem as moléculas de glicose em dextrana. A frutose residual é o açúcar primário fermentado em ácido láctico. O acúmulo de bactérias e dextrana aderido ao elemento dentário compõem a placa bacteriana (NEWBRUN *et al.*, 1977) (Figura 3).

O *Streptococcus mutans*, através de sua ação sacarolítica, produz ácido láctico de forma pontual na placa, iniciando o processo de desmineralização, resultando fundamentalmente na solubilização da hidroxiapatita $C_{10}(PO_4)_6X_2$ (unidade molecular formadora do esmalte dental), quando a acidez salivar reduz os valores abaixo do crítico situado, em torno de pH 5,2 (CURY, 1981; ROSEN *et al.*, 1989).

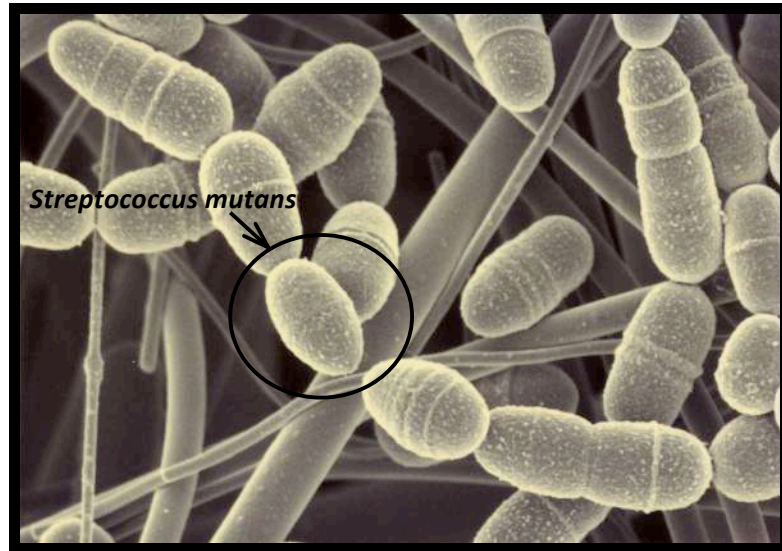


Figura 3 - *Streptococcus mutans* em placa bacteriana ou biofilme.

FONTE: Disponível em: < <http://www.saishika.jp/biofilm/Streptococcus%2520mutans>>.

Acesso em: 17 novembro de 2010

Mediante esse quadro, é estabelecido o parâmetro inicial para o surgimento da cárie incipiente, clinicamente observada na forma de mancha branca do esmalte dentário. A patologia cárie dentária está instalada, causando progressiva perda dos cristais de hidroxiapatita, em função dos produtos do metabolismo bacteriano, a presença do biofilme e formação dos polissacarídeos extracelulares de fundamental importância para desagregação destes constituintes do esmalte dentário (MATSUMOTO *et al.*, 1999; DUARTE *et al.*, 2003).

A alta cariogenicidade do biofilme formado na presença de sacarose é principalmente explicada pela alta concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, mutano e dextrano, mas a baixa concentração inorgânica e a composição protéica também podem influenciar o processo (CURY *et al.*, 2000).

As espécies *S. mutans*, *S. sobrinus* e outros membros de estreptococos bucais do grupo *mutans* são capazes de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolisam a sacarose da dieta em glicose e frutose, e unem os resíduos de glicose entre si por meio de ligações glicosídicas α -1,6 e α -1,4 para formar glicanos insolúveis. Esses glicanos conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do

biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos glicanos aderentes e insolúveis e a subsequente formação de ácidos, promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie (LOESCHE, 1986; GRÖNROOS, 2000).

Outros estreptococos bucais, incluindo *S. sanguis*, *S. salivarius* e possivelmente *S. gordonii*, também podem sintetizar esses polissacarídeos, mas apenas os estreptococos do grupo *mutans* apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose. Além disso, *S. mutans* também produz maior quantidade de ácidos a partir de carboidratos, do que outras bactérias bucais, porque são capazes de fermentar grande variedade de açúcares e são mais resistentes aos ácidos. Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos intracelulares que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de carboidratos fermentáveis exógenos (GRÖNROOS, 2000).

As células de *S. mutans* são Gram positivas, têm morfologia ovalada, medem cerca de 0,5 a 0,75 nm de diâmetro, agrupam-se em pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37 °C. O *S. mutans* em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas, fortemente aderidas ao meio com bordas irregulares. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 mm de diâmetro. Quando cultivados em ágar sangue em microaerofilia por 48 horas, as colônias de *S. mutans* apresentam-se brancas ou cinzas, circulares ou irregulares com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, tendendo aderir na superfície do ágar. O meio de cultura mais frequentemente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é o Ágar Mitis Salivarius com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD *et al.*, 1973).

3.4 ADERÊNCIA *in vitro* de *S. mutans*

Segundo Gaines *et al.* (2003), na tentativa de elucidar os fenômenos de interações microbianas, co-agregação, aderência e metabolismo dos diferentes microrganismos bucais, muitos modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos, embora nesse tipo de estudo existam vantagens e desvantagens. Dependendo do tipo de análise a ser realizada, os fatores inerentes a microbiota bucal necessitam ser minimizados para a análise mais detalhada de cada fenômeno. Esses modelos incluem como corpos de prova, cortes dentais, fragmentos de dentina, vidro, entre outros.

Os modelos utilizados para ensaio de aderência são frequentemente analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Cintilografia, ELISA com utilização de anticorpo específico para a bactéria em estudo e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (GAINES *et al.*, 2003).

Eick *et al.*, (2004), em estudo *in vitro* analisaram a capacidade de aderência de *S. mutans* em diferentes materiais restauradores, com análise do experimento por meio de MEV e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Aldsworth e Macfarlane (2001) desenvolveram um sistema de aderência *in vitro* em membranas de ultrafiltração para a investigação de formação de placa bacteriana formada por bactérias bucais no estudo de desenvolvimento de lesões de cárie de raiz.

De acordo com os trabalhos relatados, há evidências que *S. mutans* interage *in vitro*, através de seus mecanismos de aderência e co-agregação, porém para que essas evidências sejam comprovadas no meio bucal, há necessidade de mais pesquisas, pois como foram observados, muitos fatores devem ser considerados nessa interação (BARBIERI, 2005).

Prabu *et al.* (2006) ao estudar o potencial antiplaca do flavonóide guaijaverin de *Psidium guajava* destacam que *Streptococcus mutans* adere à superfície do esmalte do dente por interações de ligações hidrofóbicas.

Agentes terapêuticos que ajudam a evitar formação de ligações hidrofóbicas deveriam ajudar a reduzir a incidência de cáries. Adicionalmente, observam que a hidrofobicidade de *S. mutans* está principalmente associada a proteínas da superfície das células, sendo possível que os componentes ativos dos extratos de plantas liguem-se às proteínas da superfície das células, diminuindo a hidrofobicidade (McBRIDE *et al.*, 1984).

A pesquisa de Prabu *et al.* (2006), baseada em hidrofobicidade descreveu em duas linhagens diferentes de *S. mutans* características suficientes para classificá-las como hidrofóbicas e hidrofílicas, ampliando a gama de alternativas para explicação dos mecanismos de ação dos agentes terapêuticos.

3.5 APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA DAS PLANTAS MEDICINAIS

O emprego de plantas medicinais, passando de geração a geração (inclusive com o aval de Hipócrates, há mais de 300 a.C., cuja expressão clássica “a natureza que cura” fez dela seu aliado), chegou até nossos dias na forma de uma nova ciência, a fitoterapia. A importância fundamental do estudo das plantas que curam é, possivelmente, maior que o próprio conhecimento das doenças, considerando que grande parte das substâncias aplicadas no preparo e na elaboração dos produtos farmacêuticos é extraída do reino vegetal (XAVIER *et al.*, 1995).

A necessidade de medicar e a disponibilidade de plantas no processo civilizatório constituíram os primórdios do ato de curar, remontando à antiguidade, o uso de vegetais como medicamentos (LIMA, 1997). No Brasil estão localizadas cerca de 20% das 50 mil espécies

medicinais catalogadas pela United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization - UNESCO, facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças, inclusive na área odontológica (NUNES *et al.*, 1999).

A remoção do biofilme dentário é um fator importante na prevenção da cárie dentária em humanos. Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene, os agentes antimicrobianos foram estudados no controle do biofilme. Face ao exposto, diversas substâncias são utilizadas, na forma de enxaguatório bucal, para redução da microbiota cariogênica (JARDIM; JARDIM, 1998). Algumas infusões de origem vegetal são utilizados na higiene oral com a vantagem da redução de efeitos colaterais, sendo relatadas apenas uma pequena ardência com possibilidade de erosão na mucosa, quando comparados a produtos sintéticos (MORAN *et al.*, 1992).

Nesse sentido, alguns trabalhos na literatura pesquisaram o emprego de tais “fitomedicamentos” e a aceitação deles pela população. Amorim (1999) estudou o uso da fitoterapia popular em 782 famílias do município de Campina Grande/PB e constatou que 82,9% delas tinham um “especialista” em plantas medicinais e costumavam usar remédios preparados com plantas. Esse autor verificou que a maioria (87,2%) havia aprendido a usar plantas com a própria família e também o modo mais freqüente de preparo dos remédios com elas era o chá (infuso ou decocto, 63,3%). Quanto às indicações, observou que a maioria delas coincidiu com as da literatura científica.

O trabalho proposto por Sampaio (1997), corrobora com as indicações de plantas medicinais para tratamento de afecções bucais, em sua pesquisa com plantas adstringentes brasileiras relatou o uso da solução do suco do tronco da bananeira (*Musa sapienten* Linn) com água, como bochecho obtendo excelente ação contra aftas. Também indicado para aftas, o decocto da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn). O autor acrescenta ainda que o pó da madeira do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam) era aconselhado para o

fortalecimento gengival, assim como as folhas da mangueira (*Mangifera indica* Linn), no caso de ulcerações bucais.

Tomando por base indicações mais genéricas, aventa-se a hipótese dessas preparações agirem sobre a massa de bactérias extremamente organizadas que se aderem seletivamente às superfícies dos dentes e constituem o biofilme dentário. Esse consiste em uma complexa massa microbiológica, agente etiológico predominante das principais patologias orais – a cárie dentária e as doenças periodontais, ambas consideradas entre as mais frequentes infecções da humanidade (PEREIRA,1998).

Dessa forma, numerosos produtos com ingredientes de origem vegetal estão sendo cada vez mais testados por exercer influência inibitória no crescimento do biofilme dentário na cavidade oral. Estudos *in vitro* têm demonstrado que tinturas de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e mirra possuem efeito em certos microrganismos formadores do biofilme comparável ao da clorexidina (PEREIRA,1998). Ainda em relação à camomila, realizou-se uma análise exploratória sustentada na divisão por sexo. Essa pesquisa sugeriu que o enxaguatório bucal de camomila é mais benéfico para homens, em detrimento de mulheres, na resolução da mucosite oral induzida pelo 5-fluoracil, quimioterápico usado no tratamento do câncer. O mesmo estudo não apresenta evidência de que a camomila cause alguma toxicidade (FIDLER, 1996).

Segundo Xavier *et al.*, (1995), os óleos do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e do cravo (*Eugenia caryophyllata* T.) são indicados para odontalgias, devendo ser aplicados com o auxílio de uma pelota de algodão sobre o dente dolorido. Os estudos demonstram que a romã (*Punica granatum* Linn) possui atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, microrganismo de extrema importância no início do processo carioso, além de ser usada contra gengivite e feridas bucais por sua ação antisséptica e antiinflamatória (OLIVEIRA & FERRAZ, 1998).

Segundo Samuelsson (1989), embora várias plantas estejam sendo utilizadas como matéria-prima para a produção de fitoterápicos ou sob formulações galênicas comercializadas com fins terapêuticos, a grande maioria (cerca de 94%), não possuem dados científicos que comprovem a sua eficácia e seu espectro toxicológico no homem. Outros autores definiram que esses fitomedicamentos não podem ser considerados medicamentos éticos porque não têm sua eficácia, toxicidade e controle de qualidade definidos (FARNSWORTH *et al.*, 1985; FERREIRA, 1998; LAPA *et al.*, 2000).

3.6 A VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DOS INSUMOS

A análise das atividades antimicrobiana, antiácida e removedora de biofilme foi realizada no decorrer do mestrado do autor dessa pesquisa, com 10 espécies vegetais e seus respectivos óleos essenciais e fixos, bem como seus extratos foram testados frente à principal bactéria causadora da cárie dentária, a *Streptococcus mutans*. As espécies inicialmente estudadas foram *Aniba roseodora*, *Artocarpus integrifolia*, *Bertholletia excelsa*, *Carapa guianensis*, *Copaifera multijuga*, *Croton cajucara*, *Cyperus rotundus*, *Guatteria citriodora*, *Protium heptaphyllum* e *Tynanthus elegans* (CORRÊA, 2007).

O microrganismo *Streptococcus mutans* demonstrou sensibilidade aos óleos essenciais extraídos da resina de *Protium heptaphyllum*, das folhas de *Guatteria citriodora* e de *Croton cajucara* e dos tubérculos de *Cyperus rotundus*, do óleo-resina do caule de *Copaifera multijuga*, bem como, ao extrato clorofórmico da casca da semente de *Carapa guianensis* e aos extratos hexânicos do caule de *Tynanthus elegans* e dos tubérculos de *Cyperus rotundus* (CORRÊA, 2007).

A mais expressiva sensibilidade de *Streptococcus mutans* foi ao óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora*, apresentando atividade antimicrobiana com inibição total do

microorganismo na placa de Petri em meio sólido. As propriedades removedora de biofilme e antimicrobiana foram mais pronunciadas nos óleos essenciais extraídos dos tubérculos de *Cyperus rotundus* e da resina de *Protium heptaphyllum*.

Com base nos resultados mais promissores obtidos de *Cyperus rotundus*, *Guatteria citriodora* e *Protium heptaphyllum*, as espécies foram selecionadas para continuidade ao estudo no doutorado, pois apresentam potencial biotecnológico para elaboração de produtos fitoterápicos de baixo custo. As plantas são adaptadas ao clima amazônico, rústicas e de fácil cultivo e manejo, viabilizando a obtenção dos seus óleos essenciais para a elaboração e comercialização no mercado de produtos odontológicos a fim de combater ou controlar a *Streptococcus mutans* e a cárie dentária (CORRÊA, 2007).

3.7 AS ESPÉCIES SELECIONADAS PARA VERIFICAÇÃO DA SEGURANÇA

3.7.1 *Cyperus rotundus* (CYPERACEAE)

A família Cyperaceae apresenta distribuição cosmopolita, com cerca de 120 gêneros e 4500 espécies, das quais 845 ocorrem nos Neotrópicos, geralmente em solos úmidos, incluindo ervas daninhas comuns, encontradas em planaltos e campos de regiões tropicais e temperadas. No Brasil ocorrem 44 gêneros e cerca de 700 espécies. As espécies de Cyperaceae podem ser conhecidas pelas folhas com bainha fechada e lígula ausente, além do caule triangular (COSTA *et al.*, 1999; SOUZA; LORENZI, 2008).

Na Reserva Ducke são encontrados 13 gêneros e 19 espécies restritas às áreas abertas e bordas da mata. Compõem-se de ervas cespitosas, rizomatosas, com folhas laminares a lineares, concentradas na base de ramos aéreos bastante rígidos ou distribuídas ao longo destes. A unidade floral é formada por espiguetas monoclinas, compostas por uma gluma,

perianto reduzido a escamas, cerdas ou tricomas e o fruto é do tipo drupa (COSTA *et al.*, 1999).

A espécie *C. rotundus* é uma planta perene, herbácea, ereta, de caule triangular medindo 20 a 40 cm de altura, com rizomas; a qual se multiplica por sementes e vegetativamente, a partir de rizomas, bulbos basais e tubérculos subterrâneos. Possui alta capacidade de adaptação a vários fatores, como ambientes, solos com as mais diferentes texturas, pH e fertilidade. É considerada a mais importante planta invasora do mundo, devido sua ampla distribuição, capacidade de competição e agressividade, bem como pela dificuldade de controle e erradicação. Em baixas temperaturas, o desenvolvimento e a multiplicação dos rizomas são processos lentos, pois o congelamento do solo mata os rizomas (KISMANN, 1991) (Figura 4).

É considerada uma das espécies botânicas de maior amplitude de distribuição geográfica, está presente em praticamente todos os países de clima tropical ou subtropical e até mesmo, em regiões de clima temperado. No Brasil, é registrada em toda a extensão territorial. Tem grande capacidade de reprodução, podendo produzir cerca de 40 toneladas de massa verde por hectare (KISMANN, 1991).

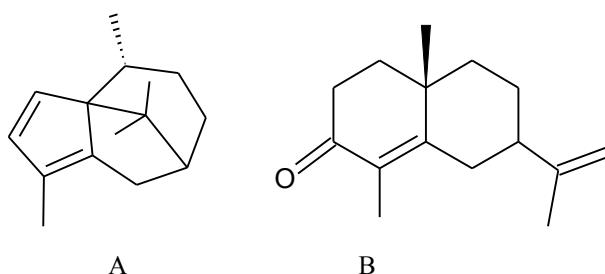


Figura 4 - Tiririca (*Cyperus rotundus* L.) e seus tubérculos
Fotos: Corrêa, R. F.

3.7.1.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DOS TUBÉRCULOS DE *C. rotundus*

O óleo essencial extraído dos tubérculos de *C. rotundus* coletados na Estação Experimental de Hortaliças do Arianá (INPA) é constituído essencialmente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados. Os principais componentes identificados por CG-EM no óleo essencial dos tubérculos foram cipereno (17,41%), α -ciperona (15,84%), epoxicariofileno (8,08%) e β -selineno (7,09%) (SANTOS, 2003). Os espécimes brasileiros apresentam como principais componentes do óleo essencial de *Cyperus rotundus* a α -ciperona (22,8%) e ciperotundona (12,1%) (ZOGHBI *et al.*, 2008) (Figura 5).

O estudo comparativo dos óleos essenciais dos tubérculos coletados nos meses de junho e outubro na Tunísia demonstrou a semelhança na constituição de ambos os óleos, com variações nos teores dos seus constituintes. A α -ciperona (25,23%) e o cipereno (20,38%) foram os componentes mais abundantes, sendo que o cipereno tem alto teor em junho, seguido do ciperotundeno e rotundeno, e a α -ciperona possui alto teor em outubro. A característica geral dos óleos foi de alta concentração de sesquiterpenos (70%), baixa proporção de monoterpenos oxigenados (10%) e monoterpenos (5%) (KILANI *et al.*, 2008).



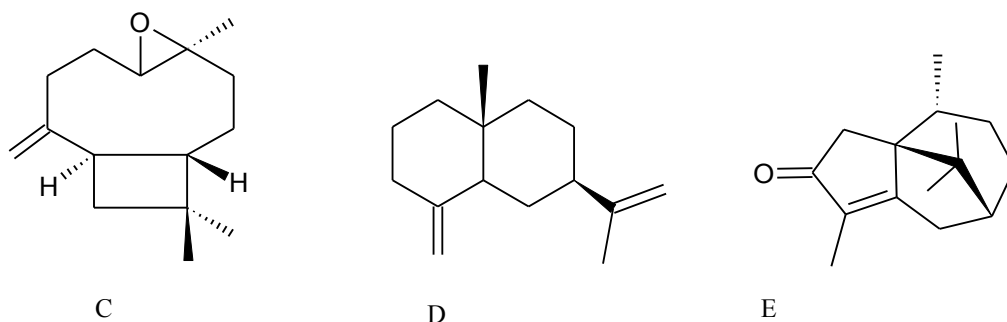


Figura 5 - Principais constituintes do óleo essencial dos tubérculos de *C. rotundus* encontrados em espécies brasileiras: A = cipereno, B = α -ciperona, C = epoxycariofileno, D = β -selineno, E = ciperotundona

O estudo da composição química dos óleos essenciais dos tubérculos coletados de *Cyperus rotundus*, em duas localidades diferentes (Empangeni-A e KwaDlangezwa-B) na África do Sul, caracterizadas como amostras A e B, na análise por CG-EM foi determinada a presença de α -ciperona (11,0%), mirtenol (7,9%), óxido de cariofileno (5,4%) e β -pineno (5,3%) como os componentes majoritários da amostra A. Os principais constituintes da amostra B foram β -pineno (11,3%), α -pineno (10,8%), α -ciperona (7,9%), mirtenol (7,1%) e α -selineno (6,6%) (LAWAL; OYEDEJI, 2009).

Na Nigéria e Tunísia os óleos essenciais dos tubérculos de *Cyperus rotundus* apresentam alterações nas composições químicas, o que sugere variedades fitoquímicas. Os constituintes mais abundantes encontrados e seus teores respectivos foram cipereno (19,2-30,9%) e α -ciperona (4,5-25,2%), as concentrações de outros componentes variaram (KILANI *et al.*, 2005).

Na Índia os tubérculos de *Cyperus rotundus* produziram óleos essenciais que foram analisados como constituintes majoritários e teores variáveis o α -copaeno (11,4-12,1%), cipereno (8,4-11,7%), valerenal (8,7-9,8%), óxido de cariofileno (7,8-9,7%) e *trans*-pinocarveol (5,2-7,4%), alguns constituintes descritos foram ausentes em espécies comparadas de outros países (JIROVETZ *et al.*, 2004). Na Alemanha, os constituintes majoritários foram ciproteno, α -copaeno, cipereno, α -selineno, rotundeno, cadaleno e nootkateno (SONWA & KÖNIG, 2001).

O estudo da comparação de três técnicas de extração de óleo essencial, sendo hidrodestilação, extração líquida pressurizada e extração por fluido supercrítico possibilitou observar diferenças significativas nos teores dos constituintes. As substâncias majoritárias foram α -copaeno, cipereno, β -selineno, β -ciperona e α -ciperona. As observações obtidas foram que a extração líquida pressurizada tem alta eficiência de extração e a extração de fluido supercrítico tem boa seletividade de extração dos constituintes β -ciperona e α -ciperona (TAM *et al.*, 2007).

3.7.1.2 PERFIL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DOS TUBÉRCULOS DE *C. rotundus*

O óleo essencial de *Cyperus rotundus* foi testado quanto ao efeito da proliferação da linhagem de células leucêmicas (L1210) pelo método com o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) MTT. O resultado deste experimento foi que o óleo essencial apresentou efeito citotóxico nas células testadas e a Concentração Inibitória a 50% (CI₅₀) foi 49 μ g/mL. Além disso, a 50 μ g/mL, o óleo essencial causou indução de apoptose das células L1210 (KILANI *et al.*, 2008).

O teste realizado com a cepa *Candida albicans* (ATCC 10231) foi positivo apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,6 mg/mL (DUARTE *et al.*, 2003).

É importante salientar que um estudo na área odontológica demonstrou que o extrato etanólico dos tubérculos de *C. rotundus* apresentou inibição do crescimento de *S. mutans*, da sua produção de ácido láctico e da aderência de 50% a uma concentração de 0,5 mg/mL e inibição completa a 4 mg/mL do extrato. A atividade enzimática da glicosiltransferase que sintetiza o glucano (insolúvel em água) a partir da sacarose, foi inibida em 10% a 2 mg/mL do

extrato de *C. rotundus*. Estes resultados sugerem que o extrato etanólico inibe as propriedades cariogênicas de *S. mutans* na formação do biofilme (YU *et al.*, 2007).

3.7.2 *Guatteria citriodora* Ducke (ANNONACEAE)

A família Annonaceae é representada predominantemente nos trópicos por cerca de 130 gêneros e 2200 espécies, com centros de distribuição na Região Amazônica e Guianas. No Brasil ocorrem em praticamente todas as formações naturais com aproximadamente 33 gêneros e 250 espécies (RIBEIRO *et al.*, 1999; SOUZA & LORENZI, 2008).

Na Reserva Ducke, a família é representada por 16 gêneros e 60 espécies, caracterizada pelo hábito arbóreo, ou muitas vezes pela presença de arvoretas, raramente na forma de lianas. Vegetativamente a família pode ser reconhecida pelo odor forte do corte do tronco ou de ramos, que se torna característico com a prática, pela presença de fibras longas nas cascas, conhecida popularmente como envira e pela presença de estruturas em forma de chamas no corte transversal do tronco (RIBEIRO *et al.*, 1999; SOUZA & LORENZI, 2008).

As flores apresentam odor característico como principal aviso aos polinizadores de que estão em funcionamento. Muitas das espécies têm antese noturna e algumas espécies com antese diurna, o que eleva a temperatura das flores (termogênese), podendo atingir até doze graus acima da temperatura ambiente, o que aumenta a volatilização dos compostos odoríferos. Os seus frutos são apocárpicos, carnosos e indeiscentes. Os principais polinizadores são coleópteros (besouros) de diferentes famílias e a dispersão ocorre principalmente por meio de animais (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A espécie *Guatteria citriodora* é uma árvore conhecida popularmente como envira-amarela ou laranjinha. A face superior da folha é glabra, a inferior densamente coberta por pelos eretos e marrom-escuros (MOBOT, 2003; RIBEIRO *et al.*, 1999). É encontrada nas

regiões de maior distribuição como nos estados do Pará, Mato Grosso e Amazonas, na floresta pluvial amazônica de terra firme, e também nas Guianas, Suriname, Bolívia, Equador e Colômbia, Peru e Venezuela (MOBOT, 2003).

As árvores desta espécie têm altura de 15 a 20 m e possui em copa piramidal ou colunar, tronco ereto e cilíndrico, de 20 a 35 cm de Diâmetro a Altura do Peito (DAP), com casca fibrosa, quase lisa e lenticelada. As folhas são simples, alternadas, subcoriáceas, discolores, glabras ou com pelos esparsos na face superior, denso ferrugíneo-tomentosas na face inferior quando jovens e glabrescentes posteriormente; apresentado as nervuras principal e secundária muito salientes na face inferior, de 10 a 20 cm de comprimento por 3 a 6 cm de largura, sobre pecíolo de 3 a 5 mm. As flores são axiliares, aos pares, sobre pedúnculos de 5 a 8 mm, hermafroditas, com cálice de 4 a 5 mm de comprimento e pétalas tomentosas de 1 a 2 cm. Infrutescências, em glomérulo, frutos de formato elipsoides do tipo drupa, lisos, de polpa carnosa e de cor roxa quando maduros (RIBEIRO *et al.*, 1999) (Figura 6).



Figura 6 - *Guatteria citriodora* - Galho com frutos e folha da espécie
Fotos: Corrêa, R. F.

3.7.2.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *G. citriodora*

O óleo essencial extraído das folhas secas de *G. citriodora* coletado no mês de julho no município de Maués foi analisado por CG-EM e caracterizado pelos teores de 77,1% de monoterpenos e 15,1% de sesquiterpenos. Os compostos identificados totalizaram 86,2%. Os principais constituintes identificados foram citronelal (25,5%), citronelol (22,4%), neo-isopulegol (8,3%), α -copaeno (3,3%), isopulegol (3,1%) e óxido de cariofileno (3,0%) (RABELO, 2008) (Figura 7).

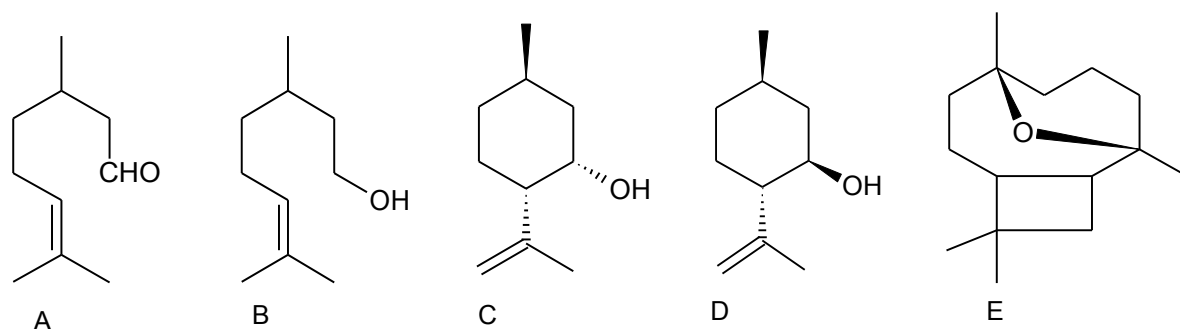


Figura 7 - Principais constituintes do óleo essencial das folhas de *G. citriodora*: A = citronelal, B = citronelol, C = neo-isopulegol, D = isopulegol, E = óxido de cariofileno.

3.7.2.2 PERFIL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *G. citriodora*

O óleo essencial dos frutos de *G. citriodora* foi testado contra *Leishmania amazonenses* e *Leishmania guyanensis*, apresentando atividade contra *L. guyanensis* com o valor para a concentração inibitória mínima de $12,1 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$. No ensaio de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* foi constatada a letalidade de 94,5% das larvas a uma concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ (RABELO, 2008).

3.7.3 *Protium heptaphyllum* March (BURSERACEAE)

A família Burseraceae representa um dos grandes táxons botânicos presentes na região amazônica. O gênero *Protium* é o mais expressivo, com mais de 80% das espécies pertencentes a família Burseraceae, a qual possui distribuição pantropical, incluindo cerca de 20 gêneros e 500 espécies. Na Reserva Ducke são encontrados 5 gêneros e 41 espécies. São árvores de pequeno porte, mas algumas espécies podem atingir o dossel da floresta e alguns arbustos são encontrados na família (RIBEIRO *et al.*, 1999; SIQUEIRA, 1991; SOUZA & LORENZI, 2008).

A característica da família é a presença de resina aromática, conhecida como breu, em quase todas as partes das plantas, com cheiro característico de incenso ou terpenos. Suas folhas são alternas e compostas, geralmente imparipinadas. Os folíolos apresentam pulvínulo no gênero *Protium*. Pouco se conhece a respeito da polinização das Burseraceae neotropicais e a dispersão se dá de forma endozoocórica (RIBEIRO *et al.*, 1999; SOUZA; LORENZI, 2008) (Figura 8).

A espécie *Protium heptaphyllum* é uma árvore perenifólia ou semidecídua, aromática medindo de 10 a 20 m de altura, possui copa densa e oblonga, com tronco de 40 a 60 cm de DAP, nativa em quase todo o Brasil, principalmente em terrenos arenosos secos ou úmidos. As fohas são compostas pinadas, com 2 a 4 pares de folíolos glabros, coriáceos, de 7 a 10 cm de comprimento, suas flores apresentam coloração avermelhada e seus frutos são cápsulas oblongas, deiscentes, de cor vinácea. A multiplicação ocorre por sementes e apresenta característica de exsudação do tronco de um óleo-resina denominado de almecega ou breu-branco (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 8 - Árvore e caule com resina de breu branco
Foto: Corrêa, R. F.

3.7.3.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *P. heptaphyllum*

Siani *et al.* (1999) realizaram a identificação dos constituintes presente no óleo essencial de *P. heptaphyllum* e como majoritários foram encontrados o terpinoleno (21,8%), o dilapiol (16,1%), o p-cimen-8-ol (11,3%) e o p-cimeno (11,0%). Segundo Bandeira *et al.* (2000) a constituição majoritária é composta por terpinoleno (28,5%), limoneno (16,9%), α -felandreno (16,9%) (Figura 9) e α -pineno (10,5%).

Marques (2010) realizou o estudo da composição química dos óleos essenciais das sub-espécies de *P. heptaphyllum* coletadas em Cruzeiro do Sul, Acre. Na espécie *P. heptaphyllum* subsp. *ulei* foram identificados 16 constituintes (95,74%) sendo o majoritário, o terpinoleno (42,31%), seguido do p-cimen-8-ol (13,62%), do limoneno (11,87%) e do p-cimeno (4,75%) (Figura - 9). Em *P. heptaphyllum* subsp. *heptaphyllum* foram identificados (98,53%) de 21 constituintes, sendo p-cimeno (39,93%) o constituinte

majoritário, seguido por n-tetradecano (13,38%), dihidro-4-careno (11,69%) e α -felandreno (7,41%).

A investigação fitoquímica do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* March. coletado no estado do Ceará apresentou 86,4% de monoterpenos, sendo o terpinoleno (28,5%) o maior constituinte, seguido de α -pineno (10,5%) e α -felandreno (16,7%) (BANDEIRA *et al.*, 2001).

Segundo Silva *et al.* (2009), os principais constituintes voláteis identificados a partir da maceração em hexano do óleo-resina de *P. heptaphyllum* foram p-cimeno (15,6%), terpinoleno (12,0%) (Figura 9), α -pineno (3,3%) e α -cubebeno (3,3%).

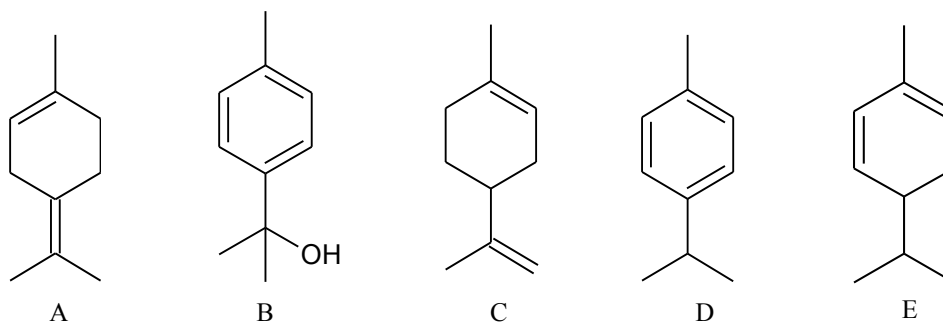


Figura 9 - Principais constituintes do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*: A = terpinoleno, B = p-cimeno-8-ol, C = limoneno, D = p-cimeno e E = α -felandreno.

3.7.3.2 PERFIL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. heptaphyllum*

O óleo essencial de *P. heptaphyllum* revelou atividades farmacológicas como anti-inflamatória, nociceptivas antagônicas e analgésica reduzindo em 74% o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em ratos (SIANI *et al.*, 1999).

3.8 A IMPORTÂNCIA MICROBIOLÓGICA DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E REMOVEDORA DE BIOFILME NA ODONTOLOGIA

A presença de altos números de *Streptococcus mutans* no biofilme e na saliva ($> 10^6$ UFC/mL) é um índice confiável para apontar pessoas de alto risco de cárie. A possibilidade de aparecimento de lesões cariosas aumenta em proporção direta com o grau de presença dessas bactérias no ambiente bucal, constatado por métodos de contagem (LORENZO; LORENZO, 2002; YANO *et al.*, 2002).

Nos pacientes de alto risco, a escovação com dentifrícios fluoretados deve estar associada à utilização de substâncias antimicrobianas capazes de atuar no meio bucal, no processo de desmineralização-remineralização, como um meio preventivo seguro e de baixo custo. A eficácia da escovação depende do risco à cárie do paciente e não age isoladamente como um método eficaz na prevenção de cáries, e doenças periodontais (TINOCO; TINOCO, 2000).

A concentração do grupo *Streptococcus mutans* na saliva humana tem uma variação que vai desde não detectável até 10^7 UFC/mL, com concentração média de 10^5 UFC/mL na saliva (BERNIMOULIN, 2003). Os bochechos antimicrobianos reduzem o biofilme visível na superfície dos dentes. A aplicação clínica dos bochechos pode ser dividida em duas categorias: preventiva e terapêutica (FISCHMAN, 1994).

A eficácia de um bochecho antimicrobiano, contendo óleo essencial, no controle do biofilme supragengival e da gengivite, em estudos clínicos de curta e longa duração foi demonstrada por Ross *et al.* (1989) e Overholser *et al.* (1990). O fato dos bochechos apresentarem geralmente ação bactericida explica o mecanismo primário da sua atividade clínica. As considerações do mecanismo de ação dos bochechos “*in vivo*”, devem ser

conduzidas no contexto para o entendimento de sua ação direta sobre o biofilme e sua gênese (PAN *et al.*, 2000).

Claffey (2003) esclareceu os benefícios dos bochechos com óleos essenciais como um componente seguro nos cuidados diários de higiene oral. Ressaltou que bochechos contendo álcool desnaturado como veículo têm aumentado as suspeitas sobre a associação do álcool com o câncer oral.

Segundo Seymour (2003), muitas evidências geram suporte ao uso de dentifrícios e bochechos com óleos essenciais em inúmeras áreas da saúde oral, incluindo atividade antimicrobiana, irrigação caseira, manutenção da saúde dos implantes, uso pós-cirúrgico, redução de bactérias na escova dental e redução de bacteremia.

A propriedade removedora de biofilme por ação direta dos óleos essenciais indicou potencialidade para elaboração de produtos inovadores de uso odontológico, que associada a propriedade antimicrobiana reduzem a população bacteriana de *S. mutans*, interrompendo o processo cariogênico. Os dentifrícios e bochecho oriundos dessa descoberta foram relatados na patente US 2010/0284943, com aplicação profilática e terapêutica contra a cárie dentária (CORRÊA, 2010).

3.8.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais é avaliada por meio da determinação da menor quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um aspecto relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação com aos

aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO *et al.*, 2003).

O ressurgimento do interesse nas terapias naturais e o crescimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem mais dados sobre os óleos e extratos de plantas (LIS-BACHIN & DEANS, 1997; DE-SOUZA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006 e OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Vários estudos têm apontado algumas propriedades terapêuticas dos óleos, destacando as atividades antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, antissética das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e antiinflamatória (HALCON & MILKUS, 2004; COSTA *et al.*, 2005; OYEDJI & AFOLAYAN, 2006 e LIMA & DIMENSTEIN, 2006).

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização deste estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Dessa forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de novos microrganismos patogênicos (MENG *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2001; MICHELIN *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007 e SAÚDE-GUIMARÃES & FARIA, 2007).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca, devido

às propriedades químicas que estes apresentam, necessitando modificações para aplicação desses métodos (CHRISTOPH *et al.*, 2000; NOSTRO *et al.*, 2004; SAEED & SABIR, 2004 e DUARTE *et al.*, 2005).

Na microbiologia, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos e óleos essenciais vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, métodos de macrodiluição e de microdiluição. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos e óleos essenciais ativos de plantas, utilizou-se o método de microdiluição em caldo na placa multipoço, contendo meio líquido inoculado e posteriormente corado com resazurina (ELOFF, 1998).

A avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada em placas de Petri contendo meio sólido, compatível com a bactéria estudada. Para esse teste foi necessário realizar a subcultura por repicagem do conteúdo dos poços com inibição de crescimento, corados na cor azul, para avaliação em que concentração apresenta efeito bactericida ou bacteriostático, a técnica foi desenvolvida por Eloff (1998).

Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Além disso, podem formar uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados, sendo assim, a falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana tem sido um dos empecilhos encontrados para a realização desse tipo de estudo (HOOD *et al.*, 2003).

Visando melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsificadores, a exemplo de Tween 20, Tween 80, DMSO (dimetilsulfóxido) e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos através do meio de cultura (GROPPO *et al.*, 2002; BAYDAR *et al.*, 2004 e BRUNI *et al.*, 2004). As propriedades físicas e químicas desses agentes são importantes para auxiliar

na visualização da atividade antimicrobiana dos óleos, no entanto, deve-se levar em consideração que ao se introduzir um agente emulsificador, este está sujeito a possíveis interações com a substância em teste, bem como, possuir atividade antimicrobiana. Esses efeitos podem ser acentuados ou minimizados a depender do modo de preparo da solução óleo-agente emulsificador. Por isso, preconiza-se uma relação adequada entre óleo e emulsificador (JANSSEN *et al.*, 1987 e HAMMER *et al.*, 1999).

A interferência do agente emulsificador na susceptibilidade da bactéria ao óleo essencial pode ser explicada pela possível influência que este exerce sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular. Os emulsificadores podem agir antagônica ou sinergicamente aos componentes ativos do óleo. Altas concentrações de Tween, por exemplo, podem aumentar a atividade antibacteriana produzindo resultados falso-positivos ou reduzir a bio-atividade do óleo, esse último efeito é, possivelmente, causado pela formação de micelas que dificultariam o contato direto do óleo com os microrganismos (COX *et al.*, 2000 e TAKARADA *et al.*, 2004). Para minimizar esses efeitos, alguns autores propuseram que os emulsificadores Tween 20, Tween 80 e outros, sejam utilizados em concentrações que variem entre 0,5 a 20,0% em solução com óleo. Para o Tween 80 especificamente, preconiza-se a concentração específica de 0,02% a fim de padronizar o método de diluição em caldo para a determinação da CIM, estando os valores desta relacionados ao agente emulsificador usado (HOOD *et al.*, 2003).

Existe interesse por parte da indústria farmacêutica em aumentar o conhecimento sobre as concentrações inibitórias dos óleos essenciais, em busca do equilíbrio entre a aceitabilidade e a eficácia da ação antimicrobiana. A CIM pode ser definida em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os métodos disponíveis podem ser divididos em grupos: difusão, diluição, impedância e densidade ótica. Desses, a diluição mostrou ser o que melhor disponibiliza

dados quantitativos para CIM, enquanto a difusão em placa de Petri se constitui em um método qualitativo (TASSOU *et al.*, 2000).

Os fatores que podem interferir nos valores da CIM obtidos através de métodos de difusão e diluição são: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (HAMMER *et al.*, 1999 e RIOS & RECIO, 2005).

As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL *et al.*, 2004).

3.8.2 FATORES INTERFERENTES

Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição. Há assim, a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste. Os aspectos importantes a serem considerados são os meios de cultura, pH, disponibilidade de oxigênio, inóculo e condições de incubação (SAHM & WASHINGTON II, 1991; SCAZZOCCHIO *et al.*, 2001; ZGODA & PORTER, 2001; KARAMAN *et al.*, 2003 e COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004;).

3.8.2.1 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos a serem desafiados e não conter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana em estudo. No método de difusão a concentração do ágar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios (PINTO *et al.*, 2003). Entre os meios de cultura utilizados para teste de susceptibilidade de bactérias, o Müller-Hinton é o mais citado, outros meios utilizados são o Tryptic Soy Ágar e Tryptic Soy Broth (TSA e TSB) e o meio líquido Luria-Bertani (LB) para bactérias. Em relação aos fungos são utilizados os meios Sabourand Dextrose Ágar e Sabourand Dextrose Broth (SDA e SDB), Potato Dextrose Ágar (PDA) e Nutrient Broth (NB) (BARRY & THONRSBERRY, 1991; ELOFF, 1998; IROBI & ADEDAYO, 1999; KHAN & KATIYAR, 2000; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; CORTEZ *et al.*, 2002; RABANAL *et al.*, 2002 e CHANDRASEKARAM & VENKATESALU, 2004).

3.8.2.2 pH

O pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano, com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas. O aumento da acidez do meio diminui a atividade antibacteriana de substâncias básicas como a estreptomicina e provoca o aumento da atividade de substâncias ácidas como a penicilina (PINTO *et al.*, 2003).

Barry e Thornsberry (1991) afirmaram que a atmosfera com concentração de CO₂ elevada, deve ser evitada, já que altera o pH da superfície, sendo então capaz de afetar a atividade antimicrobiana de alguns agentes.

Li-Chang *et al.* (2005) avaliaram o efeito do pH (5-9) na atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis inoculado com o microrganismo teste e incubado a 37 °C por 9 h. O extrato exerceu um efeito bactericida em *S. aureus*, após 1,5 e 3 h de cultivo em pH 5 e 6, respectivamente.

3.8.2.3 DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO

Conforme o metabolismo do microrganismo desafiante, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, as condições de disponibilidade de oxigênio podem influenciar na sua multiplicação. Nos trabalhos desenvolvidos para a determinação da atividade da estreptomicina utilizando *Staphylococcus aureus*, por diluição em tubos, verificou-se que houve pouca influência da disponibilidade de oxigênio (PINTO *et al.*, 2003).

3.8.2.4 INÓCULO

A susceptibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo e da sua padronização, além da quantidade inoculada que deve ser estabelecida para cada método desenvolvido. Como exemplo no teste de suscetibilidade de metilicina contra *Staphylococcus aureus*, em meio sólido, esse padrão deve ser de 10^6 UFC/mL. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de 10^5 UFC/mL no início do período de incubação (SAHM & WASHINGTON II, 1991).

Segundo recomendação de Barry & Thornsberry (1991); Sahm & Washington II (1991) e Rabanal *et al.* (2002), o padrão de leitura 0,5 na escala McFarland fornece densidade de aproximadamente 10^8 UFC/ mL. De forma alternativa o inóculo pode ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante. As placas devem ser inoculadas em até 30 minutos após a padronização do inóculo, para que a densidade celular não altere.

3.8.2.5 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

A incubação dos microrganismos deve ser feita a 35 a 37 °C para o crescimento de bactérias e 25 a 27°C para fungos. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos devem ser semelhantes, propiciando-se a mesma temperatura e agitação. No método de difusão, as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter a temperatura homogênea na estufa. Condições alternativas só devem ser utilizadas se forem essenciais para o crescimento do microrganismo em teste (KARAMAN *et al.*, 2003; SPRINGFIELD *et al.*, 2003 e CHANDRASEKARAN & VENKATESALU, 2004).

3.9 NORMATIZAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

No Brasil, apenas em 1995, passou a existir normatização oficial sobre os medicamentos fitoterápicos (BENDAZZOLI, 1995). No entanto, a Portaria n. 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 31/01/1995, foi revogada de acordo com o artigo 4º da Resolução da Diretoria Colegiada n. 17, de 24/02/2000 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) / Ministério da Saúde. O artigo 1º da referida resolução aprovou o regulamento técnico, visando a normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos no Sistema de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2000). Tal regulamento define o fitoterápico como uma substância adjuvante adicionada ao medicamento com a finalidade de prevenir alterações e corrigir e/ou melhorar as características organolépticas, biofarmacotécnicas e tecnológicas desse medicamento.

O regulamento técnico da ANVISA designa o medicamento fitoterápico como um medicamento farmacêutico obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou de

diagnóstico. O fitoterápico caracteriza-se pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2001).

A fitoterapia e outras práticas farmacológicas tradicionais têm seu uso difundido em todo o mundo. Essa ampla utilização sugere, mas não assegura que os medicamentos tradicionais apresentam uma relação risco-benefício favorável. No entanto, os medicamentos tradicionais podem ser considerados como um potencial e atraente recurso terapêutico. Persiste a necessidade de avaliar os reais benefícios e os possíveis riscos apresentados através da realização de ensaios clínicos conduzidos em conformidade com os princípios da ciência clínica atualmente praticada (BRASIL, 2008).

As justificativas para que sejam exigidos ensaios clínicos de um fármaco convencional envolvem, basicamente, quatro questões: o tripé da qualidade total no desenvolvimento, produção e controle de medicamentos, (do inglês *Chemistry-Manufacturing-Control* – CMC), os aspectos pré-clínicos, os aspectos clínicos e os questionamentos éticos. No entanto, as plantas medicinais e os fitoterápicos possuem duas características próprias: são misturas multicomponentes e, na maioria das vezes, sua utilização pelo homem precede a investigação formal. Estas características têm importantes ramificações para as quatro questões citadas acima: de qualidade total no CMC, pré-clínicas, clínicas e éticas (LAPA, 2003).

Em 1993, o mercado de fitoterápicos movimentou, no continente asiático, o equivalente a US\$ 4,5 bilhões, sendo o Japão responsável por praticamente 50% desse total. Isso faz com que os japoneses sejam os maiores consumidores *per capita* de produtos farmacêuticos à base de plantas no mundo (FERREIRA, 1998 e WHO, 2009).

Organizações internacionais e autoridades nacionais têm publicado normas para orientar a realização de ensaios clínicos com fitoterápicos nas quais as exigências requeridas

para os fármacos convencionais têm sido adaptadas para o caso particular dos medicamentos tradicionais. Essas normas são habitualmente amplas em sua cobertura, muito detalhadas, e freqüentemente ultrapassadas. Além disso, normas e regulamentos nacionais atendem às necessidades regulatórias e ao formalismo de cada país (LAPA, 2003).

O público-alvo para essas recomendações é essencialmente constituído de pesquisadores clínicos que desejam avaliar os benefícios e os riscos dos fitoterápicos, seguido das agências regulatórias nacionais. Justamente por isso, as recomendações estão redigidas em termos amplos, de forma a atender aos pesquisadores clínicos, bem como à situação regulatória global. Espera-se que estas recomendações forneçam o embasamento adequado para a realização de ensaios clínicos com plantas medicinais e com fitoterápicos que possam ser aprovados pelas agências regulatórias nacionais. Esse processo aumentaria as chances de determinar quais são as plantas medicinais e os fitoterápicos que apresentam efetividade e segurança para o uso na prática clínica e no tratamento de doenças (BRASIL, 2008).

3.10 CONTROLE DE QUALIDADE PARA FITOTERÁPICOS

Por convenção e de forma geral, medicamentos quimicamente definidos são aqueles para os quais existe a reprodutibilidade no processo e na qualidade, que se inicia com sua síntese e/ou purificação do ingrediente ativo, passa pela fabricação e finaliza com a sua administração para o paciente. Como os fitoterápicos são fabricados a partir de material vegetal, essas características e considerações devem ser traduzidas em termos apropriados à fonte vegetal (LAPA, 2003).

Os fitomedicamentos foram amplamente utilizados na terapêutica medicamentosa até a década de 1950, quando então foram paulatinamente substituídos nas farmácias por derivados sintéticos (LAPA *et al.*, 2000).

Ao contrário dos medicamentos quimicamente definidos, de forma geral, as plantas medicinais e os fitoterápicos têm sido utilizados pela humanidade muito antes de avaliações experimentais clínicas. Para aproveitar essa informação em protocolos para a avaliação desses produtos, é importante que a composição química, a forma de fabricação e o controle da qualidade do produto a ser utilizado imitem a formulação utilizada tradicionalmente. Postula-se que o fato de estarem constituídos por uma mistura fornece vantagem terapêutica, pois os componentes desconhecidos podem combinar entre si e com aqueles já determinados de maneira aditiva ou sinérgica resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido puro. Assim, na avaliação dos fitoterápicos não haveria a necessidade de purificação para se identificar ou mesmo isolar os constituintes químicos (LAPA, 2003).

Para fitoterápicos, a “análise dos ingredientes farmacologicamente ativos” pode ser melhor alcançada a partir da análise de um ou mais ingredientes supostamente responsáveis pela atividade, pela análise de um composto que se apresenta com um teor considerável em relação à composição total ou, ainda, pelo perfil cromatográfico dos ingredientes totais. As últimas duas análises são alternativas quando os constituintes responsáveis pela atividade biológica não estão definidos (LAPA, 2003).

As especificações para valores aceitáveis dos dados analíticos devem refletir os melhores padrões disponíveis. Para fitoterápicos, a variação do teor de um lote para outro pode ser um problema e vários procedimentos analíticos podem ser necessários para quantificar adequadamente seus constituintes. Pelo fato dos fitoterápicos serem originados de plantas, os níveis de contaminação por herbicidas e pesticidas, assim como as contaminações

tóxicas, devem ser cuidadosamente considerados, da mesma forma que a presença de adulterantes (BRASIL, 2008).

Muitos fitoterápicos são de fato poli-herbáceos. As plantas podem ser misturadas antes da extração ou os extratos podem ser combinados. Em qualquer dos casos, a informação sobre cada espécie presente deve ser fornecida. Os fitoterápicos para uso humano são objetos de ensaios clínicos e devem ser produzidos de acordo com os princípios das Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além disso, em muitos países, a planta utilizada para fabricação do princípio ativo tem de possuir o certificado atualizado de BPF (BRASIL, 2008).

No Brasil, existe normatização específica relacionada ao registro de medicamentos fitoterápicos. A Resolução RDC nº. 48, de 16 de março de 2004, contém definições específicas como droga vegetal, derivado de droga vegetal, fitoterápico, matéria-prima vegetal e princípio ativo de medicamento fitoterápico.

A droga vegetal é uma planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. A matéria-prima vegetal trata-se da planta medicinal fresca, droga vegetal ou seus derivados. O derivado de droga vegetal refere-se aos produtos de extração da matéria prima vegetal, como extrato, tintura, óleo, cera, exsudado, suco, e outros.

Fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos de fase III. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais. O princípio ativo do medicamento fitoterápico é a substância, ou classe química (como alcalóides, flavonóides, ácidos graxos e

outros), quimicamente caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico.

3.11 A IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO DOS FITOTERÁPICOS

Entende-se por validação de plantas medicinais a comprovação, por meio de estudos científicos apropriados, de suas propriedades terapêuticas e segurança em humanos, qualificando seu uso como medicamento. O protocolo que caracteriza uma planta medicinal como um fitoterápico é bem definido e não difere em absolutamente nada do protocolo recomendado para produtos sintéticos (LAPA *et al.*, 2001).

As plantas medicinais utilizadas em medicamentos fitoterápicos são xenobióticos, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até prova em contrário. De fato uma planta medicinal, *a priori*, não deve ser considerada inócua, se do reino vegetal são obtidas substâncias extremamente tóxicas (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993 e LAPA *et al.*, 2003).

Segundo Lapa (2003), as plantas medicinais constituem fonte imediata e viável de medicamentos para enfermidades com poucos recursos terapêuticos. É notório que no Brasil e outros países em desenvolvimento, as plantas medicinais e os fitoterápicos delas obtidos são muito utilizados no tratamento das doenças prevalentes. No entanto, pouco desses produtos foram estudados de acordo com protocolos científicos modernos. A maioria não pode, portanto, ser aceita como medicamento ético de prescrição livre porque, em geral, são produtos sem eficácia comprovada na espécie humana, sem estudos da eventual toxicidade e sem controle de qualidade apropriado. A validação científica desses produtos é essencial ao seu uso como medicamentos alternativos. Os protocolos para a caracterização de

medicamentos são bem definidos internacionalmente e, de modo geral, foram incorporados à legislação.

No Brasil a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e a Portaria 116/96 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde regulamentam esses estudos, mas não os detalham. Para esse fim, outras publicações devem ser consultadas, como a Organização Mundial de Saúde que trata da normatização de condutas éticas e científicas na pesquisa biológica em seres humanos visando, futuramente, à harmonização internacional e a livre circulação de produtos farmacêuticos. Se esses propósitos são válidos também para plantas medicinais e fitoterápicos, suas ações deverão ser comprovadas e as toxicidades avaliadas cientificamente na espécie humana, como qualquer outro medicamento.

Para Lapa *et al.* (2001), nos países em desenvolvimento, além da descoberta de compostos inovadores, o estudo científico de fitoterápicos tem outros objetivos sociais relevantes. *A curto prazo*, a aceitação popular dos medicamentos naturais permite antever que a aderência terapêutica e a efetividade dos tratamentos de difícil aceitação deverão aumentar com a introdução de fitoterápicos cientificamente controlados, mesmo naquelas enfermidades que contam com recursos apropriados. *A médio/longo prazo*, a exploração racional da biodiversidade e dos recursos terapêuticos naturais, por empresas farmacêuticas regionais, trará o fortalecimento do mercado e da infra-estrutura técnico-científica no setor de medicamentos. Antevê-se com isso, a formação e a participação empresarial da longa cadeia de especialistas necessários à consolidação da autonomia ao atendimento primário à saúde.

3.12 A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

O uso de animais para fins experimentais já preocupava os filósofos dos séculos XVII e XVIII. Voltaire (1694-1778), grande contestador de sua época, discordava do paradigma

mecanicista de René Descartes (1596-1650) que negou a condição de seres conscientes aos animais e inaugurou a concepção dos organismos como autômatas, como máquinas naturais. Esse argumento contribuiu para a prática da vivissecção (a operação feita em animais vivos) e a realização de experimentos cruéis com os animais.

Ao contrário de Descartes, Voltaire acreditava que os animais são seres sencientes. Immanuel Kant (1724-1804), outro importante filósofo do século XVIII, defendia um antropocentrismo débil, onde o homem tinha obrigações para com os animais. O filósofo inglês Jeremy Bentham (1749-1832), por sua vez, defendia a igualdade de condições a todos os seres sensíveis em virtude de sua capacidade de sofrimento. Após a Revolução Intelectual, Iluminista, dos séculos XVII e XVIII vem a Revolução Industrial dos séculos XIX e XX, que possibilitou o desenvolvimento da ciência e da técnica. No século XIX, nomes como Claude Bernard (1813 – 1878), pai da fisiologia e Louis Pasteur (1827-1895), pai da microbiologia, impulsionaram a ciência com suas descobertas por meio da experimentação animal, validando o método científico (FEIJÓ, 2005).

Atualmente, as pesquisas em animais têm como propósitos a pesquisa como meio, aquela envolvendo o uso de modelos animais para a geração de conhecimento que seja transponível aos seres humanos, caso das pesquisas nas fases pré-clínicas ou básicas, ou, ainda a pesquisa como fim, na qual é estudado o animal e suas características (GOLDIM & RAYMUNDO, 1997).

De acordo com a Resolução Normativa n. 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta as ações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e a rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) coordenadas pelo CONEP (sistema CEPs-CONEP), item III que trata dos *Aspectos Éticos da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos*, sub-item III-3, letra B, a pesquisa em qualquer área do conhecimento, envolvendo seres humanos deverá estar fundamentada na experimentação

prévia realizada em laboratórios, animais ou em outros fatos científicos. O mesmo CNS publicou, em 20 de setembro de 2004, a Resolução RDC n. 219, determinando que as pesquisas clínicas no Brasil com medicamentos e produtos para a saúde, com a finalidade de futuro registro devem, também, ser submetidas à avaliação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dados pré-clínicos e de estudos clínicos de fases anteriores ao protocolo devem ser apresentados para dar subsídio a essa avaliação.

Portanto, as pesquisas em modelos animais fundamentam as pesquisas clínicas. Sem pesquisa pré-clínica, não há a realização de ensaio clínico, não havendo, conseqüentemente, nem a aprovação nem a liberação de novos medicamentos e produtos para a saúde em nosso país (BRASIL, 2004 e NISHIIOKA, 2006).

3.13 REGULAMENTAÇÃO DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO BRASIL

A primeira Lei que regulamentou a utilização de animais em pesquisa no mundo foi publicada em 1876, no Reino Unido. Quase 60 anos depois, em 10 de julho de 1934, o Chefe do Governo Provisório dos Estados Unidos do Brasil, o Sr. Getúlio Vargas, publicou o Decreto Lei n. 24.645, regulamentado posteriormente pelo Decreto Lei n. 3.688 de 03 de outubro de 1941. Essa lei determina que todos os animais existentes no país fossem tutelados pelo estado e penaliza quem aplicar ou fizer aplicar maus tratos aos animais. O art. 3º, que apresenta 31 incisos, que conceitua o que são maus tratos aos animais. Com relação à pesquisa científica, o inciso IV determina que sejam considerados maus tratos “golpear, ferir ou mutilar voluntariamente qualquer órgão ou tecido de economia, exceto a castração, só para animais domésticos, ou operações outras praticadas em benefício exclusivo do animal e exigidas para defesa do homem, ou no interesse da ciência” (BRASIL, 1934; BRASIL, 1941).

Ainda é importante ressaltar que: praticar ato de abuso e crueldade; manter animais em locais anti-higiênicos, que impeçam a respiração, movimentos e descanso ou os privem de água e luz; abandonar animal doente ou ferido, extenuado ou mutilado, bem como deixar de ministrar a ele tudo o que humanitariamente se possa prover; não dar morte rápida, livre de sofrimento prolongado a todo animal cujo extermínio seja necessário para consumo ou não; e encerrar os animais em número tal que não lhes seja possível mover-se livremente ou deixá-los sem água ou comida, são caracterizados atos de maus tratos aos animais (BRASIL, 1934; BRASIL, 1941).

Na Inglaterra, em 1959 o zoólogo William Russell e o microbiologista Rex Burch publicaram a obra *“The Principles of Humam Experimental Tecnique”*, estabelecendo princípios orientadores ao uso de animais na pesquisa, conhecidos como o princípio dos “3Rs”: *“Reduce”*, *“Replace”* e *“Refine”*. A *“Reduce”* (redução) determina que os pesquisadores devam utilizar o mínimo de animais em um experimento. Para isto, deve-se adotar um bom modelo estatístico, utilizar ratos provenientes de colônias geneticamente homogêneas mantidas em biotérios em condições adequados e com pessoal treinado. O *“Refine”* (refinamento) orienta para a o emprego de métodos adequados de analgesia, sedação e eutanásia, com o propósito de reduzir a dor e desconforto, evitando ao máximo o estresse e *distress* dos animais de experimentação. A *“Replace”* (substituição) orienta para ao uso de métodos alternativos, sempre que possível (RAYMUNDO & GOLDIM, 2001).

Em 27 de janeiro de 1978, foi proclamada em assembléia da UNESCO, em Bruxelas, a *Declaração Universal do Direito dos Animais*. O art. 8º determina que “a experimentação animal, que implica um sofrimento físico, é incompatível com os direitos do animal, quer seja uma experiência médica, científica, comercial ou qualquer outra” e, que “as técnicas substitutivas devem ser utilizadas e desenvolvidas” (GOLDIM & RAYMUNDO, 1997).

Em 1988, o Brasil tem a sua nova Constituição Federal. No Capítulo VI, que trata do Meio Ambiente, o art. 225, inciso VII, incumbe ao Poder Público “proteger a fauna e flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, pratiquem a extinção de espécies ou submetam animais à crueldade” (BRASIL, 1988).

Em 1993, a Ordem dos Advogados do Brasil (OAB) inicia um debate sobre a regulamentação do uso de animais na experimentação, com a participação de Academia Brasileira de Ciências (ABC) que cria uma comissão para a elaboração de um projeto de lei. A comissão era formada pelas seguintes entidades: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Sociedade Mundial para a Proteção dos Animais (WSPA) e Sociedade Zoófila Educativa (SOZED) (FIN & RIGATTO, 2007).

Em 2008 o Senado da República aprova a Lei n. 11.794 em 08 de outubro de 2008, conhecida como lei “Arouca” da Câmara Federal, que regulamenta os procedimentos para uso de animais em experimentações científicas, evitando sofrimento e maus-tratos aos animais (BRASIL, 2008). No ano seguinte, o Presidente da República aprova o Decreto Lei n. 6.899 de 15 de julho de 2009 e cria o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), responsável pela normatização do tema em escopo (BRASIL, 2009).

Merece destaque o papel do COBEA na questão da Ciência de Animais de Laboratório. Em 1991 o COBEA criou os *Princípios Éticos na Experimentação Animal*, que têm orientado diversos pesquisadores preocupados com o bem-estar animal. Em 2003, o COBEA, juntamente com a *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care* (AAALAC) publicou o “Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório”. Outra publicação importante, apoiada pelo COBEA (divulgada últimas Reuniões Anuais da FESBE) partiu do Departamento de Psicobiologia, da Escola Paulista de

Medicina - USP, em 2005, os “Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação” (GUIMARÃES & MÁZARRO, 2004).

3.14 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICIDADE COM FITOTERÁPICOS

A análise pré-clínica segue os protocolos das agências estatais controladoras da saúde pública como a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos da América e a Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) na Comunidade Européia, os quais são renovados periodicamente por exigência para tal finalidade. Nesta fase as misturas de óleos essenciais, propostas no estudo, são analisadas com base nos protocolos internacionais recomendados pela OMS (*Guidelines for Drugs for Use in Man. Technical Report Series 563*, 1975; WHO – *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, Manila 1993; *International Conference on Harmonization of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Genebra, 1994-2003), adaptado à Legislação Brasileira (*Boas Práticas Clínicas*, Grupo Mercado Comum – MERCOSUL, Resolução N° 129/96; ANVISA – RDC 48 e RE 90, 16 de Março, 2004; Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos).

A informação necessária para um fármaco convencional não difere dos fármacos fitoterápicos nos ensaios pré-clínicos. As informações pré-clínicas são geralmente necessárias para direcionar a realização de ensaios clínicos para um fármaco convencional. Consistem de dados relacionados à eficácia, à toxicidade e à farmacocinética (BRASIL, 2008).

A eficácia é demonstrada através de experimentos em enzimas/receptores, *in vitro* e em modelos animais. A toxicidade é investigada: *in vitro* e em camundongos para avaliar a

genotoxicidade, *in vitro* para avaliar a citotoxicidade, em roedores para avaliar a toxicidade aguda em dose única e a dose máxima tolerada; em um modelo de roedor e em um modelo não-roedor para investigar efeitos tóxicos de doses repetidas (1, 3, 6, 9 meses), em um modelo de roedor e em coelhos para avaliar a toxicidade na função reprodutiva; em rato para avaliar a carcinogenicidade (BRASIL, 2008).

As análises farmacocinéticas referem-se à absorção do fármaco no intestino depois de uma dose oral ou mobilização do local após a injeção, distribuição do princípio ativo no organismo, taxa do metabolismo da droga, do envolvimento enzimático metabólico e da natureza dos metabólitos produzidos (BRASIL, 2008).

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

Brito (1995), considera que a partir da definição de fitoterápico como medicamento de origem vegetal, pela Portaria n. 123, de 19 de outubro de 1994, os mesmos estão sujeitos à legislação vigente para medicamentos. De acordo com a Resolução n. 1 de 13 de junho de 1988, do Conselho Nacional de Saúde, em seu capítulo VIII, no artigo 52 (que trata das exigências da pesquisa Pré-clínica), incisos 3 e 4 (referentes à duração dos estudos pré-clínicos, período de exposição dos animais mamíferos roedores e não-roedores, não humanos) os estudos toxicológicos pré-clínicos estão divididos em DL₅₀, toxicidade aguda (dose simples), toxicidade aguda (doses repetidas) e toxicidade subcrônica (doses repetidas).

A Dose Letal 50% (DL₅₀) consiste na administração de níveis crescentes de doses da amostra (extrato ou óleo essencial vegetal) administrada por gavagem, obtendo-se inicialmente um nível de dose que não mata nenhum dos animais tratados, em seguida 3 níveis crescentes de doses nos quais morram entre 10% e 90% dos animais, e posteriormente uma última dose que mata 100% dos animais tratados.

A toxicidade aguda em dose simples avalia o efeito tóxico após exposição a uma dose ou dose fracionada, da amostra diluída em veículo específico estabelecida após análise da DL_{50} , administrada por gavagem em um período de 24 horas. Fornece informações iniciais do modo de ação tóxica da amostra analisada. Serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre a toxicidade a longo prazo ou com doses repetidas.

A toxicidade aguda em doses repetidas fornece informação inicial do modo de ação da amostra analisada, monitorando os dados a respeito dos riscos sobre a saúde, resultante da exposição de doses repetidas, administradas por gavagem, em um curto espaço de tempo (14 dias).

A toxicidade subcrônica em doses repetidas fornece informações acerca dos riscos potenciais sobre a saúde, resultantes de uma exposição preferencialmente oral, de doses repetidas da amostra em um período mais longo, porém limitado de tempo (30 dias). Essa análise tem por finalidade caracterizar o perfil toxicológico da amostra estudada, administrado repetidamente por um longo período de tempo.

No teste de toxicidade aguda são utilizados mamíferos roedores em idade adulta, ambos os sexos (mínimo de seis animais/sexo), sendo que as fêmeas devem ser multíparas, não isogênicas e não grávidas. A amostra estudada deve ser administrada por via oral ou parenteral uma única vez ou fracionada em períodos não superior a 24 horas, obedecendo à via proposta para o uso do produto em seres humanos. Após 15, 30 e 60 minutos, e a cada 4 horas e diariamente, durante 14 dias após a administração, os animais são observados quanto à variação de peso e consumo de alimentos, além da observação clínica, incluindo parâmetros a serem observados, tais como: alterações de comportamento, pêlos, pele e mucosas, sistemas respiratório e cardiovascular, sistema nervoso central, periférico e autônomo.

Os animais que morrem no decorrer do experimento são necropsiados e aqueles que sobrevivem são eutanasiados e necropsiados ao final do período de observação (BRASIL, 2004; BRITO, 1995 e WHO, 1993).

No teste de toxicidade aguda (doses repetidas), são realizadas sete administrações da amostra em avaliação, chamadas tratamentos, em dias alternados, pela via selecionada. A duração do período de observação é de 14 dias durante administração de todos os tratamentos, avaliando-se qualquer manifestação tóxica ocorrida, além de parâmetros diários de peso corporal, consumo de água e alimento e produção de excretos. Para esse teste são utilizados mamíferos roedores (ratos Wistar) em idade adulta de ambos os sexos (10 animais/sexo). Os animais que morreram no decorrer do estudo são necropsiados para a determinação da *causa mortis*, aqueles que sobreviveram ao final do estudo são eutanasiados e necropsiados. Os órgãos como fígado, rins, coração, baço, pulmões, estômago, testículos ou ovários, são retirados e pesados (BRITO, 1995).

O estudo de toxicidade subcrônica (doses repetidas), é realizado previamente ao estudo a longo prazo (crônico). Nesse caso a amostra estudada é administrada diariamente, pela mesma via preconizada para seres humanos, a vários grupos de animais, a razão de uma dose por grupo, além do grupo controle, durante um período de 30 dias. Pelo menos três níveis de dose são estabelecidos: menor dose que produza o efeito terapêutico; maior dose que produza efeito adverso detectável (limitada pelo volume da dose); e uma dose intermediária (média aritmética entre a dose maior e menor).

Para esse estudo são utilizadas duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora (10 animais/sexo/dose) e uma não-roedora (3 animais/sexo/dose). No decorrer do período de administração da amostra, os efeitos nos animais são diariamente observados, como massa corporal, quantidade de alimento consumido e de excretas produzidas. Após 30 dias do experimento são realizadas análises bioquímicas completas de sangue, incluindo hemograma

completo. Na necrópsia geral de todos os animais são feitos os exames macroscópicos, pesagens de órgãos, sendo obrigatória a realização de exames histopatológicos nos animais tratados com a maior dose e grupo controle (BRITO, 1995; BRASIL, 2004).

A ANVISA, na Resolução n. 90, de 16 de março de 2004, recomenda que sejam analisados macro e microscopicamente órgãos como fígado, rins, pulmões, coração, esôfago, intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, glândulas adrenais e tireóide.

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

A escolha dos animais de laboratório, como espécies utilizadas nos testes toxicológicos, está baseada na sua fácil manutenção e observação, na possibilidade de utilização de um grande número de indivíduos, com ciclos vitais curtos, alta proliferação, padronização genética e de fácil manuseio no ambiente de laboratório. As espécies de laboratório convencionais são o *Mus domesticus domesticus* (camundongo) e o *Rattus norvergicus* (rato) (COBEA, 2003).

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

A ANVISA, na Resolução n. 90, de 16 de março de 2004, determina que a duração mínima de estudos de toxicidade pré-clínica de doses repetidas (longa duração) de amostras,

deve ser de 4 semanas até 30 dias de uso terapêutico da amostra por ano, e de 12 semanas acima de 30 dias de uso terapêutico da amostra por ano.

3.14.1 PARÂMETROS HEMATÓLOGICOS EM RATOS WISTAR

A hematologia clínica é uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos animais, tendo o hemograma como um dos métodos de avaliação de diagnóstico e prognóstico de enfermidades (SWENSON, 1988; JAIN, 1993). O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico, por permitir uma quantificação dos elementos celulares do sangue. É constituído pelo eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas (DESCAT, 2002; FAILACE, 2003).

O hemograma pode ser realizado utilizando-se métodos não automatizados, método do hemocítometro, e também, por meio de equipamentos automatizados - com ampla variação tecnológica eletrônica associada à informática. Várias publicações científicas comparando as metodologias não automatizada e automatizada demonstram que os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significantes (MORESCO *et al.*, 2003; FAILACE e PRANKE, 2004; LEITE *et al.*, 2007; MATANA *et al.*, 2008; BORGES e SIQUEIRA, 2009; MACKELLY, 2009). Assim, a tendência é a substituição gradual pelos equipamentos automatizados (NAOUM, 2008).

O eritrograma ou hematimetria, de acordo com Failace (2003), é a parte do hemograma que avalia o eritrôn, e que compreende a massa eritróide circulante - reticulócitos e eritrócitos maduros - além do mielograma. A hematimetria é uma avaliação quantitativa da massa de eritrócitos e hemoglobina no sangue circulante, que fornece informações sobre a morfologia dos eritrócitos. Ela é composta pela: contagem de hemácias (Hm) - expressa em $Hm \times 10^6/mm^3$; dosagem de hemoglobina (Hb) - expressa em gramas/ decilitros (g/dL);

determinação do hematócrito (Ht) - expresso em porcentagem (%); determinação do volume corpuscular médio (VCM) - expresso em fentolitros (fL); determinação da hemoglobina corpuscular média (HCM) - expressa em picograma (pg); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) - expressa em porcentagem (%) e amplitude de distribuição dos eritrócitos (ADE) fornecidos nas determinações automáticas.

Através do leucograma pode-se analisar as células responsáveis pela defesa do organismo e, portanto, avaliar a capacidade de resposta destas células frente a diferentes situações. É composto pelas contagens total de leucócitos (CTL) e diferencial de leucócitos (CDL). A contagem diferencial de cada leucócito (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) é emitida em (a) porcentagem (%) na contagem relativa e número de leucócitos/mm³, na contagem absoluta, e (b) pela avaliação da morfologia das mesmas no estiraço sanguíneo (DESCAT, 2002).

Segundo Santos e Meirelles Filho (2004), as plaquetas são analisadas quantitativamente, sendo expressas em PLT x 10³/mm³, e que através de contadores automatizados é possível obter: a amplitude de distribuição das plaquetas (ADP) - expressa em fentolitro (fL), o volume médio das plaquetas (VMP) - expresso em fentolitro (fL), e a razão de células grandes de plaquetas (RCGP) - expresso em percentual (%).

Ressalta-se que o hemograma deve também abranger as análises qualitativas dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas, principalmente as que consideram o tamanho e a forma celular, a coloração e as inclusões citoplasmáticas e nucleares, e as atipias celulares (NAOUM, 2008).

Os contadores de células sanguíneas modernos apresentam alto nível de precisão. Porém de acordo com Silva *et al.* (2007), é importante considerar a variação entre os instrumentos. Os tipos de contadores automáticos mais utilizados nos laboratórios de hematologia são os contadores eletrônicos por impedância e os contadores a laser.

Atualmente, há um crescente aumento na utilização de analisadores hematológicos automáticos para determinação do perfil hematológico em animais de laboratório, permitindo uma redução do trabalho manual e aumento da exatidão da contagem. Os diversos artigos disponibilizados em várias bases de pesquisas (ADEBAYO *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2005; AL SAHHAF, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2008) mostram que é prática comum o uso desses contadores para a determinação do hemograma em animais, porém a grande maioria corresponde a equipamentos padronizados para sangue humano e não para animais de laboratório.

3.14.2 PARÂMETROS DA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA EM RATOS WISTAR

O avanço tecnológico e o aprofundamento do conhecimento científico trazem consigo a necessidade dos pesquisadores dominarem com maior acurácia e precisão o desenvolvimento da pesquisa, em uma busca cautelosa pelo controle de variáveis que podem interferir diretamente no resultado final do estudo. Nesse sentido, estudos que avaliaram o nível de estresse, grau de ansiedade, temperatura e ambiente, apresentaram valores importantes da influência dessas variáveis sobre parâmetros bioquímicos e fisiológicos em animais (BRINCO, 2007).

Geralmente, os valores de parâmetros fisiológicos dos animais de experimentação são determinados em países de longa tradição na manutenção de biotérios que passam a ser admitidos como constantes para os animais de uma mesma linhagem, espalhados por diversos países (PINHEIRO, 1998). No entanto, tais parâmetros podem variar de acordo com sexo, linhagem, genótipo e serem influenciados pela idade, dieta, manuseio, ambiente, entre outros.

Na comparação de alguns parâmetros avaliados em diferentes estudos com ratos Wistar sadios como Guimarães; Mazáro, (2003); Centro de Bioterismo da FMUSP, (2008); Harkness; Vagner (1993); Canadian Council on Animal Care (1993) foi possível observar algumas variações intra-espécies decorrentes de diferenças geográficas e de manuseio. Nesse contexto, é imprescindível que cada laboratório ou biotério estabeleça um conjunto próprio de valores de referência biológicos dos animais sadios controle, de acordo com a linhagem, sexo e idade de cada espécie utilizada.

O estabelecimento desses valores de referência permite avaliar com maior acurácia a homeostase e as modificações induzidas por processos patológicos, assim como avaliar os resultados obtidos nos procedimentos experimentais provenientes de intervenções terapêuticas (CARVALHO *et al.*, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa obteve as autorizações legais para sua consecução do conselho do patrimônio genético (CGEN) e do comitê de ética em experimentação animal (CEE-UFAM), em anexo.

4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

A primeira etapa da investigação fitoquímica consistiu na coleta do material vegetal. A exsicata foi preparada para a identificação botânica de cada espécie, onde a seleção do material foi feita de forma cuidadosa, evitando coletar partes dos vegetais afetados por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta de insignificante interesse para a investigação. No local de coleta, registrou-se

o período relacionado a estação climática do ano a hora, a data, o tipo de solo e o georeferenciamento do espécime, essas informações são importantes, visto que, o ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos produtos vegetais (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividades de coleta do material botânico

Espécie botânica	Parte da planta	Local de coleta
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Tubérculos	Estação Experimental de Hortaliças do Ariaú, INPA
<i>Protium heptaphyllum</i> March	Resina	Fazenda Experimental da UFAM
<i>Guatteria citriodora</i> Ducke	Folhas	Reserva Ducke do INPA

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

A secagem foi realizada em estufa de ar circulante a 45 °C, com duração média de 4 dias, dependendo da parte da planta. Para o processo de moagem utilizou-se liquidificador, com copo de vidro e lâminas em aço inoxidável para evitar adição de resíduos na amostra, e posteriormente extração dos óleos essenciais utilizando o sistema de Clevenger modificado de hidrodestilação por arraste de vapor (MIGUEL & MIGUEL, 2004; MATOS, 2009).

4.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A International Standard Organization (ISO) define óleo essencial, como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água. Desta forma, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Sua principal característica é a volatilidade com aroma agradável e intenso na grande maioria; por esse motivo são denominados de essenciais (SIMÕES, 2003).

Os óleos voláteis foram obtidos através de processo de hidrodestilação, no sistema Clevenger modificado com duplo condensador (Figura 10) por 3 horas, mantendo-se a temperatura de 100 °C. Posteriormente os óleos foram filtrados usando Na₂SO₄ anidro para retirar resíduos de água e armazenados em ampolas, de coloração âmbar, que preservam as amostras da ação direta da luz. Para manutenção da integridade dos óleos voláteis e de seus constituintes químicos, as ampolas foram seladas e mantidas sob refrigeração. Na sequência do estudo os óleos foram submetidos às análises químicas, ensaios biológicos e testes de toxicidade.



Figura 10 - Sistema de Clevenger modificado para extração de óleo essencial
Foto: Corrêa, R. F.

4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram submetidos à análise por Cromatografia em fase Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) de marca Shimadzu modelo QP2010 Plus com fonte de ionização de impacto eletrônico de 70 eV, para identificação e obtenção dos espectros de massas.

As análises foram realizadas em coluna capilar (5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano), com o gás de arraste Hélio (He) em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção foi em modo split 1:100, com temperatura do injetor a 240 °C e do detector a 280°C. A programação do forno foi de 50 a 310°C com taxa de elevação de 4°C/min. Os constituintes foram identificados por meio dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados da espectroteca Wiley e da literatura (ADAMS, 2009).

4.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA (CIM) EM MEIO LÍQUIDO

Para a determinação da CIM, utilizou-se o teste de microdiluição em placa de 92 poços, com o preparo de Broth Müller-Hinton (BMH), na proporção indicada pelo fabricante de 21 g/L em 300 mL.

As amostras de óleos essenciais, mistura de óleos e o padrão digluconato de clorexidina foram diluídas em dimetil sulfóxido (DMSO) emulsificante, nas proporções 40 mg/mL para os óleos e mistura em 400 µL e 0,5% no padrão em 1 mL. Posteriormente, as amostras foram condicionadas em frascos *eppendorf* fechados e receberam banho de luz ultravioleta por 30 minutos, na câmara de fluxo laminar para descontaminação.

A preparação do inóculo foi realizada em ambiente estéril na câmara de fluxo laminar para evitar contaminações por manipulação, de preferência no ato do teste, evitando-se a morte das colônias bacterianas. A incubação foi realizada em estufa de crescimento bacteriológico a uma temperatura de 36°C ± 1 °C durante 24 a 48 h para o teste da microdiluição na verificação da CIM, repetindo-se o processo de incubação com igual

temperatura em 24 horas, nas 8 placas de Petri contendo Ágar Müller-Hinton (AMH) com a subcultura para avaliação do CBM.

O método foi validado por Eloff (1998), e constitui uma técnica que emprega microplacas de 96 poços, com o auxílio de pipeta automática multicanal. Todos os poços foram preenchidos com 100 µL de Broth Müller-Hinton (BMH). Na sequência adiciona-se na primeira coluna 100 µL de cada amostra na concentração de 40 mg/mL, a qual de imediato passa a ser de 20 mg/mL, bem como utilizou-se o controle positivo digluconato de clorexidina a 0,5% que passou a ser de 0,25%.

Na microdiluição há transferência seriada de 100 µL entre todas as colunas de poços subseqüentes, nas concentrações (mg/mL): 1(10,0), 2(5,0), 3(2,5), 4(1,25), 5(0,62), 6(0,31), 7(0,16), 8(0,08), 9(0,04), 10(0,02), 11(0,01), 12(0,005). Misturou-se bem cada amostra a ser analisada e o meio de cultura em forma de caldo. Com esse procedimento, todos os poços ficaram com 100 µL, exceto a última coluna, com 200 µL, considerada como controle de contaminação das amostras.

O inóculo foi preparado em tubo contendo 10mL de água destilada e esterilizada com adição das colônias bacterianas de *S. mutans* na proporção de 3×10^8 UFC/mL, correspondente ao tubo nº 1 na escala de McFarland de padrão de turbidez. Importante salientar, a necessidade de agitar o tubo contendo o inóculo antes de serem adicionados 100 µL em cada poço, exceto os poços da última coluna (controle de contaminação das amostras), totalizando 200 µL de volume em cada poço entre o microrganismo a ser testado, a concentração do produto a ser analisado com meio líquido e controles.

A microplaca foi incubada a $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 h. Depois deste período, foi analisada visualmente e/ou espectrofotometricamente quanto ao crescimento microbiano, através da turvação do meio de cultura (KOLODZIEJ *et al.*, 1999). Também pode ser realizada leitura através do uso de corante. A diluição que não apresenta turvação indicou a

concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo teste (PELCZAR *et al.*, 1997). A resazurina (fenoxazin-3-ona), um corante indicador de óxido-redução, foi empregada para avaliar a viabilidade bacteriana (PALOMINO *et al.*, 2002; MONTEJANO *et al.*, 2005).

A solução de resazurina foi preparada na concentração de 0,1 mg/mL, em seguida todos os poços da microplaca foram preenchidos com 10 μ L do corante, e mantidos 21 horas em incubação. Após a adição do corante foi feita uma inspeção visual de sua aplicação, a microplaca foi reincubada a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas, mantendo-as até 24 h para confirmação dos resultados. Em seguida, foi realizada leitura visual final como indicada na literatura (PALOMINO *et al.*, 2002; MONTEJANO *et al.*, 2005).

A manutenção de cor azul nos poços foi interpretada como ausência do crescimento microbiano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de células viáveis em crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras diluídas capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas, ou seja, a menor concentração dos óleos essenciais e mistura de óleos capaz de impedir a mudança de cor azul para rosa (ALVES *et al.*, 2008) (Figura 11).

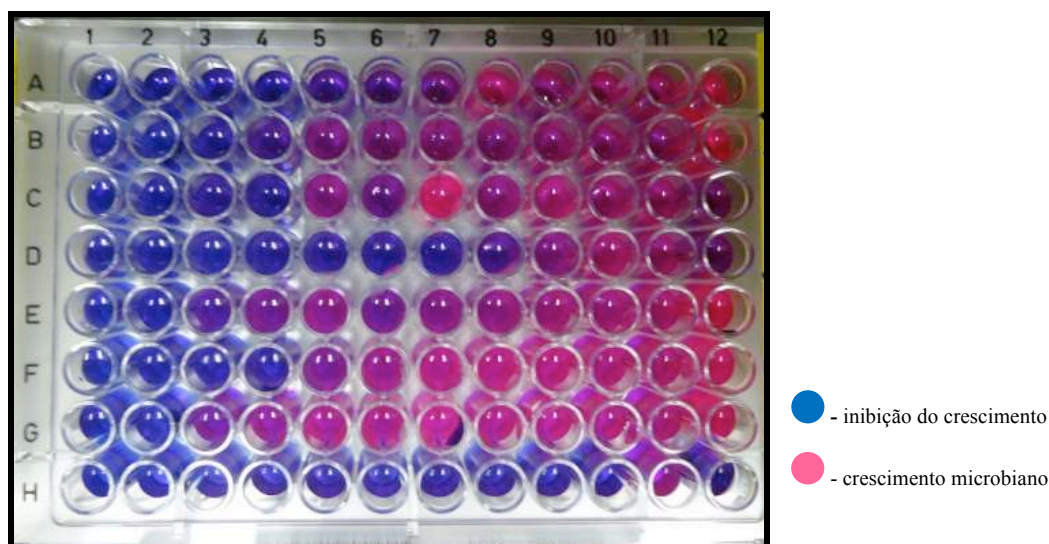


Figura 11 – Microplaca para determinação da CIM

4.5.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MINIMA (CBM) EM MEIO SÓLIDO

Para a determinação da CBM, após a leitura visual da microplaca foi realizada subcultura de cada linha de poços de cor azul, transferindo-se os microrganismos inibidos por meio de alça de platina estéril para placas de Petri, contendo Ágar Müller-Hinton (AHM) na concentração de 34 g/L. A placa de Petri foi dividida em até 4 zonas de crescimento, onde cada zona representou um poço respectivamente. As placas foram incubadas por 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a fim de determinar se a CBM apresentou efeito bactericida ou bacteriostático (Figura 12).



Figura 12 – Placa de Petri com meio sólido e repique do conteúdo dos poços com inibição de crescimento

4.6 CÁLCULO DA DOSE EM FUNÇÃO DO VOLUME ADMINISTRADO

A densidade da mistura de óleos essenciais que compõem a amostra RF-11MAO pura calculada gravimetricamente foi de 0,95 g/mL. Por se tratar de uma mistura de óleos essenciais, provavelmente com ações sinérgicas, a referência às doses administradas foi

sempre relacionada aos volumes utilizados do material original puro e da mistura diluída com tween 80/água destilada a 1%. As doses expressas em g/Kg de RF-11MAO mencionadas no estudo devem ser calculadas multiplicando os volumes utilizados em mL/Kg por 0,95.

4.7 TESTES PRELIMINARES AO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Os experimentos preliminares foram realizados com camundongos Swiss, para definição das doses na extrapolação em ratos Wistar em protocolos estabelecidos para aos testes pré-clínicos. Nos testes preliminares foram observados os aspectos fisiológicos e comportamentais do *screening hipocrático*, demonstrados na forma de atividade estimulante ou depressora dos sistemas nervoso e muscular. Tais manifestações surgiram a partir do primeiro contato da amostra RF-11MAO, na forma de dose nesses mamíferos.

Para os testes de Campo aberto, Rota-Rod, Arame foram utilizados 9 camundongos Swiss, em duas doses distintas, divididos 3 por teste, sendo 2 tratamentos e 1 controle. Para a determinação da dose letal 50%, foram utilizados 12 camundongos Swiss, sendo 6 tratamentos e 6 controles observados por 8 dias consecutivos. Utilizou-se fêmeas não isogênicas pesando entre 30 e 40g, com o volume administrado de 0,1 e 0,2 mL na concentração de 2,5 e 5 mL/Kg respectivamente, da amostra RF-11MAO pura nos testes de Campo aberto, Rota-Rod, Arame. Na determinação da dose letal 50% foi utilizada a RF-11MAO pura e diluída 1/3. Para esses testes não foram realizadas análises estatísticas dos dados, em função do número de camundongos envolvidos nos experimentos (n=3), respeitando o princípio dos “3Rs”: “*Reduce*”, “*Replace*” e “*Refine*” proposto por Raymundo e Goldim (2001). No teste Sono barbitúrico foram utilizados 25 camundongos Swiss, divididos em 5 grupos de 5 animais, os dados foram submetidos a análise de variância

ANOVA, seguida pelo teste de Turkey que considerou como valores significativos aqueles cujo $p < 0,05$.

4.8 O ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA RF-11MAO EM RATOS WISTAR

Nos experimentos pré-clínicos foram utilizados 200 ratos albinos Wistar de ambos os sexos, sendo 100 para os testes da fase aguda, observados durante 14 dias consecutivos, testados em dose única e 100 para a fase sub-crônica, observados durante 28 dias consecutivos, testados em dose diária. Após os testes preliminares foram estabelecidos os valores utilizados nesses testes. O volume administrado de 0,2 mL, nas concentrações diluídas da RF-11MAO em 1/3, 1/10, 1/30 e 1/100. Os animais escolhidos com idade de 120 dias apresentavam peso médio de 350 g para os machos e 240 g para fêmeas, todos provenientes do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os animais foram mantidos no Biotério do setor de Farmacologia e Toxicologia do CBA, em condições controladas de umidade relativa do ar variando entre 65% – 70%, temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 6 às 18 horas). Os animais foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* por todo o período experimental.

4.9 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RF-11MAO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O *screening hipocrático* compreende um conjunto de ensaios úteis e comumente utilizados na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas segundo Lúcio *et al.* (2000). Nos testes preliminares de Campo aberto, Rota-

Rod, Arame e Sono barbitúrico foram definidas as relações dose/efeito no sistema nervoso central e a determinação da dose letal 50% (DL₅₀).

Para os testes foram utilizadas fêmeas não isogênicas de camundongos Swiss, pesando entre 30 e 40g, tratadas com a amostra RF-11MAO e animais controles testados com veículo inerte. A forma de administração da dose foi por gavagem pela via oral, com auxílio de cânula orogástrica. Os animais foram colocados em grupos em caixas-moradia e avaliados em diferentes intervalos de tempo segundo Kanjanapothi et al. (2004); Lapa et al. (2005) e Oliveira, (2007).

4.9.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (*Open-Field*)

O registro no campo aberto consistiu a observação do animal em uma caixa de acrílico medindo 30x30x15 cm, contendo 9 quadrados impressos no fundo ou campo, durante 5 minutos os animais são analisados nos seguintes aspectos: O número de cruzamentos, quando o animal cruza com as 4 patas as divisões do campo e o número de levantar ('rearing'), quando o animal fica com duas patas tocando ou não nas paredes da caixa, metodologia descrita por Sielgel (1946), validada por Archer (1973), Nahas (1999) e desenvolvida por Lapa et al. (2005).

O teste do campo aberto permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, a partir dos tratamentos com água salina 0,9% (10 mL/Kg) via oral e a amostra RF-11MAO (0,1mL; 0,2mL), após 30 minutos e 1h. A avaliação foi direcionada nesse teste, para a movimentação (número de cruzamentos) e atividade exploratória (número de levantar) (LAPA et al., 2005) (Figura 13).

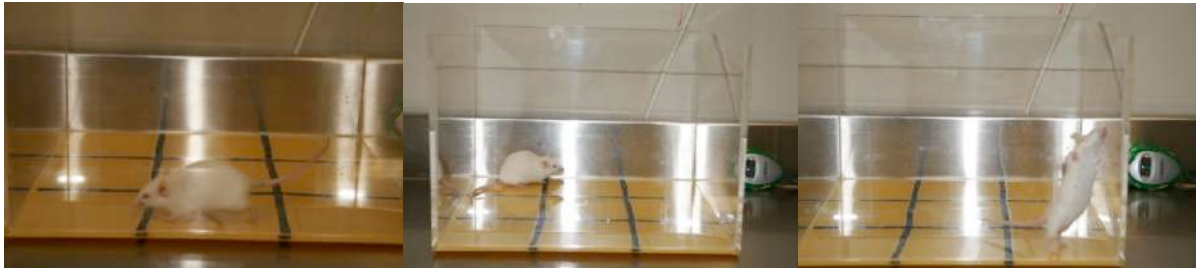


Figura 13 - Teste do Campo-Aberto (*Open-Field*)
Fotos: Corrêa, R. F.

4.9.2 TESTE DO ROTA-ROD

Para a realização desse teste, os animais foram treinados 24 horas antes. O aparelho é constituído de um cilindro de 5 cm de diâmetro subdividido em seis compartimentos, dispostos a 25 cm de altura e girando a 12 r.p.m. (Figura 14). O teste permite avaliar se os tratamentos promovem distúrbios na coordenação motora dos animais, por depressão com sedação (sono) e/ou com relaxamento muscular. O registro foi realizado durante 1 minuto, verificando-se a latência para a primeira queda do animal e o tempo de permanência na barra giratória. Os animais podem ser reconduzidos a barra três vezes durante o experimento (LAPA *et al.*, 2005).

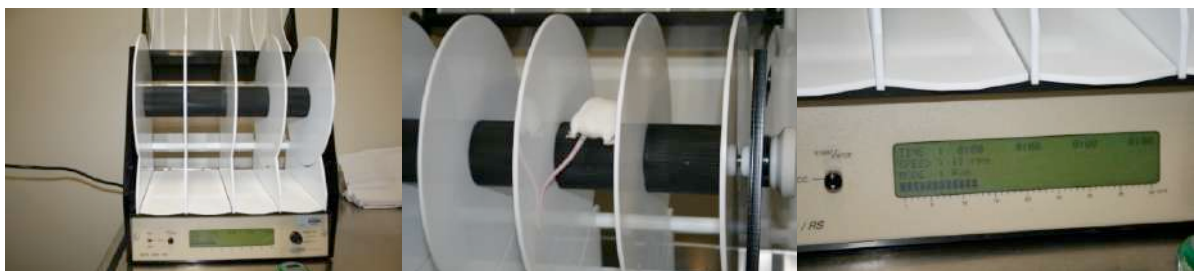


Figura 14 - Teste do Rota-Rod
Fotos: Corrêa, R. F.

4.9.3 TESTE DO ARAME (*WIRING TEST*)

Para a realização desse teste, os animais foram submetidos a um treino de uma tentativa antes do tratamento com a amostra em estudo. O experimento consiste em suspender os animais pela cauda e colocar suas patas dianteiras num arame, com 1mm de diâmetro por 15 cm de comprimento, com altura de 20 cm, apoiado por barras laterais. Tão logo o animal agarre o arame com as patas dianteiras, ele é tracionado horizontalmente e solto, registrando-se o tempo que o animal leva para agarrar o arame com as patas traseiras (BOISSIER *et al.*, 1961).

O teste permite avaliar a capacidade de preensão (agilidade) do animal, que pode ser interpretada como efeito sedativo e/ou miorrelaxante de uma substância natural. O registro observa o tempo que o animal leva para agarrar o arame com pelo menos uma das patas traseiras em 3 tentativas (LAPA *et al.*, 2005) (Figura 15).



Figura 15 - Teste do Arame (*wiring test*)
Fotos: Corrêa, R. F.

4.9.4 TESTE DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICO

Nesse experimento os animais receberam como indutor do sono o pentobarbital sódico (50mg/Kg) e mantidos em camas plásticas. Esse teste permite investigar ou confirmar um possível efeito hipnosedativo de uma substância natural. Logo após aplicação do pentobarbital

intraperitoneal, registra-se a latência para o sono (tempo de indução do sono) e a duração do sono (tempo de recuperação). Espera-se que após a injeção do barbitúrico seja registrado o sono por pelo menos 3 h consecutivas (CARLINI e BURGOS, 1979); (CHWEH *et al.*, 1987); (LIMA *et al.*, 1993); (LANCEL, 1999) e (LAPA *et al.*, 2005).

Dos 5 grupos de 5 camundongos Swiss de fêmeas adultas, 3 receberam tratamento, 1 veículo e 1 controle, 1 h antes da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico para verificação da latência (tempo de indução do sono) e a duração do sono (tempo de recuperação). As fêmeas do tratamento receberam 0,2 mL da amostra RF-11MAO pura e diluída em 1/3 e 1/10, do veículo receberam 0,2 mL de Tween 80 (1%) e do controle receberam água, sendo submetidos ao sono após 1h com o barbitúrico.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, seguida pelo teste de Turkey, as colunas e as barras verticais representam as médias e erro padrão das médias (n=5). O teste t de Student também foi utilizado para comparação das médias entre dois grupos experimentais. Considerou-se como valores significativos aqueles cujo $p < 0,05$.

4.9.5 TESTE PARA DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀)

Para determinar a dose letal de 50% foi realizada uma observação geral da dose/efeito em camundongos Swiss tratados com dose diária da amostra RF-11MAO diluída 1/3, em Tween 80 e observados durante 8 dias, o volume foi mantido em 0,2 mL. Administrado por gavagem para 6 animais (tratados) e 6 animais (controle) que receberam água. Os grupos foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental (OECD, 2001). As observações foram realizadas nos seguintes espaços de tempo de 0-24 horas (1 dia), 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 192 horas (8 dias), conforme Lapa *et al.*, (2005).

4.10 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICIDADE AGUDA ORAL EM RATOS - DOSE ÚNICA

O teste de toxicidade aguda avaliou as alterações comportamentais e os sinais aparentes de toxicidade nas primeiras 24 horas, após a administração da amostra RF-11MAO. A evolução dos efeitos foi observada durante 14 dias. Os parâmetros comportamentais dos ratos machos e fêmeas foram considerados a partir dos seguintes sinais: Estado geral, hiperreflexia, hipermotilidade, irritabilidade, tremores, convulsões, quietação, letargia, perda de equilíbrio, ataxia, sonolência, piloereção, midríase, palidez de orelha, medo, salivação, lacrimejamento, diarreia, micção, tônus muscular, postura, força muscular, reação à dor, contorções abdominais. O protocolo proposto para os estudos de toxicidade aguda considera ainda a observação da dose letal mediana (DL₅₀ aproximada) por via oral, porque esse efeito não é comum no estudo de fitoterápicos (LAPA *et al.*, 2005).

4.10.1 FASE EXPERIMENTAL DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Para realização do teste foram utilizados 100 ratos albinos Wistar de ambos os sexos, com idade de 120 dias, com peso médio de $325,70 \pm 25,88\text{g}$ para os machos e $235,04 \pm 15,16\text{g}$ para fêmeas (média $\pm$ desvio-padrão da média), provenientes do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os animais foram mantidos no Biotério no setor de Farmacologia e Toxicologia do CBA, em condições controladas de umidade relativa do ar variando entre 65% – 70%, temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 6 às 18 horas). Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* por todo o período experimental (Figura 16).



Figura 16 - Biotério do CBA com a manutenção dos ratos Wistar em condições controladas
Foto: Feitosa, K.

Os 10 grupos de 10 ratos receberam em dose única a amostra RF-11MAO constituída da mistura dos óleos essenciais de tiririca (*Cyperus rotundus*), breu-branco (*Protium heptaphyllum*) e laranjinha (*Guatteria citriodora*) diluída nas proporções de (1/3; 1/10 e 1/30) em Tween 80 e volume de 0,2 mL. A administração foi por via oral, com auxílio de cânula orogástrica procedeu-se a gavagem, pela manhã do primeiro dia de tratamento, enquanto o grupo controle recebeu água e o grupo veículo, Tween 80/água (1%).

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

Ao completar as 24 horas, 50% dos animais de ambos os sexos foram eutanasiados e submetidos a necrópsia. Para completar o estudo, no dia seguinte ao décimo quarto dia eutanasiou-se os outros 50%. Após 24 horas e 14 dias de tratamento, o sangue dos animais foi coletado para dosagem bioquímica e os órgãos retirados e pesados para serem submetidos a análise histopatológica.

Os 50 animais que permaneceram no biotério por 14 dias, em igual número de ratos machos e fêmeas foram mantidos em grupos de 10 animais em gaiola padrão, modelo eurostandard tipo IVS em polisulfona e grade em aço inoxidável, medindo 480 x 375 x 210 mm e tiveram seu peso, consumo de água e ração monitorado individualmente, durante todo experimento.

Em ambas etapas foram realizadas observações comportamentais sistemáticas para avaliar o *screening hipocrático*, que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (MALONE & ROBICHAUD, 1983).

Os parâmetros como: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, respostas ao toque e aperto da cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tonus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, Straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte foram avaliados no tempo de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, e tabulados numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise (LAPA *et al.*, 2005).

Após 14 dias do período de observação, os animais remanescentes foram anestesiados com éter etílico, sangrados pela artéria aorta abdominal e necropsiados. Após inspeção geral *in situ*, os órgãos foram isolados, dissecados e submetidos a exame macroscópico detalhado. Os órgãos ocos foram abertos no seu maior comprimento para inspeção da mucosa e os órgãos sólidos examinados em vários planos de secção. O exame histopatológico foi realizado em necrópsias dos seguintes órgãos: pulmão, traquéia, timo, coração, rim, fígado, baço,

medula óssea, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, glândulas salivares, tireóide, supra-renal e hipófise, pâncreas, bexiga, gônadas, útero, próstata e vesícula seminal. Biópsias das demais estruturas isoladas (artéria aorta, traquéia, músculo esquelético, nervo ciático, linfonodo, pele, mama e globo ocular) foram preservadas para estudos posteriores, se necessários, e acondicionados em frascos identificados com o mesmo número do indivíduo necropsiado contendo solução de formol tamponado (LAPA *et al.*, 2005).

As amostras do sangue coletado foram utilizadas para os exames da bioquímica plasmática (AST, ALT, glicose, bilirrubina, fosfatase alcalina, ácido úrico, colesterol, proteínas totais, creatinina, uréia, albumina) e exames hematológicos (eritrócitos, hematócrito, plaquetas, leucócitos, coagulação) (LAPA *et al.*, 2005). O protocolo experimental segue os procedimentos baseados na resolução n. 90, de 16 de março de 2004 da ANVISA.

4.10.2 VARIÁVEIS AVALIADAS EM MACHOS E FÊMEAS

As variáveis avaliadas nos animais foram: consumo diário de ração (g), consumo diário de água (g), massa corporal diária (g), análise macroscópica dos órgãos; Aparecimento de sinais de toxicidade. De forma a padronizar o teste, procurou-se observar os seguintes sinais: alteração da locomoção – movimentos dos animais na gaiola; insuficiência respiratória e cardíaca (dispnéia, bradicardia e taquicardia); piloereção – a ocorrência de eriçamento dos pêlos; silorréia – presença de secreção na boca dos animais; contorções abdominais, diarreia; reflexos auriculares e corneal – para comprovar se o animal responde a estimulação provocada por pinça hemostática nas regiões auriculares e corneal, através da movimentação sensitiva; atividade sobre a musculatura esquelética (força para agarrar) – para avaliar a capacidade do animal permanecer seguro à grade superior da gaiola; e a atividade no sistema nervoso central – tremores, convulsões, sedação, hipnose e coma (LAPA *et al.*, 2005).

4.11 ESTUDO DA TOXICIDADE CRÔNICA PRÉ-CLÍNICA – DOSES REPETIDAS

Os 10 grupos analisados foram compostos de 10 ratos cada, sendo 5 machos e 5 fêmeas por caixa moradia, que receberam doses diárias da amostra RF-11MAO, diluída nas proporções de 1/10; 1/30 e 1/100, em Tween 80. A forma de administração foi por via oral, com auxílio de cânula orogastrica para o procedimento da gavagem, pela manhã, enquanto o grupo controle recebeu água e o grupo veículo, Tween 80 (1%). Os grupos foram observados diariamente; logo após o trigésimo dia, 50% dos animais de ambos os sexos foram submetidos à necrópsia e no dia seguinte os outros 50%. O sangue foi coletado para dosagem bioquímica e os órgãos dissecados, posteriormente pesados e retirados os fragmentos para serem submetidos à análise histopatológica.

Foram observados e registrados diariamente os dados fisiológicos como peso, consumo de água, consumo de ração dos animais, bem como as alterações comportamentais anormais durante todo o estudo. A avaliação laboratorial incluiu: hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas; alanina-aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato-aminotransferase (AST ou TGO), fosfatase alcalina, creatinina, uréia, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, albumina, glicemia e uréia (LAPA *et al.*, 2005).

Após a eutanásia, foi feita a avaliação macroscópica à vista desarmada dos órgãos, além da pesagem absoluta (g) de cada órgão, os valores foram divididos pelo peso médio dos cérebros, único órgão no corpo que não altera a forma mantendo peso estável, para determinar os pesos relativos (%) e análise estatística. Foram colhidas amostras de fígado, pulmão, coração, rim, baço, intestino, estômago, esôfago e cérebro dos animais para exame histopatológico, cujas fatias foram fixadas em formol tamponado 10% por 24h, embutidas em

blocos de parafina, seccionadas à 5 µm e corados com hematoxilina e eosina para análise histopatológica (JUNQUEIRA, 1983; LAPA *et al.*, 2005).

A principal finalidade da análise histopatológica foi avaliar a integridade tecidual dos órgãos extirpados. Dentre os principais parâmetros investigados estão lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose. A intensidade de acometimento poderia variar de discreta (menos de 25% do órgão), moderada e acentuada (maior que 50%) (LAPA *et al.*, 2005).

4.12 AVALIAÇÃO HEMATOLOGICA DOS RATOS WISTAR

As amostras de sangue coletadas em tubos com anticoagulante EDTA sódico foram utilizadas para realizar o eritrograma: hematócrito ou volume globular (VG), hemoglobinometria, concentração de hemoglobina globular média (CHGM), volume globular médio (VGM) e hematimetria (SILVA *et al.*, 2007).

Para a realização do Leucograma, fez-se a coloração dos esfregaços sangüíneos, pelo método rápido Panótico. Depois de corados, os esfregaços foram submetidos à microscopia óptica de luz (100x) para ser realizada a leucometria específica e a conversão dos valores relativos e absolutos dos leucócitos (BAIN, 2004).

Devido ao grande número de amostras e algumas limitações da técnica, como o tempo de realização, e tendo em vista que se trabalhou com as médias, para a realização da leucometria fez-se duas amostras de sangue para cada animal. Para cada 0,8 mL de sangue coletado de cada animal, obteve-se a duplicata com 0,4 mL de sangue, viabilizando a comparação dos dados em média na análise estatística.

4.13 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DOS RATOS WISTAR

A coleta de sangue para avaliação bioquímica foi realizada em animais sob jejum de 12 horas. Os ratos foram anestesiados com éter etílico, eutanaziados e verificado o peso corporal. O sangue foi coletado através de punção da veia cava inferior, utilizando-se seringa heparinizada. O plasma foi separado após centrifugação das amostras a 2500 rpm por 10 minutos. Foram analisados os seguintes parâmetros fisiológicos da análise bioquímica: glicose, triglicerídeos, colesterol total, uréia, creatinina, atividade das enzimas fosfatase alcalina (FALC), aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT).

A determinação da glicemia está relacionada aos níveis plasmáticos de glicose e foi realizada em alíquotas de plasma (10 µL), utilizando método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Gold Analisa®). A glicemia foi avaliada em animais sob jejum de 12 horas. Os resultados foram expressos em mg/dL.

O colesterol total foi determinado pelo método enzimático colorimétrico de colesterol-oxidase (Gold Analisa®). Neste método, a colesterol-oxidase catalisa a oxidação do colesterol produzindo o peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), onde a intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Os triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático colorimétrico da glicerol-3-fosfato-oxidase (Gold Analisa®). Neste método os triglicerídeos sofrem ação das lipases, resultando na molécula de glicerol, e este é posteriormente convertido em glicerolfosfato, que é oxidado a dihidroacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água

oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha), em que a intensidade de cor é proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

A determinação da concentração de uréia no plasma foi realizada através de um método enzimático colorimétrico (Gold Analisa®). Neste método, a uréia é hidrolisada pela urease em íons amônia e CO₂. Em meio alcalino, os íons amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, para formar indofenol. A absorbância do complexo formado, medida em 600 nm, é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra em mg/dL.

A determinação da concentração de creatinina em mg/dL no plasma foi realizada através de um método enzimático colorimétrico (Gold Analisa®). Neste método a creatinina reage com o picrato alcalino, formando um complexo que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH, promovendo a decomposição do picrato de creatinina e deixando inalterada a cor derivada dos cromógenos, que também é medida fotometricamente.

A diferença entre a leitura fotométrica antes e após a acidificação permite quantificar a concentração de creatinina verdadeira. As atividades enzimáticas da fosfatase alcalina (FALC) e das transaminases (aspartato amino transferase - AST e alanina amino transferase - ALT) expressa em U/L no plasma foram determinadas utilizando kit comercial (Gold Analisa®), por método cinético colorimético.

Segundo Wolford *et al.* (1986) o conhecimento desses parâmetros é muito importante na avaliação e observação dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais, assim como na análise das modificações induzidas por processos toxicológicos. A metodologia para determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos obtidos de ratos Wistar foi adaptada da literatura proposta por Wolford *et al.* (1986); Amaral *et al.* (1995/96); Lillie *et al.* (1996); Pinheiro *et al.* (1997/98); Dantas *et al.* (2006).

4.14 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA

A análise histopatológica do fígado, pulmão, rim, baço, gônadas, adrenais, linfonodos, timo, próstata, vesícula seminal, esôfago, estômago e intestinos delgado e grosso, foi realizada em todos os fragmentos das necropsias provenientes dos animais machos e fêmeas que participaram dos testes pré-clínicos, tanto da fase aguda quanto subcrônica. Os fragmentos dos órgãos foram retirados e fixados em formol 10%, o preparo dos fragmentos para inclusão em parafina foram mergulhados consecutivamente em álcool a 70%, álcool a 80%, álcool a 90% e álcool absoluto, durante uma hora em cada solução. O álcool absoluto foi trocado duas vezes, totalizando três horas (BEHMER *et al.*, 1976; ALZOLA, 2001).

Os fragmentos foram transferidos para recipientes com xilol, onde ficaram durante duas horas para diafanização, sendo essa solução trocada após a primeira hora. Em seguida, foram alocados em recipientes com parafina e levados para uma estufa a vácuo, onde permaneceram por uma hora. Na etapa seguinte, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina histológica (Histosec®). Foram realizados cortes de tecido de 4 µm nos blocos de parafina, utilizando micrótomo rotativo (LEICA®, modelo RMS2125, Germany). Os cortes foram fixados sobre lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE) (TIMM, 2005; GARTNER & HIATT, 2007). A avaliação do grau de lesão histopatológica foi conduzida por observação qualitativa e quantitativa seguindo parâmetros comparativos e analíticos (STEVENS & LOWE, 1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais extraídos das folhas secas de *G. citriodora* coletada no mês de julho, da resina de *P. heptaphyllum* coletada em março, dos tubérculos secos de *C. rotundus* nos meses de setembro e outubro, e a mistura de todos, na proporção descrita na patente US 2010/0284943 (CORRÊA, 2010), compondo a amostra RF11-MAO, apresentaram rendimento, densidade e coloração conforme descrição na Tabela 3. A densidade da mistura dos óleos essenciais foi de 0,95 g/mL, importante parâmetro para o cálculo das doses nos testes pré-clínicos.

Tabela 3. Características dos óleos essenciais das espécies selecionadas e da mistura

Espécies e mistura dos óleos	Nome comum e código	Rendimento (%)	Densidade (g/mL)	Coloração
<i>Cyperus rotundus</i>	tiririca	0,4	0,90	amarelo escuro
<i>Guatteria citriodora</i>	laranjinha	1,1	0,80	amarelo claro
<i>Protium heptaphyllum</i>	breu-branco	3,3	0,82	amarelo claro
<i>Amostra</i>	RF-11MAO	4,8	0,95	amarelo claro

5.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cyperus rotundus*

O cromatograma de íons totais do óleo essencial de *Cyperus rotundus* apresentou 88 picos conforme a Figura 17. Foram identificados 27 constituintes que correspondem ao teor de 49% do óleo essencial, sendo as 5 substâncias majoritárias, a α -ciperona (8,10%), ciperotundona (7,83%), cipereno (6,10%), óxido de cariofileno (4,75%) e β -selineno (4,68%). Os constituintes identificados foram, citados, comparados na Tabela 4 e os espectros de

massas confirmaram a identificação com a literatura pesquisada de Adams (2009) e Zoghbi *et al.* (2008).

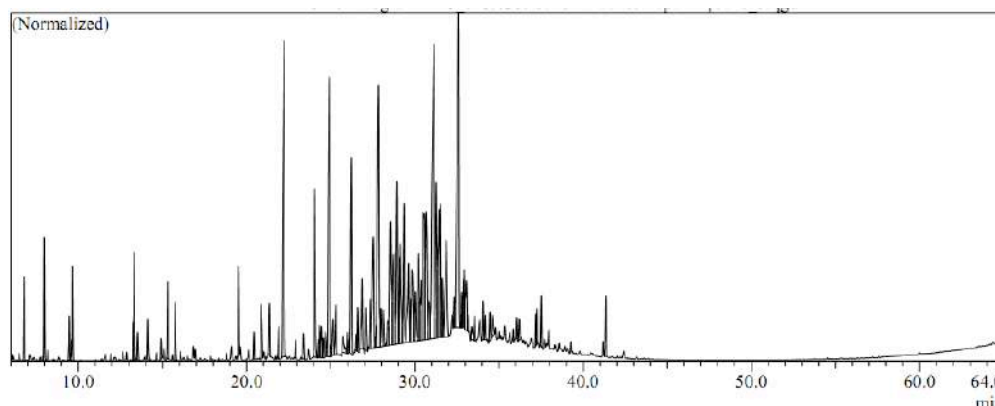


Figura 17 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial dos tubérculos de *Cyperus rotundus* do INPA

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *C. rotundus* coletada na várzea e descritos na Tabela 4 foram comparados com outras pesquisas demonstrando variações nos teores dependendo da região.

A α -ciperona, com teor de 8,10%, apresentou menor teor do que a encontrada por Santos (2003), 15,84% e por Zoghbi *et al.* (2008), 22,8%. Em outros países como Tunísia (KILANI *et al.*, 2008), o teor encontrado foi de 25,23%, na África do Sul o teor variou de 7,9-11,0% (LAWAL e OYEDEJI, 2009) e na Nigéria de 4,5-25,2%.

O teor de ciperotundona, nos óleos essenciais de Tiririca foi de 7,83%, inferior aos 12,1% identificada por Zoghbi *et al.* (2008). O teor de 6,10% de cipereno, também foi menor que os 17,41% encontrado por Santos (2003) e aos 20,38% obtidos por Kilani *et al.* (2008) na Tunísia, mas foi similar aos 8,4 - 11,7% indentificado na Índia por Jirovetz *et al.* (2004).

O óxido de cariofileno com teor de 4,75% foi menor do que o 5,4% encontrado na África do Sul por Lawal & Oyedeji (2009) e também menor do que o 7,8 - 9,7% identificado na Índia por Jirovetz *et al.* (2004).

O β -selineno com o teor de 4,68% foi menor que o 7,09% identificado por Santos (2003).

Tabela 4 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Cyperus rotundus*

n°	Constituintes	IR ¹	IR ²	IR calculado	Teor (%)	Método de Identificação ³
1	canfeno	954	-	950	0,64	IR, EM
2	β -pineno	986	980	986	1,05	IR, EM
3	p-cimeno	1024	-	1028	0,37	IR, EM
4	limoneno	1029	1030	1032	0,21	IR, EM
5	1,8-cineol	1031	1032	1034	0,85	IR, EM
6	nopinona	1140	-	1139	0,31	IR, EM
7	<i>trans</i> -pinocarveol	1139	1138	1141	1,13	IR, EM
8	<i>trans</i> -verbenol	1144	1144	1147	0,28	IR, EM
9	pinocarvona	1164	1166	1165	0,40	IR, EM
10	p-cimen-8-ol	1182	1185	1187	0,19	IR, EM
11	mirtenal	1195	1195	1199	0,80	IR, EM
12	verbenona	1204	1206	1212	0,60	IR, EM
13	α -copaeno	1376	1374	1380	0,51	IR, EM
14	β -elemeno	1390	-	1397	0,33	IR, EM
15	cipereno	1398	1396	1407	6,10	IR, EM
16	rotundeno	1459	1457	1466	2,17	IR, EM
17	germacreno d	1481	-	1482	0,23	IR, EM
18	β -selineno	1490	1488	1494	4,68	IR, EM
19	cubebol	1515	-	1521	0,31	IR, EM
20	<i>trans</i> -calameneno	1522	1529	1530	0,24	IR, EM
21	óxido de cariofileno	1583	1580	1593	4,75	IR, EM
22	β -cedren-9-ona	1631	-	1631	2,64	IR, EM
23	3-iso-tujopsanona	1642	-	1646	1,96	IR, EM
24	3-tujopsanona	1654	-	1656	1,59	IR, EM
25	ciperotundona	1695	1694	1710	7,83	IR, EM
26	vetiselinenol	1731	-	1729	0,71	IR, EM
27	α -ciperona	-	1755	1765	8,10	IR, EM
total identificado (%)					48,98	
não identificados (%)					51,02	

¹Fonte: Índice de Kovats em coluna DB-5 relativo a série de n-alcanos (ADAMS, 2009).

²Índices calculados segundo Zoghbi *et al.* (2008).

³IR = Índice de Retenção; EM = Espectro de Massas.

Os espectros de massas das substâncias majoritárias do óleo essencial obtido dos tubérculos de *C. rotundus* corroboram com as descrições de Adams (2009) e Zoghbi *et al.* (2008) e estão apresentados nas Figuras 18-22.

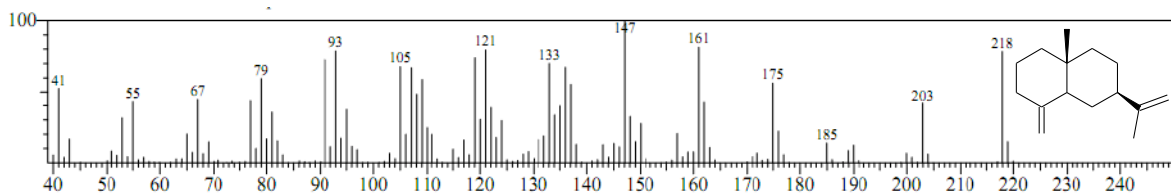


Figura 18 - Espectro de massas da α -ciperona

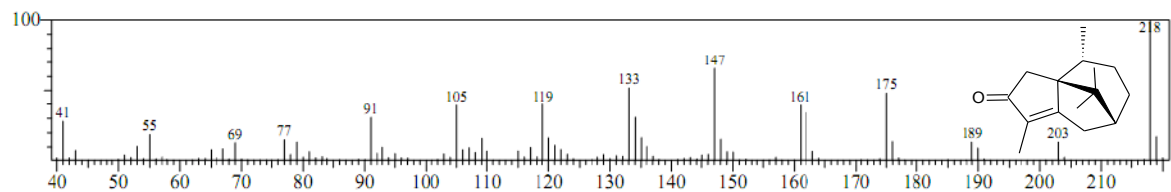


Figura 19 - Espectro de massas da ciperotundona

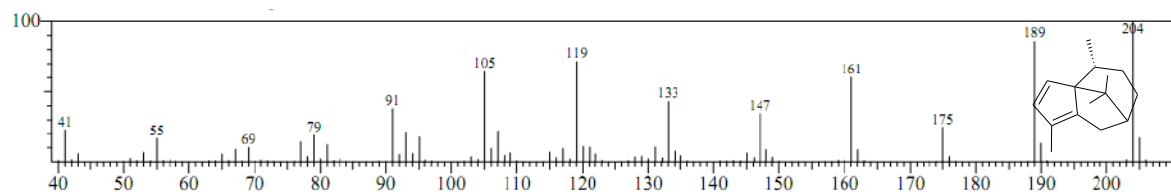


Figura 20 - Espectro de massas do cipereno

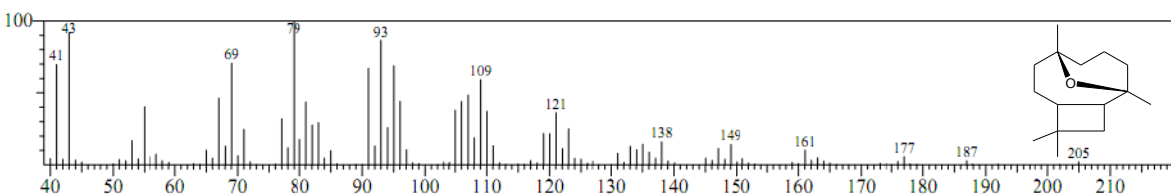


Figura 21 - Espectro de massas do óxido de cariofileno

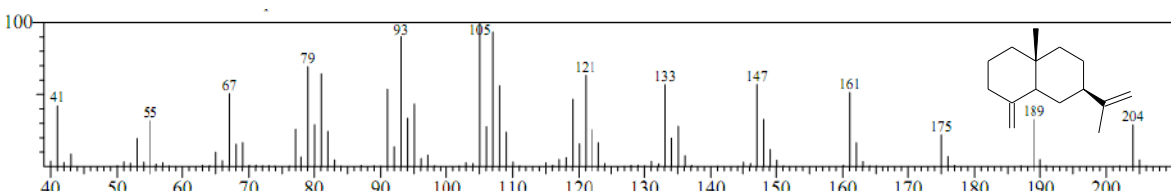


Figura 22 - Espectro de massas do β -selineno

5.3 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Protium heptaphyllum*

O cromatograma de íons totais apresentou 57 picos, conforme a Figura 23. A avaliação da constituição química possibilitou identificar 38 constituintes, os quais representam 89% do teor de óleo essencial obtido da resina de *P. heptaphyllum*, descritos na Tabela 5.

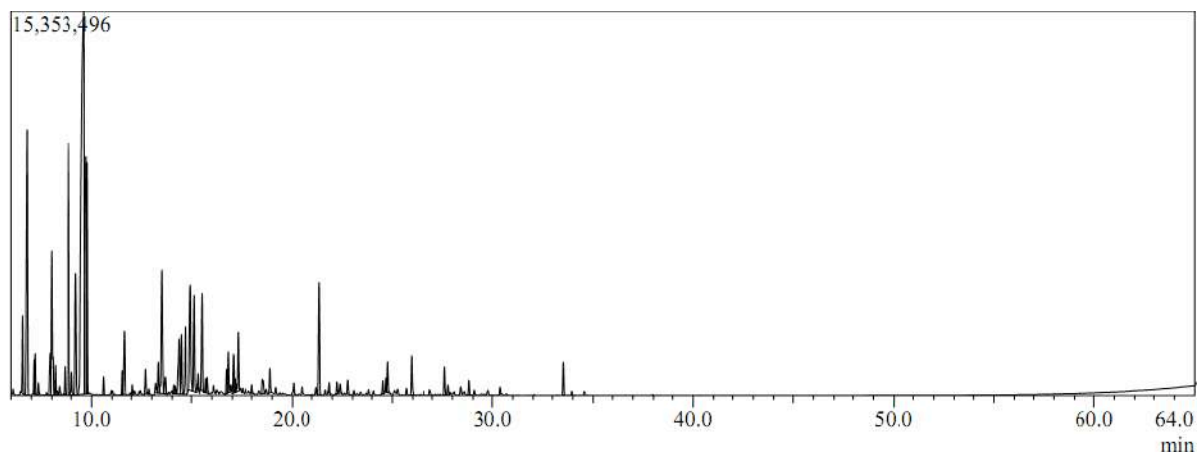


Figura 23 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*

As substâncias majoritárias identificadas no óleo essencial de *P. heptaphyllum* foram p-cimeno (25,70%), α -felandreno (7,78%), limoneno (7,77%), canfeno (7,15%) e *trans*-diidro- α -terpineol (3,69%) (Tabela 5). Conforme a literatura consultada, observa-se variações nos constituintes majoritários. De acordo com Siani *et al.* (1999), as substâncias citadas com maior teor foram terpinoleno, dilapiol, p-cimen-8-ol e p-cimeno. Para Bandeira *et al.* (2001), os constituintes majoritários foram terpinoleno, α -pineno e α -felandreno.

Segundo Marques *et al.* (2010), em *P. heptaphyllum* subsp. *ulei*, os majoritários foram terpinoleno, p-cimen-8-ol e limoneno, em *P. heptaphyllum* subsp. *heptaphyllum*, o p-cimeno foi o de maior teor, seguido de n-tetradecano e diidro-4-careno. As variações sazonais em óleos essenciais podem ocorrer por diversos fatores, inclusive a época de coleta e a localização, visto que os locais de coletas foram diferentes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Tabela 5 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Protium heptaphyllum*

n°	Constituintes	IR ¹	IR ²	IR calculado	Teor (%)	Método de Identificação ³
1	α -pineno	939	942	944	1,36	IR, EM
2	canfeno	954	-	951	7,15	IR, EM
3	<i>trans</i> -p-mentano	979	-	984	1,08	IR, EM
4	β -pineno	979	-	986	3,62	IR, EM
5	3-p-menteno	987	-	991	0,52	IR, EM
6	mirceno	990	986	997	0,30	IR, EM
7	α -felandreno	1002	1003	1011	7,78	IR, EM
8	α -terpineno	1017	1019	1022	3,30	IR, EM
9	p-cimeno	1024	1021	1033	25,70	IR, EM
10	limoneno	1029	1028	1036	7,77	IR, EM
11	1,8-cineol	1031	1030	1038	3,59	IR, EM
12	γ -terpineno	1059	1061	1061	0,32	IR, EM
13	terpinoleno	1088	1092	1088	0,46	IR, EM
14	p-cimeneno	1091	1085	1091	1,70	IR, EM
15	<i>cis</i> -p-ment-2-en-1-ol	1121	-	1123	0,49	IR, EM
16	<i>trans</i> -diidro- α -terpineol	1147	-	1146	3,69	IR, EM
17	<i>cis</i> -diidro- α -terpineol	1164	-	1163	0,17	IR, EM
18	borneol	1169		1171	1,86	IR, EM
19	terpinen-4-ol	1177	1171	1180	1,48	IR, EM
20	p-cimen-8-ol	1182	1179	1188	3,50	IR, EM
21	α -terpineol	1188	1185	1194	2,34	IR, EM
22	mirtenol	1195	-	1200	0,28	IR, EM
23	verbenona	1205	-	1213	0,33	IR, EM
24	cuminaldeído	1241	-	1243	0,90	IR, EM
25	carvotanacetona	1247	-	1251	0,86	IR, EM
26	piperitona	1252	-	1257	1,46	IR, EM
27	felandral	-	-	1278	0,16	IR, EM
28	p-cimen-7-ol	1290	-	1294	0,53	IR, EM
29	Timol	1290	-	1305	0,52	IR, EM
30	δ -elemeno	1338	1330	1340	0,16	IR, EM
31	α -copaeno	1376	1370	1380	2,87	IR, EM
32	β -elemeno	1390	1385	1395	0,18	IR, EM
33	metileugenol	1403	1399	1407	0,26	IR, EM
34	β -cariofileno	1419	1417	1424	0,29	IR, EM
35	germacreno D	1481	1474	1482	0,26	IR, EM
36	δ -cadineno	1523	-	1529	0,91	IR, EM
37	espatulenol	1578	-	1585	0,64	IR, EM
38	óxido de cariofileno	1583	1576	1591	0,23	IR, EM
Total identificado (%)					89,02	
Não identificados (%)					10,98	

Fonte: Índice de Kovats em coluna DB-5 relativo a série de n-alcanos (ADAMS, 2009).

²Índices calculados segundo SIANI *et al.* (1999).

³IR = Índice de Retenção; EM = Espectro de Massas.

Os espectros de massas das substâncias majoritárias estão apresentados nas Figuras 24-28, e confirmaram a identificação conforme descrito por Siani *et al.* (1999) e Adams (2009).

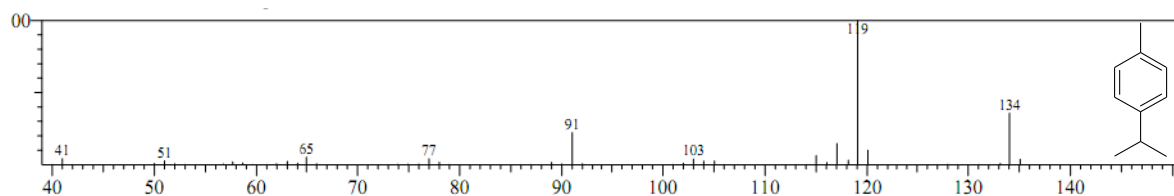


Figura 24 - Espectro de massas do p-cimeno

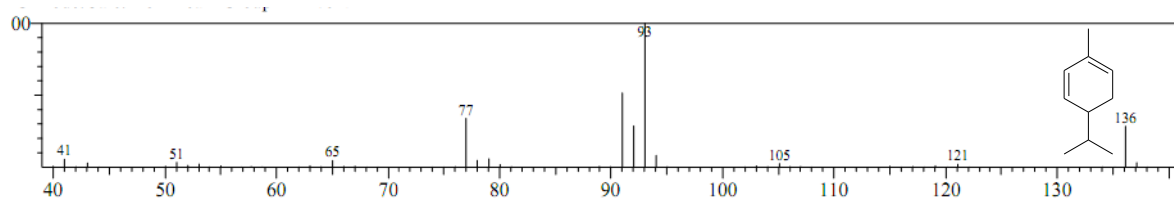


Figura 25 - Espectro de massas do α-felandreno

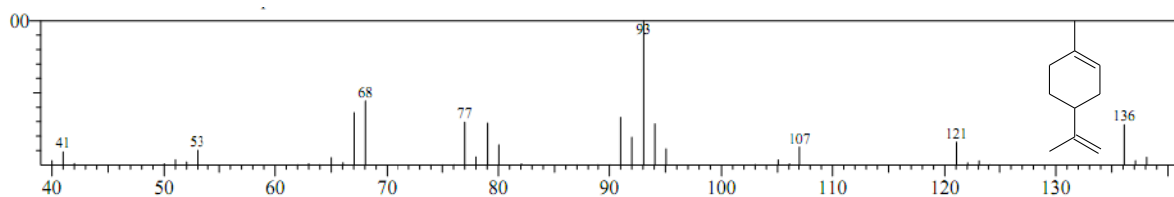


Figura 26 - Espectro de massas do limoneno

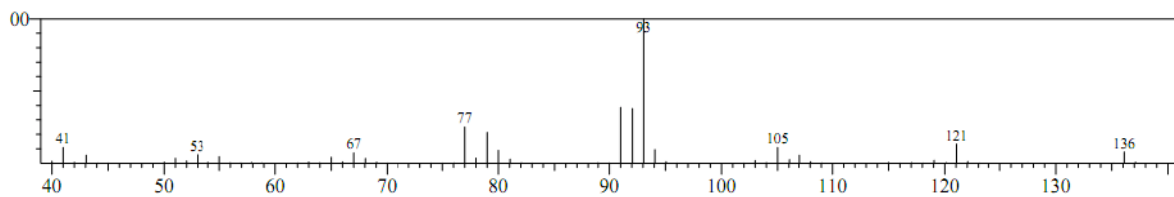


Figura 27 - Espectro de massas do canfeno

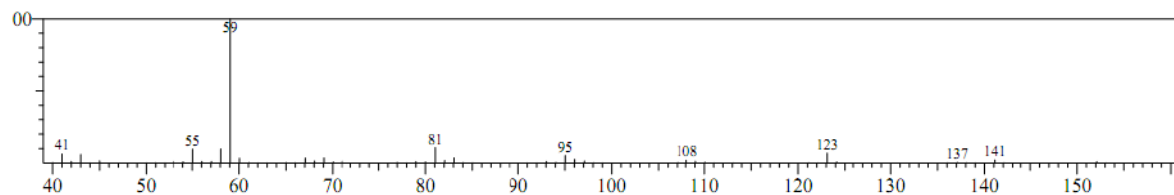


Figura 28 - Espectro de massas do *trans*-diidro-α-terpineol

5.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Guatteria citriodora*

O cromatograma de íons totais obtido a partir da análise do óleo essencial de *G. citriodora* apresentou 72 picos (Figura 29). Com a avaliação da constituição química foi possível identificar 42 constituintes, que equivalem ao teor total de 73,41% descritos na Tabela 6.

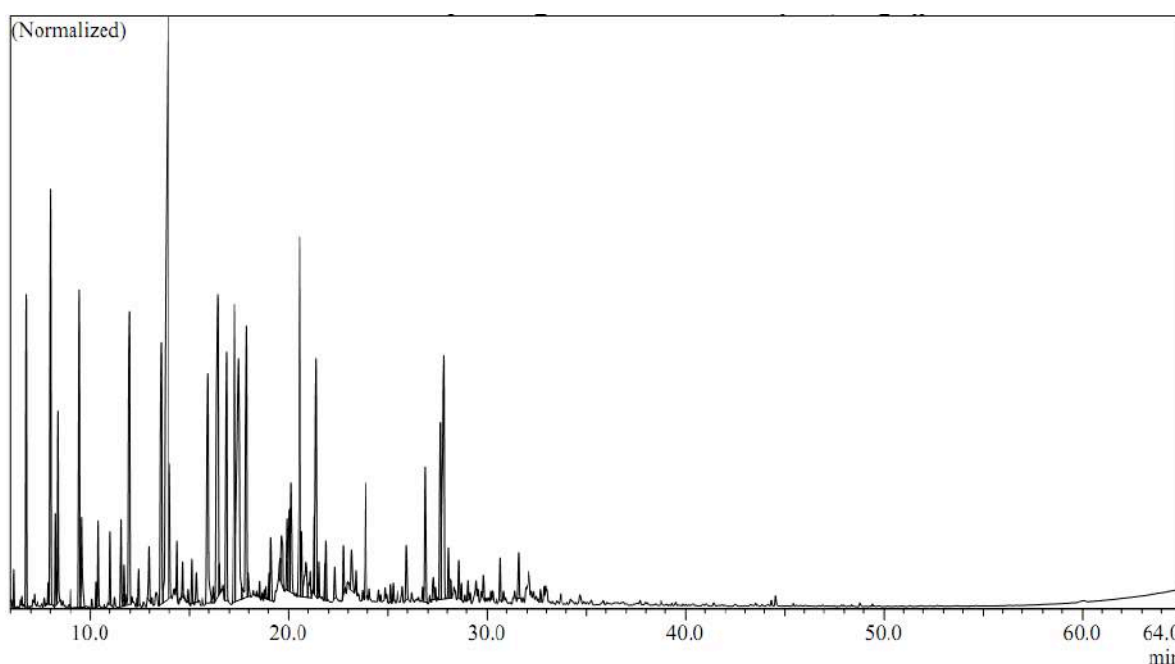


Figura 29 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora*

As substâncias majoritárias identificadas no óleo essencial de *G. citriodora* foram o citronelal (14,53%), citrionelol (5,31%), acetato de citrionelila (5,10%), geraniol (4,88%) e β -pineno (4,22%). Segundo Rabelo (2008), os principais constituintes identificados nessa espécie foram o citronelal e citrionelol, sendo que os teores foram diferentes aos teores encontrados no presente estudo.

As variações em óleos essenciais podem ocorrer por diversos fatores, inclusive a época de coleta, mas é importante observar que os constituintes majoritários permaneceram os mesmos, podendo ser os promissores marcadores químicos desse óleo essencial (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Tabela 6 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Guatteria citriodora*

n.	Constituintes	IR ¹	IR ²	IR calculado	Teor (%)	Método de Identificação ³
1	canfeno	954	-	950	2,66	IR, EM
2	sabineno	975	-	983	0,14	IR, EM
3	β -pineno	979	980	987	4,22	IR, EM
4	6-metil-hept-5-en-2-one	985	-	993	0,65	IR, EM
5	mirceno	990	993	997	1,50	IR, EM
6	δ -3-careno	1011	-	1015	0,11	IR, EM
7	p-cimeno	1024	-	1029	3,13	IR, EM
8	limoneno	1029	1031	1032	0,93	IR, EM
9	bergamal	1056	1056	1055	0,65	IR, EM
10	cis-óxido de linalol	1072	-	1074	0,56	IR, EM
11	trans-óxido de linalol	1086	-	1087	0,72	IR, EM
12	6,7-epóxi-mirceno	1092	-	1093	0,33	IR, EM
13	linalol	1096	1100	1102	4,00	IR, EM
14	isopulegol	1149	1158	1149	3,69	IR, EM
15	citronelal	1153	1156	1159	14,53	IR, EM
16	iso-isopulegol	1159	-	1161	1,50	IR, EM
17	neo-iso-isopulegol	1171	1170	1172	0,38	IR, EM
18	terpinen-4-ol	1177	1178	1180	0,26	IR, EM
19	p-cimen-8-ol	1182	-	1188	0,06	IR, EM
20	α -terpineol	1188	-	1193	0,37	IR, EM
21	mirtenol	1195	-	1200	0,30	IR, EM
22	citronelol	1225	1231	1232	5,31	IR, EM
23	Neral	1238	1243	1245	2,95	IR, EM
24	geraniol	1253	1255	1257	4,88	IR, EM
25	geranial	1267	1272	1275	3,75	IR, EM
26	formato de citronelila	1273	-	1278	0,24	IR, EM
27	acetato de citronelila	1352	1356	1356	5,10	IR, EM
28	acetato de nerila	1361	-	1366	0,82	IR, EM
29	ciclosativeno	1371	1367	1372	0,36	IR, EM
30	α -copaeno	1376	1376	1381	2,70	IR, EM
31	acetato de geranila	1381	-	1385	0,26	IR, EM
32	β -cubebeno	1388	1390	1394	0,29	IR, EM
33	β -elemeno	1390	1391	1396	0,50	IR, EM
34	β -cariofileno	1419	1418	1425	0,44	IR, EM
35	aromadrendeno	1441	1439	1445	0,16	IR, EM
36	epi-cubebol	1494	1493	1500	0,16	IR, EM
37	α -muuroleno	1500	1499	1506	0,14	IR, EM
38	cis-calameneno	1529	1523	1529	0,59	IR, EM
39	espatulenol	1578	1576	1587	2,22	IR, EM
40	óxido de cariofileno	1583	1581	1592	3,99	IR, EM
41	viridiflorol	1592	-	1600	0,55	IR, EM
42	guaiol	1600	1596	1605	0,22	IR, EM
Total identificado (%)					73,41	
Não identificados (%)					26,59	

¹Fonte: Índice de Kovats em coluna DB-5 relativo a série de n-alcanos (ADAMS, 2009).²Índices calculados segundo Rabelo (2008).³IR = Índice de Retenção; EM = Espectro de Massas.

Os espectros de massas das substâncias majoritárias do óleo essencial de *G. citriodora* estão apresentados nas Figuras 30-34, e estão de acordo com a literatura consultada (RABELO, 2008; ADAMS, 2009).

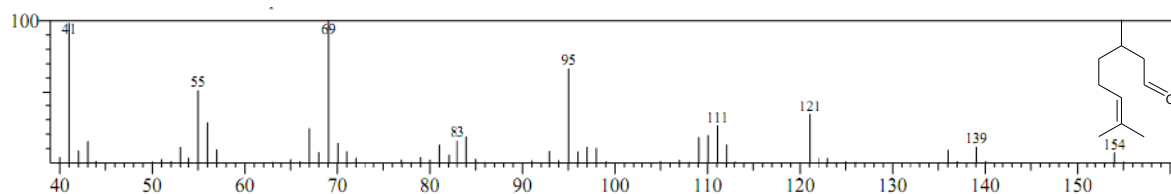


Figura 30 - Espectro de massas do citronelal

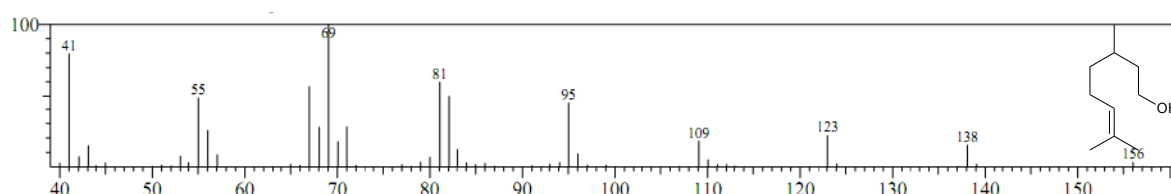


Figura 31 - Espectro de massas do citronelol

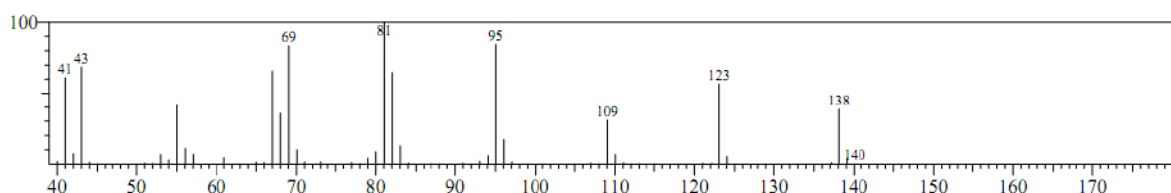


Figura 32 - Espectro de massas do acetato de citronelila

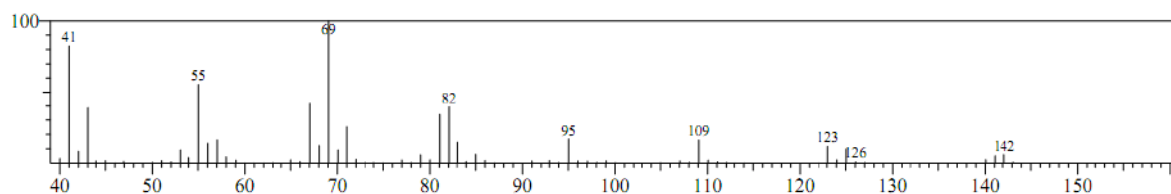


Figura 33 - Espectro de massas do geraniol

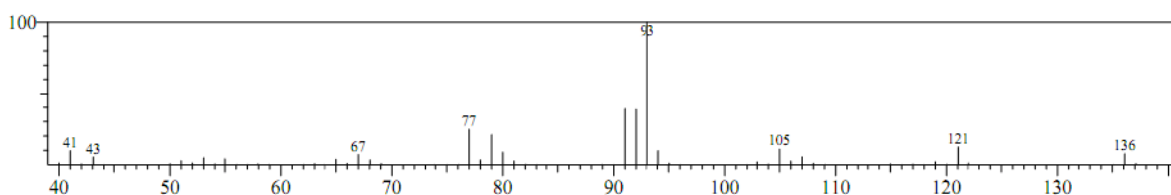


Figura 34 - Espectro de massas do β -pineno

5.5 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA RF-11MAO

A amostra identificada como RF-11MAO consistiu da mistura dos óleos essenciais das espécies *Cyperus rotundus*, *Protium heptaphyllum* e *Guatteria citriodora* na proporção de 5,0:2,5:1,0 conforme formulação da Patente US 2010/0284943 (CORRÊA, 2010). O cromatograma de íons totais da mistura RF-11MAO está demonstrado na Figura 35.

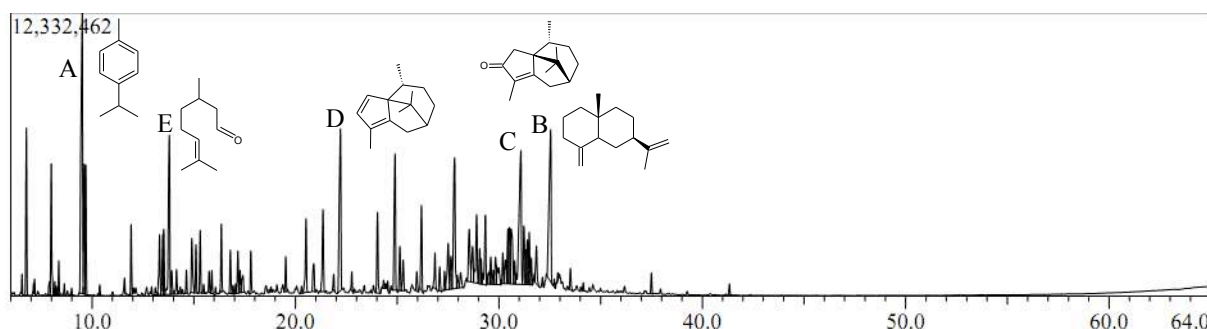


Figura 35 - Cromatograma de íons totais do óleo essencial da mistura RF-11MAO
A = p-cimeno, B = α -ciperona, C = ciperotundona, D = cipereno, E = citronelal.

Os constituintes majoritários estão descritos na Tabela 7 e observa-se a presença majoritária do p-cimeno, constituinte com maior teor em *P. heptaphyllum*, seguido dos constituintes majoritários α -ciperona, ciperotundona e cipereno presentes em *C. rotundus* e o majoritário de *G. citriodora*, o citronelal, os quais corroboram com as descrições de Siani *et al.* (1999), Zoghbi *et al.* (2008), Rabelo (2008) e Adams (2009). Esses constituintes majoritários são considerados os marcadores químicos da mistura RF-11MAO.

Tabela 7 - Constituintes majoritários identificados na amostra RF-11MAO

Constituintes	Teor (%)	Método de Identificação ¹
p-cimeno	8,24	IR, EM
α-ciperona	5,53	IR, EM
ciperotundona	5,20	IR, EM
cipereno	4,74	IR, EM
citronelal	4,00	IR, EM
óxido de cariofileno	3,74	IR, EM
β-selineno	3,37	IR, EM
canfeno	2,79	IR, EM
limoneno	2,48	IR, EM
β-pineno	2,38	IR, EM

¹IR = Índice de Retenção; EM = Espectro de Massas

5.6 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima - CIM, apresentou ação bacteriostática com valor de 50% menor que a Concentração Bactericida Mínima - CBM para os óleos essenciais de *Guatteria citriodora* e *Cyperus rotundus*, bem como as CIM e CBM mantiveram valores iguais para o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* e para RF-11MAO testados sobre o *Streptococcus mutans* conforme metodologia de Eloff (1998) e Pinto *et al.* (2003).

Os valores descritos na Tabela 8, em destaque a amostra RF-11MAO, indicaram resultados promissores (CIM e CBM) se comparados aos valores dos óleos essenciais separadamente, demonstrando atividade bactericida em 1,2 mg/mL contra *S. mutans*, a principal bactéria responsável por formar o biofilme e causar a cárie dentária. A simples morte ou retirada do microrganismo da superfície dentária, importante fator na estruturação do biofilme, contribui inibindo o processo cariogênico (FISCHMAN, 1994; PAN *et al.*, 2000; MONTANARO *et al.*, 2004).

As concentrações bactericidas de 1,2 mg/mL obtida das amostras de *C. rotundus* e RF-11MAO e portanto, inibidoras do biofilme, apresentaram menor valor se comparado com a pesquisa realizada por Yu *et al.* (2007), que obtiveram inibição da formação do biofilme na concentração de 4 mg/mL, através da inibição enzimática da glicosiltransferase utilizando extrato de *Cyperus rotundus*, demonstrando eficácia e potencialidade para novos produtos odontológicos corroborados por Claffey (2003) e Seymour (2003).

Tabela 8 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima sobre *Streptococcus mutans*

Amostra	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>G. citriodora</i>	2,5	5,0
<i>P. heptaphyllum</i>	5,0	5,0
<i>C. rotundus</i>	0,6	1,2
RF-11MAO	1,2	1,2

5.7 TESTES PRELIMINARES PRÉ-CLÍNICOS (PRIMEIRA DOSE)

Os camundongos Swiss foram tratados com 0,1 mL da mistura pura RF-11MAO, correspondente a 2,5 mL/Kg. Após os tempos de absorção de 30 min e 1h, iniciou-se as observações pertinentes aos testes do Campo Aberto e Rota-Rod, que sugeriram depressão do sistema nervo central (SNC) por letargia dos movimentos. No teste do Arame não houve mudança de comportamento em relação à dose de acordo com Kanjanapothi *et al.* (2004); Lapa *et al.* (2005) e Oliveira (2007).

5.7.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (Open-Field)

Os animais tratados com a amostra pura RF-11MAO, 30 minutos após administração, demonstraram que o número de cruzamentos das linhas do campo aberto, foi em média, 46 vezes enquanto que nos tratamentos controle foi de 63 vezes. Com a observação de 5 minutos, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 27% se comparado com o controle na análise. Transcorrida 1 hora do tratamento e 5 minutos de observação, o número de cruzamentos reduziu aproximadamente 81%, com valor médio de 9,5 vezes para os animais tratados e de 49,5 vezes para o tratamento controle (Figura 36 - A).

Com a administração da amostra, após 30 minutos o número de levantares dos animais tratados com a RF-11MAO foi em média de 18,5 vezes e os do controle de 40 vezes. Logo, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 54% se comparado com o controle na análise. Após 1 hora, o número de levantares dos animais tratados foi em média 1,5 vezes e os do controle de 20 vezes, apresentando redução de aproximadamente 92% (Figura 36 - B).

No teste do campo aberto avalia-se a atividade exploratória do animal, como o número de cruzamentos e de levantares, pois são atividades que podem ou não serem afetadas pela ação da amostra testada, apresentando uma ação depressora direta sobre o sistema nervoso central ou como relaxante muscular periférico, reduzindo os movimentos.

A análise preliminar dos dados obtidos a partir dos animais tratados com a dose de 0,1 mL da amostra pura RF-11MAO sugeriu depressão no sistema nervoso central conforme Lapa *et al.* (2005), por ter causado letargia dos movimentos no número de cruzamentos e levantares, após 30 minutos de administração da amostra. Transcorrida 1 hora, o quadro foi agravado. A análise dos resultados foi baseada na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973) e Nahas (1999).

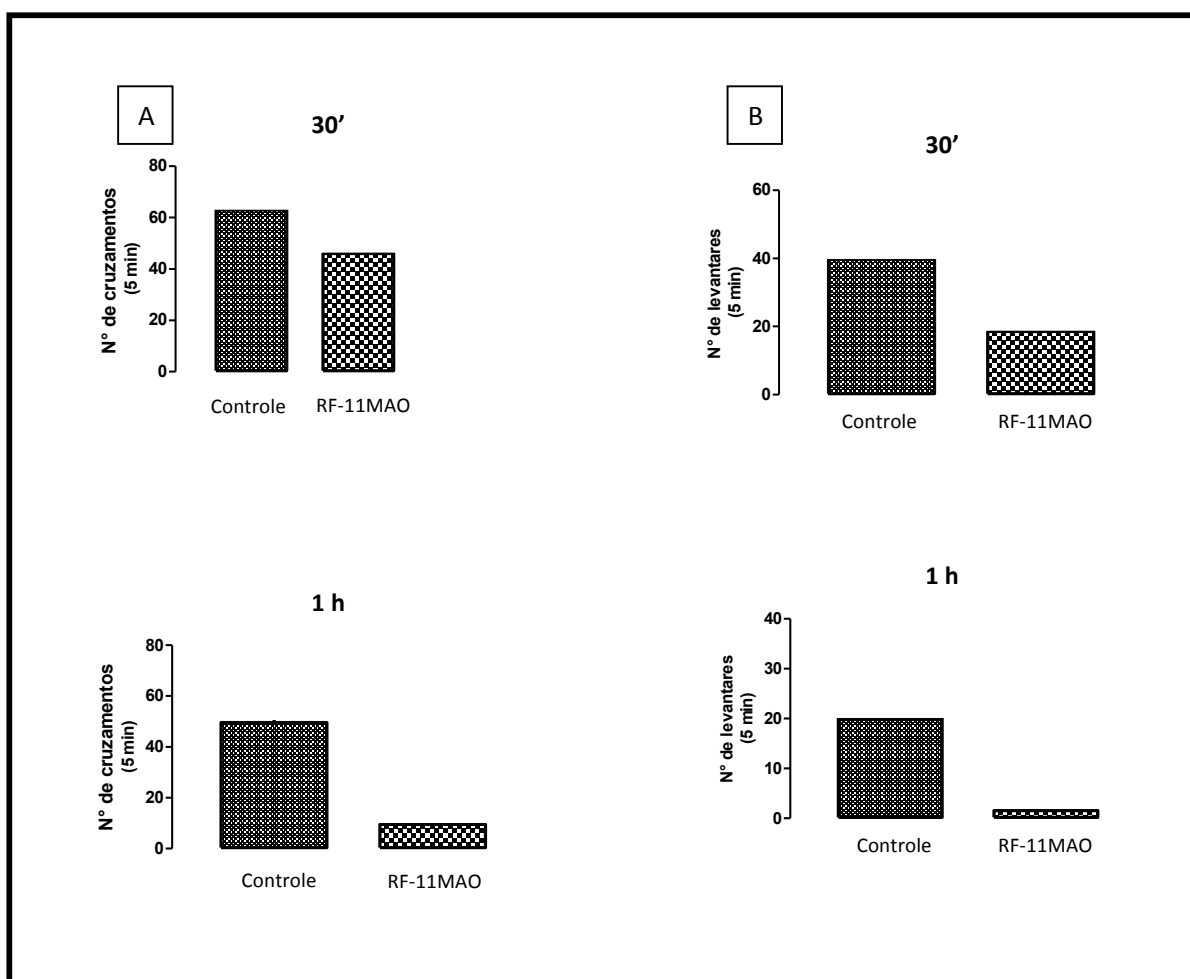


Figura 36 – Número de cruzamentos e levantares no Teste do Campo Aberto, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO

5.7.2 TESTE DO ROTA-ROD

A latência para primeira queda dos animais tratados com a RF-11MAO, após 30 minutos, foi em média de 13,5 segundos e os do tratamento controle de 32 segundos. Elevando para 21 segundos e 46,5 segundos respectivamente, após 1 hora da ingestão da amostra (Figura 37 - A).

No entanto, ao se analisar a permanência dos animais no cilindro giratório, após 30 minutos do tratamento, constatou-se que o tempo de permanência dos animais tratados com RF-11MAO foi em média de 38,5 segundos e os do controle de 39,5 segundos, indicando que a ingestão da amostra não afetou os animais nesse teste. Após 1 hora, o tempo de permanência dos animais tratados com RF-11MAO foi em média de 48,0 segundos e o controle de 55,5 segundos, sem haver, no entanto, diferença significativa entre ambos (Figura 37 - B).

O teste do Rota-rod avalia a coordenação motora do animal, logo a latência para primeira queda e a permanência no aparelho foram os dois parâmetros observados. A ação da amostra testada pode afetar ou não as atividades, por ação depressora do sistema nervoso central e relaxante muscular, reduzindo os reflexos.

A análise preliminar dos dados obtidos a partir dos animais tratados com a dose de 0,1 mL da amostra pura RF-11MAO sugeriu depressão no sistema nervoso central em relação à latência para primeira queda, contudo não demonstrou ação relaxante do sistema muscular, por inibição do arco-reflexo de permanência do animal tratado no aparelho conforme Rosland *et al.* (1990) e Lapa *et al.* (2005) .

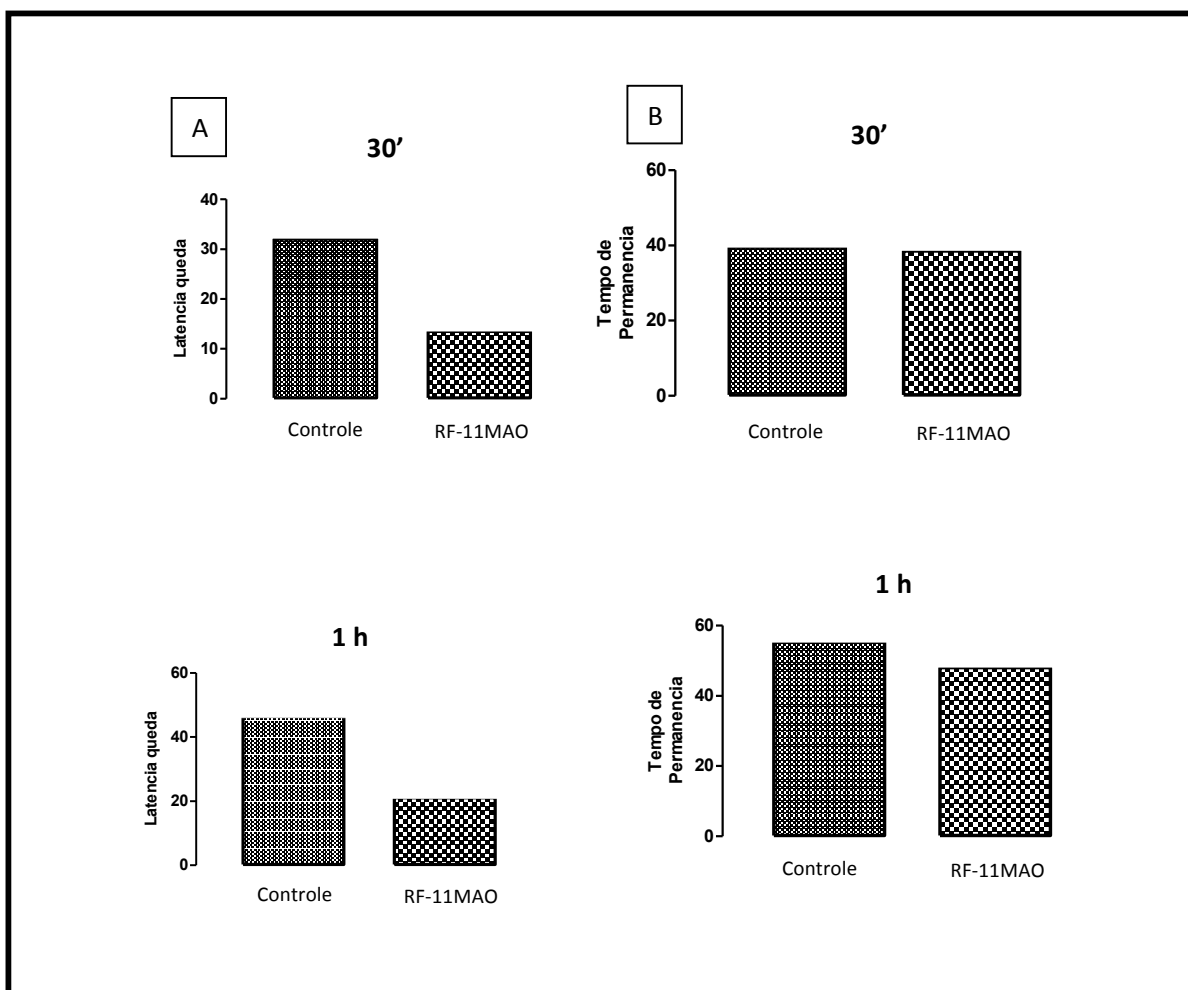


Figura 37 - Tempos de latência e permanência no Rota-Rod, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO

5.7.3 TESTE DO ARAME (*WIRING TEST*)

Os animais tratados com RF-11MAO após os períodos de 30 minutos e 1 hora foram observados quanto a habilidade e o tempo para segurar o arame, que mantiveram-se em média o mesmo do controle, de 1,5 e 2,5 segundos, respectivamente nesses períodos de tempo. Os animais tratados demonstraram igual desempenho, não havendo transtornos de comportamento, se comparado com o controle na análise (Figura 38).

O teste do arame permite avaliar a capacidade de preensão (agilidade) do animal ao segurar o arame. A amostra testada pode ou não afetar esse reflexo, por ação depressora do sistema nervoso central e relaxante muscular, reduzindo ou impedindo os movimentos.

Transcorrido o tempo de análise, não foi constatada ação depressora do sistema nervoso central ou relaxante muscular na dose de 0,1 mL da amostra pura RF-11MAO, nos dois tempos analisados, mantido assim o arco-reflexo do animal para o ato de segurar o arame conforme Boisseier *et al.* (1961) e Lapa *et al.* (2005).

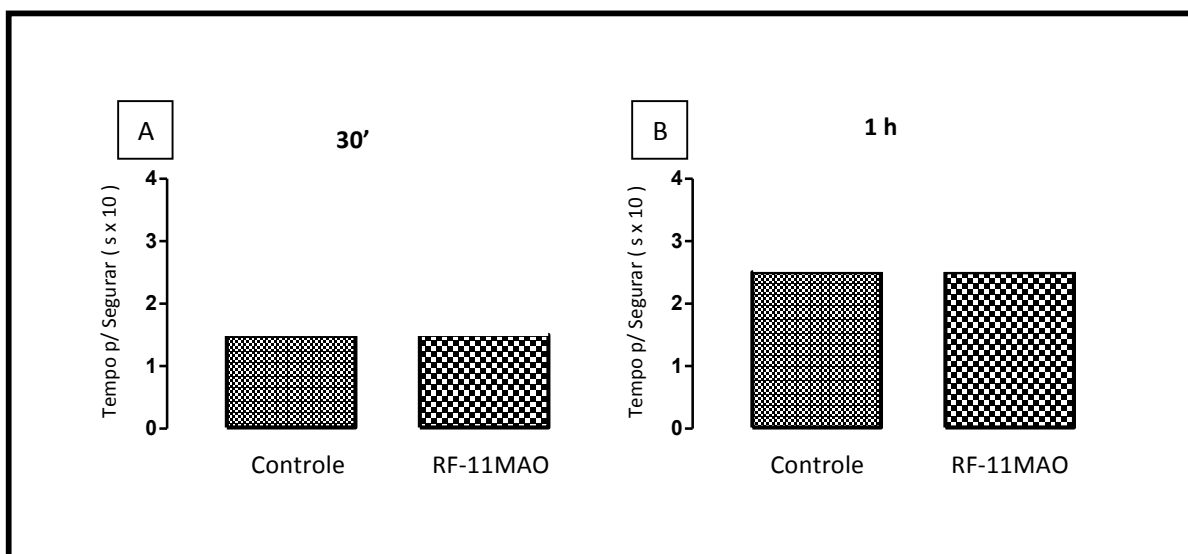


Figura 38 - Tempo para segurar o arame no Teste do Arame, dos camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO

5.8 TESTES PRELIMINARES PRÉ-CLÍNICOS (SEGUNDA DOSE)

Os resultados com a dose de 0,1mL da amostra RF-11MAO pura mostraram uma diminuição do equilíbrio e a deambulação dos animais que apresentaram dificuldade respiratória, em alguns dos testes anteriores, provavelmente por depressão do sistema nervoso central e ação relaxante muscular.

Os efeitos avaliados nos testes do Campo Aberto, Rota-Rod e Arame (Figuras 39 - 41) apareceram-se com maior intensidade nos camundongos Swiss tratados por via oral com 0,2 mL, correspondente a 5,0 mL/Kg da amostra pura, nos tempos de 30 minutos e agravando-se

após 1 hora, tempo necessário para a absorção intestinal da dose após administração, conforme Lapa *et al.* (2005).

5.8.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (*OPEN-FIELD*)

No teste do campo aberto foi avaliada a atividade exploratória do animal e os parâmetros, número de cruzamentos e de levantares foram considerados pois as atividades podem ou não serem afetadas, por ação da amostra testada, por ação depressora direta sobre o sistema nervoso central ou como relaxante muscular periférico reduzindo os movimentos.

Os animais tratados foram observados e após 30 minutos, o número de cruzamentos dos animais tratados com RF-11MAO foi em média de 42,5 vezes e os do controle 56,0 vezes (Figura 39 – A). Com o tempo de observação de 5 minutos, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 24% se comparado com o controle na análise. Após 1 hora, verificou-se que o número de cruzamentos dos animais tratados com os óleos essenciais RF-11MAO foi em média de 10,5 vezes e os do controle de 37,0 vezes. Na observação, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 72% se comparado com o controle na análise (Figura 39 -A).

Com a administração da amostra, após 30 minutos o número de levantares dos animais tratados com a RF-11MAO foi em média de 11,0 vezes e os do controle de 23,5 vezes (Figura 39 - B). Logo, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 53% se comparado com os do controle na análise. Após 1 hora constatou-se que o número de levantares dos animais tratados com RF-11MAO foi em média de 2,5 vezes e o controle de 13,5 vezes. Durante o período de observação, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 81% se comparado aos do controle (Figura 39 - B).

Os animais tratados com a dose de 0,2 mL da amostra pura RF-11MAO, manifestaram letargia dos movimentos em relação aos parâmetros de cruzamentos e de

levantares, sugerindo depressão no Sistema Nervoso Central – SNC conforme Lapa *et al.* (2005).

A depressão do SNC induziu ao relaxamento muscular, inibindo parcialmente o arco-reflexo dos animais tratados, após 30 minutos e agravando-se após 1 hora da administração da dose proposta, confirmando os dados anteriores com a dose de 0,1 mL. A análise dos resultados foi baseada na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973) e Nahas (1999).

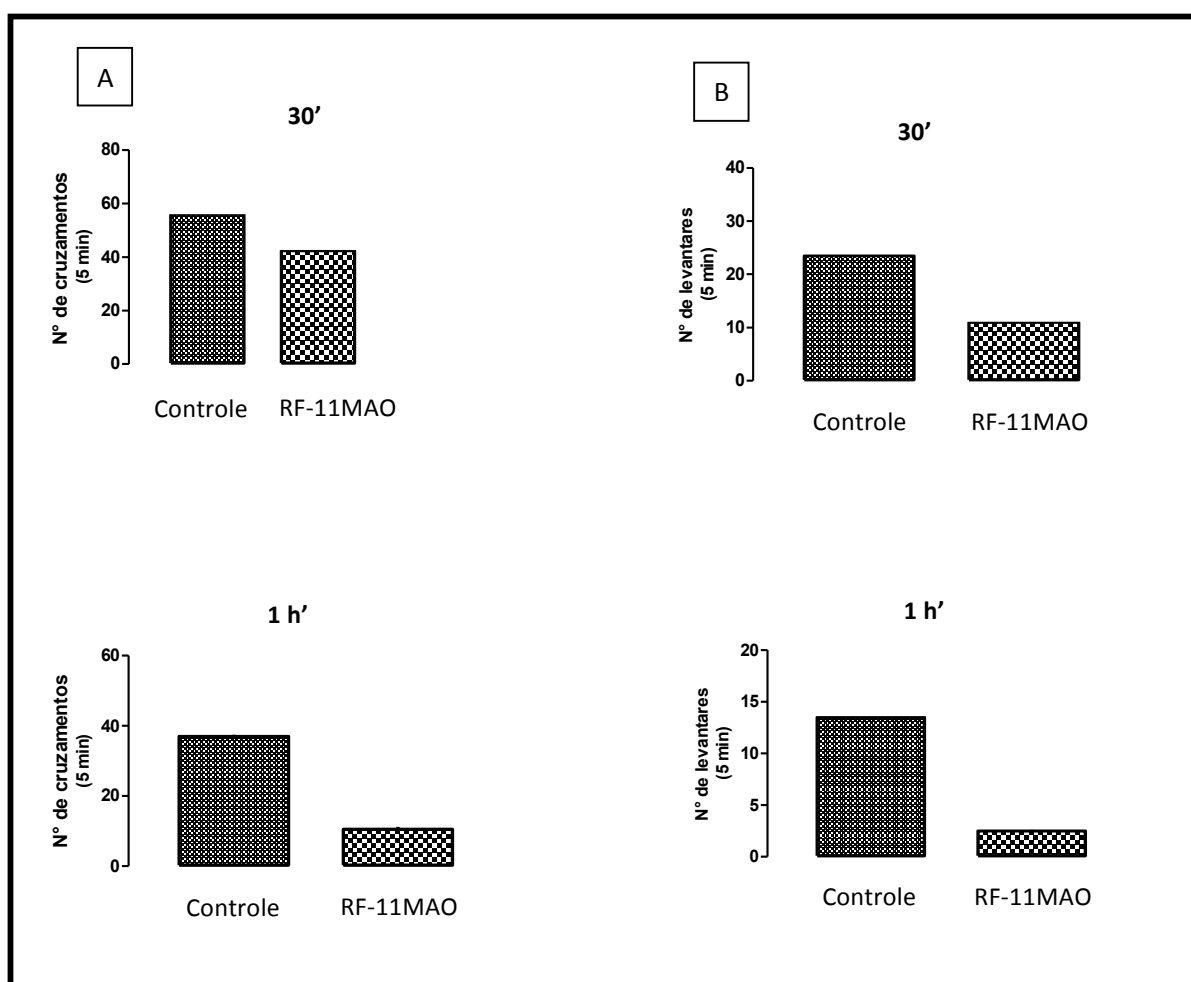


Figura 39 - Número de cruzamentos e levantares no Teste do Campo Aberto, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO (segunda dose)

5.8.2 TESTE DO ROTA-ROD

Avaliou-se no teste do Rota-rod, a coordenação motora do animal e os dois parâmetros considerados foram a latência para primeira queda e a permanência no aparelho, pois a ação da amostra testada pode afetar ou não, as atividades, por ação depressora do sistema nervoso central e relaxante muscular, reduzindo os reflexos.

A latência para a primeira queda dos animais tratados com RF-11MAO, após 30 minutos foi em média de 9,0 segundos e os do controle, de 34,0 segundos. Com a observação de 1 minuto, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 73% se comparado com os do controle.

Após 1 hora do tratamento, verificou-se que a latência para a primeira queda dos animais tratados com RF-11MAO foi em média de 0,5 segundo e os do controle, de 49,5 segundos. Decorrido o período de observação, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 99% se comparado com o controle na análise (Figura 40 - A).

Quanto ao tempo de permanência no cilindro, os animais tratados com RF-11MAO após 30 minutos, ficaram em média 9,0 segundos e os do controle 51,0 segundos. Na observação, os animais tratados demonstraram redução de aproximadamente 82% se comparado com os do controle.

Após 1 hora, constatou-se que o tempo de permanência dos animais tratados com RF-11MAO foi em média de 1,0 segundo e os do controle, de 56,0 segundos, apresentando portanto, uma redução de 98% se comparados com os controle (Figura 40 - B).

A análise preliminar dos dados obtidos a partir dos animais tratados com a dose de 0,2 mL da amostra pura RF-11MAO, confirmou os dados anteriores com a dose de 0,1 mL, pois sugeriu depressão no sistema nervoso central em relação à latência para queda e potencializou a ação relaxante muscular, por inibição do arco-reflexo de permanência do animal tratado no aparelho, após 30 minutos. Transcorrido o tempo experimental de 1 hora, o

quadro depressivo do sistema nervoso central foi potencializado, reduzindo drasticamente a latência e a permanência, conduzindo à letargia dos movimentos e inibição do arco-reflexo dos animais tratados submetidos ao aparelho (ROSLAND *et al.*, 1990; LAPA *et al.*, 2005) .

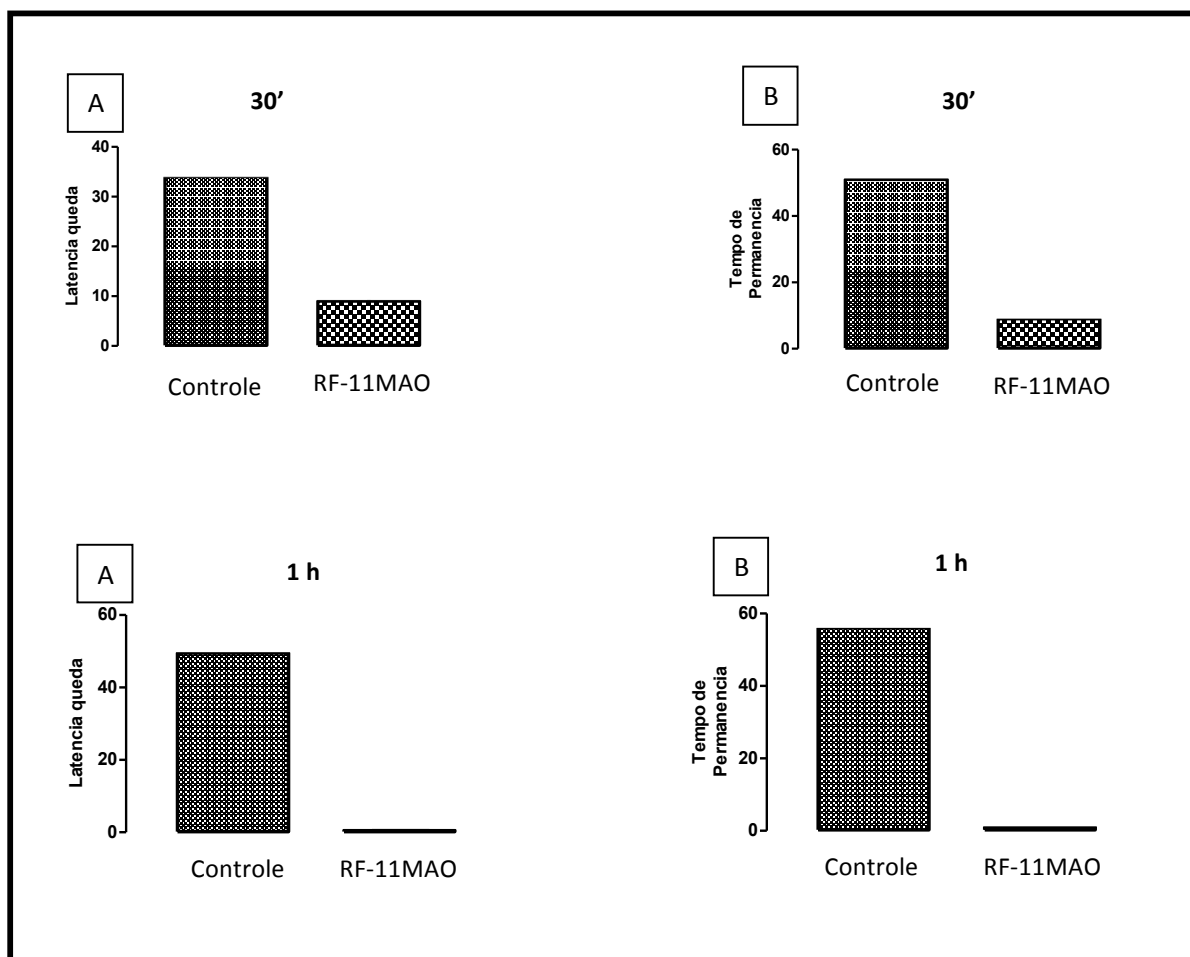


Figura 40 - Tempos de latência e permanência no Rota-Rod, de camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO (Segunda dose)

5.8.3 TESTE DO ARAME (*WIRING TEST*)

O teste do arame permite avaliar a agilidade do animal ao segurar o arame e se a amostra testada pode ou não afetar esse reflexo, por ação depressora do sistema nervoso central e relaxante muscular. Quando a ação depressora é leve, pode afetar o equilíbrio e produzir vertigem.

Os animais foram tratados com RF-11MAO e após 30 minutos foi observado que o tempo para o animal segurar o arame foi em média de 3,5 segundos e do animal controle foi de 2,5 segundos. Transcorrido o tempo de observação, os animais tratados demonstraram maior desempenho, aproximadamente 29%, se comparado ao animal controle (Figura 41 - A).

Após 1 hora do tratamento, os animais tratados foram observados quanto ao tempo para segurar o arame, e o resultado foi em média de 2,5 segundos, enquanto os animais controle foi de 1,5 segundos. Na observação, os animais tratados demonstraram desempenho 40% maior de tempo, se comparado com o controle na análise (Figura 41 - B).

A partir da observação dos resultados foi possível constatar leve depressão do sistema nervoso central, pois os animais tratados apresentaram desequilíbrio e com isso foi estimulado o mecanismo de arco-reflexo do sistema muscular na dose de 0,2 mL da amostra pura RF-11MAO, nos dois tempos analisados, mantendo assim o sinal de alerta do animal para o ato de segurar o arame como ponto de apoio, conforme Boisseier *et al.* (1961) e Lapa *et al.* (2005). Tal fato não foi observado no experimento anterior com a dose de 0,1 mL de RF-11MAO.

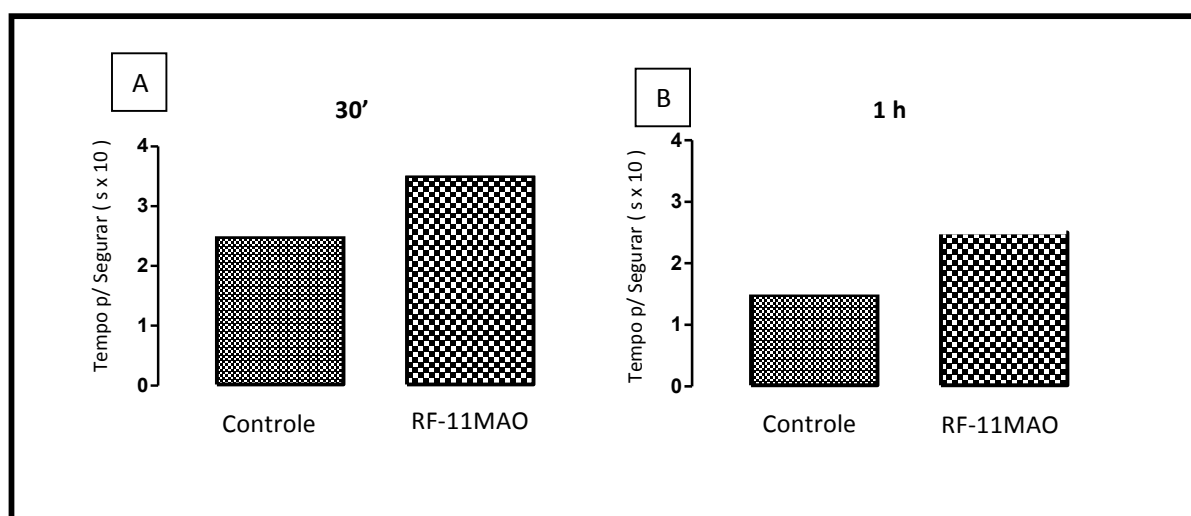


Figura 41 – Tempo para segurar o arame no Teste do Arame, dos camundongos em resposta à ação da amostra RF-11MAO (Segunda dose)

5.8.4 TESTE DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICO

Os animais tratados com RF-11MAO na dose pura de 5 mL/Kg e nas proporções diluídas de 1/3 e 1/10 foram comparados com o veículo e o controle. A análise da latência do sono revelou que os animais tratados dormiram mais rápido, se comparados com os animais veículo que dormiram em 198,0 segundos e os do controle em 190,5 segundos (Figura 42).

Os animais tratados dormiram em tempos diferentes conforme diluição da amostra. Os tempos em média foram de 179,8 segundos para a amostra 1/10, 154,3 segundos para a amostra 1/3, e 149,0 segundos para a amostra pura. A partir da análise da latência do sono foram observadas variações nos animais tratados com diferentes diluições de RF-11MAO, com média de 7% para a amostra diluída em 1/10, 19% para a amostra diluída em 1/3 e 22% para a amostra pura quando comparados com o veículo e o controle (Figura 42).

A análise da duração do sono mostrou que os animais tratados dormiram mais tempo (demoraram em atingir a vigília) e ultrapassaram o tempo esperado de 3h (180,0 minutos) da administração do pentobarbital. A ação da amostra RF-11MAO potencializou o efeito do barbitúrico afetando diretamente o tempo do sono. Os resultados da duração do sono foram em média 187,0 minutos para a amostra 1/10; 212,3 minutos para a amostra 1/3 e 240,0 minutos para a amostra pura, se comparados aos animais veículo com 157,8 minutos e ao controle com 153,3 minutos (Figura 42).

A avaliação da duração do sono demonstrou diferença entre os animais tratados nas respectivas diluições da amostra com 21,98% para a amostra diluída em 1/10; 38,48% para a amostra diluída em 1/3 e 56,55% para a amostra pura em média, se comparados com o veículo e o controle. A avaliação dos resultados para o teste de sono induzido por barbiturico indicou que a amostra RF-11MAO deprimiu o Sistema Nervoso Central, por apresentar

ação agonista que potencializou a ação do barbitúrico, como depressor empregado nos animais nesse teste.

Os resultados são semelhantes aos benzodiazepínicos, que apresentam efeito ligante de sítios localizados nos receptores GABAérgicos do tipo A, evidenciado principalmente pelo prolongamento da duração do sono induzido por agentes hipnóticos, o que foi bem observado nos resultados obtidos, como depressores do sistema nervoso central de acordo com Carlini & Burgos (1979), Chweh *et al.* (1987), Lima *et al.* (1993), Lancel (1999) e Lapa *et al.* (2005).

A análise estatística demonstrou diferença significativa nos animais tratados com RF-11MAO pura e diluída em 1/3 se comparadas ao controle, nos dois parâmetros analisados, a latência e a duração do sono, contribuindo com os resultados de atividade depressora (Figura 42). Vale ressaltar, que um animal (n. 02) do grupo que recebeu a amostra pura apresentou respiração forçada e foi a óbito após 2h de experimento; os demais animais do mesmo grupo foram a óbito após 24h.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Turkey como valores significativos aqueles cujo $p < 0,01$. As colunas e as barras verticais representam as médias e erro padrão das médias (n=4).

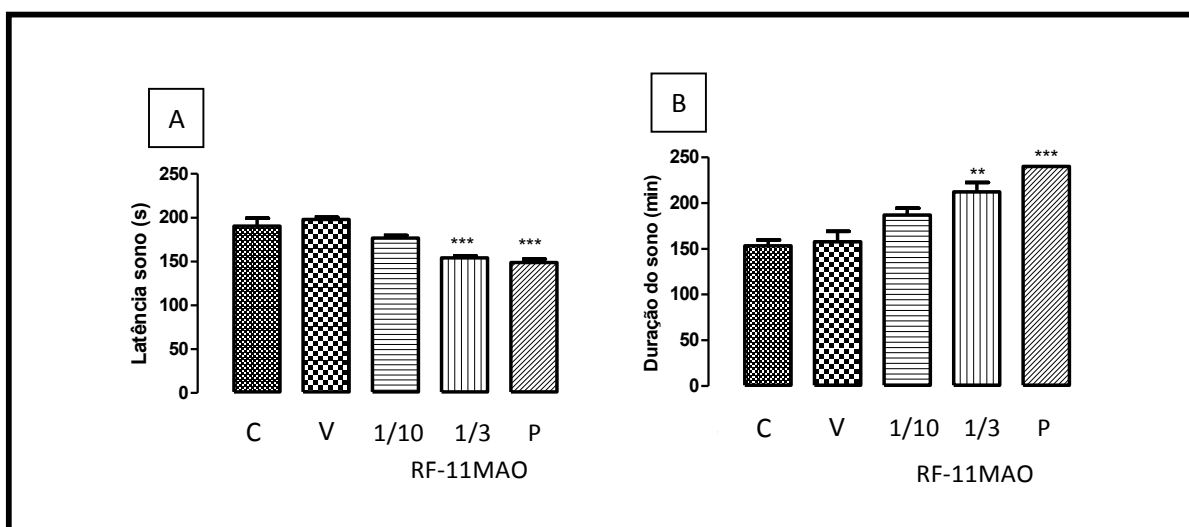


Figura 42 – Latência e duração do Sono induzido por Barbitúrico, Controle (água) e Veículo (água+tween)
 ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) diferente significativamente *versus* controle

5.8.5 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL DE 50% (DL₅₀)

Os resultados dos testes preliminares caracterizaram como dose letal de 100% em camundongos Swiss, o volume de 0,2 mL da amostra pura RF-11MAO correspondente a 5 mL/Kg no período de 24 horas após administração via oral.

O resultado obtido em 6 camundongos Swiss tratados durante 8 dias com administração diária por gavagem de 0,2 mL de RF-11MAO, diluída em 1/3, apresentou letalidade de 50% dos animais, durante o tratamento e com observação diária, conforme descrita na Tabela 8.

A dose letal de 50% (DL₅₀) foi calculada a partir do volume administrado de 0,2 mL diluído em 1/3. Logo, no volume total da amostra diluída contém 0,07 mL de RF-11MAO pura, que foi administrada em camundongo com massa corpórea no final do experimento de 40g. A partir da relação mL/Kg, a DL₅₀ da amostra RF-11MAO foi de 1,8 mL/Kg conforme Lapa *et al.* (2005).

A análise da DL₅₀ em camundongos permitiu a extrapolação da dose para ratos Wistar e elaboração de protocolo dos testes definitivos de toxicidade pré-clínicos, nas fases aguda e subcrônica, diluindo-se a amostra em 1/3, 1/10, 1/30 e 1/100 (OECD, 2001).

Tabela 8 - Tratamento para determinação da DL₅₀ em camundongos Swiss

Hora e dias / Animais tratados	0-24hs (1 dia)	48hs (2 Dias)	96hs (4 Dias)	192hs (8 Dias)
I	Piloereção	###	###	Óbito no dia 6
II	Respiração forçada, piloereção	Respiração forçada, espasmos	Respiração forçada, espasmos, piloereção e óbito	###
III	###	###	Respiração forçada	Óbito no dia 5
IV	###	###	Piloereção, respiração forçada	###
V	###	###	###	###
VI	###	###	###	Respiração forçada

Tratamento em camundongos Swiss

###- Nada digno de nota

5.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Os ratos machos e fêmeas, tratados após 24 horas com doses diluídas de RF-11MAO em 1/3, 1/10 e 1/30, não apresentaram sinais indicativos de toxicidade que os diferenciassem dos animais do grupo controle e veículo. A inquietação dos animais indicou diminuição da mobilidade que, no entanto, não foi persistente nem relacionada à dose. Após 14 dias, não houve morte em nenhum grupo e tampouco manifestação de sinais de toxicidade conforme Lapa *et al.* (2005).

Na avaliação pré-clínica aguda, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução do desenvolvimento ponderal dos animais experimentais, além da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados (TOFOVIC; JACKSON, 1999; RAZA *et al.* 2002; TEO *et al.* 2002; MELO 2001). Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas descritas por Gonzalez e Silva (2003).

Os resultados demonstraram que o peso dos ratos machos e fêmeas tratados permaneceu com crescimento ponderal de forma estável, indicando que os animais mantiveram sua rotina alimentar, configurando quadro de normalidade, sem alterações significantes estatisticamente ou significativas em relação à dose administrada e o efeito produzido (OECD, 2001). Os dados representam a média e o erro padrão e foram submetidos à análise Two-way ANOVA (Figura 43). Pode-se observar nessa figura, que as diferenças iniciais (dia 0) entre os tratamentos (animais) foram mantidos ao longo do experimento, não havendo portanto, influência da ação da amostra RF-11MAO nos pesos dos animais machos e fêmeas. Os ratos machos usados no tratamento com a amostra diluída em 1/3 apresentaram

menor peso médio desde o início do experimento, dando a falsa impressão de efeito positivo da amostra no seu desenvolvimento.

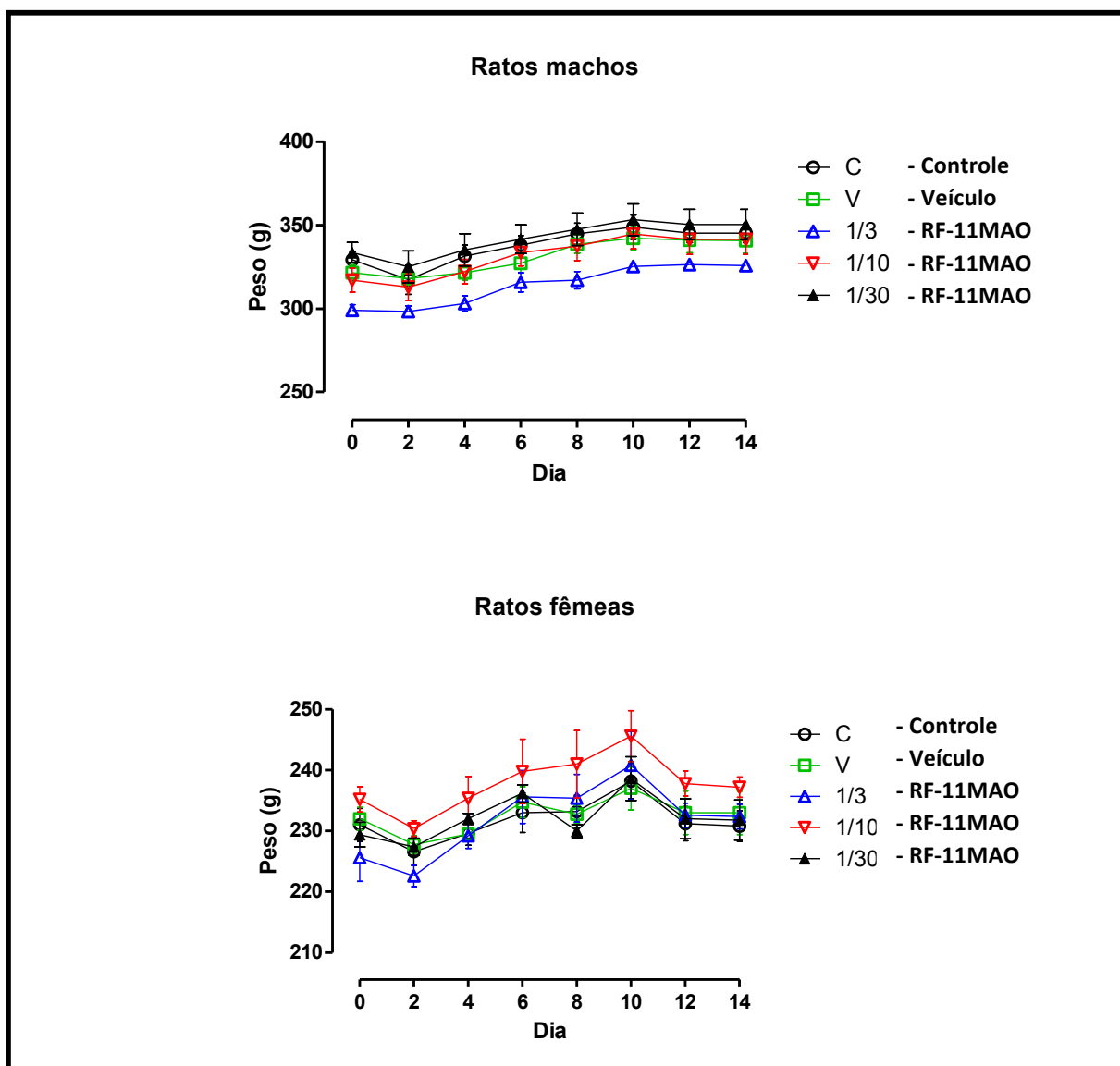


Figura 43 - Peso dos ratos machos e fêmeas em resposta à administração da amostra RF-11MAO diluída

Os resultados do consumo de ração nos ratos machos e fêmeas também permaneceram com crescimento ponderal constante. Os níveis do consumo de ração confirmaram os indicadores clássicos de saúde animal (TOFOVIC & JACKSON, 1999; MELO, 2001;

RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002), como ganho de peso e manutenção do crescimento dos animais tratados com a amostra RF-11MAO, indicando padrão de normalidade.

Os dados obtidos demonstraram não haver lesão no esôfago e estômago dos animais que tiveram contato com a amostra, mesmo administrada por gavagem e introduzida com cânula orogástrica no estômago, onde o indicativo de lesão por toxicidade refletiria diretamente na redução do consumo de ração, o qual não ocorreu. O consumo de ração manteve-se sem alterações estatísticas significantes ou significativas em relação à dose administrada e o efeito observado (Figura 44).

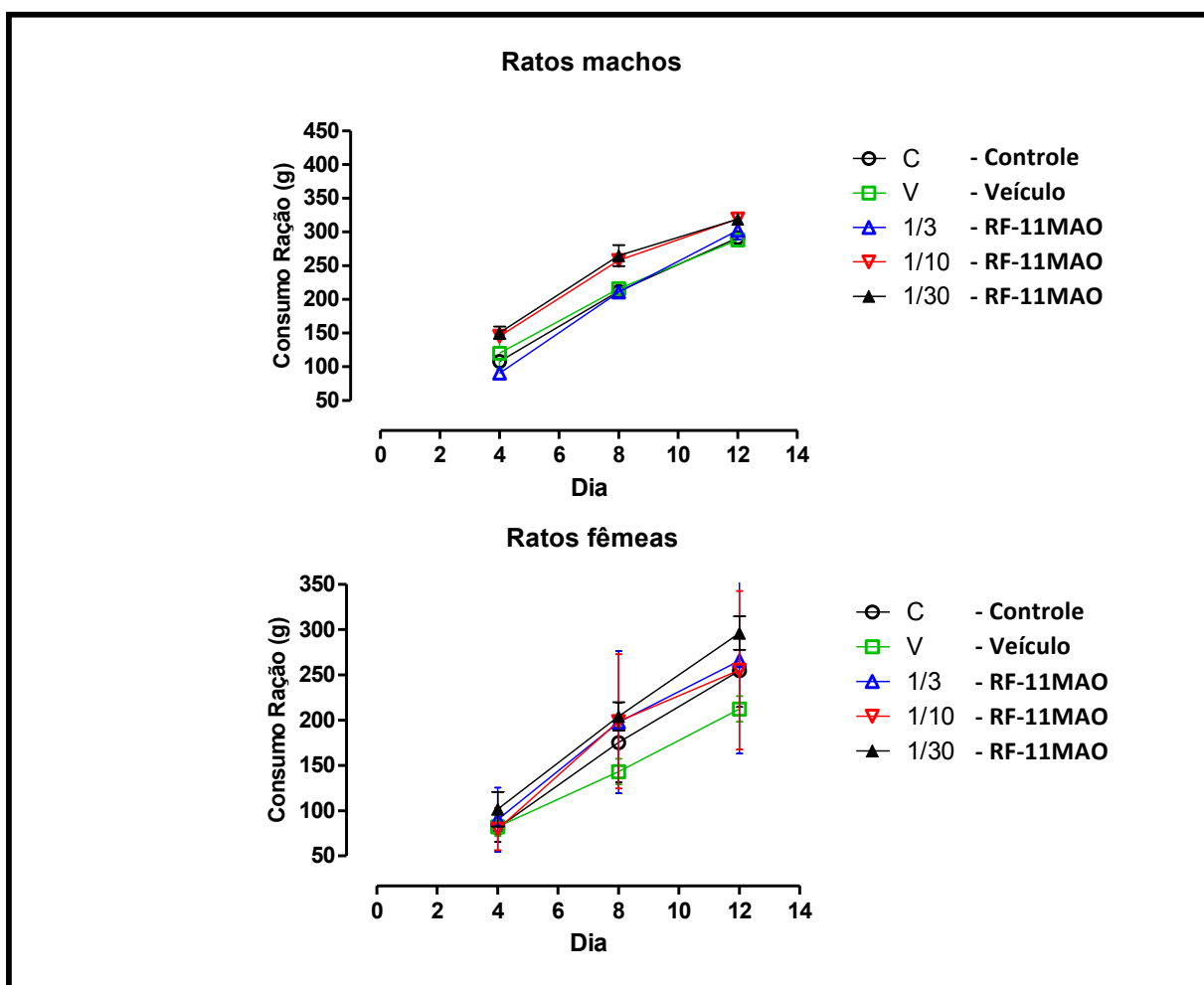


Figura 44 - Consumo de Ração dos ratos machos e fêmeas em resposta à administração RF-11MAO diluída

Os resultados quanto ao consumo de água permaneceram crescentes acompanhando o consumo de ração e ganho de peso por crescimento ponderal nos ratos machos e fêmeas (Figura 45). Os níveis de consumo de ração acompanham o controle, demonstrando não haver dano tóxico renal provocado pela amostra, geralmente caracterizado pela redução do consumo de água nos animais tratados conforme Tofovic & Jackson (1999), Melo (2001), Raza *et al.* (2002) e Teo *et al.* (2002). Os dados observados mantiveram os níveis de normalidade sem alterações estatísticas significantes ou significativas para a análise toxicológica em relação à dose administrada (Figura 45).

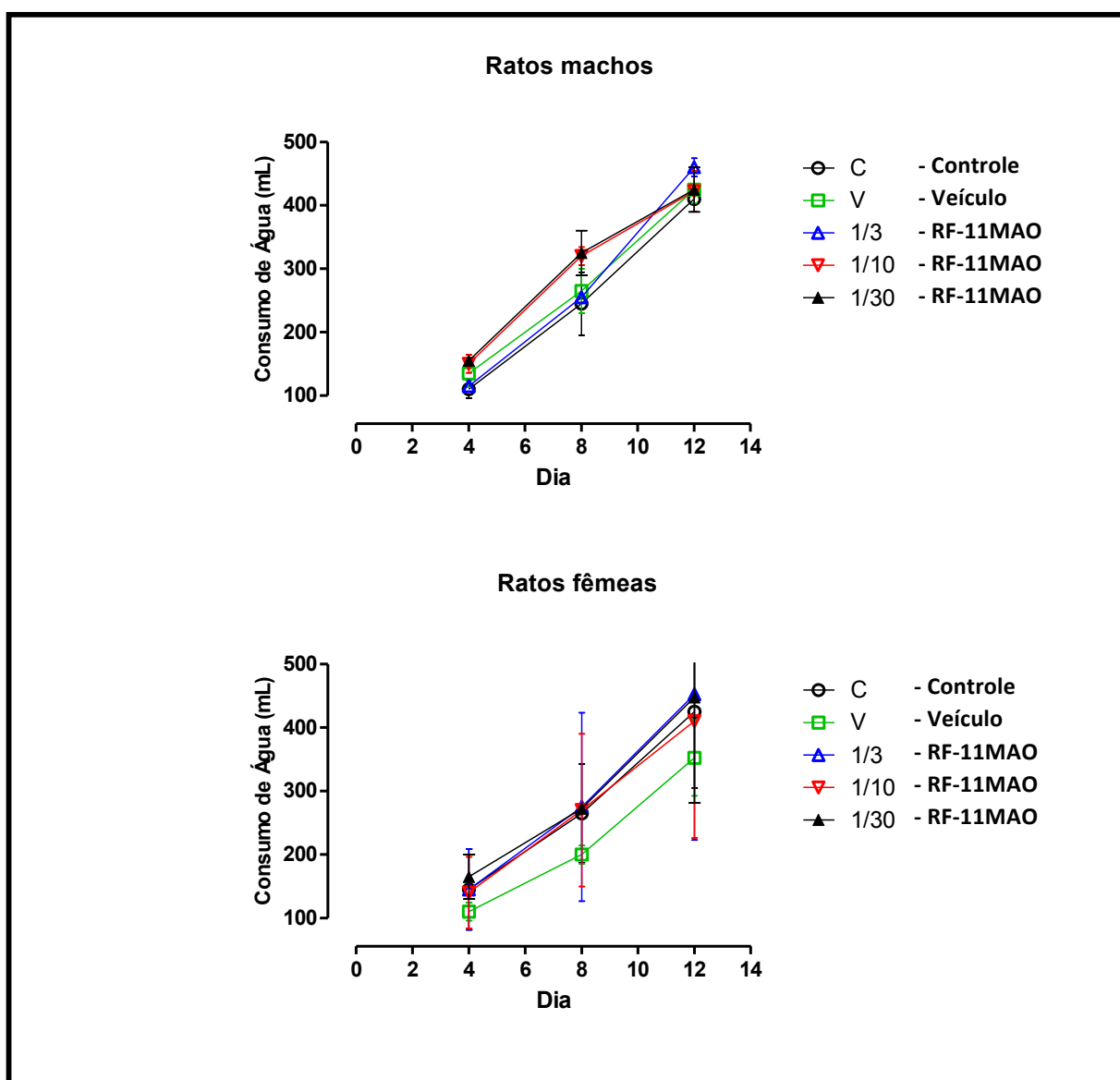


Figura 45 - Consumo de água dos ratos machos e fêmeas em resposta à administração de RF-11MAO diluída

5.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA

A análise dos ratos machos e fêmeas tratados não demonstrou sinais de anormalidade quando equiparados aos animais do grupo controle e veículo. Os animais foram observados diariamente por 28 dias consecutivos, após a administração das doses diluídas em 1/10, 1/30 e 1/100 da amostra RF-11MAO, e não apresentaram indicativos de toxicidade. A relação dos animais tratados com as doses repetidas por 28 dias não manifestaram distúrbios de comportamento, dos hábitos alimentares e necessidades fisiológicas, com destaque para ausência de morte em todos os grupos observados. Os dados anteriores de segurança avaliados na fase aguda foram confirmados e mantidos na fase subcrônica, em relação às doses e efeitos esperados.

Os resultados demonstraram que o peso dos ratos machos e fêmeas permaneceram com crescimento ponderal durante os 28 dias de observação, mesmo sob o efeito da administração subcrônica em doses repetidas (Figura 46). A evolução natural do peso em todos os grupos observados evidenciou a inexistência de toxicidade da amostra e sua potencial segurança, não apresentando alterações estatísticas significantes ou significativas para a análise em relação às doses propostas corroborando com as pesquisas de Tofovic & Jackson (1999), Melo (2001), Raza *et al.* (2002) e Teo *et al.* (2002).

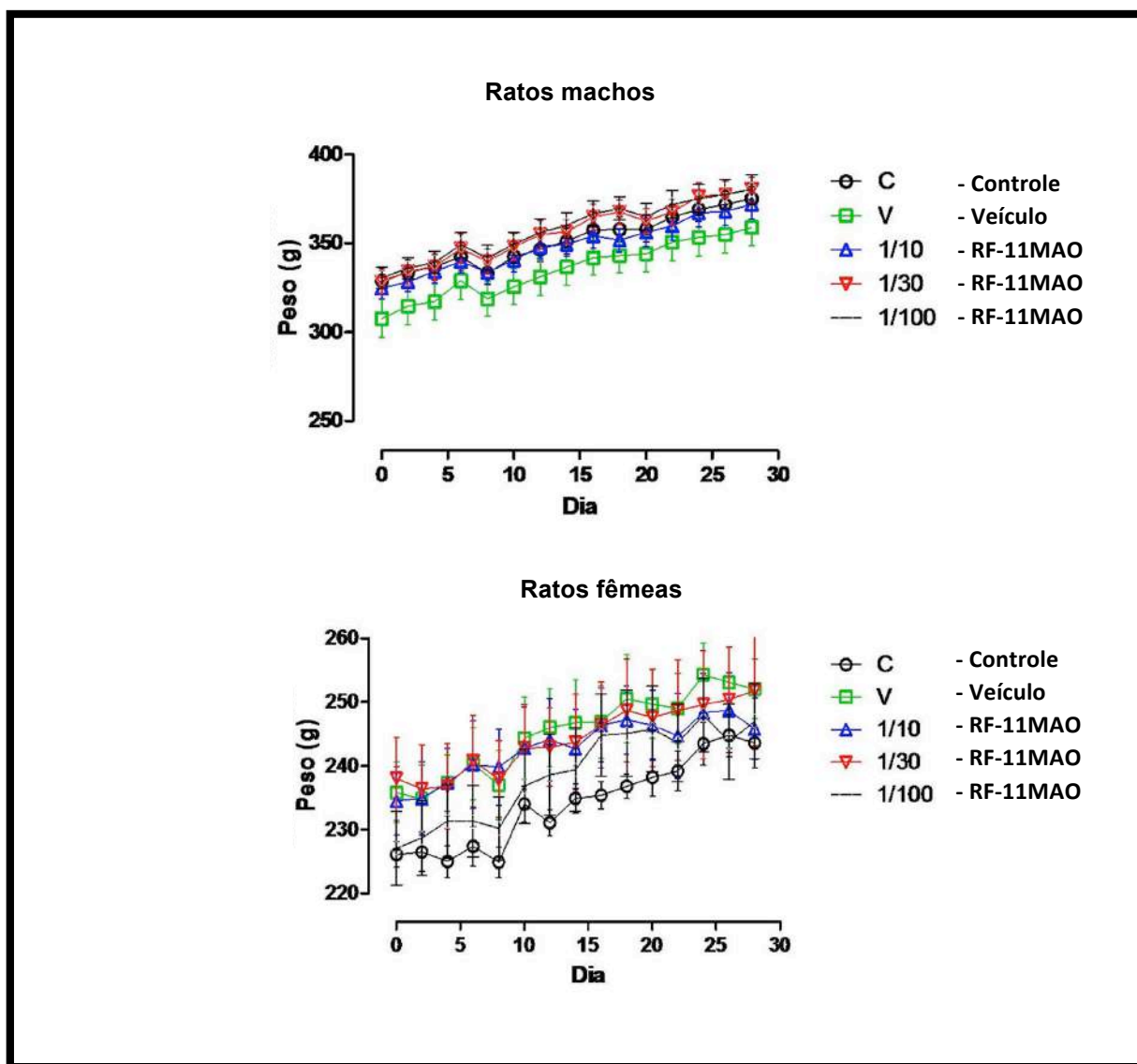


Figura 46 - Peso dos ratos fêmeas em 28 dias

A permanência na fase subcrônica dos resultados anteriores foi observada no consumo de ração para ratos machos e fêmeas, que mantiveram estabilidade no crescimento ponderal durante os 28 dias do experimento, compatíveis com a saúde dos animais observados, que favoreceu o ganho de peso e crescimento normais independentes dos tratamentos com a amostra RF-11MAO, em doses repetidas (Figura 47).

Os dados obtidos demonstraram não haver lesão no esôfago e estômago dos animais que tiveram contato com a amostra. A indicação desse tipo de lesão patológica, por toxicidade, reflete diretamente em abstinência alimentar refletida diretamente na redução do consumo de ração conforme Tofovic & Jackson (1999), Melo (2001), Raza *et al.* (2002) e

Teo *et al.* (2002). A análise estatística não apresentou dados significantes ou alterações significativas durante os período de observação, que refletisse diretamente na avaliação do consumo de ração, em relação à administração das doses repetidas.

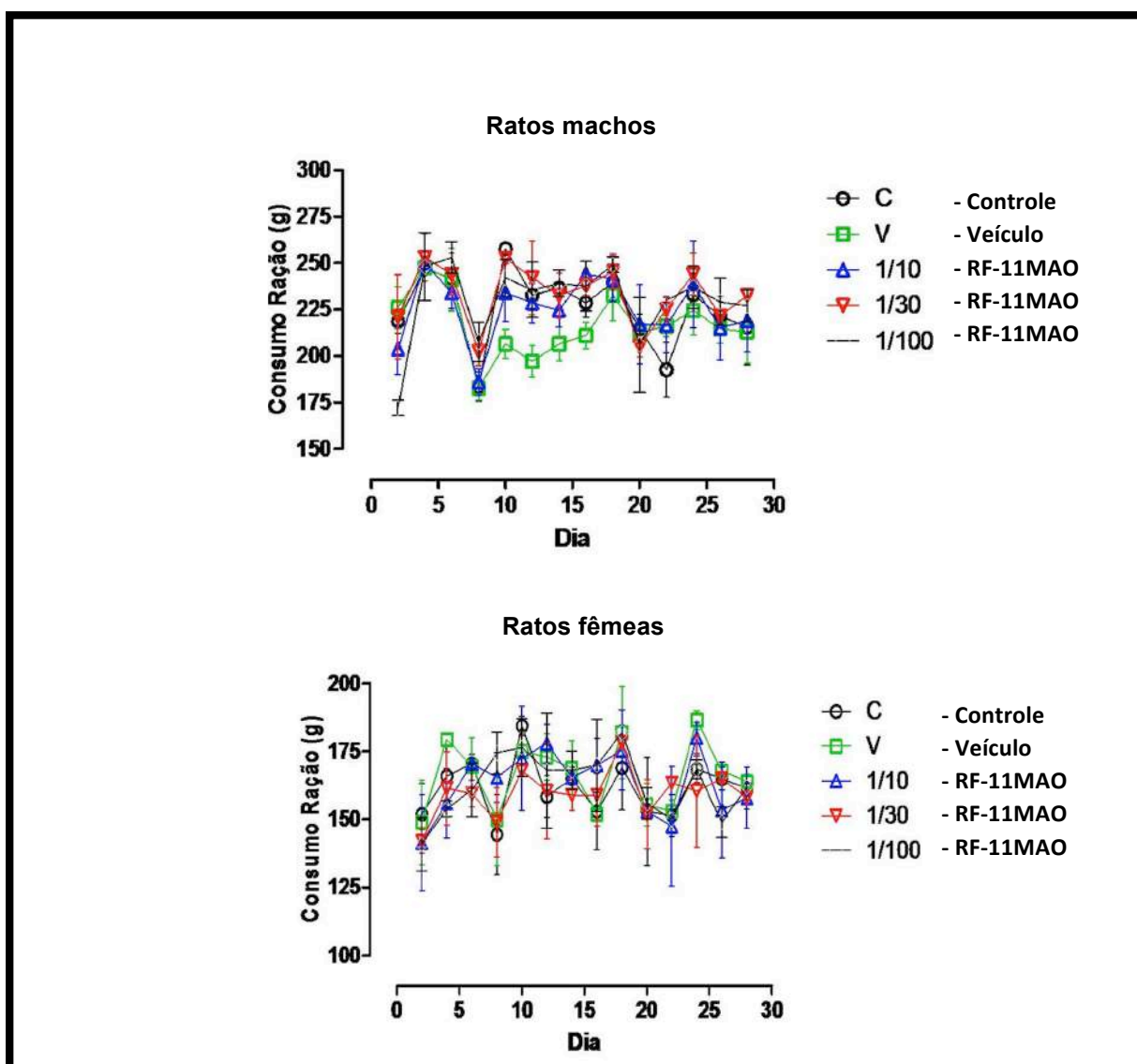


Figura 47 - Consumo de ração dos ratos machos e fêmeas em 28 dias

O consumo de água manteve-se estável, acompanhando o consumo de ração e ganho de peso por crescimento ponderal, compatíveis com os padrões de normalidade nos ratos machos e fêmeas (Figura 48). Os dados demonstraram não haver dano tóxico renal, provocado pela exposição de amostra nefrotóxica, geralmente caracterizado pela redução do

consumo de água nos animais tratados, segundo Tofovic & Jackson (1999), Melo (2001), Raza *et al.* (2002) e Teo *et al.* (2002). A análise estatística não apresentou variações significantes durante os 28 dias de observação, não havendo manifestação tóxica da amostra nos animais tratados, que refletisse no consumo de água, em relação às doses diárias administradas.

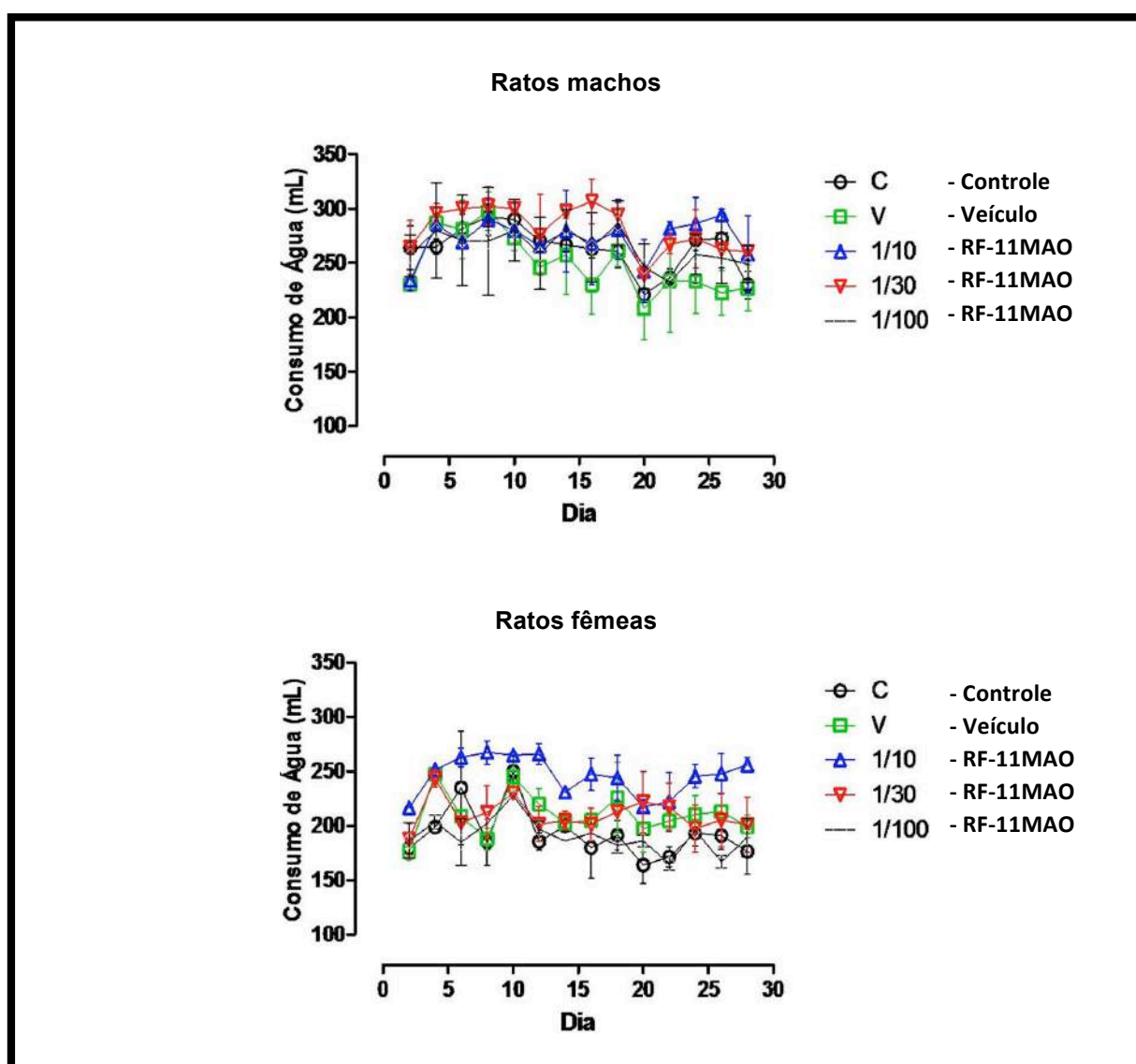


Figura 48 - Consumo de água dos ratos machos e fêmeas em 28 dias

5.11 HEMOGRAMA DOS RATOS WISTAR TRATADOS

5.11.1 ANÁLISE HEMATOLÓGICA AGUDA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 24 HORAS

O estudo hematológico determina o estado de saúde dos animais, tendo o hemograma como uma forma avaliativa de diagnóstico e prognóstico de enfermidades segundo Swenson, (1988) e Jain (1993).

Para a avaliação hematológica dos efeitos da administração aguda (em dose única), foram comparados parametricamente os hemogramas obtidos, após 24 horas do tratamento dos animais ($n = 5$, por grupo), com a amostra RF-11MAO diluída em 1/30, 1/10 e 1/3, bem como os animais do controle (C = água) e veículo (V = Tween 1%). Os valores representam a média e o erro padrão conforme Swenson (1988), Jain (1993) e Lapa *et al.* (2005). d

A concentração de leucócitos (Leucometria) normal varia entre 6 e $17 \times 10^3/\mu\text{L}$, o valor que indica toxicidade reflete aumento expressivo acima de 200% no sangue de ratos Wistar adultos, após a administração da amostra a ser testada, segundo Santos (1999) e Bush (2004).

Após 24 horas, a concentração de leucócitos nos ratos machos manteve-se estável nos animais tratados com a amostra diluída em relação aos do controle. Não há variação relacionada diretamente com a dose da amostra RF-11MAO, pois a menor diluição (dose mais alta) não indicou aumento da concentração celular de leucócitos, se comparada de forma escalonar com as demais diluições, indicando padrão de normalidade hematológica descritos por Gonzalez & Silva (2003), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, sem indicação de resposta imunológica por toxicidade nos animais tratados na

pesquisa (Tabela 9). Os valores de referência corroboram com os obtidos por Mitruka & Rawnsley (1981) na hematimetria ($8,1 - 9,7 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($13,4 - 15,8 \text{ g/dL}$), por Harkness & Wagner (1993) na leucometria ($6,0 - 17,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($7,0 - 10,0 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($11,0 - 18,0 \text{ g/dL}$) e, pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2009) na hematimetria ($3,3 - 8,3 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($7,2 - 16,0 \text{ g/dL}$).

Tabela 9 – Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos machos após 24 horas

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Veículo (Tween)	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$13,73 \pm 1,19$	$7,57 \pm 1,57$	$8,24 \pm 2,08$	$9,00 \pm 2,99$	$9,73 \pm 2,49$	$8,65 \pm 1,87$
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$8,10 \pm 0,34$	$9,16 \pm 0,51$	$9,14 \pm 0,47$	$9,82 \pm 0,25$	$9,36 \pm 0,69$	$9,10 \pm 0,17$
Hemoglobina (g/dL)	$14,55 \pm 0,51$	$17,57 \pm 1,02$	$18,22 \pm 0,77$	$17,63 \pm 0,69$	$18,28 \pm 0,88$	$18,05 \pm 0,66$
Hematócrito (%)	-----	$46,18 \pm 2,91$	$47,36 \pm 2,04$	$46,43 \pm 1,89$	$47,63 \pm 2,40$	$47,53 \pm 1,69$
VCM (fL)	-----	$50,40 \pm 1,27$	$51,80 \pm 0,60$	$52,67 \pm 1,64$	$50,90 \pm 1,27$	$52,20 \pm 1,85$
HCM (g/dL)	-----	$19,17 \pm 0,32$	$19,92 \pm 0,58$	$20,00 \pm 0,56$	$19,58 \pm 0,74$	$19,80 \pm 0,70$
CHCM (g/dL)	-----	$38,03 \pm 0,69$	$38,42 \pm 0,71$	$38,00 \pm 0,34$	$38,40 \pm 0,59$	$37,93 \pm 0,70$
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-----	$792,7 \pm 102,5$	$860,2 \pm 48,24$	$750,8 \pm 88,39$	$816,50 \pm 50,53$	$809,5 \pm 40,71$

VCM: volume corpuscular média; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Plt: plaquetas.

A concentração de leucócitos no sangue dos ratos fêmeas, após 24 horas da administração, manteve-se estável nos animais tratados em relação aos do controle. A variação não possui relação direta com a dose da amostra RF-11MAO, pois a menor diluição não indicou aumento da concentração celular (Leucometria), indicando padrão de normalidade hematológica conforme Santos (1999), Gonzalez & Silva (2003), Bush (2004), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenciação significativa, sem indicação de resposta imunológica por toxicidade nos animais tratados na pesquisa (Tabela 10). Os valores de referência corroboram com os obtidos por Mitruka & Rawnsley (1981) na leucometria ($8,0 - 11,8 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($13,4 - 15,8 \text{ g/dL}$), por Harkness & Wagner (1993) na leucometria ($6,0 - 17,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($7,0 - 10,0 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($11,0 - 18,0 \text{ g/dL}$) e, pelo Centro de Criação de Animais de

Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2009) na leucometria ($4,0 - 12,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($3,3 - 8,3 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($7,2 - 16,0 \text{ g/dL}$).

Tabela 10 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos fêmeas após 24 horas

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Veículo (Tween)	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$11,25 \pm 1,00$	$5,20 \pm 1,74$	$3,75 \pm 0,60$	$7,18 \pm 1,37$	$5,42 \pm 0,67$	$4,50 \pm 2,33$
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$7,46 \pm 0,42$	$8,63 \pm 0,10$	$8,50 \pm 0,39$	$8,74 \pm 0,30$	$8,60 \pm 0,24$	$8,76 \pm 0,20$
Hemoglobina (g/dL)	$14,16 \pm 0,44$	$16,82 \pm 0,19$	$16,63 \pm 0,48$	$17,50 \pm 0,57$	$16,88 \pm 0,50$	$17,50 \pm 0,22$
Hematócrito (%)	-----	$44,62 \pm 1,39$	$43,18 \pm 0,75$	$45,28 \pm 2,24$	$43,20 \pm 1,49$	$45,40 \pm 0,91$
VCM (fL)	-----	$51,02 \pm 1,39$	$50,87 \pm 1,56$	$51,84 \pm 1,98$	$50,22 \pm 0,72$	$51,80 \pm 0,98$
HCM (g/dL)	-----	$19,48 \pm 0,25$	$19,60 \pm 0,40$	$20,08 \pm 0,58$	$19,64 \pm 0,26$	$19,98 \pm 0,33$
CHCM (g/dL)	-----	$38,18 \pm 0,79$	$38,55 \pm 0,83$	$38,74 \pm 0,72$	$39,04 \pm 0,22$	$38,58 \pm 0,73$
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-----	$837,4 \pm 92,08$	$767,0 \pm 88,73$	$845,0 \pm 82,50$	$910,3 \pm 113,2$	$714,2 \pm 101,6$

VCM: volume corpuscular média; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Plt: plaquetas.

5.11.2 ANÁLISE HEMATOLÓGICA AGUDA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 14 DIAS

Na avaliação hematológica dos efeitos da administração aguda (em dose única), foram comparados parametricamente os hemogramas obtidos, após 14 dias do tratamento dos animais ($n = 5$, por grupo), com a amostra RF-11MAO diluída em 1/30, 1/10 e 1/3, bem como os animais do controle (C = água) e veículo (V = Tween 1%). Os valores representam a média e o erro padrão conforme Swenson (1988), Jain (1993) e Lapa *et al.* (2005).

A concentração de leucócitos no sangue dos ratos machos apresentou relativa estabilidade, nos animais tratados em relação aos do controle, após 14 dias. A variação não possui relação direta com a dose da amostra RF-11MAO, pois a menor diluição (dose mais alta) não indicou aumento da concentração celular de leucócitos no sangue dos animais tratados, indicando padrão de normalidade hematológica descritos por Santos (1999),

Gonzalez & Silva (2003), Bush (2004), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver dados significantes ou significativos, sem indicação de resposta imunológica por toxicidade nos animais tratados na pesquisa (Tabela 11). Os valores de referência corroboram com os obtidos por Mitruka & Rawnsley (1981) na hematimetria ($8,1 - 9,7 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina (13,4 - 15,8 g/dL), por Harkness & Wagner (1993) na leucometria ($6,0 - 17,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($7,0 - 10,0 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina (11,0 - 18,0 g/dL) e, pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2009) na hematimetria ($3,3 - 8,3 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina (7,2 - 16,0 g/dL).

Tabela 11 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos machos após 14 dias

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Veículo (Tween)	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13,73 $\pm$ 1,19	7,45 $\pm$ 2,52	7,08 $\pm$ 3,27	8,50 $\pm$ 1,28	6,92 $\pm$ 0,90	9,22 $\pm$ 2,94
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,10 $\pm$ 0,34	8,82 $\pm$ 0,25	8,77 $\pm$ 0,37	8,79 $\pm$ 0,19	9,02 $\pm$ 0,29	9,15 $\pm$ 0,29
Hemoglobina (g/dL)	14,55 $\pm$ 0,51	17,08 $\pm$ 1,23	17,06 $\pm$ 0,60	17,40 $\pm$ 0,74	17,30 $\pm$ 0,62	17,70 $\pm$ 0,71
Hematócrito (%)	-----	45,48 $\pm$ 1,27	45,22 $\pm$ 1,65	45,28 $\pm$ 0,87	46,30 $\pm$ 1,37	47,42 $\pm$ 2,34
VCM (fL)	-----	50,68 $\pm$ 1,02	51,52 $\pm$ 0,51	51,50 $\pm$ 1,68	51,37 $\pm$ 0,97	51,83 $\pm$ 1,50
HCM (g/dL)	-----	19,33 $\pm$ 0,95	19,44 $\pm$ 0,27	19,83 $\pm$ 1,31	19,18 $\pm$ 0,22	19,38 $\pm$ 0,38
CHCM (g/dL)	-----	38,10 $\pm$ 1,42	37,70 $\pm$ 0,39	38,50 $\pm$ 1,81	37,35 $\pm$ 0,46	37,35 $\pm$ 0,46
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-----	636,8 $\pm$ 122,1	670,8 $\pm$ 1,57	832,0 $\pm$ 87,84	640,7 $\pm$ 130,6	812,3 $\pm$ 53,05

VCM: volume globular média; **HCM:** hemoglobina globular média; **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média; **Plt:** plaquetas.

A concentração de leucócitos no sangue dos ratos fêmeas permaneceu estável, após 14 dias da administração nos animais tratados com a amostra RF-11MAO diluída, não havendo diferença se comparados aos do controle e veículo. A estabilidade dos valores obtidos demonstra que a dose única da amostra RF-11MAO diluída, não indicou efeito tóxico nesse período de tempo, mantendo o padrão de normalidade hematológica conforme Santos (1999), Gonzalez & Silva (2003), Bush (2004), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver dados significantes ou significativos, sem indicação de resposta imunológica por toxicidade nos animais tratados na pesquisa conforme Tabela 12. Os valores de referência corroboram com os obtidos por Mitruka & Rawnsley (1981) na leucometria ($8,0 - 11,8 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($13,4 - 15,8 \text{ g/dL}$), por Harkness & Wagner (1993) na leucometria ($6,0 - 17,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($7,0 - 10,0 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($11,0 - 18,0 \text{ g/dL}$) e, pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2009) na leucometria ($4,0 - 12,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($3,3 - 8,3 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($7,2 - 16,0 \text{ g/dL}$).

Tabela 12 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos fêmeas após 14 dias

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Veículo (Tween)	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$11,25 \pm 1,00$	$5,22 \pm 1,47$	$6,58 \pm 2,19$	$5,88 \pm 0,98$	$5,42 \pm 1,65$	$5,15 \pm 0,86$
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$7,46 \pm 0,42$	$8,32 \pm 0,28$	$8,28 \pm 0,18$	$8,47 \pm 0,22$	$8,46 \pm 0,50$	$8,52 \pm 0,36$
Hemoglobina (g/dL)	$14,16 \pm 0,44$	$16,34 \pm 0,56$	$16,03 \pm 0,45$	$16,66 \pm 0,37$	$16,44 \pm 0,83$	$16,53 \pm 0,50$
Hematócrito (%)	-----	$43,70 \pm 1,43$	$42,73 \pm 1,23$	$44,50 \pm 1,00$	$43,76 \pm 2,10$	$44,32 \pm 0,95$
VCM (fL)	-----	$52,50 \pm 0,59$	$51,63 \pm 1,00$	$52,54 \pm 0,74$	$51,76 \pm 0,71$	$52,03 \pm 1,49$
HCM (g/dL)	-----	$19,64 \pm 0,19$	$819,40 \pm 0,52$	$19,68 \pm 0,33$	$19,28 \pm 0,54$	$19,42 \pm 0,41$
CHCM (g/dL)	-----	$37,40 \pm 0,30$	$37,60 \pm 0,55$	$37,46 \pm 0,13$	$37,54 \pm 0,77$	$37,33 \pm 0,69$
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-----	$714,2 \pm 101,6$	$793,5 \pm 89,73$	$843,4 \pm 95,57$	$782,4 \pm 71,69$	$781,7 \pm 51,52$

VCM: volume corpuscular média; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Plt: plaquetas.

5.11.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA SUBCRÔNICA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 28 DIAS

Para a avaliação hematológica do efeito da administração subcrônica (em doses repetidas diariamente) foram comparados parametricamente os hemogramas obtidos, após 28 dias de tratamento dos animais ($n = 10$, por grupo), com a amostra RF-11MAO diluída em 1/100, 1/30 e 1/10, bem como os animais do controle e veículo (C = água; V= Tween 1%). Os valores representam a média e o erro padrão de acordo com Swenson (1988), Jain (1993) e Lapa *et al.* (2005).

A concentração de leucócitos no sangue nos ratos machos manteve-se estável nos animais tratados em relação aos do controle, após 28 dias de tratamento. A variação não possui relação direta com a dose da amostra RF-11MAO, pois a menor diluição não indicou aumento da concentração celular de leucócitos no sangue dos animais tratados, indicando padrão de normalidade hematológica descrito por Santos (1999), Gonzalez & Silva (2003), Bush (2004), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas entre elas, sem indicação de resposta imunológica por toxicidade nos animais tratados na pesquisa (Tabela 13). Os valores de referência corroboram com os obtidos por Mitruka & Rawnsley (1981) na hematimetria ($8,1 - 9,7 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina (13,4 - 15,8 g/dL), por Harkness & Wagner (1993) na leucometria ($6,0 - 17,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($7,0 - 10,0 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina (11,0 - 18,0 g/dL) e, pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2009) na hematimetria ($3,3 - 8,3 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina (7,2 - 16,0 g/dL).

Tabela 13 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos machos após 28 dias

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle (Água)	Veículo (Tween1%)	1/100	RF-11MAO 1/30	1/10
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13,73 $\pm$ 1,19	7,04 $\pm$ 1,44	6,41 $\pm$ 1,31	6,40 $\pm$ 1,23	6,54 $\pm$ 1,40	7,98 $\pm$ 2,22
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,10 $\pm$ 0,34	9,23 $\pm$ 0,57	8,79 $\pm$ 0,48	8,89 $\pm$ 0,88	9,70 $\pm$ 1,28	9,53 $\pm$ 1,45
Hemoglobina (g/dL)	14,55 $\pm$ 0,51	17,08 $\pm$ 0,71	16,39 $\pm$ 1,01	16,99 $\pm$ 1,51	18,07 $\pm$ 2,42	17,79 $\pm$ 2,96
Hematócrito (%)	-----	45,82 $\pm$ 2,13	44,00 $\pm$ 2,51	45,66 $\pm$ 4,52	47,4 $\pm$ 5,13	45,59 $\pm$ 1,67
VCM (fL)	-----	49,69 $\pm$ 1,12	50,11 $\pm$ 1,84	51,24 $\pm$ 1,53	50,29 $\pm$ 1,26	50,190 $\pm$ 1,26
HCM (g/dL)	-----	18,52 $\pm$ 0,62	18,68 $\pm$ 0,82	19,14 $\pm$ 0,72	18,62 $\pm$ 0,57	18,66 $\pm$ 0,44
CHCM (g/dL)	-----	37,27 $\pm$ 0,65	37,24 $\pm$ 0,52	37,34 $\pm$ 0,74	36,91 $\pm$ 1,05	37,12 $\pm$ 0,59
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-----	693,0 $\pm$ 49,69	723,9 $\pm$ 49,70	745,3 $\pm$ 84,50	716,1 $\pm$ 80,65	722,6 $\pm$ 96,12
Linfócitos (%)	-----	76,20 $\pm$ 14,63	75,20 $\pm$ 15,53	69,20 $\pm$ 17,34	80,50 $\pm$ 9,58	77,00 $\pm$ 12,06
Segmentados (%)	-----	20,00 $\pm$ 14,38	21,10 $\pm$ 15,33	25,70 $\pm$ 17,28	15,90 $\pm$ 8,31	18,50 $\pm$ 10,01
Bastonetes (%)	-----	0,10 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,63	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Eosinófilos (%)	-----	2,00 $\pm$ 0,94	2,20 $\pm$ 1,75	1,90 $\pm$ 1,19	2,40 $\pm$ 2,79	2,30 $\pm$ 1,25
Monócitos (%)	-----	1,70 $\pm$ 1,05	1,50 $\pm$ 0,84	1,40 $\pm$ 0,84	1,30 $\pm$ 0,67	2,20 $\pm$ 1,62

VCM: volume corpuscular média; **HCM:** hemoglobina corpuscular média; **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média; **Plt:** plaquetas. Os resultados são médias $\pm$ desvio padrão das médias de 10 animais por grupo.

A concentração de leucócitos no sangue dos ratos fêmeas manteve-se estável nos animais tratados com a amostra diluída em relação aos do controle, após 28 dias de tratamento. A variação não possui relação direta com a dose da amostra RF-11MAO, pois a menor diluição não indicou aumento da concentração celular no sangue dos animais tratados, indicando padrão de normalidade hematológica corroborado por Santos (1999), Gonzalez & Silva (2003), Bush (2004), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significantes ou significativas entre elas, sem indicação de resposta imunológica por toxicidade nos animais tratados na pesquisa (Tabela 14). Os valores de referência corroboram com os obtidos por Mitruka & Rawnsley (1981) na leucometria ($8,0 - 11,8 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($13,4 - 15,8 \text{ g/dL}$), por Harkness & Wagner (1993) na leucometria ($6,0 - 17,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($7,0 - 10,0 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($11,0 - 18,0 \text{ g/dL}$) e, pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2009) na leucometria ($4,0 - 12,0 \times 10^6/\mu\text{L}$), hematimetria ($3,3 - 8,3 \times 10^6/\mu\text{L}$) e hemoglobina ($7,2 - 16,0 \text{ g/dL}$).

Tabela 14 - Análise hematológica no tratamento com RF-11MAO diluída, em ratos fêmeas após 28 dias

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle (Água)	Veículo (Tween1%)	1/100	RF-11MAO 1/30	1/10
Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11,25 $\pm$ 1,00	6,14 $\pm$ 1,85	5,92 $\pm$ 2,15	6,20 $\pm$ 1,87	6,21 $\pm$ 2,95	7,19 $\pm$ 1,63
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,46 $\pm$ 0,42	8,82 $\pm$ 0,78	9,01 $\pm$ 0,657	9,13 $\pm$ 1,22	8,53 $\pm$ 0,46	8,73 $\pm$ 0,33
Hemoglobina (g/dL)	14,16 $\pm$ 0,44	16,93 $\pm$ 1,61	17,33 $\pm$ 1,39	17,58 $\pm$ 2,55	16,59 $\pm$ 0,88	16,66 $\pm$ 0,73
Hematócrito (%)	-----	45,46 $\pm$ 4,20	46,49 $\pm$ 3,94	47,04 $\pm$ 6,91	44,22 $\pm$ 2,12	45,03 $\pm$ 2,12
VCM (fL)	-----	51,56 $\pm$ 1,14	51,58 $\pm$ 1,36	51,49 $\pm$ 1,54	51,87 $\pm$ 1,33	51,60 $\pm$ 1,05
HCM (g/dL)	-----	19,23 $\pm$ 0,44	19,23 $\pm$ 0,34	19,24 $\pm$ 0,41	19,47 $\pm$ 0,38	19,09 $\pm$ 0,33
CHCM (g/dL)	-----	37,30 $\pm$ 0,93	37,30 $\pm$ 0,58	37,40 $\pm$ 0,45	37,53 $\pm$ 0,64	37,00 $\pm$ 0,89
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-----	771,5 $\pm$ 83,34	763,0 $\pm$ 116,9	755,0 $\pm$ 79,21	716,2 $\pm$ 93,90	718,5 $\pm$ 94,19
Linfócitos (%)	-----	70,50 $\pm$ 9,38	66,20 $\pm$ 10,42	69,30 $\pm$ 13,04	69,90 $\pm$ 13,90	68,20 $\pm$ 11,40
Segmentados (%)	-----	26,20 $\pm$ 9,34	29,50 $\pm$ 10,29	26,30 $\pm$ 14,73	26,30 $\pm$ 13,86	27,10 $\pm$ 10,12
Bastonetes (%)	-----	0,10 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Eosinófilos (%)	-----	1,60 $\pm$ 1,43	1,80 $\pm$ 0,91	1,80 $\pm$ 1,22	1,80 $\pm$ 0,78	2,30 $\pm$ 1,16
Monócitos (%)	-----	1,80 $\pm$ 0,63	2,50 $\pm$ 1,90	3,20 $\pm$ 2,53	2,00 $\pm$ 1,41	2,40 $\pm$ 2,36

VCM: volume corpuscular média; **HCM:** hemoglobina corpuscular média; **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média; **Plt:** plaquetas. Os resultados são médias $\pm$ desvio padrão das médias de 10 animais por grupo.

Os resultados obtidos na análise hematológica completa dos animais tratados com a amostra RF-11MAO diluída em 1/3, 1/10, 1/30 e 1/100 nas fases aguda e sub-crônica demonstraram em 24 horas, 14 dias na dose única e 28 dias em doses repetidas, não haver aumento expressivo (acima de 200%) de células brancas do sangue na leucometria, por resposta imunológica. A partir dos dados foi possível observar que não houve redução drástica de células vermelhas do sangue por morte na heritrometria, além de não serem observadas as características de discrasias sanguíneas por ação tóxica da amostra testada.

Os outros indicadores possíveis de toxicidade relacionados à amostra RF-11MAO diluída não foram expressos como alteração da bioquímica plasmática sanguínea, da massa relativa dos órgãos e na análise histológica, bem como a sanidade dos animais que permaneceram crescendo, sem alterações de peso e abstinência no consumo de água e ração. A ausência de alterações desses importantes indicadores, criteriosamente avaliados, reflete a manutenção dos parâmetros celulares normais do sangue e fundamentalmente não houve morte em nenhum grupo dos ratos tratados, caracterizando o padrão de normalidade hematológica corroborado por Santos (1999), Gonzalez & Silva (2003), Bush (2004), Matana *et al.* (2008), Borges & Siqueira (2009) e Mackelly (2009).

5.12 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DO SORO DE RATOS MACHOS

FASE AGUDA

A análise da bioquímica plasmática permitiu a comparação paramétrica dos animais tratados com os animais do controle e veículo. Os resultados de cada parâmetro bioquímico dos ratos machos foram avaliados separadamente e correlacionados com todos os dados obtidos e órgãos correspondentes de interesse toxicológico. Os valores para análise estatística das médias e erro padrão, bem como os valores de referência da colônia em intervalos de

segurança foram revelados nas Tabelas 15 e 16, nos ratos machos tratados em 24 horas e 14 dias com dose única da amostra RF-11MAO, nas diluições de 1/30, 1/10 e 1/3.

Tabela 15 – Bioquímica plasmática dos ratos machos, após 24 horas tratados com a amostra RF-11MAO

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Veículo (Tween)	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Ácido úrico (mg/dL)	1,5 ± 0,4 [1,0 – 2,3]	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4
Albumina (g/dL)	2,7 ± 0,6 [1,7 – 4,0]	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,5	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2
ALT (U/L)	61,2 ± 9,8 [46,4 – 78,1]	40,4 ± 5,2	37,6 ± 9,4	46,3 ± 8,4	46,7 ± 14,6	52,32 ± 8,1
AST (U/L)	104,7 ± 19,6 [75,4 – 78,1]	92,5 ± 9,5	79,4 ± 7,1	83,3 ± 10,2	102,1 ± 10,8	103,9 ± 11,3
Bilir. Total (mg/dL)	0,11 ± 0,04 [0,05 – 0,19]	0,55 ± 0,42	0,23 ± 0,21	0,86 ± 1,35	0,70 ± 0,62	0,59 ± 0,23
Colesterol (mg/dL)	91,6 ± 14,7 [70,2 – 118,4]	88,7 ± 14,1	97,2 ± 19,9	85,8 ± 21,0	81,2 ± 16,1	*53,25 ± 5,6
Creatinina (mg/dL)	0,46 ± 0,20 [0,18 – 0,89]	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Fosf. Alcalina (U/L)	331,2 ± 67,4 [224,4 – 463,8]	223,2 ± 74,7	217,8 ± 52,2	274,3 ± 100,6	231,5 ± 73,5	321,2 ± 57,5
Glicose (mg/dL)	150,4 ± 14,0 [132,4 – 182,8]	135,4 ± 23,9	129,6 ± 23,3	134,2 ± 35,7	147,5 ± 7,8	91,9 ± 18,4
Prot. totais (g/dL)	6,7 ± 0,7 [5,8 – 8,4]	5,9 ± 0,8	5,7 ± 0,6	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,4	5,3 ± 0,2
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 24,7 [26 – 145]	53,4 ± 10,8	37,9 ± 7,8	52,9 ± 25,5	49,9 ± 21,8	71,2 ± 24,2
Uréia (mg/dL)	44,1 ± 16,3 [19,2 – 72,0]	46,9 ± 14,2	44,4 ± 13,0	35,8 ± 5,3	41,6 ± 7,0	52,0 ± 7,7

Os resultados são média ± desvio padrão de 5 animais por grupo.

Valores mínimo e máximo indicados entre parênteses

Tabela 16 - Bioquímica plasmática dos ratos machos, após 14 dias tratados com a amostra RF-11MAO

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Tween	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Ácido úrico (mg/dL)	1,5 ± 0,4 [1,0 – 2,3]	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,4
Albumina (g/dL)	2,7 ± 0,6 [1,7 – 4,0]	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,5
ALT (U/L)	61,2 ± 9,8 [46,4 – 78,1]	51,5 ± 7,0	43,3 ± 5,3	48,8 ± 8,1	46,7 ± 8,0	58,6 ± 7,3
AST (U/L)	104,7 ± 19,6 [75,4 – 78,1]	100,6 ± 8,3	99,18 ± 12,5	84,1 ± 15,9	107,1 ± 19,1	119,0 ± 32,4
Bilir. Total (mg/dL)	0,11 ± 0,04 [0,05 – 0,19]	0,18 ± 0,15	0,27 ± 0,25	0,46 ± 0,29	0,34 ± 0,27	0,74 ± 0,60
Colesterol (mg/dL)	91,6 ± 14,7 [70,2 – 118,4]	76,7 ± 28,1	61,9 ± 13,3	79,1 ± 11,6	77,9 ± 20,3	90,5 ± 18,8
Creatinina (mg/dL)	0,46 ± 0,20 [0,18 – 0,89]	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Fosf. Alcalina (U/L)	331,2 ± 67,4 [224,4 – 463,8]	182,4 ± 52,9	176,4 ± 36,9	204,5 ± 76,7	181,1 ± 35,1	195,2 ± 36,9
Glicose (mg/dL)	150,4 ± 14,0 [132,4 – 182,8]	125,7 ± 13,9	122,4 ± 19,2	120,3 ± 15,3	119,5 ± 7,1	117,1 ± 21,3
Prot. totais (g/dL)	6,7 ± 0,7 [5,8 – 8,4]	5,6 ± 0,4	5,6 ± 0,2	5,7 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,7 ± 0,3
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 24,7 [26 – 145]	45,2 ± 10,1	35,2 ± 6,7	47,3 ± 14,5	41,5 ± 8,9	46,9 ± 3,9
Uréia (mg/dL)	44,1 ± 16,3 [19,2 – 72,0]	38,9 ± 2,6	41,8 ± 6,4	40,4 ± 5,1	42,7 ± 4,8	43,0 ± 6,8

Os resultados são média ± desvio padrão de 5 animais por grupo.

Valores mínimo e máximo indicados entre parênteses.

A concentração plasmática de ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, quando apresenta níveis elevados, é um indicador de insuficiência renal (HELLSTEN *et al.*, 1999). A ação da amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados foi relacionada à concentração plasmática de ácido úrico, que apresentou estabilidade dos níveis séricos após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados se comparados aos do controle (Figura 49). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (1,2 - 7,5 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, que contribuam com a produção de dano renal nos animais da pesquisa relacionado à administração de RF-11MAO.

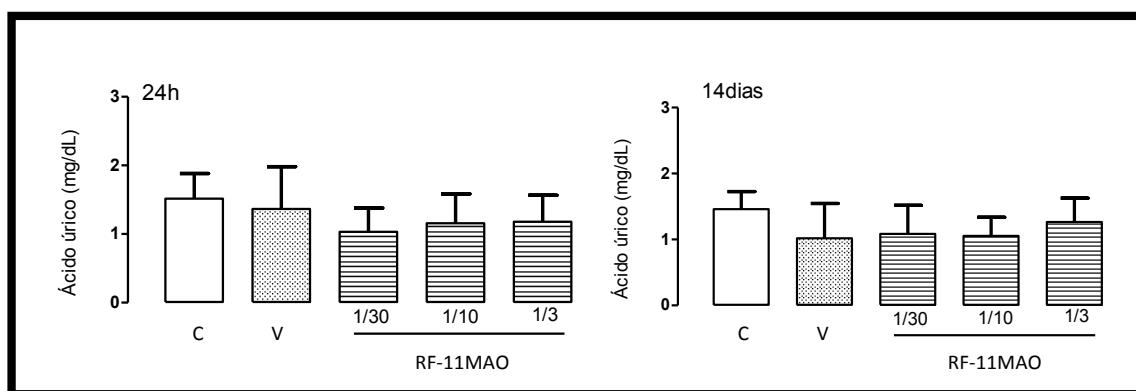


Figura 49 - Concentração de ácido úrico em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A albumina, proteína mais abundante no plasma, onde cerca de 40% encontra-se distribuída na circulação e o restante no espaço extracelular de alguns tecidos, como músculos, pele e intestinos. Essa proteína sintetizada no fígado tem como principal função a manutenção da pressão oncótica do plasma e o transporte de substâncias. Por essa razão, a diminuição de sua concentração plasmática por redução de síntese indica patologias hepáticas e desnutrição ou, o aumento das perdas indica nefropatia ou enteropatias perderoras de proteínas que acarretam, como consequência o edema e a hipovolemia, o que pode levar ao choque (VIEIRA *et al.*, 1995 e CAREGARO *et al.*, 1996).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não influenciou na concentração plasmática de albumina, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados se comparado aos do controle (Figura 50). Os níveis séricos encontrados estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (2,7 - 5,1 g/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, que confirmem produção de dano hepático ou renal nos animais tratados com a amostra RF-11MAO.

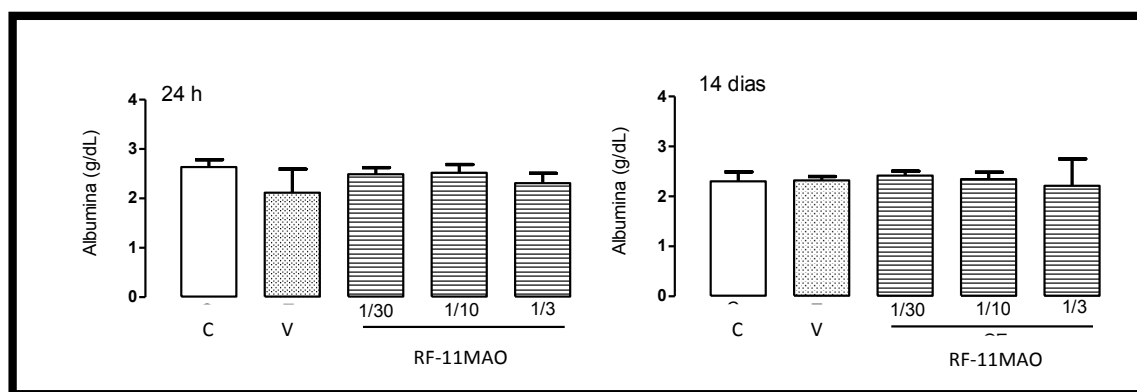


Figura 50 - Concentração de Albumina em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A enzima alanina amino transferase sintetizada no fígado é a indicadora mais sensível de hepatotoxicidade. O seu aumento indica lesão à membrana nas células hepáticas por ação tóxica. Uma droga não provoca dano algum no fígado sem interferir com a atividade normal da enzima alanina amino transferase (MARTIN *et al.*, 1981; VIJAYALAKSHM *et al.*, 2000; AL-HABORI *et al.*, 2002).

A amostra RF-11MAO diluída e fornecida em dose única nos ratos machos tratados não influenciou na concentração plasmática de alanina amino transferase (ALT), que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 51). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (45,7 - 80,8 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, pois a integridade hepática foi mantida sem dano na membrana do hepatócito por ação da amostra RF-11MAO nos animais tratados.

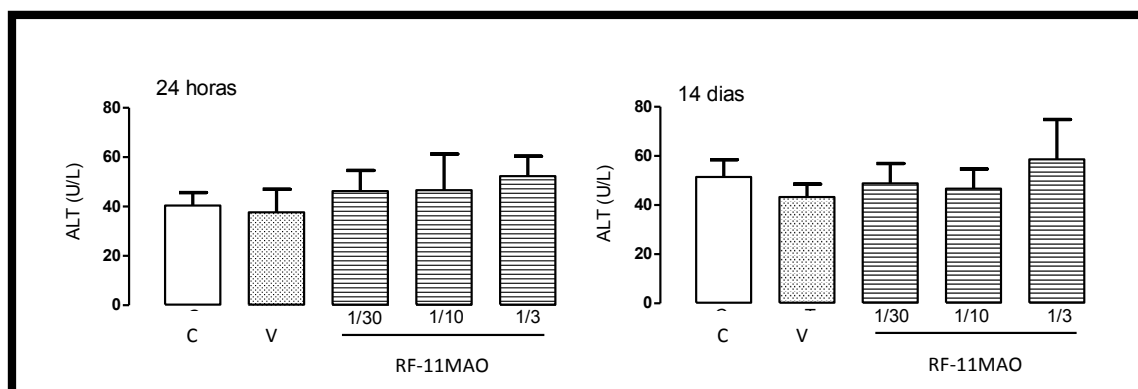


Figura 51 - Concentração plasmática de Alanina amino transferase em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em diversos tecidos, com maior destaque para fígado, músculos esquelético e cardíaco, sendo, portanto, bastante usada no diagnóstico de afecções acometendo esses órgãos (VALBERG, 2008).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não influenciou na concentração plasmática de aspartato amino transferase (AST), que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 52). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (56,8 - 128,0 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, quanto à toxicidade e danos à integridade do hepatócito, miócitos e miocárdio.

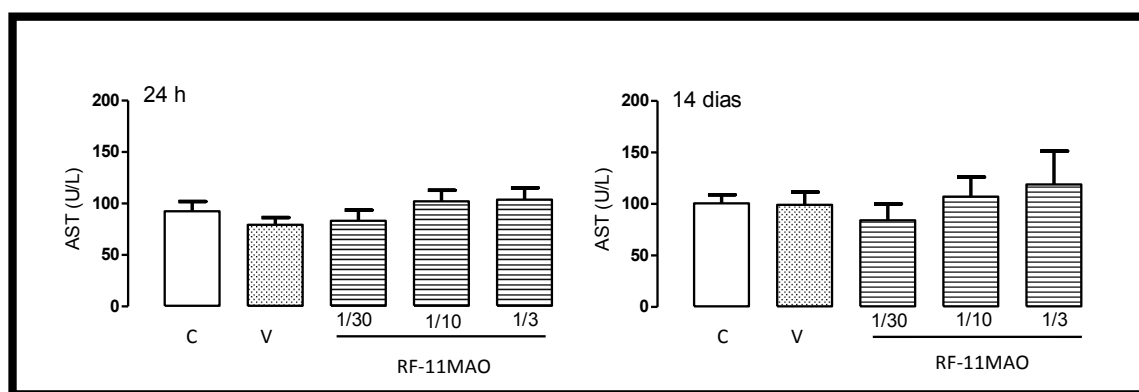


Figura 52 - Concentração plasmática de aspartato amino transferase em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A bilirrubina é um composto tetrapirrólico de cadeia aberta formado pelo catabolismo da molécula heme, mais precisamente da protoporfirina IX, componente do grupo porstético das hemoproteínas, entre as quais a hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalase e peroxidases. Apresenta-se como um pigmento amarelo e mais de 80% da bilirrubina é derivada da hemoglobina liberada com a destruição de eritrócitos circulantes maduros pelo sistema retículo-endotelial do baço, medula óssea e fígado.

A análise da bilirrubina total é utilizada para o diagnóstico diferencial de doenças hepáticas e biliares, além de outras causas de icterícia (VIEIRA *et al.*, 1995). A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não influenciou na concentração plasmática de bilirrubina, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 53). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (0,0 - 0,64 mg/dL) para ratos Wistar (SHARP & LA REGINA, 1998).

A partir da análise estatística das médias e erro padrão foi possível constatar que não houve diferenças significativas com relação à hepatite, anemia ou icterícia nos níveis estudados.

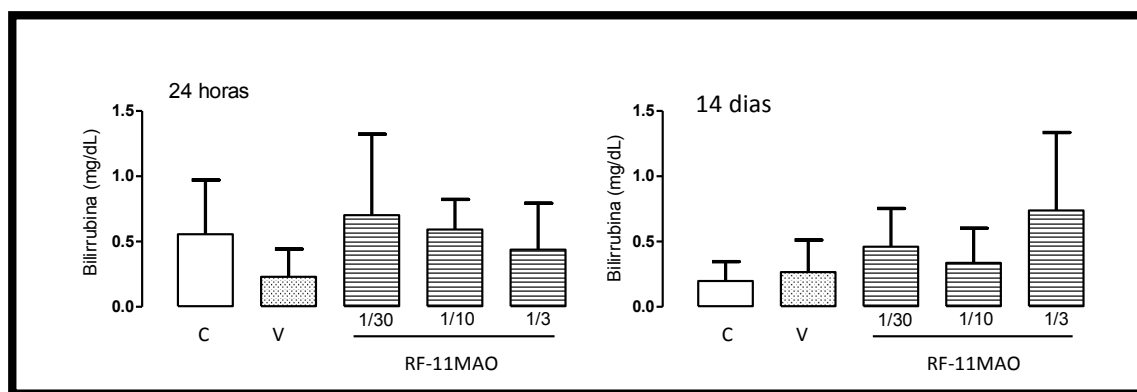


Figura 53 - Concentração plasmática de bilirrubina em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

O colesterol endógeno pode ser sintetizado a partir da acetil-CoA e os principais locais da síntese são o fígado, seguido do intestino, podendo produzi-lo em grandes quantidades. Também pode ser produzido nos testículos, ovários e córtex adrenal. O colesterol exógeno proveniente da dieta chega ao fígado, a partir de quilomícrons remanescentes, provocando a inibição da síntese da enzima da HMG-CoA redutase, diminuindo com isso a síntese endógena. O importante papel do colesterol na manutenção da heterogeneidade da membrana plasmática e na modulação de uma variedade de processos celulares incluindo sinalização, adesão e permeabilidade (VIEIRA *et al.*, 1995 e KARNELL *et al.*, 2005).

A dislipidemia é caracterizada por aumento de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (low density lipoprotein- LDL), triacilgliceróis e redução de lipoproteínas de alta densidade (high density lipoprotein-HDL) (NIEMEIJER-KANTERS *et al.*, 2001). A ação da amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados foi relacionada à concentração plasmática de colesterol, que apresentou redução significativa após 24 horas, de aproximadamente 40% em média nos animais tratados com a amostra diluída em 1/3 se comparados aos do controle (Figura 54).

A concentração plasmática de colesterol após 14 dias, manteve estabilidade nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 54). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (40,0 - 130,0 mg/dL) para ratos Wistar (HARKNESS & WAGNER, 1993).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram haver um dado significativo no tratamento com amostra diluída 1/3 em 24 horas, porém sem significado toxicológico de dislipidemia nos níveis pesquisados.

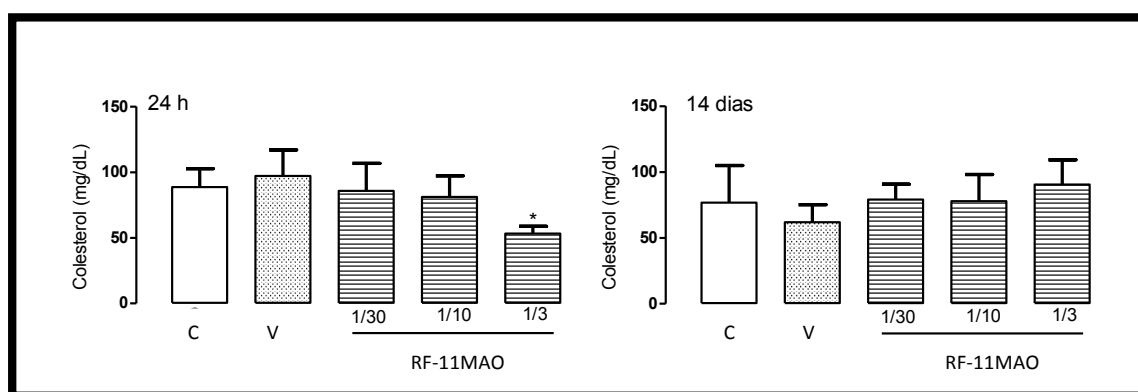


Figura 54 - Concentração plasmática de colesterol em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não-protéico formado a partir da desidratação da creatina. É utilizado como importante parâmetro para diagnosticar vários problemas renais. A interconversão de fosfocreatina e creatina é uma característica particular do processo metabólico da contração muscular. Uma parte da creatina livre no músculo não participa da reação e é convertida em creatinina espontaneamente (RHODEN *et al.*, 1998 e LEAL *et al.*, 2001). A creatinina avalia o ritmo de filtração glomerular, pois aumenta sua concentração no sangue à medida que reduz a taxa de filtração renal, por esse motivo é possível analisar o produto presente no sangue para identificar alterações renais (PEREIRA *et al.* 2006).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não influenciou na concentração plasmática de creatinina equivalente aos valores encontrados para o reagente Creatinina K, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 55). Os níveis séricos estão dentro da

faixa de valores normais mencionados na literatura (0,2 - 0,8 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), corroborado por Harkness & Wagner (1993) e Centro de Bioterismo da FMUSP (2008).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, nos níveis toxicológicos indicadores de necrose tecidual ou disfunção renal, com expressivo aumento de creatinina no plasma.

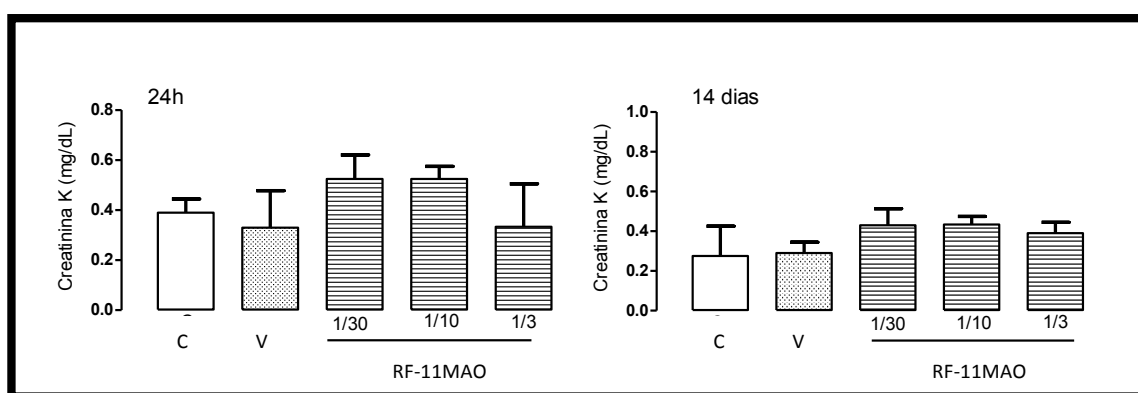


Figura 55 - Concentração plasmática do reagente creatinina K em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima de indução sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios intestinais e renais. Porém, os hepatócitos respondem pela maior parte da atividade sérica normal da FA. O aumento da produção da FA e de sua atividade sérica está relacionado a doenças hepáticas, hepatobiliares, doenças ósseas generalizadas que cursam com aumento de atividade osteoblástica, indução por drogas e várias doenças crônicas com a síndrome de Cushing, inclusive neoplasias (FARLEY & BAYLINK, 1986; NAGOYA *et al.*, 1991 e VIEIRA *et al.*, 1995).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não afetou a concentração plasmática de fosfatase alcalina, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 68). Os

níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (56,8 – 128,0 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas nos níveis indicadores de distúrbios hepatocelular, hepatobiliar e ósseo, induzidos pela amostra RF-11MAO nos animais tratados na pesquisa.

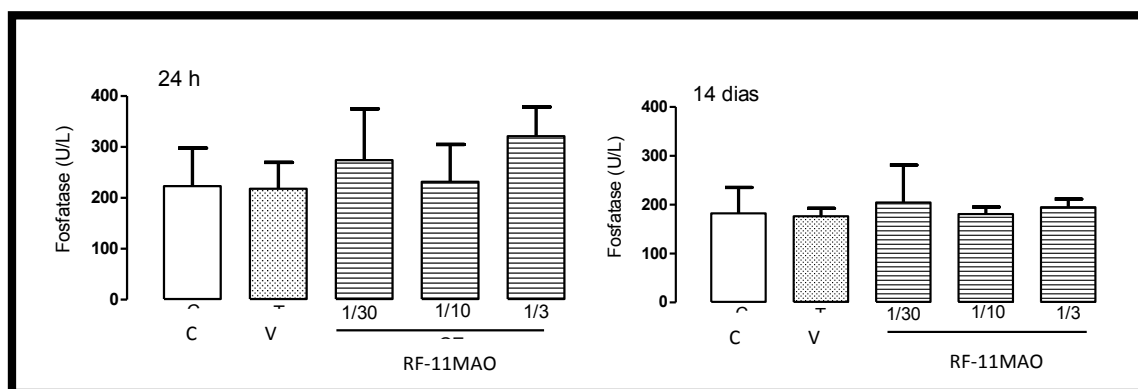


Figura 56 - Concentração plasmática de fosfatase alcalina em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A glicose é um dos principais substratos utilizados como fonte direta de energia pelos diferentes tecidos nos mamíferos de forma exógena. No entanto, se necessário, o fígado e o rim possuem a capacidade de liberar a glicose endógena armazenada sob a forma de glicogênio intracelular, pela ação enzimática da glicose-6-fosfatase, a montante do processo da glicogenólise (GIRARD & ASSAN, 1979).

O aumento da glicose plasmática ou hiperglicemia indica haver pouca insulina circundante; no entanto, a hipoglicemia indica o inverso e conseqüente descontrole metabólico. A insulina é produzida no pâncreas e é o mediador que permite a absorção da glicose pelas células (SALTIEL & KAHN, 2001; GREENFIELD & CAMPBELL, 2004).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não afetou a concentração plasmática de glicose, que apresentou-se estável após 24

horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 57). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (50,0 - 135,0 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), corroborado com o Centro de Bioterismo da FMUSP (2008). A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, sem dano pancreático ou distúrbio metabólico para o presente estudo.

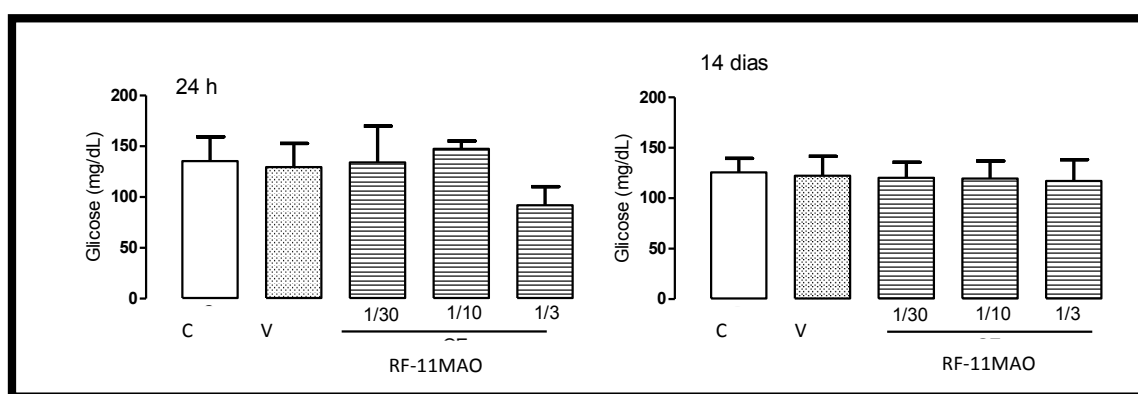


Figura 57 - Concentração de Glicose em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Os níveis séricos de proteínas totais no plasma sanguíneo são normalmente utilizados como parâmetro no controle da saúde e nutrição animal. A redução dos níveis indica casos de deficiência de proteína na dieta, insuficiência hepática, aproveitamento inadequado da proteína ingerida, hemorragias e perda da proteína intestinal ou renal por ausência de nutrição ou desnutrição. As concentrações plasmáticas de proteínas totais elevadas podem ser observadas nos casos de desidratação, bem como doenças renais crônicas (FAO, 1993; LINDSEY, 1996 e ZAIA *et al.*, 1998).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não afetou a concentração plasmática de proteínas totais, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle

(Figura 58). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (4,7 - 8,2 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, pois os níveis séricos não indicaram distúrbios nutricionais como desnutrição ou desidratação relacionados com a amostra testada nos animais.

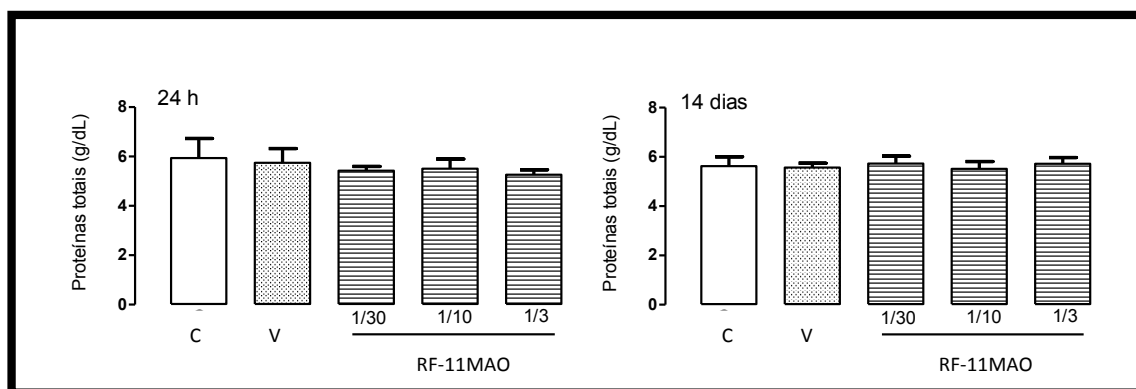


Figura 58 - Concentração plasmática de proteínas totais em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Os principais lipídeos do plasma humano são triglicerídeos, colesterol, ésteres do colesterol, fosfolípidios e ácidos graxos não-esterificados. Os triglicerídeos são substâncias insolúveis em água, transportados na forma de lipoproteínas, dos locais de origem como o intestino (origem exógena) e no fígado (origem endógena), para os locais de armazenamento e utilização. A elevação dos níveis séricos dos triglicerídeos está associada ao aumento do risco de doenças coronarianas e doenças vasculares (HENRY, 1998 e NAKAYA, 2002).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não afetou a concentração plasmática de proteínas totais, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 59). Os níveis séricos dos triglicerídeos estão dentro da faixa de valores normais

mencionados na literatura (26,0 - 145,0 mg/dL) para ratos Wistar (HARKNESS & WAGNER, 1993).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, nos níveis indicados para dislipidemias relacionados à pesquisa.

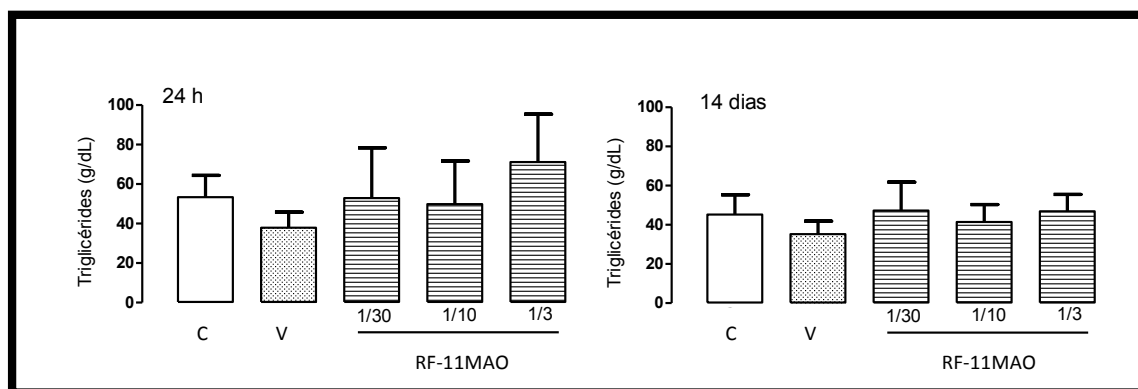


Figura 59 - Concentração plasmática de triglicérides em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A uréia é um produto nitrogenado não protéico, sintetizado no fígado por meio do ciclo da ornitina, usando a amônia derivada do catabolismo dos aminoácidos que resultam do catabolismo de proteínas exógenas (dieta) e endógenas. A excreção renal da uréia é conseguida pela filtração glomerular, e suas concentrações são inversamente proporcionais à taxa de filtração glomerular. O aumento da excreção causa severa diminuição da uréia sérica plasmática (<5,0 mg/dL), indicando insuficiência hepática crônica (cirrose hepática) ou alterações portossistêmica (COLES, 1984; CHEW & Di BARTOLA, 1992; WILLARD *et al.*, 1994).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos tratados não afetou a concentração plasmática de uréia, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 60). Os níveis séricos de uréia estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (5,0 - 29,0 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981; TEXEIRA *et al.*, 2000; EL HENDY *et al.*, 2001). A análise estatística das médias e erro

padrão demonstrou não haver diferenças significativas, nos níveis séricos de uréia indicados para insuficiência renal, cirrose hepática ou alterações portossistêmica, relacionados à dose nos animais tratados.

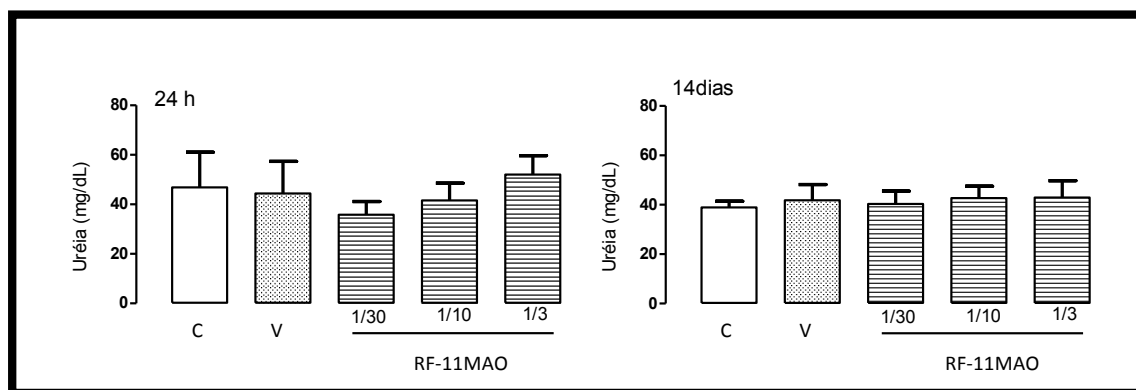


Figura 60 - Concentração plasmática de uréia em ratos machos, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

5.13 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DO SORO DE RATOS FÊMEAS

FASE AGUDA

A análise da bioquímica plasmática permitiu a comparação paramétrica dos animais tratados com os animais do controle e veículo. Os resultados de cada parâmetro bioquímico dos ratos fêmeas foram avaliados separadamente e correlacionados com todos os dados obtidos e órgãos correspondentes de interesse toxicológico. Os valores para análise estatística das médias e erro padrão, bem como os valores de referência da colônia em intervalos de segurança foram apresentados nas Tabelas 17 e 18, referentes aos ratos fêmeas tratados em 24 horas e 14 dias com dose única de RF-11MAO nas diluições de 1/30, 1/10 e 1/3.

Tabela 17 - Bioquímica plasmática dos ratos fêmeas após 24 horas tratadas com a amostra RF-11MAO

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Veículo (Tween)	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Ácido úrico (mg/dL)	1,7 ± 0,3 [1,0 – 2,3]	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,3	2,0 ± 1,2
Albumina (g/dL)	2,9 ± 0,6 [2,1 -4,2]	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,3
ALT (U/L)	50,9 ± 17,6 [22,8 – 80,8]	35,8 ± 4,4	40,0 ± 3,8	34,9 ± 8,6	34,2 ± 9,4	45,4 ± 8,9
AST (U/L)	96,0 ± 25,0 [74,0 – 166,2]	90,3 ± 26,5	81,0 ± 12,2	86,4 ± 16,4	88,7 ± 20,9	100,2 ± 12,6
Bilir. Total (mg/dL)	0,1 ± 0,04 [0,06 – 0,19]	0,60 ± 0,19	0,85 ± 0,21	1,45 ± 0,10	1,34 ± 0,42	0,82 ± 0,40
Colesterol (mg/dL)	88,2 ± 15,5 [63,5 – 118,0]	88,1 ± 15,0	95,6 ± 9,6	88,1 ± 17,1	87,1 ± 17,0	77,0 ± 13,3
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,21 [0,15 – 0,86]	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Fosf. Alcalina (U/L)	239,0 ± 65,3 [136,8 – 338,4]	122,2 ± 15,6	120,2 ± 56,9	148,3 ± 32,1	163,8 ± 37,7	166,4 ± 43,9
Glicose (mg/dL)	137,4 ± 9,5 [124,5 -160,0]	115,1 ± 35,7	122,0 ± 34,9	123,6 ± 47,1	115,9 ± 27,8	101,1 ± 18,5
Prot. totais (g/dL)	6,7 ± 0,8 [5,4 - 8,4]	5,7 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,6 ± 0,3	5,7 ± 0,2	6,3 ± 0,6
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 24,7 [26 – 145]	40,0 ± 8,5	41,7 ± 5,7	42,1 ± 19,0	41,7 ± 13,6	46,4 ± 7,2
Uréia (mg/dL)	42,3 ± 15,8 [19,4 – 68,6]	28,3 ± 1,1	29,3 ± 1,2	30,6 ± 2,4	30,2 ± 1,3	28,2 ± 1,3

Os resultados são média ± desvio padrão de 5 animais por grupo.

Valores mínimo e máximo indicados entre parênteses.

Tabela 18 - Bioquímica plasmática dos ratos fêmeas após 14 dias tratadas com a amostra RF-11MAO

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Tween	1/30	RF-11MAO 1/10	1/3
Ácido úrico (mg/dL)	1,7 ± 0,3 [1,0 – 2,3]	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,3
Albumina (g/dL)	2,9 ± 0,6 [2,1 -4,2]	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2
ALT (U/L)	50,9 ± 17,6 [22,8 – 80,8]	37,5 ± 4,6	37,0 ± 3,4	34,9 ± 4,7	34,9 ± 3,0	32,4 ± 3,7
AST (U/L)	96,0 ± 25,0 [74,0 – 166,2]	110,0 ± 18,2	105,8 ± 16,2	106,5 ± 19,7	102,3 ± 15,5	88,7 ± 12,7
Bilir. Total (mg/dL)	0,1 ± 0,04 [0,06 – 0,19]	0,66 ± 0,24	0,68 ± 0,08	0,78 ± 0,36	0,72 ± 0,36	1,04 ± 0,18
Colesterol (mg/dL)	88,2 ± 15,5 [63,5 – 118,0]	101,3 ± 19,1	98,6 ± 21,7	105,8 ± 16,0	102,2 ± 18,8	116,6 ± 10,5
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,21 [0,15 – 0,86]	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Fosf. Alcalina (U/L)	239,0 ± 65,3 [136,8 – 338,4]	85,6 ± 26,7	103,3 ± 15,1	105,0 ± 28,3	91,2 ± 15,1	81,5 ± 7,3
Glicose (mg/dL)	137,4 ± 9,5 [124,5 -160,0]	98,3 ± 45,3	91,5 ± 26,0	122,4 ± 24,7	128,8 ± 45,0	128,1 ± 27,0
Prot. totais (g/dL)	6,7 ± 0,8 [5,4 - 8,4]	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,3	5,8 ± 0,3
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 24,7 [26 – 145]	31,0 ± 4,7	27,0 ± 2,8	24,3 ± 6,1	29,7 ± 6,9	27,2 ± 6,3
Uréia (mg/dL)	42,3 ± 15,8 [19,4 – 68,6]	29,0 ± 0,9	29,1 ± 0,4	28,9 ± 1,3	29,2 ± 1,7	28,2 ± 1,0

Os resultados são média ± desvio padrão de 5 animais por grupo;

Valores mínimo e máximo indicados entre parênteses.

A concentração plasmática de ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, quando apresenta níveis elevados, é um indicador de insuficiência renal (HELLSTEN *et al.*, 1999). A ação da amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados foi relacionada à concentração plasmática de ácido úrico, que apresentou estabilidade dos níveis séricos após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados se comparados aos do controle (Figura 61).

Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (1,2 - 7,5 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981). O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver dados significantes ou significativos, que confirmem causar dano renal por ação da amostra RF-11MAO nos animais tratados.

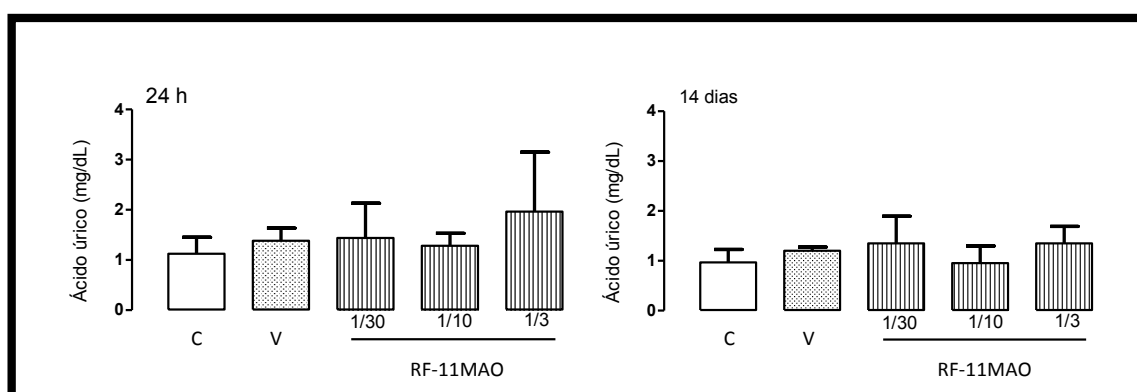


Figura 61 - Concentração plasmática de ácido úrico em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de albumina, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos ratos fêmeas tratados, se comparados aos do controle (Figura 62). Esses resultados representam os níveis séricos plasmáticos de albumina, proteína produzida no fígado e fundamental para manutenção da pressão oncótica do meio intra e extra vascular, não revelando redução drástica dessa proteína por ação tóxica, indicadora das

patologias crônicas do fígado como a cirrose hepática e no rim como a síndrome nefrótica (VIEIRA *et al.*, 1995 e CAREGARO *et al.*, 1996). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (2,7 - 5,1 g/dL) para ratos Wistar, conforme Mitruka & Rawnsley (1981). O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, que confirmem produção de dano hepático ou renal por ação da amostra RF-11MAO nos animais tratados.

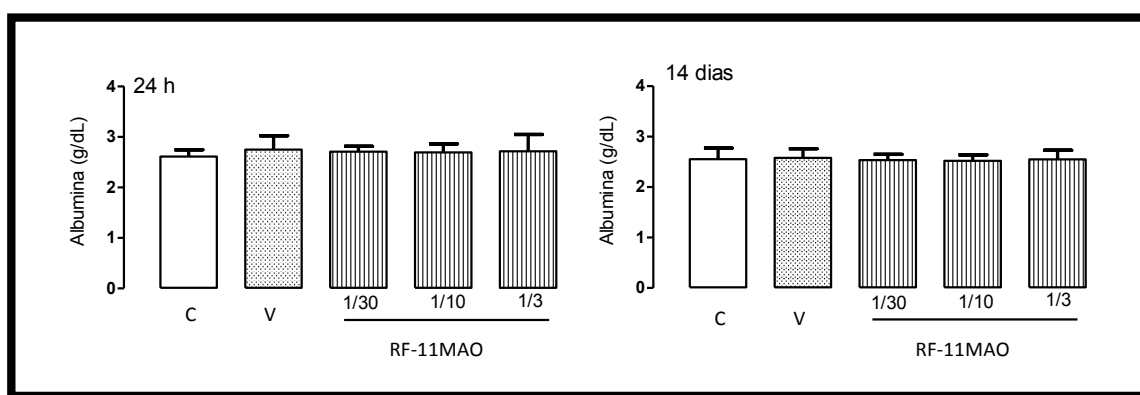


Figura 62 - Concentração plasmática de albumina em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A alanina amino transferase (ALT) é uma enzima sintetizada no fígado e indicadora mais sensível de hepatotoxicidade. Seu aumento indica lesão na membrana das células hepáticas por ação tóxica (MARTIN *et al.*, 1981 e AL-HABORI *et al.*, 2002). Uma droga não provoca dano algum no fígado sem interferir com a atividade normal dessa enzima (VIJAYALAKSHM *et al.*, 2000).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de alanina amino transferase (ALT), que manteve-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 63). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (45,7 - 80,8 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver dados significantes ou significativos, pois a integridade hepática foi mantida sem dano na membrana do hepatócito por ação da amostra RF-11MAO nos animais tratados.

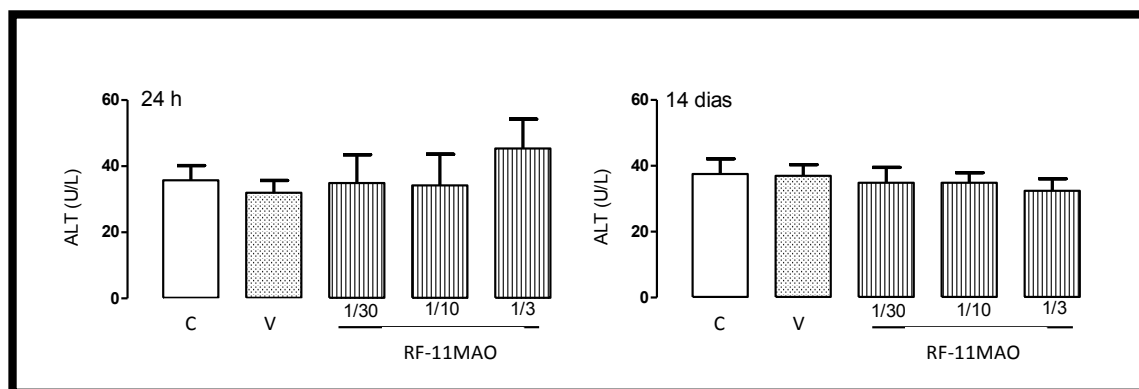


Figura 63- Concentração plasmática de alanina amino transferase em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em diversos tecidos, com maior destaque para fígado, músculos esquelético e cardíaco, sendo, portanto, bastante usada no diagnóstico de afecções acometendo esses órgãos (VALBERG, 2008).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de aspartato amino transferase (AST), que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 64). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (56,8 - 128,0 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, pois não apresentou dano a integridade do hepatócito, miócitos e miocárdio por toxicidade.

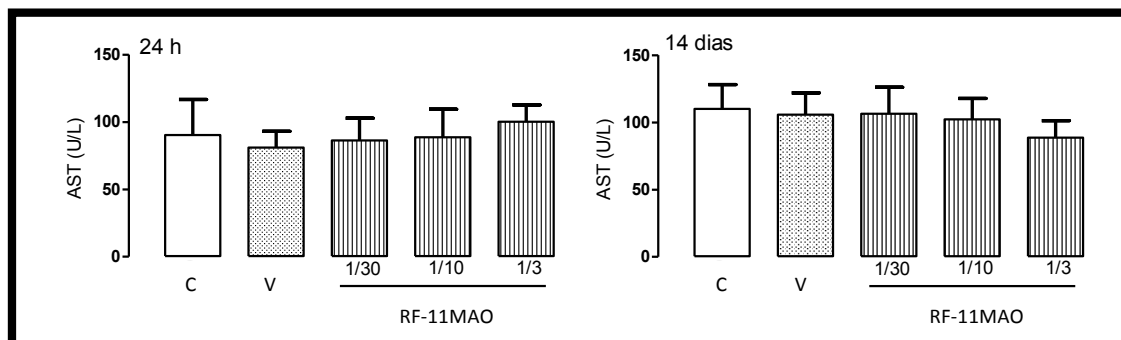


Figura 64 - Concentração plasmática de aspartato amino transferase em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A bilirrubina é um composto tetrapirrólico de cadeia aberta formado pelo catabolismo da molécula heme, mais precisamente da protoporfirina IX, componente do grupo porstético das hemoproteínas, entre as quais a hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalase e peroxidases. Trata-se de um pigmento amarelo que é derivado em cerca de 80% da hemoglobina liberada com a destruição de eritrócitos circulantes maduros pelo sistema retículo-endotelial do baço, medula óssea e fígado. A análise da bilirrubina total é útil para o diagnóstico diferencial de doenças hepáticas e biliares, além de outras causas de icterícia (VIEIRA *et al.*, 1995).

A ingestão da amostra RF-11MAO diluída em dose única nos ratos fêmeas tratados indicou que a concentração plasmática de bilirrubina apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias (Figura 65). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (0,0 - 0,64 mg/dL) para ratos Wistar (SHARP & LA REGINA, 1998). A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas de hepatite, anemia ou icterícia nos níveis estudados.

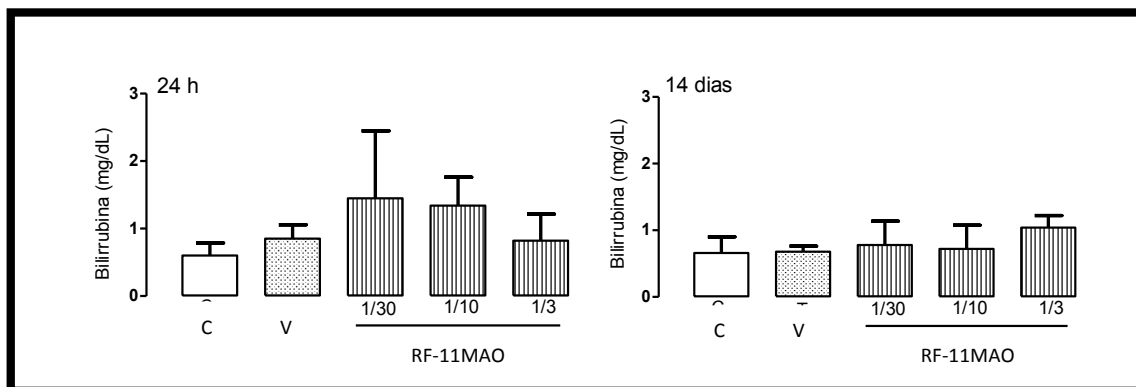


Figura 65 - Concentração plasmática de bilirrubina em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

O colesterol endógeno pode ser sintetizado a partir da acetil-CoA e produzido no fígado e intestino. O colesterol exógeno proveniente da dieta chega ao fígado a partir de quilomícrons remanescentes, diminuindo com isso, a síntese endógena. O importante papel do colesterol na manutenção da heterogeneidade da membrana plasmática e na modulação de uma variedade de processos celulares, incluindo sinalização, adesão e permeabilidade (VIEIRA *et al.*, 1995 e KARNELL *et al.*, 2005). A dislipidemia é caracterizada pelo aumento do colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade, triacilgliceróis e redução de lipoproteínas de alta densidade (NIEMEIJER-KANTERS *et al.*, 2001).

A RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não influenciou na concentração plasmática de colesterol, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, se comparados aos do controle (Figura 66). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (40,0 - 130,0 mg/dL) para ratos Wistar (HARKNESS & WAGNER, 1993). A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas de dislipidemia nos níveis pesquisados.

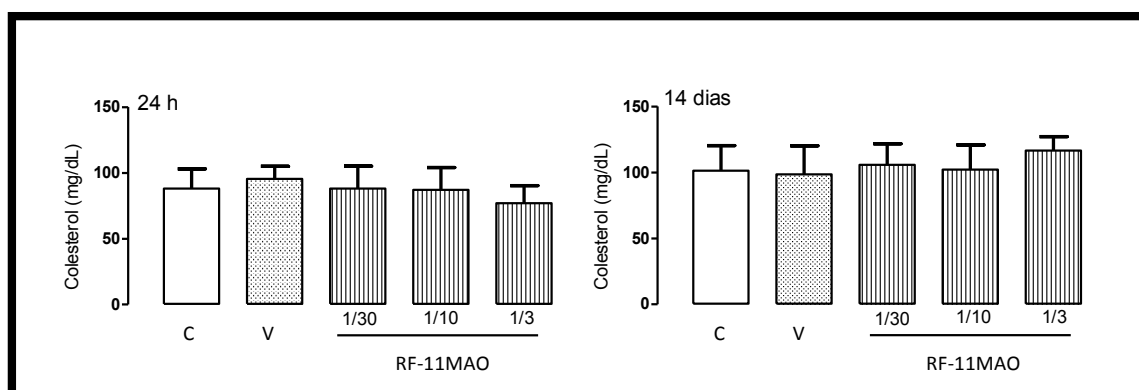


Figura 66 - Concentração plasmática de colesterol em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A creatinina é um importante parâmetro para diagnosticar vários problemas renais. Sua produção está relacionada ao processo metabólico da contração muscular, uma parte da creatina livre no músculo é convertida em creatinina espontaneamente (RHODEN *et al.*, 1998; LEAL *et al.*, 2001). A creatinina avalia o ritmo de filtração glomerular, pois sua concentração no sangue é aumentada à medida que reduz a taxa de filtração renal, o que contribui para analisar e identificar alterações renais a partir desse parâmetro (PEREIRA *et al.*, 2006).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de creatinina, equivalente aos valores encontrados para o reagente Creatinina K, que apresentou estabilidade após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 67). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (0,2 - 0,8 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), corroborado por Harkness & Wagner (1993) e Centro de Bioterismo da FMUSP (2008).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis indicadores de necrose tecidual ou disfunção renal, com expressivo aumento de creatinina no plasma.

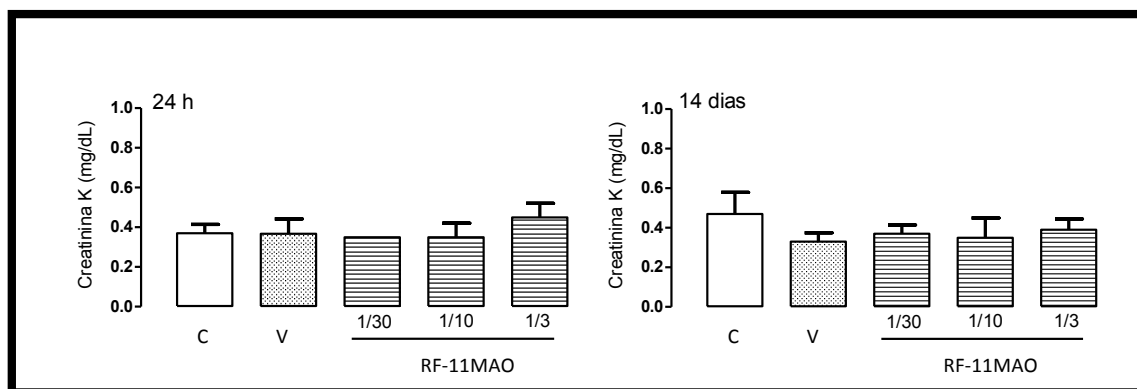


Figura 67 - Concentração plasmática do reagente creatinina K em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima de indução sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios intestinais e renais. O aumento da produção da FA e de sua atividade sérica está relacionado a doenças hepáticas, hepatobiliares, doenças ósseas, indução por drogas e várias doenças crônicas, inclusive neoplasias (FARLEY & BAYLINK, 1986; NAGOYA *et al.*, 1991; VIEIRA *et al.*, 1995).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de fosfatase alcalina, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 68). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (56,8 - 128,0 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas nos níveis indicadores de distúrbios hepatocelular, hepatobiliar e ósseo, induzidos pela amostra RF-11MAO nos animais tratados na pesquisa.

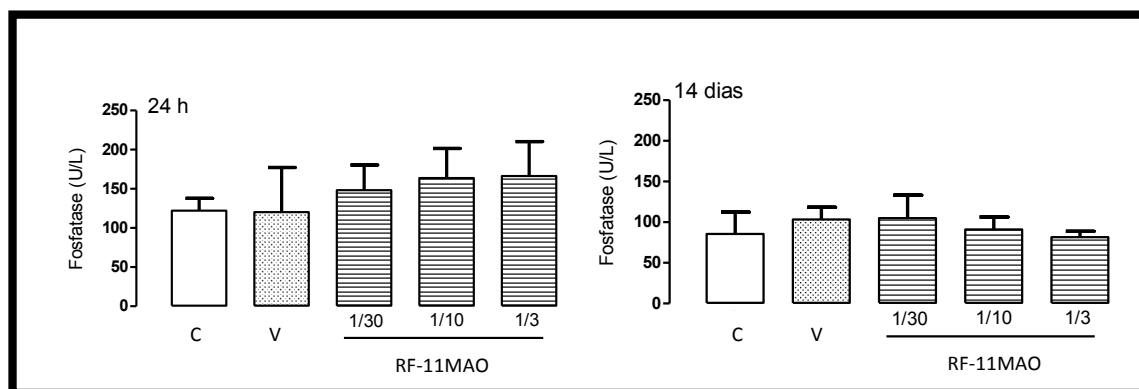


Figura 68 - Concentração plasmática de fosfatase alcalina em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

O aumento da glicose plasmática ou hiperglicemia é um indicativo de pouca insulina circundante, no entanto a hipoglicemia apresenta o inverso e conseqüente descontrole metabólico. A insulina produzida no pâncreas é o mediador que permite a absorção da glicose pelas células (SALTIEL & KAHN, 2001; GREENFIELD & CAMPBELL, 2004).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de glicose, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 69). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (50,0 - 135,0 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), corroborado com o Centro de Bioterismo da FMUSP (2008).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, sem dano pancreático ou distúrbio metabólico nos níveis estudados.

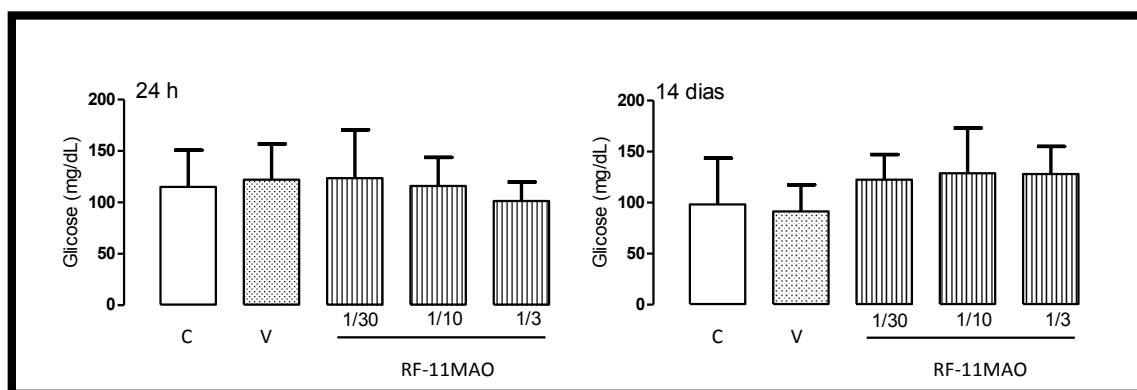


Figura 69 - Concentração plasmática de glicose em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Os níveis séricos de proteínas totais no plasma sanguíneo são normalmente utilizados como parâmetro no controle da saúde e nutrição animal. A redução dos níveis indica casos de deficiência de proteína na dieta, insuficiência hepática, aproveitamento inadequado da proteína ingerida, hemorragias e perda da proteína intestinal ou renal por ausência de nutrição ou desnutrição. Quando a concentração plasmática de proteínas totais aumenta pode ser observado nos casos de desidratação, bem como doenças renais crônicas (FAO, 1993; LINDSEY, 1996 e ZAIA *et al.*, 1998).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não influenciou na concentração plasmática de proteínas totais, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 70). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (4,7 - 8,2 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, os níveis não indicaram distúrbios nutricionais como desnutrição ou desidratação relacionados com a amostra testada nos animais.

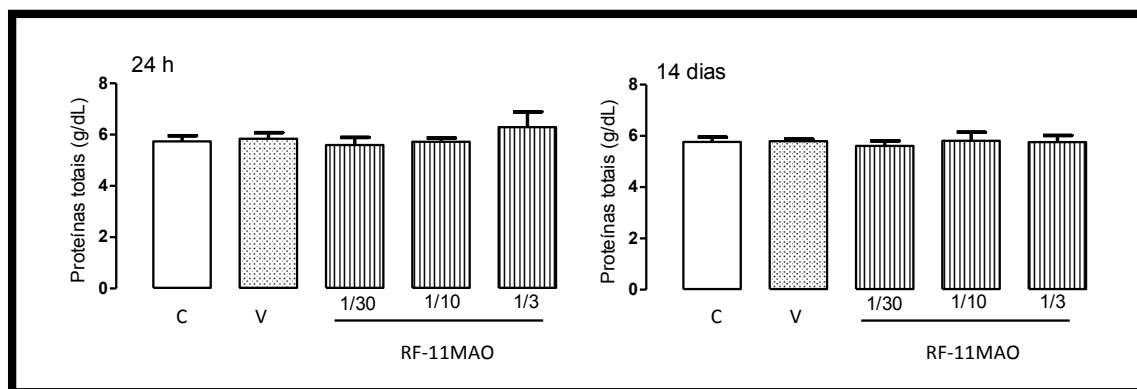


Figura 70 - Concentração plasmática de proteínas totais em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

A elevação dos níveis séricos dos triglicerídeos está associada a aumento do risco de doenças coronarianas e doenças vasculares (HENRY, 1998 e NAKAYA, 2002). A RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de proteínas totais, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 71). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (26,0 - 145,0 mg/dL) para ratos Wistar (HARKNESS & WAGNER, 1993). A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, nos níveis indicados para dislipidemias relacionados à atual pesquisa.

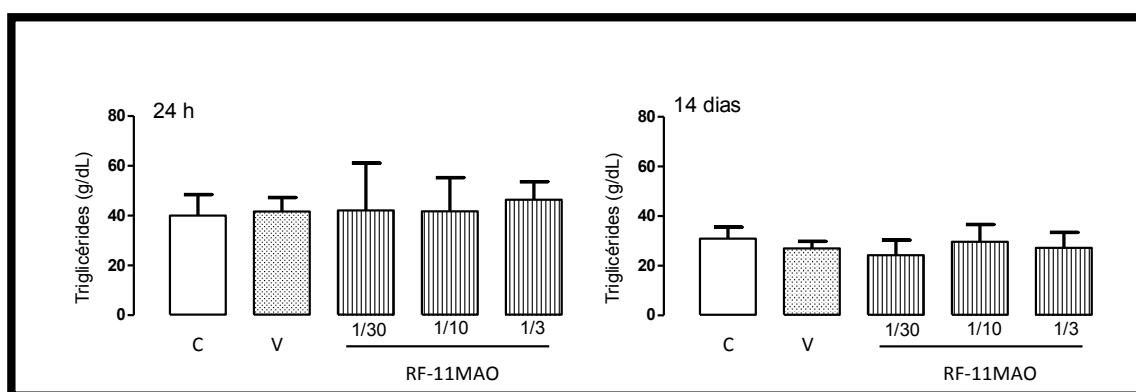


Figura 71 - Concentração plasmática de triglicérides em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

O aumento da excreção causa severa diminuição da uréia sérica plasmática (<5,0 mg/dL), indicando insuficiência hepática crônica (cirrose hepática) ou alterações portossistêmica (COLES, 1984; CHEW & Di BARTOLA, 1992; WILLARD *et al.*, 1994).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos fêmeas tratados não influenciou na concentração plasmática de uréia, que apresentou-se estável após 24 horas e 14 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 60). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (5,0 - 29,0 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981; TEXEIRA *et al.*, 2000; EL HENDY *et al.*, 2001).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, nos níveis séricos indicados para insuficiência renal, cirrose hepática ou alterações portossistêmica, relacionados à dose nos animais tratados.

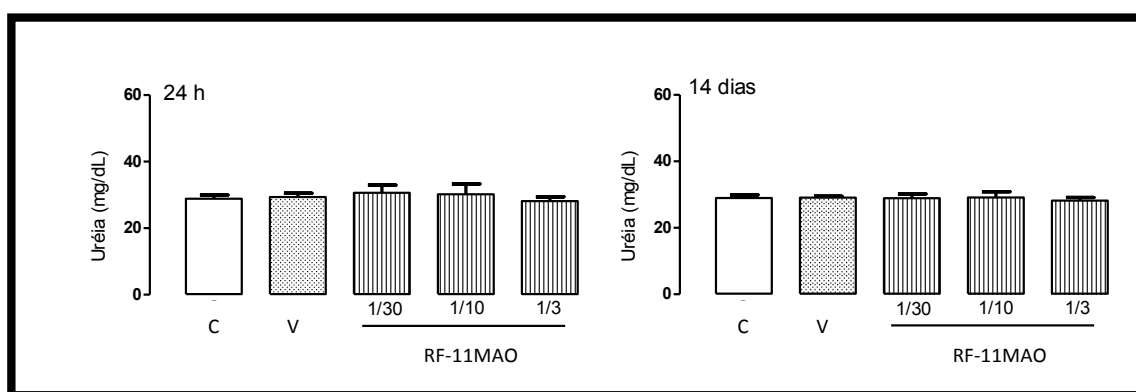


Figura 72 - Concentração plasmática de uréia em ratos fêmeas, após 24 horas e 14 dias da ingestão da RF-11MAO

5.14 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DO SORO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS FASE SUBCRÔNICA

A análise da bioquímica plasmática permitiu a comparação paramétrica dos animais tratados com os animais controle e veículo. Os resultados de cada parâmetro bioquímico dos ratos machos e fêmeas foram avaliados separadamente e correlacionados com todos os dados obtidos e órgãos correspondentes de interesse toxicológico. Os valores para análise estatística das médias e erro padrão, bem como os valores de referência da colônia em intervalos de segurança foram descritos nas Tabelas 19 e 20, nos ratos machos e fêmeas tratados em 28 dias com dose diária da amostra RF-11MAO nas diluições de 1/100, 1/30 e 1/10.

Tabela 19 - Bioquímica plasmática dos ratos machos, após 28 dias tratados com a amostra RF-11MAO

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Tween	1/100	RF-11MAO 1/30	1/10
Ácido úrico (mg/dL)	1,5 ± 0,4 [1,0 – 2,3]	1,5 ± 0,7	1,2 ± 0,5	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,5
Albumina (g/dL)	2,7 ± 0,6 [1,7 – 4,0]	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2
ALT (U/L)	61,2 ± 9,8 [46,4 – 78,1]	51,8 ± 7,9	49,5 ± 9,5	48,5 ± 7,6	51,6 ± 9,2	46,4 ± 8,7
AST (U/L)	104,7 ± 19,6 [75,4 – 78,1]	131,8 ± 28,9	118,2 ± 28,6	121,0 ± 37,2	112,1 ± 35,0	123,8 ± 27,8
Bilir. Total (mg/dL)	0,11 ± 0,04 [0,05 – 0,19]	0,34 ± 0,24	0,43 ± 0,27	0,46 ± 0,24	0,53 ± 0,32	0,61 ± 0,45
Colesterol (mg/dL)	91,6 ± 14,7 [70,2 – 118,4]	118,8 ± 27,5	98,2 ± 21,4	87,7 ± 21,3	89,8 ± 22,1	83,5 ± 17,7
Creatinina (mg/dL)	0,46 ± 0,20 [0,18 – 0,89]	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Fosf. Alcalina(U/L)	331,2 ± 67,4 [224,4 – 463,8]	163,9 ± 38,2	157,0 ± 33,3	148,6 ± 33,3	168,0 ± 26,2	166,4 ± 45,0
Glicose (mg/dL)	150,4 ± 14,0 [132,4 – 182,8]	102,7 ± 18,0	101,5 ± 14,1	99,3 ± 22,4	104,0 ± 15,8	92,0 ± 21,9
Prot. Totais (g/dL)	6,7 ± 0,7 [5,8 – 8,4]	5,4 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,5 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,6 ± 0,2
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 24,7 [26 – 145]	47,7 ± 22,2	41,8 ± 10,5	28,6 ± 4,8	36,8 ± 11,1	32,8 ± 10,6
Uréia (mg/dL)	44,1 ± 16,3 [19,2 – 72,0]	33,7 ± 3,2	33,2 ± 4,2	29,8 ± 3,6	31,5 ± 3,6	33,5 ± 7,1

Os resultados são média ± desvio padrão de 5 animais por grupo;
Valores mínimo e máximo indicados entre parênteses.

Tabela 20 - Bioquímica plasmática dos ratos fêmeas, após 28 dias tratadas com a amostra RF-11MAO

Tratamento Parâmetros	Valores referência da colônia	Controle	Tween	1/100	RF-11MAO 1/30	1/10
Ácido úrico (mg/dL)	1,7 ± 0,3 [1,0 – 2,3]	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,2
Albumina (g/dL)	2,9 ± 0,6 [2,1 – 4,2]	2,3 ± 0,01	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2
ALT (U/L)	50,9 ± 17,6 [22,8 – 80,8]	51,3 ± 12,1	47,8 ± 10,0	44,8 ± 10,2	47,1 ± 13,6	45,18 ± 11,6
AST (U/L)	96,0 ± 25,0 [74,0 – 166,2]	122,0 ± 29,1	110,0 ± 19,1	119,7 ± 28,4	98,1 ± 28,1	118,8 ± 43,8
Bilir. Total (mg/dL)	0,1 ± 0,04 [0,06 – 0,19]	0,88 ± 1,01	0,55 ± 0,17	1,06 ± 0,60	0,81 ± 0,38	0,98 ± 0,29
Colesterol (mg/dL)	88,2 ± 15,5 [63,5 – 118,0]	106,4 ± 11,4	80,3 ± 15,9	106,5 ± 14,0	96,0 ± 18,2	112,1 ± 26,6
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,21 [0,15 – 0,86]	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Fosf. Alcalina(U/L)	239,0 ± 65,3 [136,8 – 338,4]	147,6 ± 63,8	128,5 ± 44,3	115,8 ± 49,6	113,7 ± 13,5	137,9 ± 45,7
Glicose (mg/dL)	137,4 ± 9,5 [124,5 – 160,0]	118,2 ± 21,6	110,5 ± 20,5	108,0 ± 12,8	109,1 ± 20,1	105,0 ± 11,7
Prot. Totais (g/dL)	6,7 ± 0,8 [5,4 – 8,4]	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,9 ± 0,4
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 24,7 [26 – 145]	30,3 ± 9,6	27,5 ± 7,4	35,2 ± 8,4	29,1 ± 4,7	38,9 ± 10,6
Uréia (mg/dL)	42,3 ± 15,8 [19,4 – 68,6]	31,2 ± 6,5	30,5 ± 5,1	29,3 ± 4,8	28,7 ± 3,4	31,4 ± 4,8

Os resultados são média ± desvio padrão de 5 animais por grupo.
Valores mínimo e máximo indicados entre parênteses.

A concentração plasmática de ácido úrico quando está em níveis elevados é um indicador de insuficiência renal (HELLSTEN *et al.*, 1999). A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose diária nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de ácido úrico, que apresentou-se estável dos níveis séricos após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 73). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (1,2 - 7,5 mg/dl) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, que confirmem produção de dano renal por ação da amostra RF-11MAO nos animais tratados.

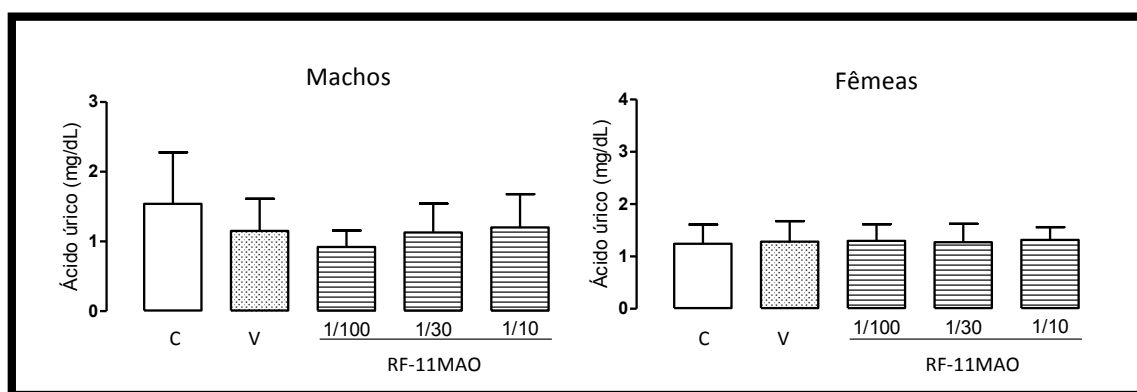


Figura 73 - Concentração plasmática de ácido úrico em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose diária nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de albumina, que apresentou-se estável após 28 dias, nos ratos machos e fêmeas tratados se comparado aos animais do controle (Figura 74). Esses resultados representam os níveis séricos plasmáticos de albumina, proteína fundamental produzida no fígado, para manutenção da pressão oncótica do meio intra e extra vascular, não revelando redução drástica dessa proteína por ação tóxica, indicadora das patologias crônicas do fígado como a cirrose hepática e no rim como a síndrome nefrótica (VIEIRA *et al.*, 1995 e CAREGARO *et al.*, 1996).

Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (2,7 - 5,1 g/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981). O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, que confirmem produção de dano hepático ou renal por ação da amostra RF-11MAO nos animais tratados.

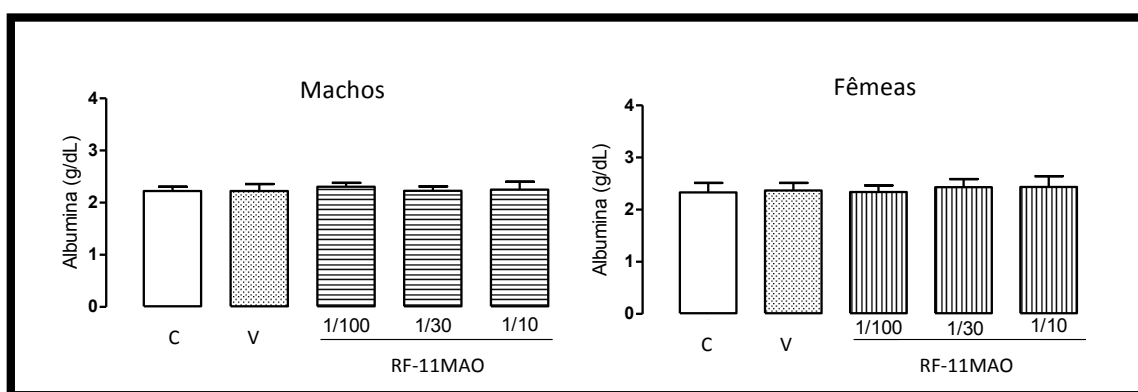


Figura 74 - Concentração plasmática de albumina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A alanina amino transferase (ALT) é uma enzima sintetizada no fígado, indicadora mais sensível de hepatotoxicidade, seu aumento indica lesão à membrana nas células hepáticas por ação tóxica (MARTIN *et al.*, 1981 e AL-HABORI *et al.*, 2002). Uma droga não provoca dano algum no fígado sem interferir com a atividade normal dessa enzima (VIJAYALAKSHM *et al.*, 2000).

A RF-11MAO diluída e administrada em dose diária nos ratos machos e fêmeas tratados não influenciou na concentração plasmática de alanina amino transferase (ALT), que manteve-se estável após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 75). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (45,7 - 80,8 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

O resultado da análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, pois a integridade hepática foi mantida sem dano na membrana do hepatócito após o tratamento com RF-11MAO.

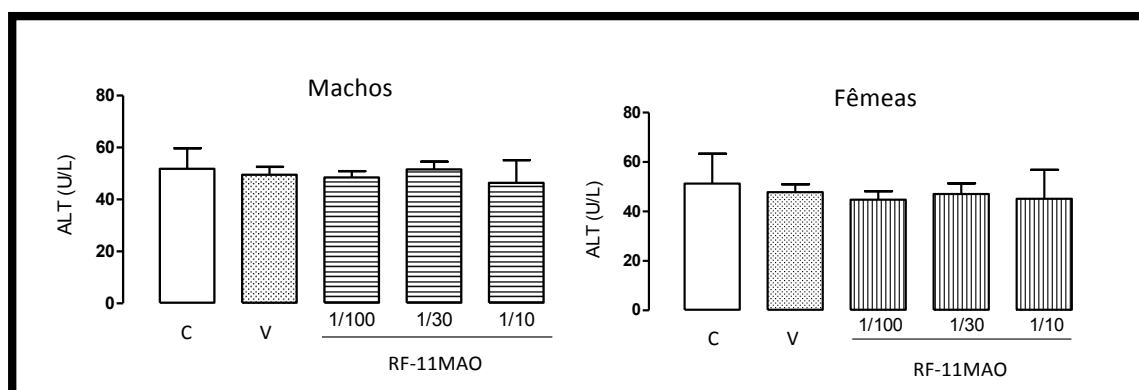


Figura 75 - Concentração plasmática de alanina amino transferase em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em diversos tecidos, com maior destaque para fígado, músculos esquelético e cardíaco, sendo bastante utilizada no diagnóstico de afecções acometendo esses órgãos (VALBERG, 2008).

A RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de aspartato amino transferase (AST), que apresentou-se estável após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 76). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (56,8 – 128,0 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, pois não foi constatado dano a integridade do hepatócito, miócitos e miocárdio por toxicidade.

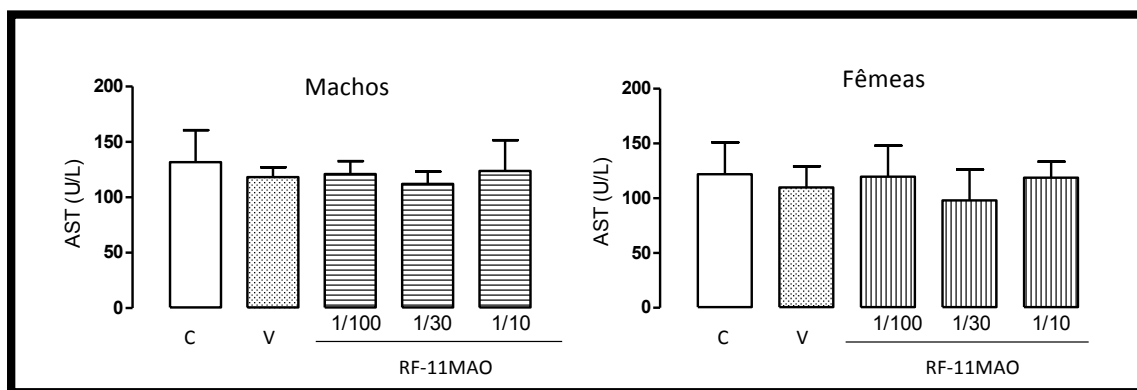


Figura 76 - Concentração plasmática de aspartato amino transferase em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A bilirrubina é derivada da hemoglobina liberada com a destruição de eritrócitos circulantes maduros pelo sistema retículo-endotelial do baço, medula óssea e fígado em mais de 80%. Apresenta-se como um pigmento de coloração amarelada e a sua análise total é útil para o diagnóstico diferencial de doenças hepáticas e biliares, além de outras causas de icterícia (VIEIRA *et al.*, 1995).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de bilirrubina, que manteve-se estável após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 77). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (0,0 - 0,64 mg/dL) para ratos Wistar (SHARP & LA REGINA, 1998). A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas de hepatite, anemia ou icterícia nos níveis estudados.

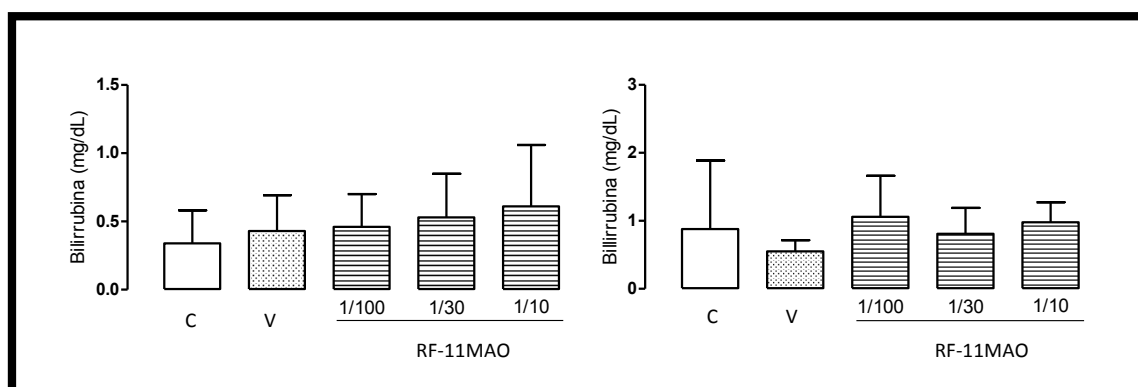


Figura 77 - Concentração plasmática de bilirrubina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

O colesterol apresenta importante função na manutenção da heterogeneidade da membrana plasmática e na modulação de uma variedade de processos celulares incluindo sinalização, adesão e permeabilidade (VIEIRA *et al.*, 1995 e KARNELL *et al.*, 2005). A dislipidemia é caracterizada por aumento de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade, triacilgliceróis e redução de lipoproteínas de alta densidade (NIEMEIJER-KANTERS *et al.*, 2001).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não influenciou na concentração plasmática de colesterol, que apresentou-se estável após 28 dias, nos animais tratados se comparados aos do controle (Figura 78). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (40,0 - 130,0 mg/dL) para ratos Wistar (HARKNESS & WAGNER, 1993).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas de dislipidemia nos níveis pesquisados.

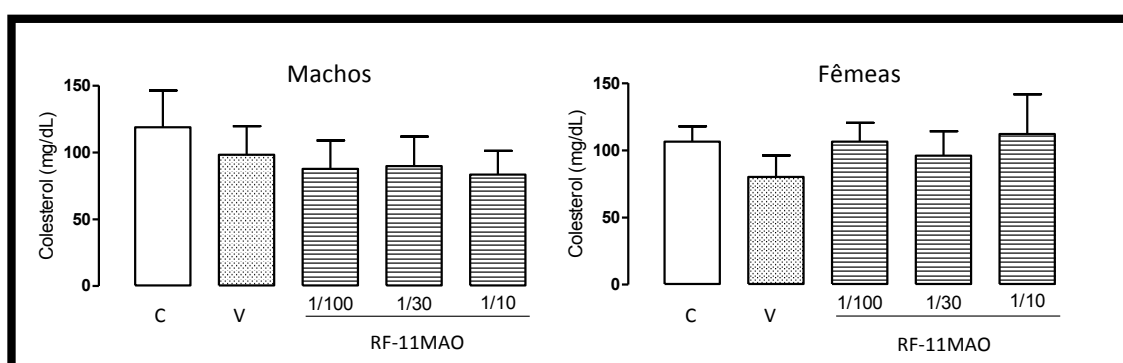


Figura 78 - Concentração plasmática de colesterol em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A creatinina é um importante parâmetro para diagnosticar vários problemas renais, sua produção está relacionada ao processo metabólico da contração muscular, uma parte da creatina livre no músculo é convertida em creatinina espontaneamente (RHODEN *et al.*, 1998 e LEAL *et al.*, 2001). A creatinina avalia o ritmo de filtração glomerular, aumenta sua

concentração no sangue à medida que reduz a taxa de filtração renal, com essa característica é possível analisar e identificar alterações renais (PEREIRA *et al.* 2006).

A RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de creatinina equivalente os valores encontrados para o reagente Creatinina K, que apresentou estabilidade após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 79). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (0,2 - 0,8 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), corroborado por Harkness & Wagner (1993) e Centro de Bioterismo da FMUSP (2008).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis indicadores de necrose tecidual ou disfunção renal, com expressivo aumento de creatinina no plasma.

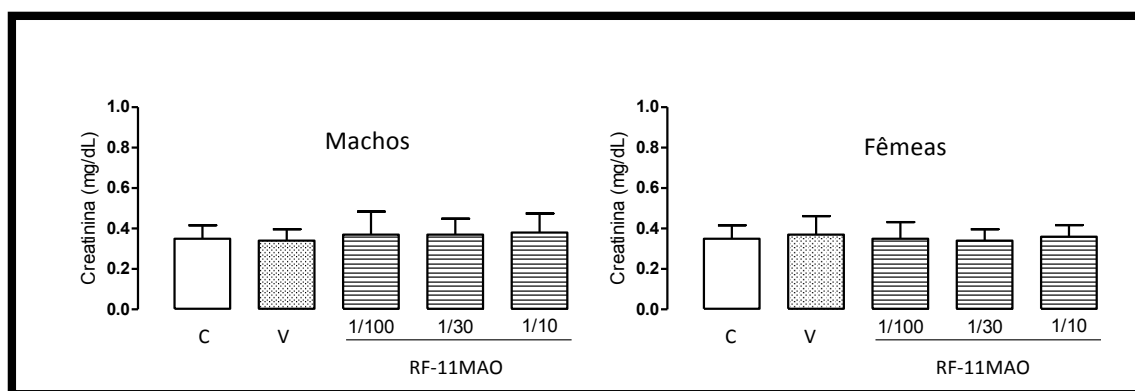


Figura 79 - Concentração plasmática de creatinina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima de indução sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios intestinais e renais. O aumento da produção da FA e de sua atividade sérica está relacionado a doenças hepáticas, hepatobiliares, doenças ósseas, indução por drogas e várias doenças crônicas, inclusive neoplasias (FARLEY & BAYLINK, 1986; NAGOYA *et al.*, 1991 e VIEIRA *et al.*, 1995).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de fosfatase alcalina, que apresentou estabilidade após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 80). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (56,8 - 128,0 U/L) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas nos níveis indicadores de distúrbios hepatocelular, hepatobiliar e ósseo, induzidos pelo tratamento com RF-11MAO nos animais tratados na pesquisa.

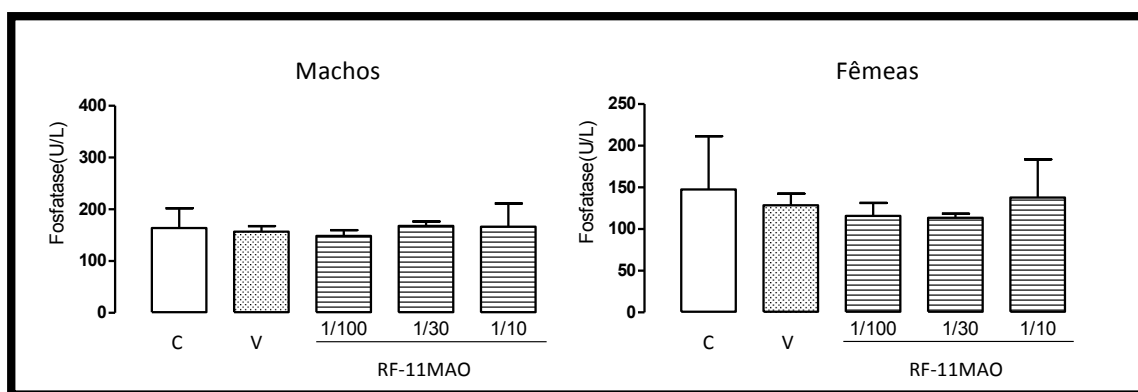


Figura 80 - Concentração plasmática de fosfatase alcalina em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

Os valores alterados de glicose plasmática, como hiperglicemia indica haver pouca insulina circundante, mas o inverso ocorre na hipoglicemia, com conseqüente descontrole metabólico. A insulina é produzida no pâncreas e trata-se de mediadora, que permite a absorção da glicose pelas células (SALTIEL & KAHN, 2001 e GREENFIELD & CAMPBELL, 2004).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de glicose, que apresentou estabilidade após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 81). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura

(50,0 - 135,0 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), corroborado com o Centro de Bioterismo da FMUSP (2008).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver dados diferenças significativas, sem dano pancreático ou distúrbio metabólico para o presente estudo.

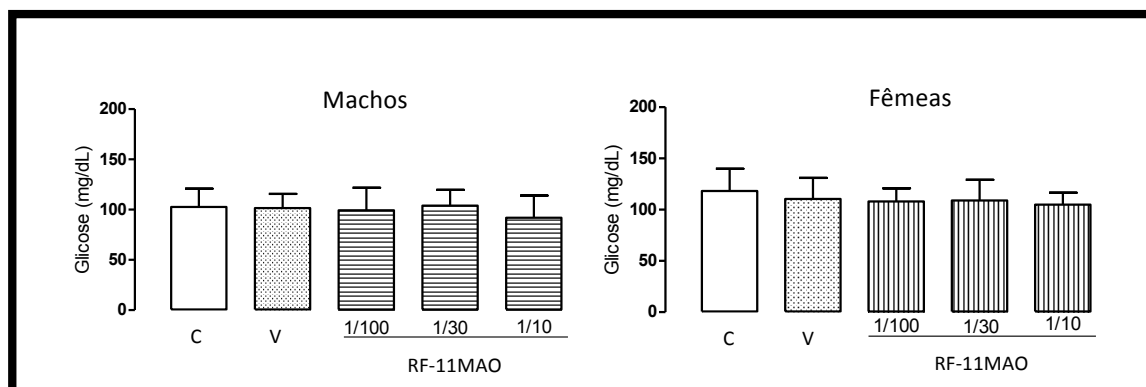


Figura 81 - Concentração plasmática de glicose em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

Os níveis séricos de proteínas totais no plasma sanguíneo são normalmente utilizados como parâmetro no controle da saúde e nutrição animal. A redução dos níveis séricos indica casos de deficiência de proteína na dieta, insuficiência hepática, aproveitamento inadequado da proteína ingerida, hemorragias e perda da proteína intestinal ou renal por ausência de nutrição ou desnutrição. Quando a concentração plasmática de proteínas totais aumenta pode ser observado nos casos de desidratação, bem como doenças renais crônicas (FAO, 1993; LINDSEY, 1996 e ZAIA *et al.*, 1998).

A RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de proteínas totais, que apresentou estabilidade após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 82). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (4,7 - 8,2 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstraram não haver diferenças significativas, os níveis não indicaram distúrbios nutricionais como desnutrição ou desidratação relacionados com a amostra testada nos animais.

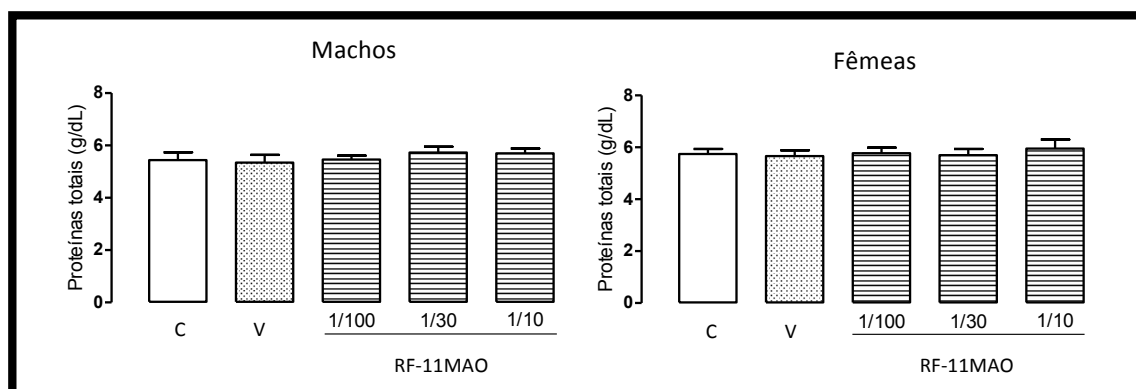


Figura 82 - Concentração plasmática de proteínas totais em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

A elevação dos níveis séricos dos triglicerídeos está associada ao aumento do risco de doenças coronarianas e doenças vasculares (HENRY, 1998 e NAKAYA, 2002). O tratamento com RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas foi relacionado à concentração plasmática de proteínas totais, que apresentou estabilidade após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 83). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (26,0 - 145,0 mg/dL) para ratos Wistar (HARKNESS & WAGNER, 1993).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, nos níveis indicados para dislipidemias relacionados à pesquisa em foco.

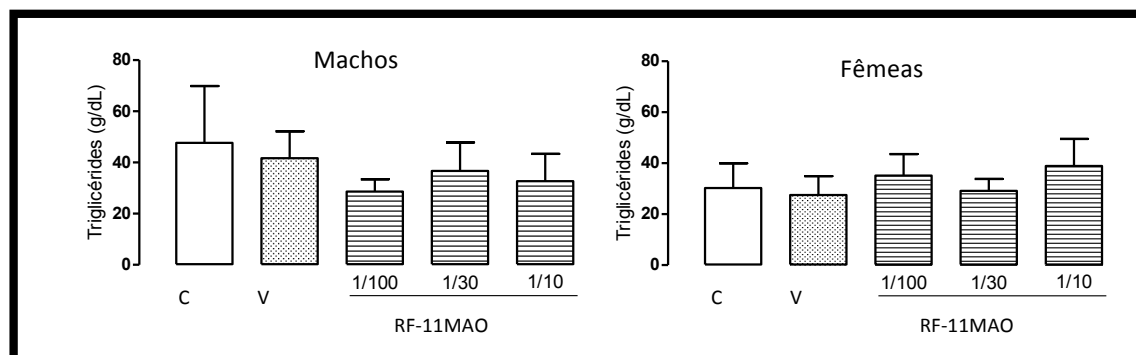


Figura 83 - Concentração plasmática de triglicerídeos em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

O aumento da excreção da uréia causa severa diminuição em nível sérico plasmático (<5,0 mg/dL), indicando insuficiência hepática crônica (cirrose hepática) ou alterações portossistêmica (COLES, 1984; CHEW & Di BARTOLA, 1992 e WILLARD *et al.*, 1994).

A amostra RF-11MAO diluída e administrada em dose única nos ratos machos e fêmeas tratados não afetou a concentração plasmática de uréia, que apresentou estabilidade após 28 dias, nos animais tratados em relação aos do controle (Figura 60). Os níveis séricos estão dentro da faixa de valores normais mencionados na literatura (5,0 - 29,0 mg/dL) para ratos Wistar (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981; TEXEIRA *et al.*, 2000 e EL HENDY *et al.*, 2001).

A análise estatística das médias e erro padrão demonstrou não haver diferenças significativas, nos níveis séricos indicados para insuficiência renal, cirrose hepática ou alterações portossistêmica, relacionados à dose nos animais tratados.

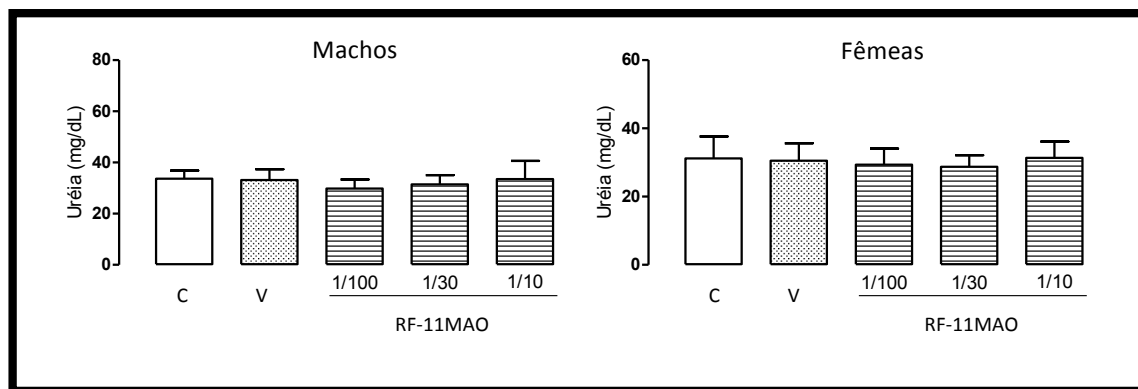


Figura 84 - Concentração plasmática de uréia em ratos machos e fêmeas, após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

5.15 DETERMINAÇÃO DAS MASSAS DOS ÓRGÃOS

A massa corporal dos ratos Wistar e a determinação das massas absoluta e relativa de seus órgãos são indicadores do estado de saúde e da função de cada órgão no animal. Com o objetivo de observar alterações nesses parâmetros foi monitorada, a mudança de massa corporal dos animais durante o tratamento.

Após a eutanásia foram retirados para a análise os seguintes órgãos: cérebro, timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rim, baço, adrenais, hipófise, testículo, próstata e vesícula seminal. A pesagem da massa absoluta (g) de todos os órgãos foi realizada com balança analítica e o valor foi dividido pela massa do cérebro (controle estável) para obtenção da massa relativa (%) de cada órgão e composição de dados para análise estatística.

Os resultados das experiências *in vivo* e *in vitro* foram expressos como médias ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (S) e o erro (Sx). A significância estatística relativamente ao grupo controle foi determinada pelo test *t* de Student (para comparação de 2 grupos) ou por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett (para comparar mais de 2 grupos). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5.15.1 TRATAMENTO AGUDO 24 HORAS EM RATOS MACHOS

Os ratos machos que foram submetidos ao tratamento agudo não apresentaram alterações macroscópicas observáveis no timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rim, baço, adrenais, hipófise, testículo, próstata e vesícula seminal.

Na análise estatística dos ratos machos foram observadas diferenças significantes sobre os pesos do fígado dos animais tratados com a dose de 1/3 e 1/10, da próstata com a dose 1/3 e das vesículas seminais com a dose 1/3, 1/30 e respectivo veículo.

Nos índices de pesos relativos (%) foram observadas diferenças significantes no baço dos animais tratados com a dose 1/10, na próstata com a dose 1/3 e nas vesículas seminais com a dose 1/3, 1/30 e respectivo veículo.

Contudo não apresentou significado toxicológico, se relacionado com os dados obtidos nas análises da bioquímica plasmática e histopatológica dos tecidos hepático, prostático,

vesicular seminal e esplênico, dos animais submetidos a ação da amostra RF-11MAO em dose única, após 24 horas nos grupos estudados (Tabelas 21 - 22).

Tabela 21 - Pesos corporais e dos órgãos de ratos machos tratados em 24 horas

Peso\Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Corporal (g)	318,0 ± 5,4	302,0 ± 5,5	299,5 ± 6,2	315,3 ± 3,1	304,0 ± 9,0
Cérebro (g)	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Timo (mg)	309,6 ± 20,7	356,3 ± 31,0	320,3 ± 40,5	365,7 ± 59,3	376,3 ± 54,8
Coração (mg)	106,4 ± 35,5	105,7 ± 16,4	105,0 ± 28,3	112,6 ± 42,4	111,2 ± 5,5
Pulmão (g)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Fígado (g)	9,4 ± 0,2	9,8 ± 0,4	11,1 ± 0,4*	11,2 ± 0,8*	10,2 ± 0,2
Rins^a (g)	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Baço (mg)	515,4 ± 22,1	553,3 ± 8,0	495,4 ± 27,2	476,6 ± 21,3	570,0 ± 25,0
Hipófise (mg)	10,2 ± 0,6	9,4 ± 0,1	8,9 ± 0,2	10,7 ± 0,7	10,3 ± 0,2
Gl. Salivar^a (mg)	542,8 ± 18,0	534,7 ± 28,9	454,3 ± 19,6	560,7 ± 34,4	522,6 ± 9,7
Adrenais^a (mg)	42,5 ± 1,6	43,4 ± 2,2	48,1 ± 2,6	46,3 ± 1,6	43,3 ± 3,1
Testículos^a (mg)	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Próstata (mg)	530,7 ± 15,6	471,5 ± 30,4	387,2 ± 28,0*	500,0 ± 30,1	554,7 ± 57,3
Ves. Seminais (mg)	410,5 ± 21,0	307,3 ± 21,3*	284,5 ± 17,0**	314,5 ± 23,1	322,1 ± 24,1*

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

*, ** - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05; **p<0,01 – Teste de Dunnet)

Tabela 22 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos machos tratados em 24 horas

Relação: órgão/cérebro (g/gx10 ⁻²) \Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Timo	23,1 ± 1,8	25,4 ± 2,3	24,0 ± 3,5	27,1 ± 5,0	28,0 ± 4,5
Coração	79,0 ± 2,0	75,4 ± 1,7	77,4 ± 3,0	82,5 ± 4,0	82,3 ± 2,6
Pulmão	106,4 ± 5,0	96,3 ± 6,8	100,4 ± 9,1	110,0 ± 6,0	98,4 ± 6,5
Fígado	697,4 ± 26,4	697,3 ± 34,8	820,5 ± 41,0	824,1 ± 74,0	758,0 ± 43,7
Rins^a	163,5 ± 7,8	169,1 ± 5,0	161 ± 17,0	174,3 ± 9,5	177,6 ± 11,0
Baço	38,2 ± 1,2	39,5 ± 1,0	36,5 ± 2,1	47,6 ± 2,1*	42,1 ± 2,0
Hipófise	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Gl. Salivar^a	40,3 ± 1,3	38,1 ± 2,0	35,5 ± 1,1	41,2 ± 3,3	38,7 ± 1,4
Adrenais^a	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Testículos^a	239,9 ± 8,4	240,4 ± 8,2	248,0 ± 9,7	254,4 ± 8,7	253,8 ± 12,1
Próstata	39,4 ± 0,7	33,6 ± 2,1	28,4 ± 1,7*	36,6 ± 2,2	41,0 ± 4,2
Ves. Seminais^a	30,4 ± 1,4	21,9 ± 1,5**	21,0 ± 1,4**	25,3 ± 2,0	24,0 ± 2,2*

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

*, ** - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05; **p<0,01 – Teste de Dunnet)

5.15.2 TRATAMENTO AGUDO 24 HORAS EM RATOS FÊMEAS

Os ratos fêmeas que foram submetidos ao tratamento agudo não apresentaram alterações macroscópicas observáveis no timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rins, baço, adrenais, hipófise e ovário.

Na análise estatística dos ratos fêmeas foram observadas diferenças significantes sobre os pesos do timo dos animais veículos e dos animais tratados, o fígado com a dosagem de 1/3. Nos índices de pesos relativos (%), o timo dos animais veículos e nos animais tratados, o fígado com a dose 1/3. Contudo não apresentou significado toxicológico, se relacionados com os dados obtidos nas análises da bioquímica plasmática e histopatológica dos tecidos glandular do timo e hepático, dos animais submetidos a ação da amostra RF-11MAO em dose única, após 24 horas nos grupos estudados (Tabelas 23 - 24).

Tabela 23 - Pesos corporais e dos órgãos de ratas fêmeas após 24 horas da ingestão da RF-11MAO

Peso\Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Corporal (g)	218,0 ± 2,2	216,0 ± 2,3	212,0 ± 3,4	217,0 ± 0,6	213,0 ± 5,2
Cérebro (g)	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,9
Timo (mg)	353,4 ± 49,5	242,2 ± 16,4*	292,2 ± 23,1	307,0 ± 21,4	272,2 ± 14,0
Coração (mg)	842,6 ± 28,0	889,9 ± 24,3	828,4 ± 30,9	837,6 ± 12,5	858,1 ± 34,7
Pulmão (g)	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Fígado (g)	6,5 ± 0,2	6,7 ± 0,3	8,3 ± 0,4*	7,4 ± 0,3	7,1 ± 0,4
Rins^a (g)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,67 ± 0,1	1,8 ± 0,6
Baço (mg)	439,0 ± 10,4	421,0 ± 15,8	410,2 ± 24,0	415,2 ± 21,4	428,0 ± 16,4
Hipófise (mg)	11,6 ± 6,3	11,7 ± 0,5	12,9 ± 6,3	12,6 ± 1,4	11,0 ± 0,7
Gl. Salivar^a (mg)	438,8 ± 22,2	476,9 ± 17,2	420,0 ± 20,1	430,7 ± 11,2	447,0 ± 32,2
Adrenais^a (mg)	62,6 ± 3,2	60,1 ± 1,6	70,4 ± 2,5	64,5 ± 6,5	70,3 ± 2,4
Ovários^a (mg)	75,5 ± 7,0	80,6 ± 4,9	70,4 ± 5,3	66,8 ± 3,4	72,3 ± 4,3

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água e tween (*p<0,05 – Teste de Dunnet)

Tabela 24 - Relação peso dos órgãos/peso cerebral de ratas fêmeas após 24 horas da ingestão da RF-11MAO

Relação: órgão/cérebro (g/gx10 ⁻²) \Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Timo	27,3 ± 4,5	18,5 ± 1,2*	22,3 ± 1,7	23,1 ± 1,5	20,7 ± 0,1
Coração	64,5 ± 3,5	68,2 ± 2,0	63,4 ± 2,6	63,0 ± 1,1	65,2 ± 2,4
Pulmão	88,3 ± 4,5	89,8 ± 3,7	85,4 ± 4,2	84,4 ± 2,0	95,3 ± 4,8
Fígado	497,3 ± 30,5	508,8 ± 28,2	637,3 ± 32,1*	561,3 ± 27,3	538,8 ± 29,1
Rins^a	122,5 ± 5,1	122,6 ± 3,6	120,6 ± 3,1	126,1 ± 2,8	131,4 ± 1,4
Baço	33,5 ± 1,1	32,2 ± 1,3	31,4 ± 2,0	31,2 ± 1,5	32,5 ± 1,4
Hipófise	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Gl. Salivar^a	33,6 ± 2,2	36,6 ± 1,7	32,1 ± 1,6	42,9 ± 1,5	34,0 ± 2,2
Adrenais^a	4,8 ± 0,3	4,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2	4,8 ± 0,4	5,3 ± 0,2
Ovários^a	5,7 ± 0,5	6,1 ± 0,3	5,4 ± 0,4	5,0 ± 0,1	5,5 ± 0,3

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05 - teste de Dunnet)

5.15.3 TRATAMENTO AGUDO 14 DIAS EM RATOS MACHOS

Os ratos machos submetidos ao tratamento agudo não apresentaram alterações macroscópicas observáveis no timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rim, baço, adrenais, hipófise, testículo, próstata e vesícula seminal.

Na análise estatística dos ratos machos foram observadas diferenças significantes sobre os pesos da próstata dos animais tratados com as doses de 1/3, 1/30 e respectivo veículo; das vesículas seminais para o veículo. Nos índices de pesos relativos (%) foram observadas diferenças significantes na próstata dos animais tratados e nas vesículas seminais dos veículos. Contudo não apresentando significado toxicológico, se relacionados com os dados obtidos nas análises da bioquímica plasmática e histopatológica dos tecidos prostático e vesicular seminal, dos animais submetidos a ação da amostra RF-11MAO em dose única, após 14 dias nos grupos estudados (Tabelas 25 - 26).

Tabela 25 – Pesos corporais e dos órgãos de ratos machos após 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Peso\Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Corporal (g)	344,3 ± 5,8	341,0 ± 7,6	326,3 ± 1,7	344,0 ± 7,7	351,3 ± 7,4
Cérebro (g)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Timo (mg)	340,0 ± 40,2	297,0 ± 32,6	287,1 ± 31,5	384,3 ± 48,1	353,5 ± 25,0
Coração (mg)	110,6 ± 9,2	121,1 ± 44,0	106,2 ± 34,2	130,0 ± 11,7	117,5 ± 17,3
Pulmão (g)	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Fígado (g)	10,3 ± 0,3	10,1 ± 0,4	10,6 ± 0,2	10,3 ± 0,2	10,3 ± 0,3
Rins^a (g)	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1
Baço (mg)	549,0 ± 14,5	594,7 ± 46,0	575,7 ± 29,0	601,2 ± 39,7	585,1 ± 20,2
Hipófise (mg)	10,1 ± 0,3	10,3 ± 0,7	8,4 ± 0,6	10,1 ± 0,7	9,5 ± 0,6
Gl. Salivar^a (mg)	532,0 ± 15,3	527,0 ± 22,0	527,0 ± 11,3	496,1 ± 14,6	532,2 ± 16,0
Adrenais^a (mg)	46,0 ± 4,4	51,0 ± 2,7	47,6 ± 1,2	44,5 ± 1,9	47,3 ± 2,1
Testículos^a (mg)	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Próstata (mg)	729,0 ± 56,0	560,2 ± 46,1*	530,0 ± 42,5*	618,2 ± 30,7	540,0 ± 64,3*
Ves. Seminais (mg)	440,0 ± 12,4	329,3 ± 46,1*	354,3 ± 5,9	399,0 ± 10,6	388,6 ± 27,0

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05 - Teste de Dunnet)

Tabela 26 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos machos após 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Relação: órgão/cérebro (g/gx10 ⁻²) \ Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Timo	24,3 ± 2,4	20,7 ± 2,3	20,8 ± 2,6	27,0 ± 3,5	24,8 ± 2,0
Coração	79,6 ± 1,6	84,3 ± 2,5	76,3 ± 2,3	91,1 ± 8,7	82,6 ± 1,6
Pulmão	106,6 ± 3,0	101,2 ± 2,3	108,1 ± 7,8	103,6 ± 4,0	100,0 ± 1,5
Fígado	746,0 ± 16,2	698,0 ± 30,2	766,4 ± 16,7	722,5 ± 19,4	722,6 ± 17,0
Rins^a	167,4 ± 1,7	170,7 ± 5,0	159,1 ± 4,1	171,0 ± 6,5	182,5 ± 7,1
Baço	39,4 ± 0,5	41,3 ± 3,0	41,3 ± 1,6	42,1 ± 3,0	41,1 ± 1,3
Hipófise	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Gl. Salivar^a	38,2 ± 1,0	36,6 ± 1,2	38,0 ± 1,3	34,7 ± 1,0	37,4 ± 1,0
Adrenais^a	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Testículos^a	238,1 ± 4,4	235,2 ± 8,3	242,0 ± 4,1	237,4 ± 4,2	229,5 ± 5,2
Próstata	52,4 ± 4,0	39,5 ± 1,0*	38,1 ± 3,3	43,3 ± 2,2	38,0 ± 4,5
Ves. Seminais^a	31,6 ± 1,0	23,3 ± 3,3*	25,4 ± 0,2	2,8 ± 0,6	27,3 ± 2,0

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05 – Teste de Dunnet)

5.15.4 TRATAMENTO AGUDO 14 DIAS EM RATOS FÊMEAS

Os ratos fêmeas submetidos ao tratamento agudo não apresentaram alterações macroscópicas observáveis no timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rim, baço, adrenais, hipófise e ovário.

Na análise estatística dos ratos fêmeas não foram observadas diferenças significantes sobre os pesos dos animais tratados e nos índices de pesos relativos (%) foi observada diferença significativa sobre o rim dos animais tratados com a dose 1/10. Contudo não apresentou significado toxicológico, se relacionados com os dados obtidos nas análises da bioquímica plasmática e histopatológica do tecido renal, dos animais submetido a ação da amostra RF-11MAO em dose única, após 14 dias nos grupos estudados (Tabelas 27 - 28).

Tabela 27 - Pesos corporais e dos órgãos de ratos fêmeas após 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Peso\Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Corporal (g)	245,2 ± 13,7	233,0 ± 3,5	232,6 ± 2,0	237,0 ± 2,5	233,3 ± 3,0
Cérebro (g)	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Timo (mg)	346,3 ± 30,7	294,3 ± 47,7	322,2 ± 19,1	304,0 ± 18,1	299,5 ± 10,7
Coração (mg)	854,8 ± 25,1	924,0 ± 10,2	859,1 ± 6,3	948,0 ± 45	883,5 ± 18,5
Pulmão (g)	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Fígado (g)	6,9 ± 0,2	6,6 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,6 ± 0,1
Rins^a (g)	1,66 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Baço (mg)	481,2 ± 25,6	469,4 ± 10,0	453,0 ± 20,6	463,0 ± 27,4	431,5 ± 15,7
Hipófise (mg)	12,0 ± 0,6	13,0 ± 0,1	12,4 ± 0,7	13,1 ± 0,6	11,6 ± 0,5
Gl. Salivar^a (mg)	432,1 ± 8,3	477,6 ± 22,7	454,3 ± 19,6	441,0 ± 31,3	460,2 ± 10,7
Adrenais^a (mg)	67,2 ± 2,2	57,2 ± 3,6	64,7 ± 3,8	60,1 ± 3,6	59,5 ± 3,0
Ovários^a (mg)	77,3 ± 9,4	86,4 ± 10,4	81,5 ± 7,6	75,1 ± 6,0	71,0 ± 7,5

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

Tabela 28 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos fêmeas após 14 dias da ingestão da RF-11MAO

Relação:órgão/cérebro (g/gx10 ⁻²) \Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Timo	25,3 ± 2,2	21,7 ± 3,3	23,8 ± 1,4	22,7 ± 1,5	22,5 ± 0,8
Coração	62,6 ± 1,2	68,7 ± 0,9	63,6 ± 1,1	69,1 ± 3,0	66,4 ± 1,8
Pulmão	89,4 ± 12,3	95,0 ± 4,7	88,7 ± 5,5	96,0 ± 3,0	89,0 ± 1,3
Fígado	504,2 ± 12,3	508,8 ± 28,2	506,6 ± 14,8	510,0 ± 27,0	493,4 ± 9,1
Rins^a	122,1 ± 1,9	128,5 ± 4,0	124,0 ± 1,7	136,0 ± 3,7*	126,4 ± 4,1
Baço	35,2 ± 1,7	35,0 ± 1,0	33,4 ± 1,3	34,6 ± 2,1	32,4 ± 1,2
Hipófise	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Gl. Salivar^a	31,0 ± 0,4	35,5 ± 1,7	33,6 ± 1,7	32,8 ± 2,0	34,5 ± 0,8
Adrenais^a	5,0 ± 0,1	4,2 ± 0,3	4,8 ± 0,2	10,1 ± 5,5	4,5 ± 0,2
Ovários^a	5,6 ± 0,6	6,4 ± 0,8	6,0 ± 0,6	5,6 ± 0,4	5,3 ± 0,5

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 5 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05 – Teste de Dunnet)

5.15.5 TRATAMENTO SUBCRÔNICO EM RATOS MACHOS

Os ratos machos submetidos ao tratamento subcrônico de doses repetidas diariamente não apresentaram alterações macroscópicas observáveis nos seguintes órgãos: cérebro, timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rin, baço, adrenais, hipófise, testículo, próstata e vesícula seminal.

Na análise estatística dos ratos machos foi observada diferença significativa sobre o peso do fígado e das vesículas seminais dos animais tratados com a dose de 1/10 e não foram

observadas diferenças significantes nos índices de pesos relativos (%). Contudo não houve significado toxicológico, se relacionados com os dados obtidos nas análises da bioquímica plasmática e histopatológica do tecido hepático e vesicular seminal, dos animais submetidos a ação da amostra RF-11MAO em doses diárias, após 28 dias nos grupos estudados (Tabelas 29 - 30).

Tabela 29 - Pesos corporais e dos órgãos de ratos machos após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

Peso\Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/100)	RF-11MAO (1/30)	RF-11MAO (1/10)
Corporal (g)	375,00 ± 8,00	361,00 ± 6,00	373,00 ± 7,00	371,00 ± 8,00	363,00 ± 10,00
Cérebro (g)	1,49 ± 0,02	1,48 ± 0,02	1,49 ± 0,02	1,44 ± 0,01	1,46 ± 0,02
Timo (mg)	287,50 ± 21,40	255,30 ± 15,50	275,30 ± 21,80	306,30 ± 14,20	289,20 ± 17,10
Coração (mg)	1108,00 ± 30,80	1095,00 ± 40,40	1153,00 ± 32,60	1106,00 ± 32,80	1050,00 ± 25,40
Pulmão (g)	1,58 ± 0,03	1,52 ± 0,04	1,66 ± 0,05	1,69 ± 0,10	1,05 ± 0,03
Fígado (g)	10,44 ± 0,34	9,53 ± 0,28	10,40 ± 0,33	11,26 ± 0,42	12,49 ± 0,49*
Rins^a (g)	1,32 ± 0,04	1,24 ± 0,04	1,39 ± 0,03	1,38 ± 0,05	1,34 ± 0,05
Baço (mg)	584,00 ± 13,70	551,00 ± 15,50	612,00 ± 19,50	608,00 ± 11,60	588,00 ± 25,00
Hipófise (mg)	17,50 ± 1,80	17,60 ± 2,00	17,80 ± 2,10	19,30 ± 1,90	19,10 ± 1,40
Gl. Salivar^a (mg)	648,90 ± 16,40	576,00 ± 20,80	589,90 ± 22,10	622,40 ± 23,00	555,10 ± 54,70
Adrenais^a (mg)	21,90 ± 0,10	20,20 ± 0,10	20,60 ± 0,10	21,70 ± 0,10	21,30 ± 0,10
Testículos^a (mg)	3,59 ± 0,09	3,33 ± 0,07	3,42 ± 0,08	3,65 ± 0,09	3,40 ± 0,10
Próstata (mg)	597,20 ± 16,70	533,20 ± 40,60	611,70 ± 24,50	558,30 ± 30,20	533,70 ± 32,50
Ves. Seminais (mg)	462,30 ± 12,90	446,00 ± 12,40	503,20 ± 16,40	485,20 ± 16,30	400,00 ± 23,20*

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 10 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05 – Teste de Dunnet)

Tabela 30 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos machos após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

Relação: órgão/cérebro (g/gx10 ⁻²) \ Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/3)	RF-11MAO (1/10)	RF-11MAO (1/30)
Timo	19,5 ± 1,6	17,3 ± 1,1	18,4 ± 1,4	21,2 ± 1,0	19,9 ± 1,3
Coração	74,7 ± 2,5	74,2 ± 2,3	77,0 ± 1,8	76,6 ± 2,1	72,1 ± 1,8
Pulmão	106,3 ± 1,8	103,3 ± 2,1	110,8 ± 2,6	117,2 ± 6,5	106,3 ± 2,6
Fígado	704,2 ± 25,7	645,6 ± 15,5	695,5 ± 22,3	779,3 ± 26,2	857,4 ± 25,0
Rins^a	177,1 ± 4,6	170,2 ± 4,1	186,1 ± 3,8	188,2 ± 3,0	184,6 ± 6,5
Baço	39,4 ± 1,1	37,3 ± 1,0	40,9 ± 1,1	42,1 ± 1,0	40,3 ± 1,6
Hipófise	1,18 ± 0,1	1,21 ± 0,1	1,18 ± 0,1	1,34 ± 0,1	1,31 ± 0,1
Gl. Salivar^a	43,7 ± 1,1	39,1 ± 1,5	39,4 ± 1,3	43,0 ± 1,3	38,1 ± 1,6
Adrenais^a	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Testículos^a	241,6 ± 5,9	226,2 ± 4,6	228,6 ± 5,6	252,8 ± 4,3	233,7 ± 7,1
Próstata	40,3 ± 1,3	36,1 ± 2,7	40,9 ± 1,6	38,6 ± 1,9	36,6 ± 2,2
Ves. Seminais^a	31,2 ± 0,9	30,3 ± 0,9	33,6 ± 1,0	33,6 ± 0,9	27,5 ± 1,7

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 10 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

5.15.6 TRATAMENTO SUBCRÔNICO EM RATOS FÊMEAS

Os ratos fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico de doses repetidas diariamente não apresentaram alterações macroscópicas observáveis nos seguintes órgãos: cérebro, timo, coração, pulmão, glândula salivar, fígado, rin, baço, adrenais, hipófise e ovários.

Na análise estatística dos ratos fêmeas não foram observadas diferenças significantes sobre os pesos dos órgãos, mas foi observada diferença significativa no índice de peso relativo (%) no fígado dos animais tratados com a dose de 1/10. Contudo não houve significado toxicológico, se relacionados com os dados obtidos nas análises da bioquímica plasmática e histopatológica do tecido hepático, dos animais submetidos a ação da amostra RF-11MAO em doses diárias, após 28 dias nos grupos estudados (Tabelas 31 - 32).

Tabela 31 – Pesos corporais e dos órgãos de ratos fêmeas após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

Peso\Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/100)	RF-11MAO (1/30)	RF-11MAO (1/10)
Corporal (g)	237,0 ± 4,0	241,0 ± 7,0	241,0 ± 7,0	252,0 ± 8,0	245,0 ± 5,0
Cérebro (g)	1,33 ± 0,01	1,38 ± 0,02	1,37 ± 0,02	1,37 ± 0,02	1,38 ± 0,03
Timo (mg)	266,2 ± 14,5	219,6 ± 11,2	278,7 ± 19,8	294,5 ± 15,7	257,5 ± 20,8
Coração (mg)	778,2 ± 15,0	778,9 ± 27,5	819,9 ± 24,9	816,6 ± 14,6	775,1 ± 13,7
Pulmão (g)	1,25 ± 0,03	1,23 ± 0,03	1,33 ± 0,05	1,28 ± 0,04	1,31 ± 0,04
Fígado (g)	7,15 ± 0,23	6,95 ± 0,22	7,28 ± 0,30	7,79 ± 0,21	8,83 ± 0,50
Rins^a (g)	0,84 ± 0,02	0,88 ± 0,04	0,86 ± 0,03	0,95 ± 0,03	0,88 ± 0,02
Baço (mg)	428,0 ± 16,1	446,0 ± 14,2	418,0 ± 13,5	486 ± 22,8	440,0 ± 8,1
Hipófise (mg)	24,1 ± 1,7	24,1 ± 1,7	22,9 ± 1,2	22,2 ± 1,0	25,0 ± 1,0
Gl. Salivar^a (mg)	212,5 ± 9,1	206,8 ± 21,7	237,3 ± 11,1	237,5 ± 7,6	224,6 ± 11,5
Adrenais^a (mg)	29,6 ± 1,0	29,7 ± 2,2	29,5 ± 1,0	31,3 ± 1,5	31,6 ± 1,8
Ovários (mg)	30,4 ± 1,7	29,0 ± 1,9	32,5 ± 1,7	32,3 ± 2,4	32,2 ± 2,2

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 10 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

Tabela 32 - Relação peso dos órgãos / peso cerebral de ratos fêmeas após 28 dias da ingestão da RF-11MAO

Relação: órgão/cérebro (g/gx10 ⁻²) \ Tratamento	Controle (Água)	Veículo Tween 80 (1%)	RF-11MAO (1/100)	RF-11MAO (1/30)	RF-11MAO (1/10)
Timo	20,0 ± 1,1	15,9 ± 1,0	20,4 ± 1,4	21,5 ± 1,1	18,8 ± 1,6
Coração	58,4 ± 1,4	56,4 ± 1,6	60,0 ± 2,0	59,6 ± 1,0	56,2 ± 1,2
Pulmão	94,4 ± 2,2	89,5 ± 2,3	97,3 ± 3,7	93,1 ± 2,6	94,8 ± 3,7
Fígado	536,2 ± 17,7	503,2 ± 12,0	532,0 ± 20,0	568,6 ± 16,2	638,7 ± 34,8*
Rins^a	126,5 ± 3,6	125,6 ± 3,9	127,6 ± 2,9	137,7 ± 2,9	126,2 ± 3,7
Baço	32,1 ± 1,3	32,4 ± 1,0	30,6 ± 1,2	35,5 ± 1,7	31,9 ± 1,0
Hipófise	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Gl. Salivar^a	32,2 ± 1,1	31,3 ± 1,8	34,8 ± 1,5	34,5 ± 1,0	31,9 ± 1,1
Adrenais^a	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Ovários^a	5,1 ± 0,5	4,2 ± 0,2	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,2	4,6 ± 0,3

Os resultados são média ± erro padrão das médias de 10 animais por grupo.

^a – A soma dos órgãos pares foi considerada

* - Diferente do grupo tratado com água (*p<0,05 – Teste de Dunnet)

5.16 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA

5.16.1 HISTOPATOLOGIA DOS ÓRGÃOS NA FASE AGUDA

Os achados histopatológicos dos órgãos dos animais tratados na fase aguda, com dose única da amostra constituída da mistura de óleos essenciais RF-11MAO na diluição 1/3 administrado em ratos Wistar machos e fêmeas, no período de 24 horas e 14 dias foram comparados com o controle.

A análise histopatológica do fígado após tratamento agudo apresentou arquitetura lobular com veias hepáticas terminais de paredes finas, regularmente distribuídas, ressaltando à presença de Esteatose Difusa Microgoticular (EDM) (Figura 85). Esse tipo de esteatose microgoticular ou microvesicular, na forma de pontos brancos, que podem ser observados em algumas condições como metabólicas congênitas, esteatose da gravidez, síndrome de Reye e nas reações hepatológicas por drogas e toxinas.

Embora os hepatócitos tenham se apresentado na grande extensão do parênquima como elementos isomorfos, no seio do lóbulo não foram identificados focos de hepatocitólise,

com ausência de afluxo inflamatório mononuclear. Os espaços portais e a interface portoparenquimatosa estavam destituídos de reação inflamatória (MINCIS & MINCIS, 2006).

A análise histopatológica das lâminas indicou alterações nos fragmentos de fígado dos ratos machos tratados, com a dose única de RF-11MAO diluída em 1/3. Após 24 horas, as lâminas foram avaliadas e indicaram EDM em 100% nos animais tratados e nos respectivos controles (Figura 85). Após 14 dias, 100% das lâminas dos animais tratados não apresentaram alterações histopatológicas, enquanto que os do controle indicaram 100% de EDM.

As lâminas avaliadas das ratas fêmeas tratadas após 24 horas demonstraram 100% de EDM. Após 14 dias foi verificado EDM em 50% das lâminas apenas, bem como, os animais controle apresentaram 100% de EDM.

Os dados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos, não apresentando alterações interparamétricas consecutivas, portanto sem significado toxicológico hepático. Os achados histopatológicos estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio temporal não relacionado à ação da amostra, com retorno espontâneo a normalidade. A análise desse comportamento está de acordo com Gartner & Hiatt (2007).

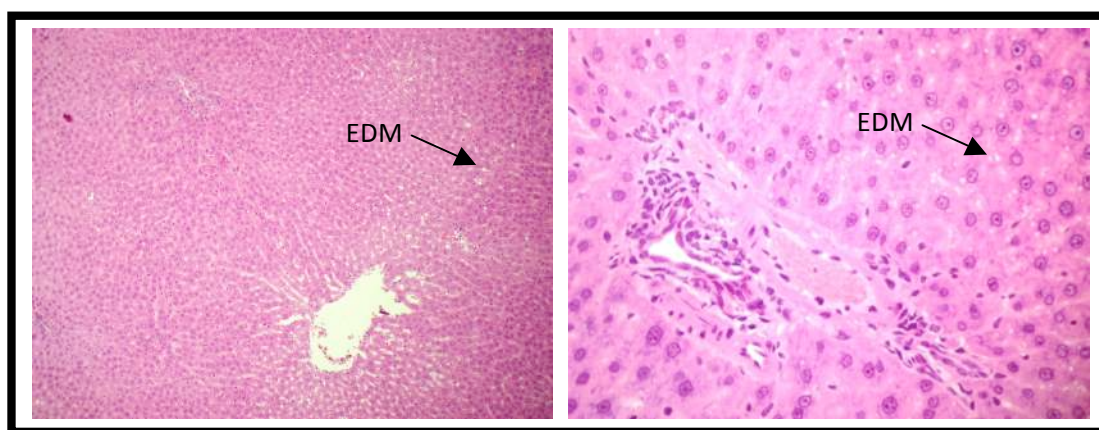


Figura 85 - Fígado de ratos machos 33 e 31 com aumento de 100x e 400x, em detalhe Esteatose Difusa Microgoticular, após 24 horas com tratamento 1/3 e no controle, respectivamente.

A análise histopatológica do tecido pulmonar demonstrou casos isolados de Focos de Colapso (FC), Focos de Colapso granulomatoso (FC/gra) e Enfisemas (E). Os septos conjuntivos interlobulares e interstício peribronquiolar mantiveram integridade e os alvéolos apresentaram-se com paredes delgadas normais. O espaço aéreo luminal mostrava-se ora ocupado por ar, caracterizando E, ora por ausência de ar, FC. A rede vascular apresentou-se fina e regularmente distribuída, encontrando-se padrões de normalidade (Figura 86).

A avaliação histopatológica indicou alterações dos fragmentos pulmonares dos ratos machos tratados, com a dose única da amostra RF-11MAO diluída em 1/3. Após 24 horas, as lâminas foram avaliadas e indicaram 67% de E e 33% de FC. Após 14 dias, os animais tratados indicaram 100% de E, bem como, os animais do controle apresentaram 33% de E.

As lâminas avaliadas dos ratos fêmeas tratados apresentaram 33% de E e 33% de FC. Após 14 dias, em 100% dos animais foi caracterizado como, não diagnosticada (ND) alteração histopatológica; nos animais do controle foram encontrados 67% de E e 33% de FC/gra (Figura 86).

Portanto, os resultados contribuem para a ausência de significado toxicológico pulmonar. Os dados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, não apresentando alterações consecutivas. Os achados histopatológicos estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio temporal não relacionado à ação da amostra, com a manutenção fisiológica do padrão de normalidade. A avaliação e o comportamento encontrados estão de acordo com a literatura (KESSEL, 2001).

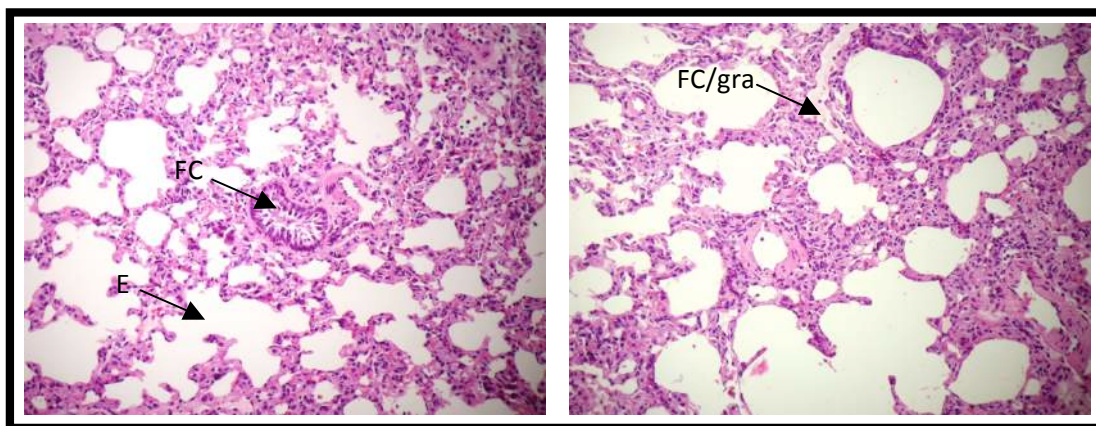


Figura 86 – Pulmão de ratos fêmeas 41 e 39 com aumento de 200x, em 24 horas com tratamento 1/3 e no controle demonstraram presença de Enfisemas, Focos de Colapso e Foco de Colapso/granulomatoso.

No rins, a arquitetura lobular estava preservada com pirâmides medulares recobertas por tecido cortical. O córtex apresentou glomérulos regularmente distribuídos, cápsula de Bowman fina, com espaço de refração artefactual, além de tufo capilares finos e mesângio delicado. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento do ducto coletor não evidenciaram particularidades histopatológicas, do mesmo modo que, as alças de Henle e ductos coletores da pirâmide medular, o sistema pielocalicial e as colunas de Bertin da pélvis renal. Não foi observada reação inflamatória tampouco fibrose no interstício (matriz).

A análise histopatológica das lâminas contendo tecido renal indicaram alterações nos ratos machos tratados, com dose única da amostra RF-11MAO diluída em 1/3. Após 24 horas, as lâminas foram avaliadas e indicaram Nefrite Intersticial Discreta (NID) em 33% dos animais. Após 24 horas, os animais tratados e os do controle não apresentaram alterações histopatológicas diagnosticadas. A avaliação histopatológica nos ratos fêmeas tratados após 24 horas apresentaram 33% de Congestão (C) e 33% de Congestão dos animais controle (Figura 87). A possível explicação para o aparecimento da congestão no tecido renal deve estar relacionada com os procedimentos técnicos empregados para fixação do órgão com formalina. A indicação de Nefrite Intersticial Discreta em um rato macho necessita ser esclarecida, pois não apresenta relação direta de toxicidade com a RF-11MAO.

Portanto, os dados não indicaram significância para o estudo toxicológico, quando relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematologia, morfologia e peso dos órgãos em discussão, não foram demonstradas alterações interparamétricas consecutivas. Os achados histopatológicos de congestão estavam presentes nos animais tratados e nos do controle, não relacionada à ação da amostra testada, com a manutenção fisiológica do padrão de normalidade, a análise e estado do rim estão em conformidade com a literatura (COMARCK, 2003).

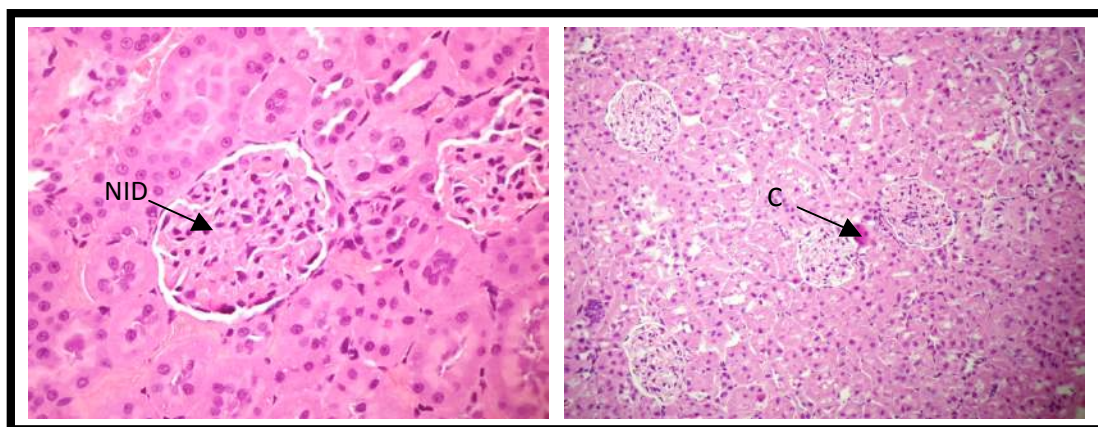


Figura 87 – Rim de ratos macho 38 e fêmea 44 com aumento de 400x e 200x, em 24 horas com tratamento 1/3, com presença de Nefrite Intersticial Discreta e o controle com Congestão, respectivamente.

O baço manteve integridade histopatológica da cápsula de tecido conjuntivo denso emitindo trabéculas que dividem o parênquima ou polpa esplênica em compartimentos incompletos. O tecido conjuntivo denso da cápsula e das trabéculas apresenta fibras musculares lisas, numerosas e mantendo a estrutura esponjosa. Na polpa esplênica verificou-se tecido linfóide com formas cordonal e nodular de corpúsculos de Malpighi e apresentam o centro germinativo de Flemming na polpa branca. Na polpa vermelha ocorreu manutenção do tecido reticular, constituindo os cordões de Bilotroth ou cordões esplênicos dentro dos padrões de normalidade (KESSEL, 2001).

As lâminas analisadas indicaram alterações histopatológicas nos ratos machos tratados. Após 24 horas foi evidenciada presença de Hemossiderina (H) em 100% dos animais

e após 14 dias as lâminas indicaram 100% de Hemossiderina/Megacariócitos (H/M) e nos animais do controle a presença em 33% de H e em 33% de H/M.

A avaliação histopatológica das lâminas dos ratos fêmeas tratados após 24 horas indicou H em 67% e H/M em 100%. Após 14 dias as lâminas dos animais tratados e do controle indicaram H/M em 100% (Figura 88).

Todavia, os dados não apresentaram significado toxicológico por ação direta da RF-11MAO, manifestados nos tecidos esplênicos. Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos e não foram verificadas alterações consecutivas interparamétricas. Os achados histopatológicos foram detectados nos animais tratados e nos do controle, indicando resposta fisiológica independente, não relacionada à ação da amostra. A avaliação para o estudo pré-clínico de toxicidade corrobora com a literatura pesquisada (GARTNER & HIATT, 2007).

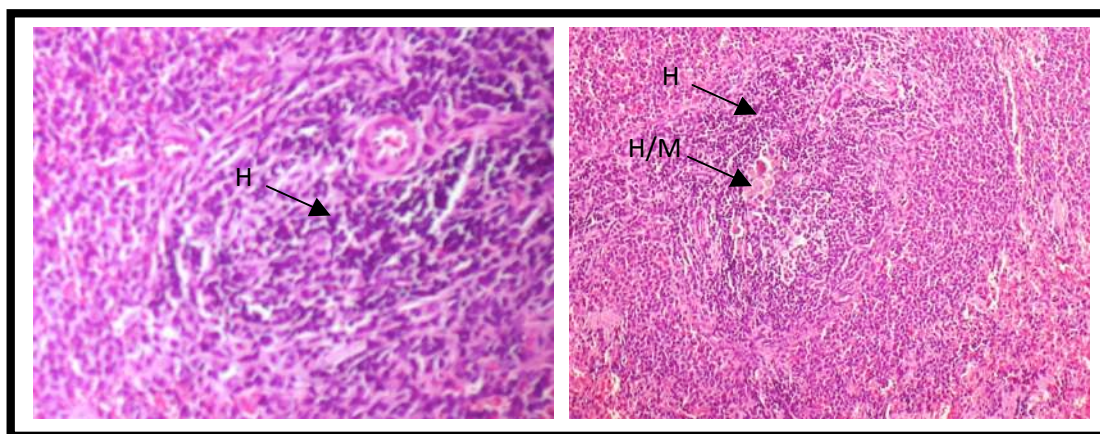


Figura 88 – Baço de ratos machos 33 e 38 com aumento de 200x e 100x, em 24 horas com tratamento 1/3, com presença de Hemossiderina e Hemossiderina/Megacariócito no controle respectivamente.

As gônadas, nos ratos machos são representadas pelos testículos e nos ratos fêmeas pelos ovários. Os testículos foram avaliados quanto a espermatogênese nos túbulos seminíferos, pela seqüência e morfologia das células da linhagem germinativa: células de Sertoli, as espermatogônias, os espermátócitos e as espermátides. A quantidade de espermatozóide na luz testicular e das células de Leydig no interstício também foi avaliada.

Nos epidídimos foi observado o volume de espermatozóides armazenados naturalmente. Em todos os fatores avaliados, as lâminas indicaram em 100% dos animais tratados e nos do controle padrões histológicos de normalidade.

Nos ovários foram observados, a seqüência de maturação dos folículos ovarianos, o tamanho e a forma das células luteínicas, a presença de cistos foliculares e de corpos lúteos em estágio de regressão. Todos os parâmetros analisados confirmam os padrões de normalidade. Após 24 horas, a avaliação das lâminas dos ovários dos ratos fêmeas do controle indicou congestão (C) em 33% (Figura 89).

O resultado da análise histopatológica não identificou alterações relacionadas a dose da RF-11MAO nos animais tratados, a congestão pontual verificada nos ovários de um animal controle representa distúrbio fisiológico sem significado diagnosticado. Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos e não foram verificadas alterações consecutivas interparamétricas. Os padrões de normalidade descritos na avaliação histopatológica apresentam conformidade com as observações de Vergouwen (1991).

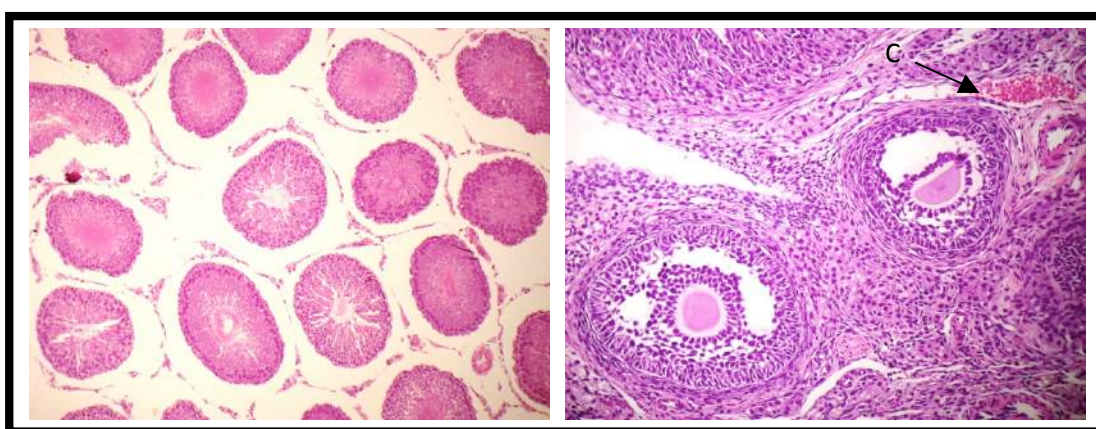


Figura 89 – Gônadas de rato macho 31 à esquerda e fêmea 44 à direita, com aumento de 100x e 200x, após 24 horas. Testículo normal e ovário com presença de Congestão no controle.

Nas glândulas adrenais, o limite entre o córtex e a medula é bem definido, porém irregular. Os agregados de células corticais podem aparecer isolados na medula, ou células

medulares podem estar presentes no córtex. A medula adrenal é composta principalmente de células poliédricas arranjadas em pequenos pacotes ou cordões ramificados curtos separados por uma rede vascular extensa. As células medulares apresentam um citoplasma finamente granular, pálido e basofílico, os seus núcleos são maiores e mais vesiculares que os presentes nas células corticais (Figura 90).

Histologicamente, as glândulas adrenais não demonstraram nos cortes teciduais alterações significativas em 100% dos ratos machos tratados, após 24 horas e 14 dias e 100% dos ratos fêmeas tratados após 24 horas e os do controle respectivos. As lâminas dos ratos fêmeas tratados após 14 dias indicaram Hiperplasia Trabecular/Aumento de Tamanho (HT/AT) em 50% dos animais tratados.

Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos e não foram verificadas alterações consecutivas interparamétricas. O achado histopatológico indicou distúrbio fisiológico isolado não relacionado à ação da RF-11MAO e sem significado para o teste de toxicidade aguda. A avaliação histopatológica foi correspondente a proposta por Mattos *et al.* (2007).

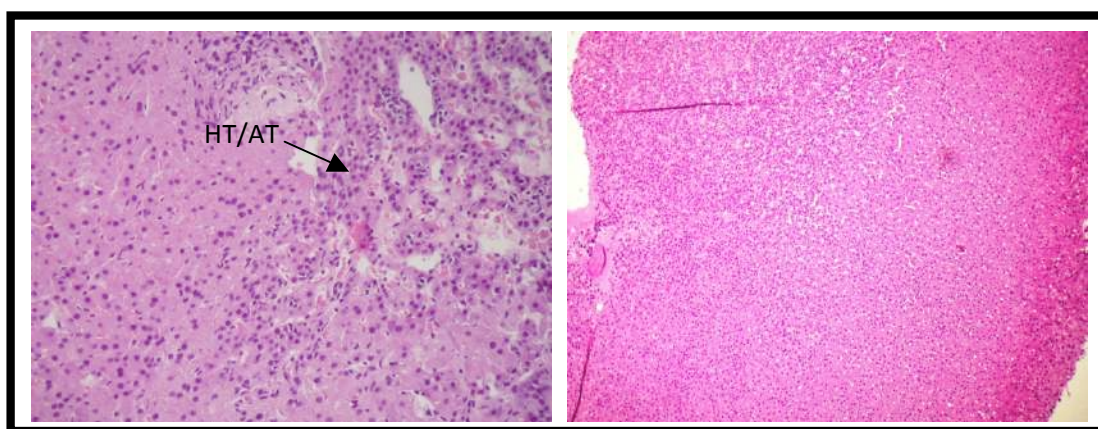


Figura 90 – Adrenais de ratos fêmeas 98 e 39 com aumento de 200x e 100x, em 14 dias de tratamento com 1/3 apresentou Hiperplasia Trabecular/Aumento de Tamanho e controle normal respectivamente.

Os linfonodos ou gânglios linfáticos apresentaram cápsula de tecido conjuntivo denso envolvendo o linfonodo com trabéculas para seu interior, dividindo o parênquima em compartimentos incompletos na região cortical, localizada abaixo da cápsula, bem como ausente no hilo e na região medular que ocupa o centro do órgão. A zona paracortical, localizada entre as camadas cortical e medular permaneceu íntegra.

A análise histopatológica das lâminas contendo tecido ganglionar linfático apresentou alterações nos ratos machos tratados. Após 24 horas indicou Histiocitose (HIS) em 33% e Histiocitose/Hemofagocitose (HIS/HEMO) em 67% dos animais. Após 14 dias foi verificada a presença de HIS em 50% e HIS/HEMO em 50% e nos animais controle não diagnosticada (ND) alteração histopatológica.

As lâminas avaliadas dos ratos fêmeas tratados demonstraram alterações histopatológicas. Após 24 horas foi verificada HIS/HEMO em 67% dos animais tratados, após 14 dias indicou HIS/HEMO em 100% dos animais tratados e apresentou HIS/HEMO em 67% e HIS em 33% dos animais controle (Figura 91).

Os dados obtidos foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos e não foram verificadas alterações consecutivas interparamétricas. Os achados histopatológicos indicaram alterações teciduais nos animais tratados e nos do controle, não relacionados a toxicidade induzida pelo tratamento com a RF-11MAO, porque naturalmente a linfa é filtrada pelos linfonodos, que favorece o contato íntimo e demorado com os macrófagos ali situados, o que facilita a fagocitose de moléculas e partículas estranhas trazidas pela linfa, caracterizada como manifestação fisiológica normal proposta por Banks (1991).

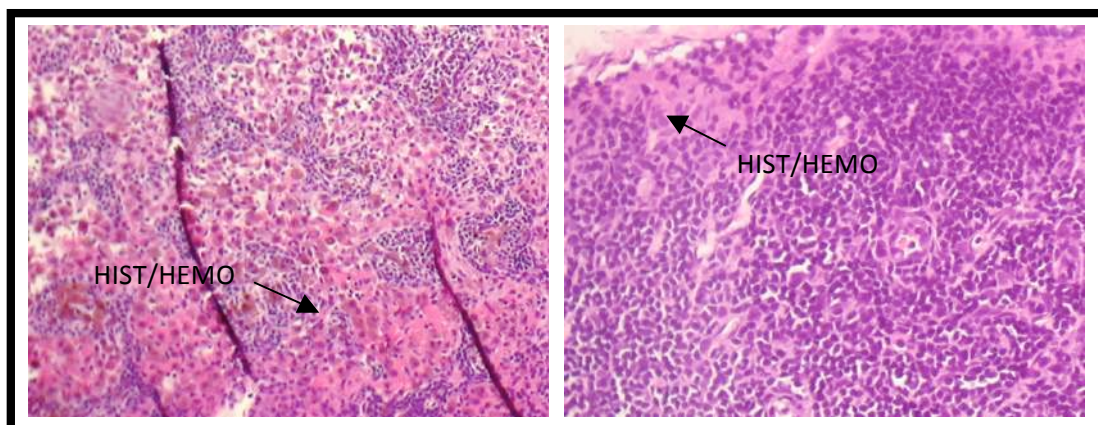


Figura 91 – Linfonodos de rato fêmea 49 e 98 com aumento de 100x e 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle apresentaram Histiocitose e Hemofagocitose respectivamente.

O timo é um órgão linfóide primário com cápsula de tecido conjuntivo denso, do qual partem tabiques que dividem o órgão em lóbulos incompletos com separação imperfeita não apresentando nódulos. Cada lóbulo é composto de uma parte periférica de tecido linfóide denso formando a zona cortical, a parte central e mais clara, envolvendo o tecido difuso que apresenta os corpúsculos de Hassal, e representa a zona medular com predominância de linfoblastos e linfócitos jovens (Figura 92).

A análise histopatológica nos cortes teciduais do timo não indicou alterações significativas ou diagnosticadas induzidas pela ação da RF-11MAO em 100% dos ratos machos e fêmeas tratados, bem como os respectivos controles, após 24 horas e 14 dias na fase aguda do teste pré-clínico. Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos e não foram verificadas alterações consecutivas interparamétricas. Na avaliação histopatológica o padrão de normalidade apresentou conformidade com o observado por Stevens & Lowe (1995).

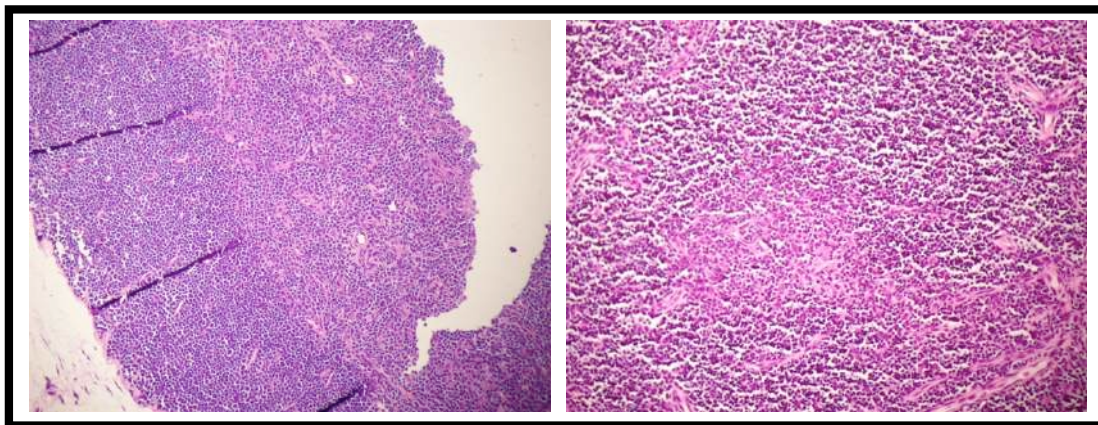


Figura 92 – Timo de rato macho 83 e 36 com aumento de 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle apresentaram parâmetros de normalidade respectivamente.

A próstata em seu lóbulo anterior, também conhecido como câmara de coagulação, tem forma tubular, aparência gelatinosa e é adjacente à vesícula seminal. As células epiteliais são colunares simples com núcleo central, apresenta padrão cribiforme por ser o lobo com maior número de dobras do epitélio, bem como o estroma mais notável ao redor dos ácinos. O produto de secreção é abundante e homogêneo translúcido (Figura 93).

A análise histopatológica nos cortes teciduais da próstata não indicou alterações significativas induzidas pela ação da RF-11MAO em 100% dos ratos machos tratados, bem como os animais controle, após 24 horas e 14 dias. Os dados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos e não foram diagnosticadas alterações consecutivas interparamétricas. Os padrões de normalidade descritos na avaliação histopatológica indicaram conformidade com as observações de Roy-Burman *et al.* (2004).

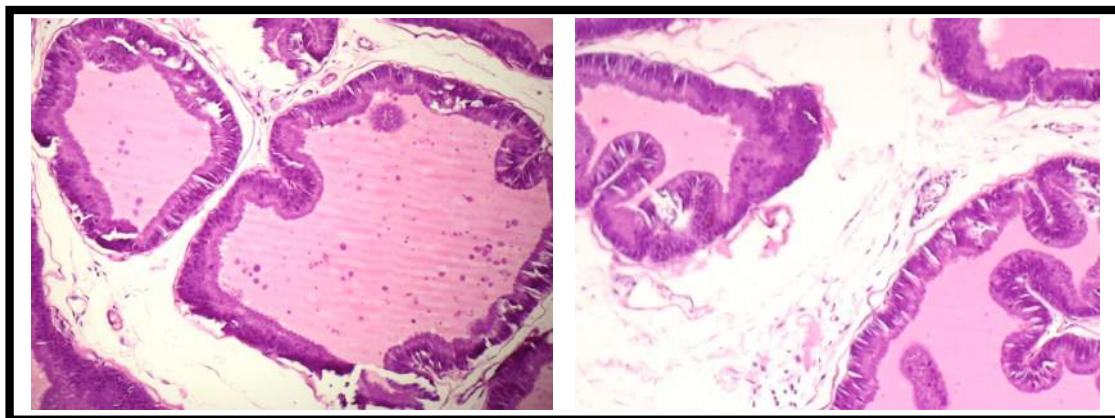


Figura 93 – Próstata de rato macho 83 e 36 com aumento de 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle demonstraram histologia normal respectivamente.

A vesícula seminal é coberta internamente por tecido glandular estratificado, revestida por uma camada muscular e vasos sanguíneos. Os cortes histológicos mantiveram higidez de suas estruturas (Figura 94). A análise histopatológica da vesícula seminal foi analisada e não indicou alterações significativas ou diagnosticada por indução da RF-11MAO em 100% dos ratos machos tratados, bem como os respectivos animais controle, após 24 horas e 14 dias.

Os resultados obtidos na histopatologia foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos, os quais não foram diagnosticadas alterações consecutivas interparamétricas. A avaliação histopatológica indicou padrões de normalidade descritos em conformidade com a literatura (ROSS & PAWLINA, 2008).

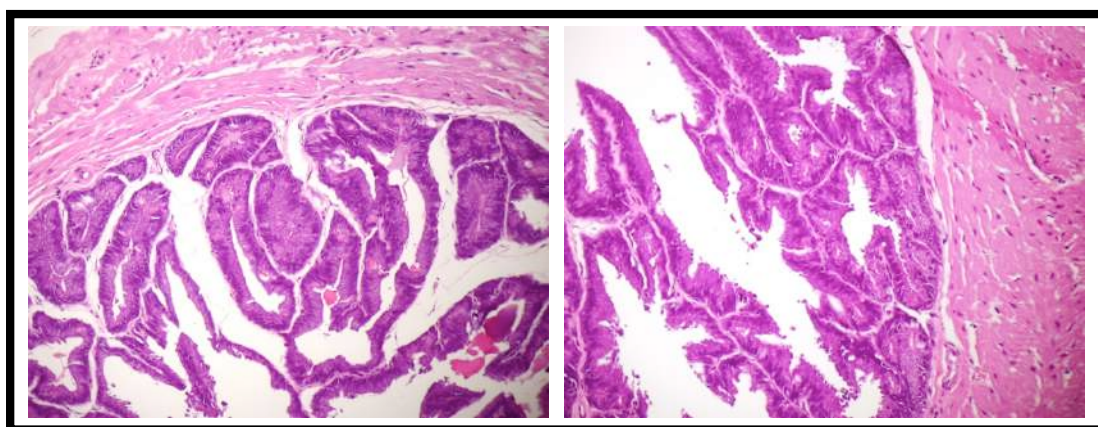


Figura 94 - Vesícula seminal de rato macho 83 e 36 com aumento de 200x, em 14 dias de tratamento com 1/3 e controle com parâmetros histológicos de normalidade respectivamente.

No esôfago foram observadas as quatro túnicas típicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, formando pregas. A túnica mucosa apresentou epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com camada germinativa distinta. Abaixo do epitélio, presença de lâmina própria constituída por tecido conjuntivo pouco acidófilo indicando uma característica moderadamente densa. A presença de núcleos de fibroblastos e células do sistema imune como linfócitos e vasos sanguíneos. A camada muscular da mucosa bem definida delimita a camada mucosa da próxima túnica, a submucosa, a qual apresentou feixes de fibras colágenas, vasos sanguíneos, com ausência de glândulas esofagianas.

A túnica muscular externa foi constituída por fibras musculares estriadas organizadas em duas camadas: circular interna e longitudinal externa. Entre as camadas foi possível observar neurônios mioentéricos formando pequenos gânglios. A última túnica, denominada de serosa, apresentou reduzido tecido conjuntivo moderadamente denso, revestido por epitélio simples pavimentoso formando o mesotélio hígido.

A avaliação histopatológica do esôfago mostrou preservação da organização tecidual, com nítida organização da camada queratinizada, demonstrando não haver reação adversa relacionada com a ação da RF-11MAO nos ratos machos e fêmeas expostos ao tratamento e aos do controle, após 24 horas e 14 dias (Figura 95). Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematológica, morfológica e peso desses órgãos, os quais não foram diagnosticadas alterações consecutivas interparamétricas. A avaliação histopatológica indicou padrões de normalidade conforme descritos na literatura (BANKS, 1991; JUNQUIRA & CARNEIRO, 2008 e ROSS & PAWLINA, 2008).

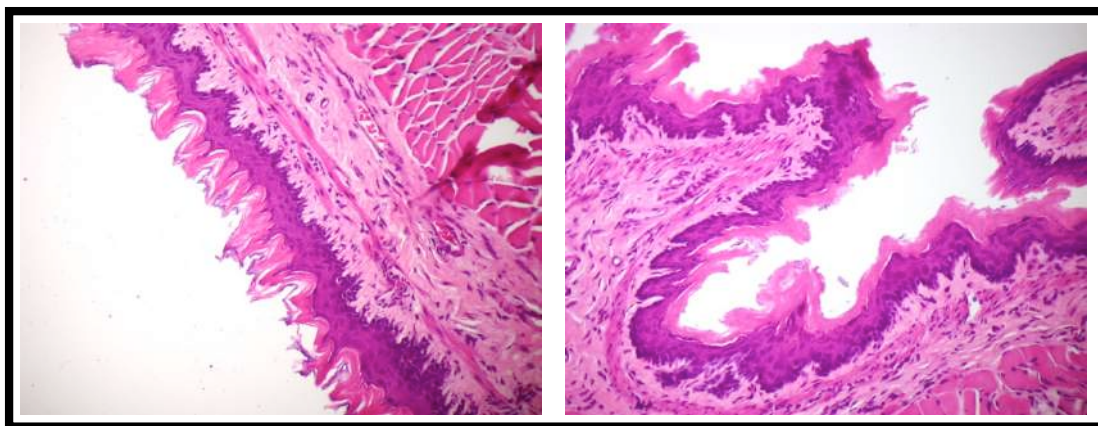


Figura 95 – Esôfago de ratos macho e fêmea 31 e 39 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

No estômago, a integridade foi mantida nas tûnicas: glandular nas células e criptas, muscular da mucosa e submucosa com presença de vasos sanguíneos hígidos. Não foram encontradas zonas de erosão tecidual por exposição tóxica direta, bem como nas camadas musculares, circular e longitudinal, ladeando os gânglios do plexo mientérico que mantiveram características histológicas normais.

A análise histopatológica da mucosa não apresentou alterações diagnosticadas ou relacionadas a ação da RF-11MAO, em 100% dos ratos Wistar de ambos os sexos, após 24 horas e 14 dias, nos tratamentos e nos animais controle (Figura 96). Os dados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematologia, morfologia e peso dos órgãos em discussão e não foram demonstradas alterações significativas interparamétricas consecutivas, e tão pouco significâtes para o estudo toxicológico. Os achados histopatológicos indicaram a manutenção do padrão de normalidade, a análise e estado fisiológico do estômago estão em conformidade com a literatura (BANKS, 1991 e JUNQUIRA & CARNEIRO, 2008).

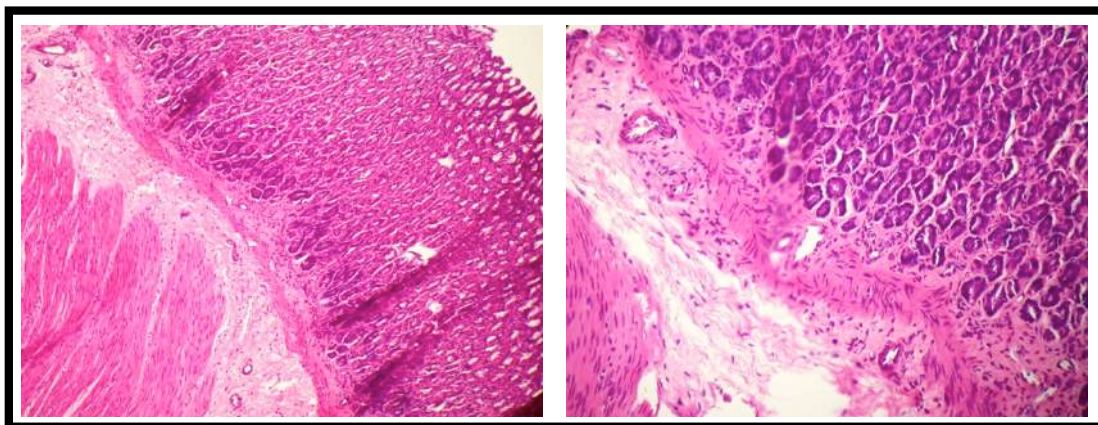


Figura 96 – Estômago de rato macho 31 e 39 com aumento de 100x e 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

O intestino delgado apresentou mucosa formada por diversos tipos celulares, com destaque as células absorptivas e caliciformes, de forma nítida células absorptivas ou enterócitos, a borda em escova, localizada em sua superfície apical. As células caliciformes foram encontradas intercaladas às células absorptivas, tanto na região dos vilos, como na região das criptas, com manutenção da higidez em todos os tecidos analisados.

Apesar da exposição ao tratamento, em dose única, após 24 horas e 14 dias, a mucosa não apresentou alterações histomorfológicas importantes, mantendo o número e altura das vilosidades e glândulas de Liberkühn íntegras, tanto nos animais tratados como nos controles, em ambos os sexos que mantiveram padrão histológico de normalidade de 100% (Figura 97).

Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematologia, morfologia e peso dos órgãos em discussão, os quais não demonstraram alterações significativas interparamétricas consecutivas, e tão pouco significantes para o estudo toxicológico. Os tecidos avaliados indicaram a manutenção do padrão de normalidade e a descrição analítica encontra em conformidade com as observações de Banks (1991).

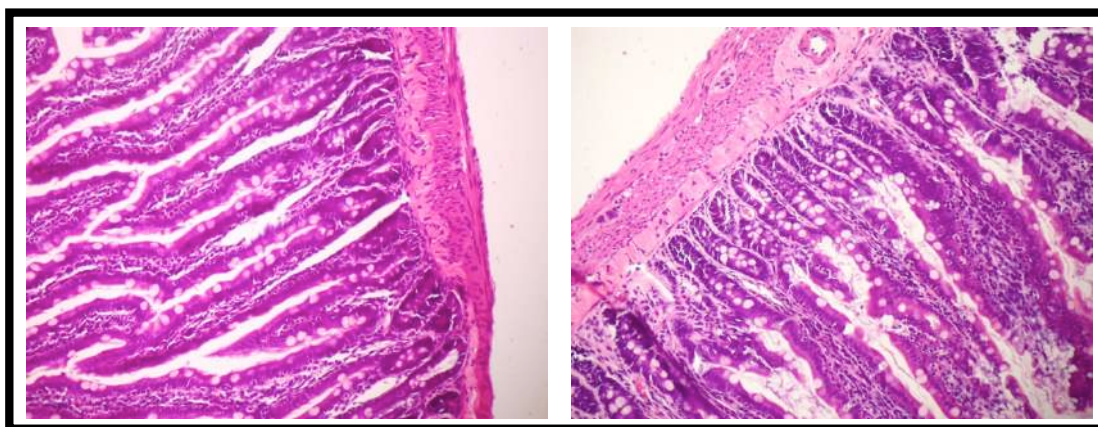


Figura 97 – Intestino delgado de ratos macho e fêmeas 31 e 39 com aumento de 200x e 100x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

O intestino grosso apresentou a capa mucosa hígida, com células glandulares e epiteliais mucoídes, especializadas na produção de muco e na absorção de líquidos, a capa submucosa formada por tecido conjuntivo largo, contendo considerável rede de vasos capilares, nódulos linfáticos e fibras nervosas. A capa muscular composta por duas camadas de fibras musculares, circular e longitudinal em íntimo contato com a capa serosa, mais externa e delgada, composta de tecido fibroelástico correspondente a extensão do peritoneu, membrana que cobre os intestinos na cavidade abdominal.

Os achados histológicos mantiveram sua integridade em 100% dos animais tratados e dos controles, em ambos os sexos após 24 horas e 14 dias (Figura 98). A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hematologia, morfologia e peso dos órgãos em discussão, os quais não demonstraram alterações significativas interparamétricas consecutivas ou significantes para o estudo toxicológico. As lâminas avaliadas indicaram a manutenção do padrão de normalidade e a descrição analítica encontra-se em conformidade a literatura (BANKS, 1991 e ROSS & PAWLINA, 2008).

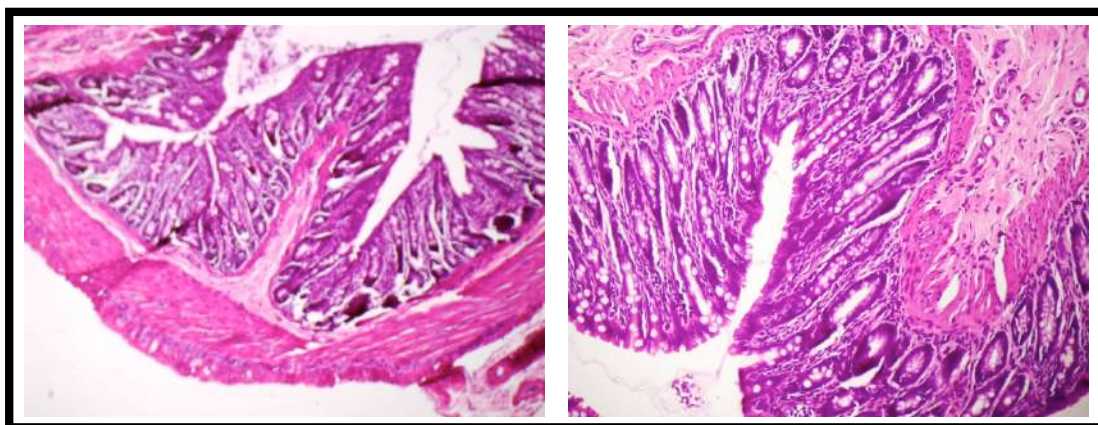


Figura 98 – Intestino grosso de ratos macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

Nas Tabelas 33 - 34 encontram-se os dados obtidos pelo parâmetro da maior dose e selecionados de forma aleatória, pertinentes aos achados histopatológicos da fase aguda dos ratos machos e fêmeas, submetidos a tratamento com dose única após 24 horas e 14 dias, bem como o respectivo controle.

Tabela 33 – Resultados da avaliação histopatologica na fase aguda em ratos machos

TRATAMENTO AGUDO	Machos - 24 h			Machos - [1/3] - 24 h			Machos - [1/3] -14 d	
Nº Animal/Órgão	26	31	36	28	33	38	78	83
Fígado	EDM	EDM	EDM	EDM	EDM	EDM	ND	ND
Pulmão	E	0	ND	FC	E	E	E	E
Rim	ND	ND	ND	ND	ND	NID	ND	ND
Baço	ND	H	H/M	H	H	H	H/M	H/M
Gônadas	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Adrenais	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Linfonodo	ND	ND	ND	HIS/HEMO	HIS/HEMO	HIS	HIS/HEMO	HIS
Timo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
V S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Esôfago	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Estômago	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ID	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 34 – Avaliação Histopatológica na fase aguda em ratos fêmeas

TRATAMENTO AGUDO	Fêmeas - 24 h			Fêmeas - [1/3] - 24 h			Fêmeas - [1/3] - 14 d	
NºAnimal/Órgão	39	44	49	24	41	46	95	98
Fígado	EDM	EDM	EDM	EDM	EDM	EDM	EDM	ND
Pulmão	FC/gra	E	E	ND	E/FC	FC	ND	ND
Rim	ND	congestão	ND	ND	ND	congestão	ND	NTAF
Baço	H/M	H/M	H/M	ND	H	H	H/M	H/M
Gônadas	ND	congestão	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Adrenais	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	HT/AT
Linfonodo	HIS	HIS/HEMO	HIS/HEMO	HIS/HEMO	ND	HIS/HEMO	HIS/HEMO	HIS/HEMO
Timo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Próstata	0	0	0	0	0	0	0	0
V S	0	0	0	0	0	0	0	0
Esôfago	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Estômago	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ID	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

5.16.2 HISTOPATOLOGIA DOS ÓRGÃOS NA FASE SUBCRÔNICA

Os achados histopatológicos dos órgãos dos ratos machos e fêmeas tratados na fase subcrônica, com doses repetidas de RF-11MAO na diluição 1/10 administrado diariamente, no período de 28 dias, foram comparados com o controle.

O fígado apresentou arquitetura lobular com veias hepáticas terminais de paredes finas, regularmente distribuídas, ressaltando a presença de Esteatose Difusa Microgoticular (EDM), Esteatose Focal Discreta (EFD) e Hiperplasia Linfóide Focal (HLF). A esteatose focal discreta é pontual e por ser discreta evolui para cura por regeneração hepática. A hiperplasia linfóide focal pode ser observada em condições hereditárias. No seio do lóbulo, embora os hepatócitos tenham se apresentado na grande extensão do parênquima como elementos isomorfos, não foram identificados focos de hepatocitólise, não havendo afluxo

inflamatório mononuclear. Os espaços portais e a interface portoparenquimatosa estavam destituídos de reação inflamatória (MINCIS & MINCIS, 2006).

A análise histopatológica das lâminas indicou alterações nos fragmentos de fígado dos ratos machos tratados, com as doses diárias de RF-11MAO diluída em 1/3. Após 28 dias, as lâminas foram avaliadas e indicaram EFD em 20%, EDM em 40% e EDM/HLF em 20% dos animais tratados e os do controle apresentaram EFD em 40%, EDM em 20% e EDM/HLF em 20%. As lâminas avaliadas das ratas fêmeas tratadas após 28 dias indicaram EDM em 40%, bem como, os animais do controle apresentaram EDM em 20% e EFD em 20% (Figura 99).

Os dados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos e não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. Contudo, sem significado toxicológico hepático, os achados histopatológicos estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio temporal não relacionado à ação da amostra, com a manutenção fisiológica do padrão de normalidade, como observado na literatura (GARTNER & HIATT, 2007).

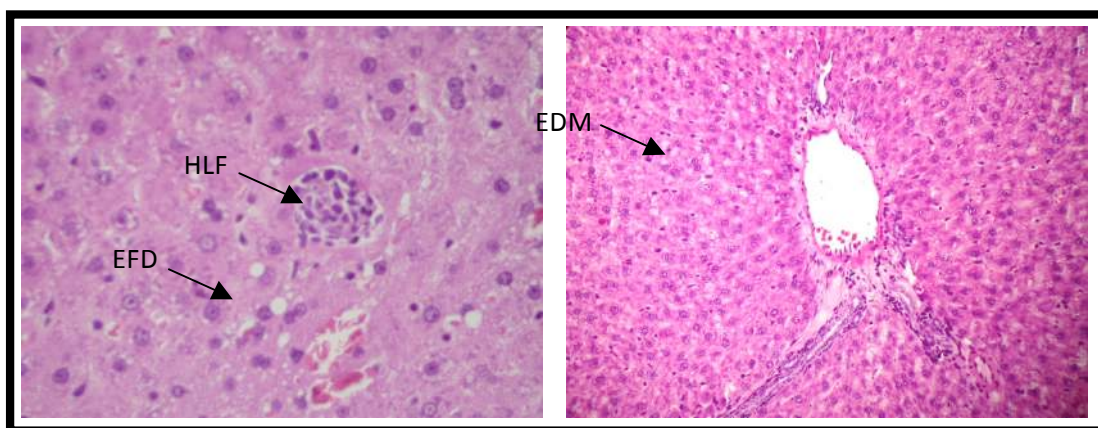


Figura 99 - Fígado de ratos machos 181 e 151 com aumento de 400x e 100x, em detalhe Esteatose Focal Difusa e Hiperplasia Linfóide Focal, após 28 dias com tratamento 1/10 e Esteatose Difusa Microgoticular no controle, respectivamente.

Nos pulmões, os cortes histopatológicos demonstraram casos isolados de Foco de Colapso (FC), Enfisemas (E), Hiperplasia (H) e Hiperplasia Linfóide Focal granulomatosa

(HLF/gra). Os septos conjuntivos interlobulares e interstício peribronquiolar mantiveram integridade e os alvéolos apresentaram-se com paredes delgadas normais. O espaço aéreo luminal mostrava-se ora ocupado por E, ora por FC. A rede vascular apresentou-se fina e regularmente distribuída, encontrando padrões de normalidade (Figura 100). As alterações histopatológicas indicaram FC em 20% e H em 20% dos ratos machos tratados com doses diárias, após 28 dias. Nos ratos fêmeas tratados indicaram HLF/grã em 20% e E em 20% dos animais, bem como nos animais controle foi verificado FC em 20%, após 28 dias.

Portanto, sem significado toxicológico pulmonar, os dados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos e não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. Os achados histopatológicos estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio pontual não relacionado a dose da RF-11MAO administrada durante o tratamento diário por 28 dias, não apresentando alterações significativas para o estudo toxicológico, com a manutenção do padrão de normalidade. A avaliação histopatológica e fisiológica encontra correspondência com a literatura (KESSEL, 2001).

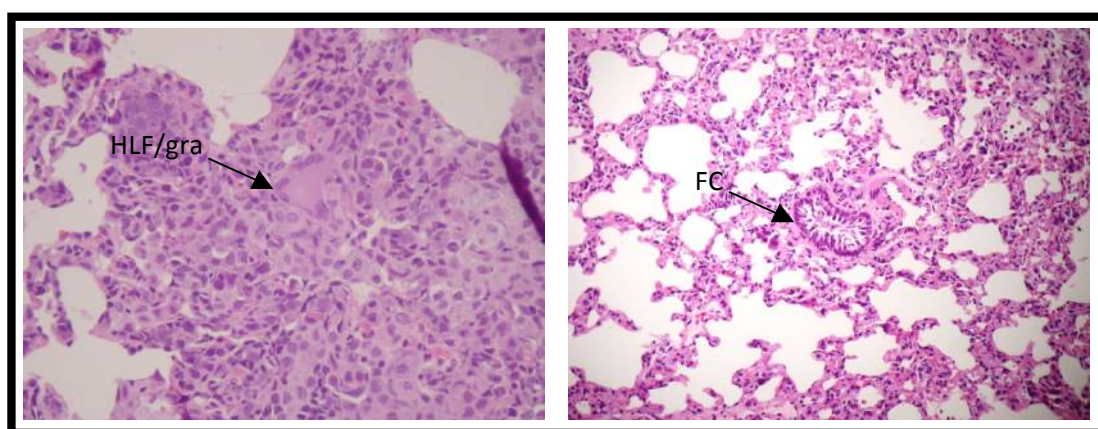


Figura 100 – Pulmão de ratos fêmeas 167 e 174 com aumento de 400x e 200x, em 28 dias com tratamento 1/10 com Hiperplasia Linfóide Focal/granulomatosa e no controle demonstraram presença de Focos de Colapso, respectivamente.

No rim, as lâminas avaliadas indicaram alterações histopatológicas em ambos os sexos com casos isolados de Nefrite Intersticial Discreta (NID). A arquitetura lobular estava preservada com pirâmides medulares recobertas por tecido cortical. O córtex apresentou glomérulos regularmente distribuídos, cápsula de Bowman fina, com espaço de refração artefactual além de tufo capilares finos e mesângio delicado. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento do ducto coletor não evidenciaram particularidades histológicas, do mesmo modo que as alças de Henle e ductos coletores da pirâmide medular e o sistema pielocalicial e ainda, as colunas de Bertin da pélvis renal. Não foi observada reação inflamatória tampouco fibrose no interstício (matriz).

Nos ratos machos, as alterações por NID afetaram 60% dos animais tratados e 20% dos animais controle, após 28 dias. Nos ratos fêmeas 20% dos animais tratados e 40% dos animais controle apresentaram NID, após 28 dias (Figura 101). Os resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos e não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas, sem significado toxicológico renal. As alterações histopatológicas estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio fisiológico que necessita ser avaliado, mas não relacionado a dose de RF-11MAO administrada durante o tratamento diário por 28 dias. As alterações não apresentaram significado para o estudo toxicológico, com a manutenção do padrão de normalidade, visto que os animais permaneceram vivos por todo período analítico. A avaliação histopatológica corresponde com as observações da literatura (COMARCK, 2003; GARTNER & HIATT, 2007).

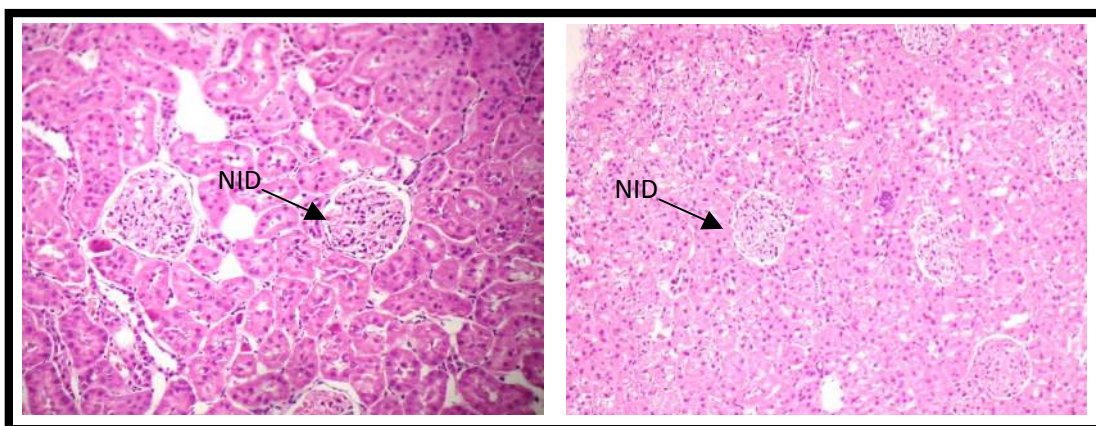


Figura 101 – Rim de ratos fêmeas 172 e 174 com aumento de 200x e 100x, em 28 dias com tratamento 1/10, com presença de Nefrite Intersticial Discreta, no animal tratado e no controle, respectivamente.

O baço manteve integridade histopatológica da cápsula de tecido conjuntivo denso emitindo trabéculas que dividem o parênquima ou polpa esplênica em compartimentos incompletos. O tecido conjuntivo denso da cápsula e das trabéculas apresentou fibras musculares lisas, numerosas e mantendo-se a estrutura esponjosa. Na polpa esplênica verificou-se tecido linfóide com formas cordonal e nodular de corpúsculos de Malpighi e apresentam o centro germinativo de Flemming na polpa branca. Na polpa vermelha ocorreu manutenção do tecido reticular, constituindo os cordões de Bilotroth ou cordões esplênicos dentro dos padrões de normalidade.

Nos ratos machos em 28 dias apresentaram Hemossiderina (H) em 20% e Hemossiderina/Magacariócitos (H/M) em 40% dos animais tratados e os do controle demonstraram H/M em 20% e H em 20% dos animais. Os ratos fêmeas apresentaram em 28 dias de tratamento H em 40% dos tratados e os do controle verificou-se H/M em 20% dos animais (Figura 102).

A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, não apresentando alterações interparamétricas consecutivas. As alterações histopatológicas estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio fisiológico e sem significado toxicológico esplênico, bem como não relacionado à dose de RF-11MAO administrada durante o

tratamento diário por 28 dias. Os dados não apresentaram significado para o estudo pré-clínico em consonância com Kessel (2001) e Gartner & Hiatt (2007).

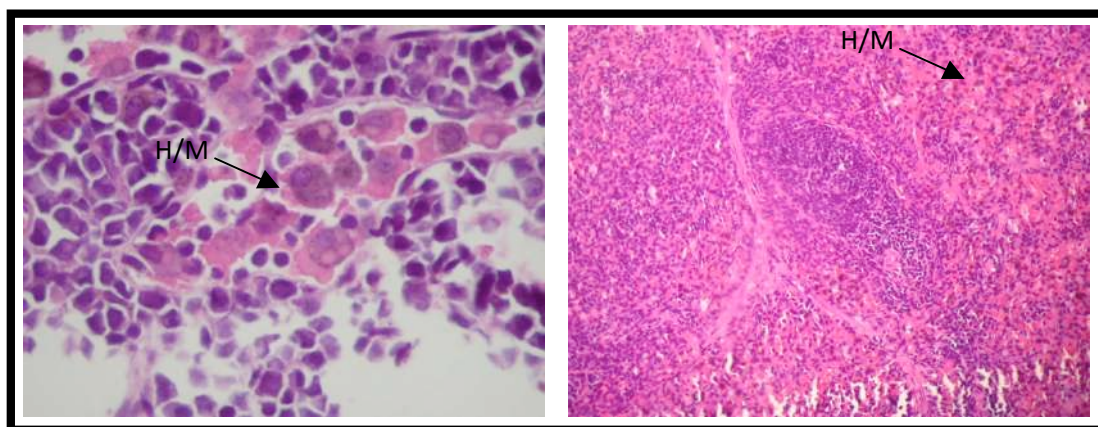


Figura 102 – Baço de ratos machos 167 e 188 com aumento de 400x e 200x, em 28 dias com tratamento 1/10, com presença de Hemossiderina/Megacariócito nos animais tratados e no controle, respectivamente.

As gônadas, nos ratos machos são representadas pelos testículos e nos ratos fêmeas pelos ovários. Os testículos foram avaliados quanto a espermatogênese nos túbulos seminíferos, pela seqüência e morfologia das células da linhagem germinativa: células de Sertoli, as espermatogônias, os espermátócitos e as espermátides. A quantidade de espermatozóide na luz testicular e das células de Leydig no interstício também foi avaliada. Nos epidídimos, observou-se o volume de espermatozóides armazenados. Os ovários foram analisados quanto a seqüência de maturação dos folículos ovarianos, o tamanho e a forma das células luteínicas, a presença de cistos foliculares e de corpos lúteos em estágio de regressão.

Não foram encontradas alterações como fibrose, isquemia e inflamação tanto nos testículos como nos ovários. Nos animais tratados em 28 dias, de ambos os sexos apresentaram 100% de normalidade (Figura 103).

Os resultados da análise histopatológica foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, não apresentando alterações interparamétricas consecutivas. As gônadas avaliadas mantiveram-se híginas, durante todo o tratamento sem alteração histopatológica diagnosticada ou relacionada com a

RF-11MAO, a avaliação histopatológica apresenta conformidade com a literatura (VERGOUWEN, 1991).

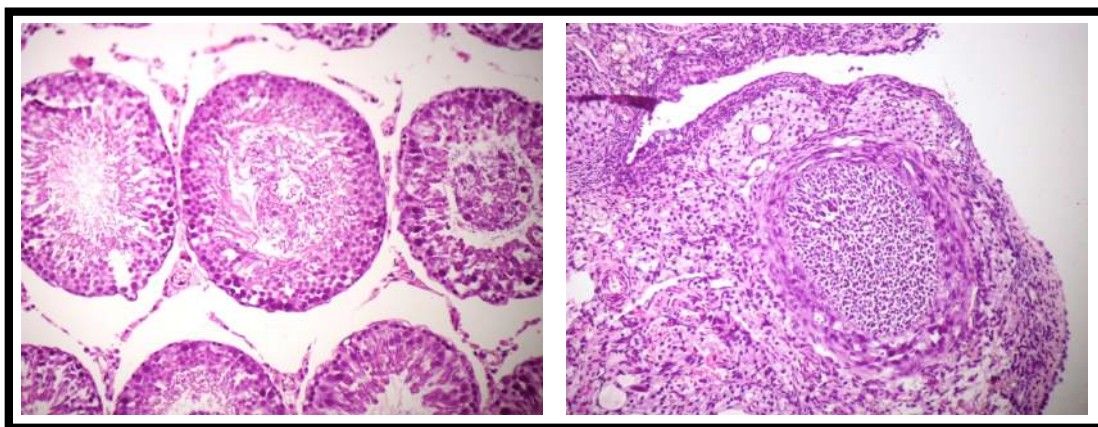


Figura 103 – Gônadas de rato macho 151 à esquerda e fêmea 169 à direita com aumento de 200x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e no controle os testículos e ovários permaneceram normais

Nas glândulas adrenais, o limite entre o córtex e a medula é bem definido, porém irregular. Os agregados de células corticais podem aparecer isolados na medula, ou células medulares podem estar presentes no córtex. A medula adrenal é composta principalmente de células poliédricas arranjadas em pequenos pacotes ou cordões ramificados curtos separados por uma rede vascular extensa. As células medulares apresentam um citoplasma finamente granular, pálido e basofílico, os núcleos são maiores e mais vesiculares que os presentes nas células corticais (Figura 104).

A avaliação histopatológica das glândulas adrenais não indicou alteração tecidual significativa em 100% dos animais machos e fêmeas tratados em 28 dias. Os resultados da análise histopatológica foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, não apresentando alterações interparamétricas consecutivas. As glândulas adrenais avaliadas permaneceram híginas, durante todo o tratamento sem alteração histopatológica relacionada com a RF-11MAO. A avaliação histopatológica apresenta concordância com as observações de Mattos *et al.* (2007).

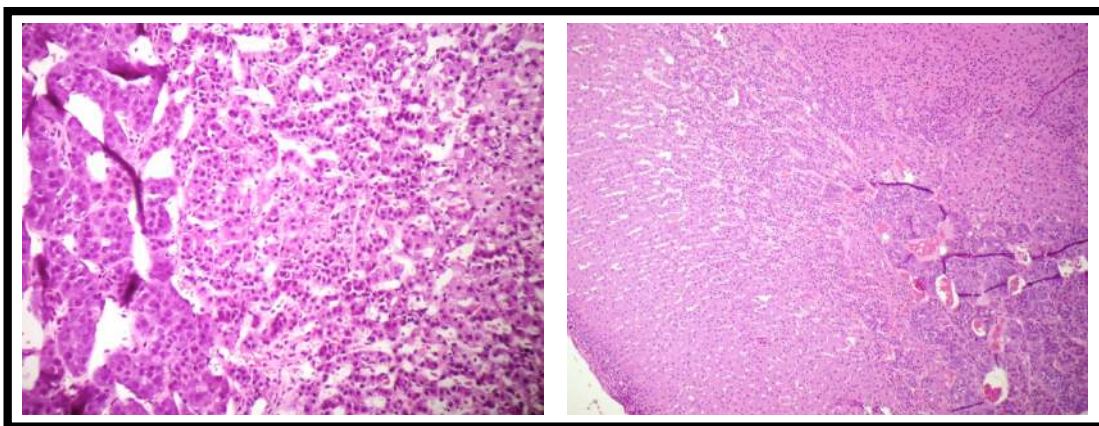


Figura 104 – Adrenais de ratos macho e fêmea 151 e 169 com aumento de 200x e 100x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle apresentaram parâmetros histológicos normais, respectivamente.

Os linfonodos ou gânglios linfáticos apresentaram cápsula de tecido conjuntivo denso envolvendo o linfonodo com trabéculas para seu interior, dividindo o parênquima em compartimentos incompletos, dividido numa região cortical, localizada abaixo da cápsula, ausente no hilo e na região medular que ocupa o centro do órgão. A zona paracortical permanece íntegra localizada entre a cortical e a medular.

Após 28 dias os ratos machos apresentaram histiocitose (HIS) em 20% e hemofagocitose (HIS/HEMO) em 20% dos animais tratados e os do controle demonstrou HIS/HEMO em 20% dos animais. Os ratos fêmeas em 28 dias apresentaram HIS em 60% dos animais tratados e nos do controle foram verificados HIS em 20% e HIS/HEMO em 20% dos animais (Figura 105).

As manifestações teciduais não indicam toxicidade induzida pelo tratamento, porque naturalmente a linfa é filtrada pelos linfonodos, que favorece o contato íntimo e demorado com os macrófagos ali situados, o que facilita a fagocitose de moléculas e partículas estranhas trazidas pela linfa. A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, não apresentando alterações interparamétricas consecutivas. As alterações histopatológicas estavam presentes nos animais controle, indicando distúrbio fisiológico e sem significado toxicológico nos linfonodos, bem como não relacionado a dose de RF-11MAO administrada

durante o tratamento diário por 28 dias. A avaliação dos dados não apresentaram significado tóxico para o estudo pré-clínico em consonância com as observações de Banks (1991).

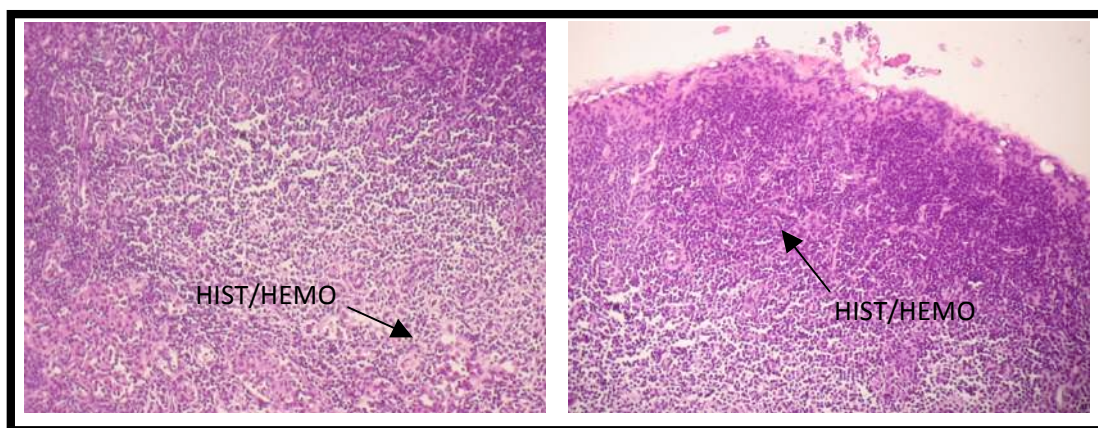


Figura 105 – Linfonodos de rato macho 186 e 156 com aumento de 100x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle apresentaram Histiocitose e Hemofagocitose, respectivamente.

O timo é um órgão linfóide primário, que demonstrou cápsula de tecido conjuntivo denso, do qual partem tabiques que dividem o órgão em lóbulos incompletos com separação imperfeita não apresenta nódulos. Cada lóbulo é formado de uma parte periférica de tecido linfóide denso formando a zona cortical, a parte central e mais clara, envolvendo o tecido difuso apresentam os corpúsculos de Hassal, e representa a zona medular com predominância de linfoblastos e linfócitos jovens, sem alterações diagnosticadas. Em 100% dos animais tratados de ambos os sexos, não indicaram modificações histopatológicas significativas para o teste pré-clínico (Figura 106).

A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, não apresentando alterações interparamétricas consecutivas. A avaliação das lâminas indicou que o timo permaneceu hígido, durante todo o tratamento, sem alteração histopatológica relacionada com a ação direta de RF-11MAO e com isso, o resultado demonstrou ser sem significado toxicológico comprovado nos cortes teciduais avaliados em conformidade com as observações de Stevens & Lowe (1995).

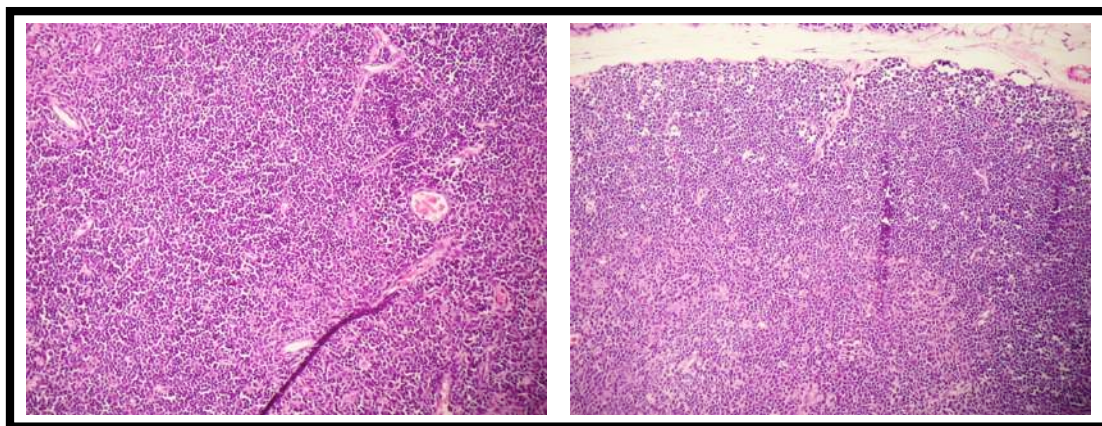


Figura 106 – Timo de rato macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 200x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle apresentaram parâmetros de normalidade, respectivamente.

A próstata em seu lóbulo anterior, também conhecida como câmara de coagulação, tem forma tubular, com aparência gelatinosa e é adjacente à vesícula seminal. As células epiteliais são colunares simples com núcleo central de padrão cribiforme. No lobo foi observado maior número de dobras do epitélio e com estrôma ao redor dos ácinos bem definidos. O líquido prostático secretado pelos ácinos permaneceu abundante e homogêneo, conferindo higidez aos tecidos avaliados. A próstata dos ratos manteve sua integridade histológica em 100% dos ratos machos tratados em 28 dias, bem como os animais do controle (Figura 107).

Os resultados da análise histopatológica foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, os quais não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. A ausência de distúrbios histopatológicos diagnosticados e relacionados com a ação da RF-11MAO refletiu na avaliação histopatológica das lâminas, que indicaram padrão de normalidade em consonância com Roy-Burman *et al.* (2004).

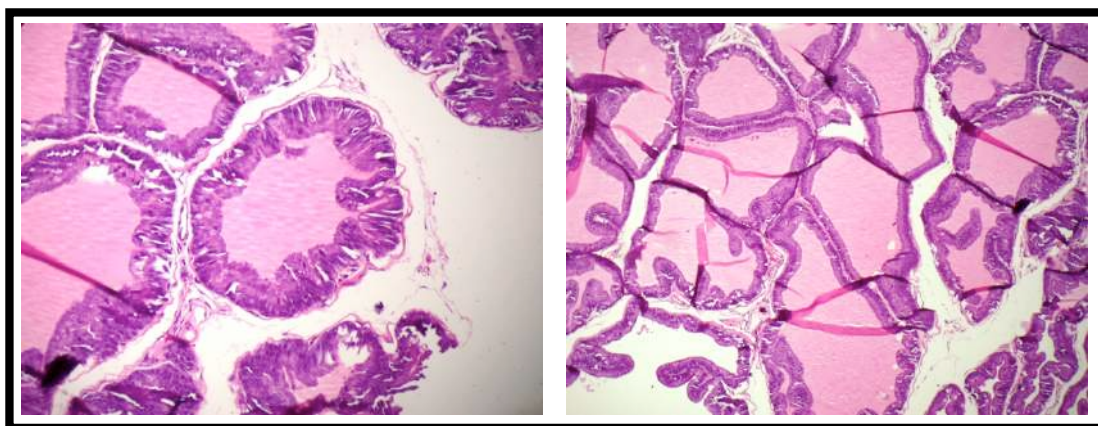


Figura 107 – Próstata de rato macho 156 e 176 com aumento de 200x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle demonstraram histologia normal, respectivamente.

A vesícula seminal é internamente coberta por tecido glandular estratificado revestida por uma camada muscular e vasos sanguíneos, os achados histológicos mantiveram higidez de sua estrutura, sem indicar manifestação histopatológica induzida pelo tratamento, após 28 dias, em 100% dos ratos machos tratados e nos do controle (Figura 108).

A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, os quais não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. A manutenção dos padrões de higidez encontram em conformidade com as observações de Ross & Pawlina (2008).

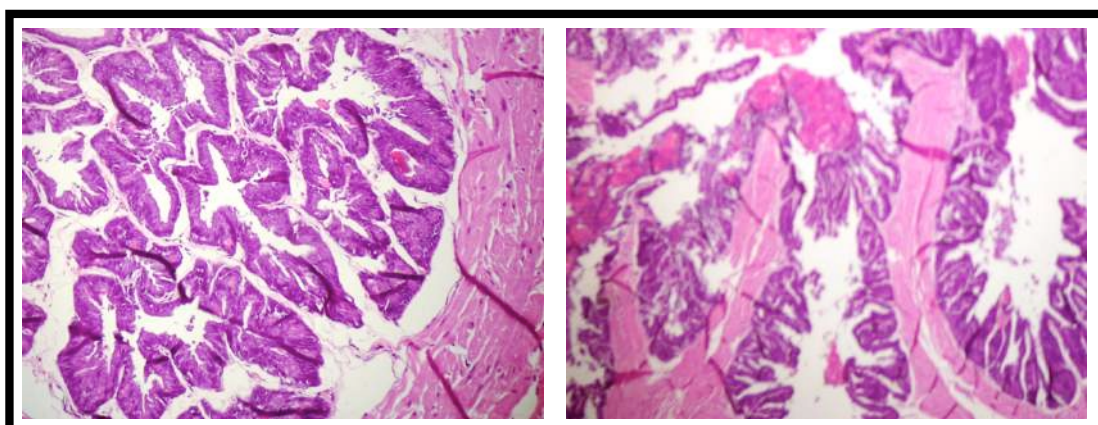


Figura 108 – Vesícula seminal de rato macho 156 e 176 com aumento de 200x e 100x, em 28 dias de tratamento com 1/10 e controle com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

No esôfago foram observadas as quatro túnicas típicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, formando pregas. A túnica mucosa apresentou epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com camada germinativa distinta. Abaixo do epitélio, presença de lâmina própria constituída por tecido conjuntivo pouco acidófilo indicando uma característica moderadamente densa. Presença de núcleos de fibroblastos e células do sistema imune como linfócitos e vasos sanguíneos. A camada muscular da mucosa bem definida delimita a mucosa da próxima túnica, a submucosa, a qual apresentou feixes de fibras colágenas, vasos sanguíneos, com ausência de glândulas esofagianas.

A túnica muscular externa apresentou-se constituída por fibras musculares estriadas organizadas em duas camadas: circular interna e longitudinal externa. Entre as camadas foi possível observar neurônios mioentéricos formando pequenos gânglios. A última túnica, denominada de serosa, apresentou reduzido tecido conjuntivo moderadamente denso, revestido por epitélio simples pavimentoso formando o mesotélio (BANKS, 1991 e JUNQUIRA & CARNEIRO, 2008).

A avaliação histopatológica do esôfago dos ratos machos e fêmeas mostrou preservação da organização tecidual, com nítida conservação da camada queratinizada, demonstrando não haver reação adversa a exposição do tratamento com a RF-11MAO, manifestada nos animais tratados e nos do controle, em 28 dias (Figura 109).

Os resultados da análise histopatológica foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, os quais não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. A avaliação da manutenção dos padrões de normalidade do tecido esofágico foi descrita conforme a literatura (ROSS & PAWLINA, 2008).

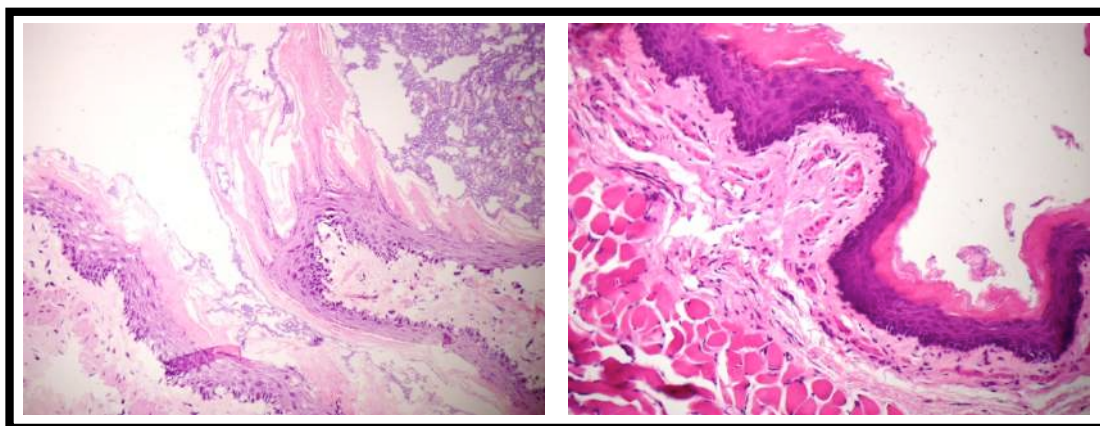


Figura 109 – Esôfago de rato macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

No estômago, a integridade foi mantida nas tûnicas: glandular nas células e criptas, muscular da mucosa e submucosa com presença de vasos sanguíneos hígidos, bem como na muscular, circular e longitudinal ladeando os gânglios do plexo mientérico.

A avaliação histopatológica apresentou mucosa sem alterações em 100% dos ratos Wistar de ambos os sexos, após análise em 28 dias, nos animais tratados e nos do controle. Tais observações indicaram que a ação da RF-11MAO foi atóxica aos tecidos avaliados (Figura 110). Os resultados da análise histopatológica foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, os quais não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. A manutenção dos padrões de normalidade do tecido estomacal encontra conformidade com a literatura (JUNQUIRA; CARNEIRO, 2008; BANKS, 1991).

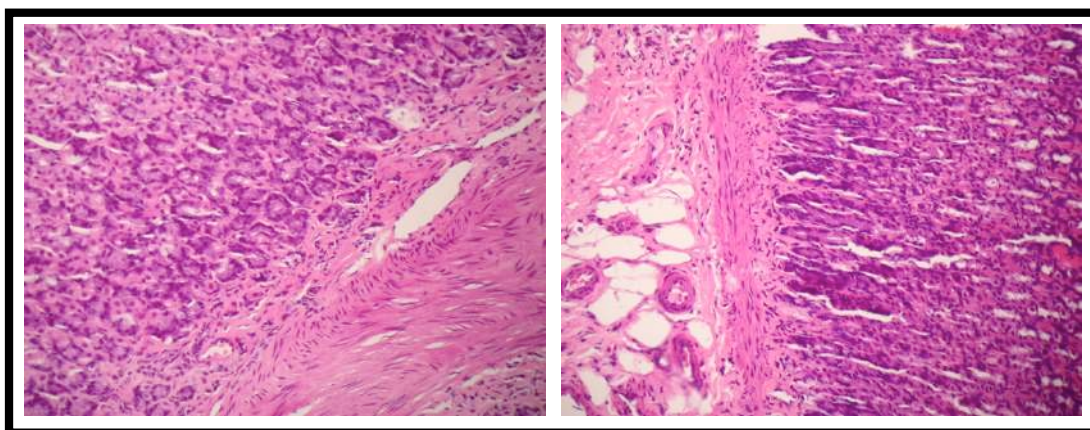


Figura 110 – Estômago de rato macho 151 e 174 com aumento de 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

O intestino delgado apresentou mucosa formada por diversos tipos celulares, com destaque as células absortivas e caliciformes, de forma nítida as células absortivas ou enterócitos, com a borda em escova, foram localizadas em sua superfície apical. As células caliciformes foram encontradas intercaladas às células absortivas tanto na região dos vilos como na região das criptas.

Apesar da exposição ao tratamento com a RF-11MAO, por 28 dias consecutivos, a mucosa não apresentou alterações histomorfológicas importantes, mantendo o número e altura das vilosidades e glândulas de Liberkühn íntegras, tanto nos animais tratados como nos do controle, em ambos os sexos mantiveram padrão histológico de normalidade de 100%, configurando ação atóxica da amostra testada (Figura 111). A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, os quais não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. A manutenção dos padrões de normalidade dos tecidos que compõem o intestino delgado foram descritos conforme a literatura (BANKS, 1991).

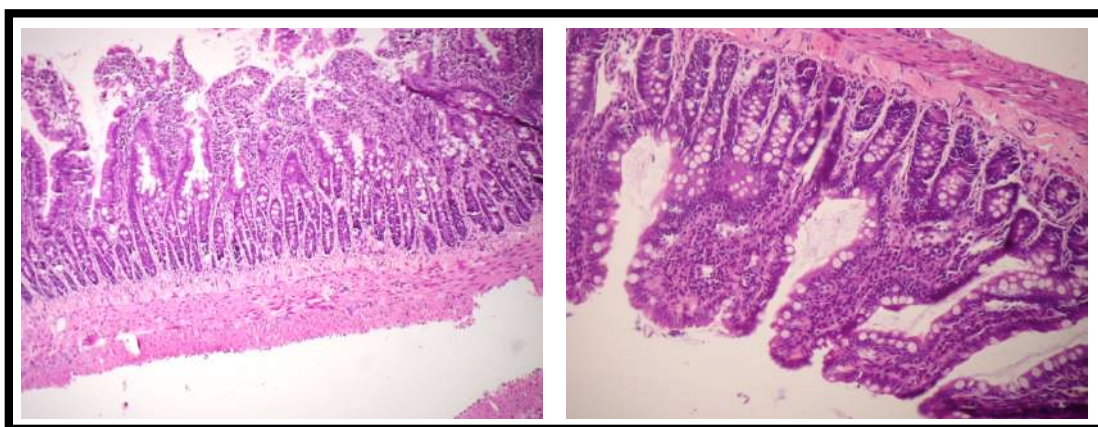


Figura 111 – Intestino delgado de ratos macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 100x e 200x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

O intestino grosso apresentou a capa mucosa, com células glandulares e epiteliais mucoídes, especializadas na produção de muco e na absorção de líquidos, a capa submucosa

formada por tecido conjuntivo largo, contendo considerável rede de vasos capilares, nódulos linfáticos e fibras nervosas. A capa muscular composta por duas camadas de fibras musculares, circular e longitudinal em íntimo contato com a capa serosa, mais externa e delgada, composta de tecido fibroelástico correspondente a extensão do peritoneu, membrana que cobre os intestinos na cavidade abdominal (Figura 112).

Os cortes histológicos mantiveram sua integridade em 100% dos animais tratados e do controle, em ambos os sexos por 28 dias. A análise histopatológica dos resultados foram relacionados com as avaliações da bioquímica plasmática, hemograma, morfologia e peso desses órgãos, os quais não apresentaram alterações interparamétricas consecutivas. Os padrões de normalidade dos tecidos que compõem o intestino grosso foram mantidos e descritos conforme as observações de Banks (1991) e Ross & Pawlina (2008).

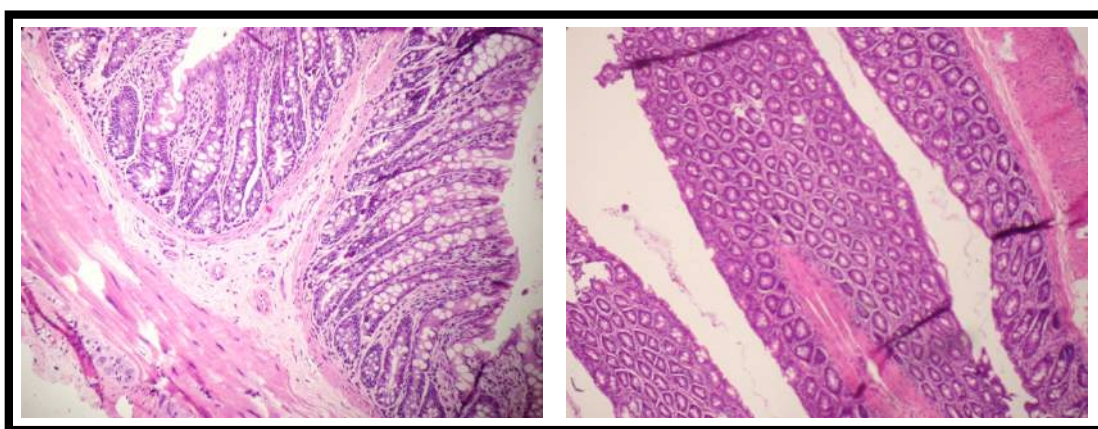


Figura 112 – Intestino grosso de ratos macho e fêmea 151 e 174 com aumento de 100x, com parâmetros histológicos de normalidade, respectivamente.

Nas Tabelas 35 - 36 encontram-se os dados obtidos pelo parâmetro da maior dose da amostra RF-11MAO diluída 1/10, escolhidos de forma aleatória, pertinentes aos achados histopatológicos da fase subcrônica dos ratos machos e fêmeas, submetidos a tratamento com doses repetidas após 28 dias, bem como o respectivo controle.

[illegible]

[illegible]

6 CONCLUSÕES

A mistura de óleos essenciais identificada como RF-11MAO apresentou como moléculas moioritárias o p-cimeno, constituinte com maior teor em *P. heptaphyllum*, seguido dos constituintes moioritários α -ciperona, ciperotundona e cipereno presentes em *C. rotundus* e o moioritário de *G. citriodora*, o citronelal. Esse constituintes moioritários são considerados os marcadores químicos da RF-11MAO.

A amostra RF-11MAO apresentou Concentração Inibitória Mínima de 1,2 mg/mL e Concentração Bactericida Mínima de 1,2 mg/mL sobre *S. mutans*.

Os resultados dos testes preliminares caracterizaram como dose letal de 100% dos animais tratados, por via oral com a dose pura em volume de 0,2 mL, correspondente a 5 mL/Kg da amostra RF-11MAO, em 24 horas após administração em camundongos Swiss.

A análise da DL_{50} da amostra RF-11MAO foi de 1,8 mL/Kg em camundongos e permitiu a extrapolação da dose para ratos Wistar, bem como a elaboração de protocolo dos testes definitivos de toxicidade pré-clínicos, nas fases aguda e subcrônica, diluindo-se a amostra em 1/3, 1/10, 1/30 e 1/100.

A administração oral de dose única da amostra RF-11MAO diluída em 1/3, 1/10 e 1/30 da amostra original, na dose ($\sim 1,5$ g/Kg) não produziu sinais de toxicidade em ratos nas primeiras 24 horas, ou 14 dias depois da administração. Não houve morte em nenhum grupo. Os exames de bioquímica plasmática e os exames hematológicos, também não indicaram sinais específicos de toxicidade de dose única em órgãos alvo.

O exame histopatológico detectou algumas alterações esporádicas (esteatose difusa no fígado, histiocitose em linfonodos, comuns a vários grupos inclusive os controles e, portanto, aparentemente não relacionadas com o tratamento, ou com o tempo após administração do RF-11MAO ($\sim 1,5$ g/Kg). Chame-se atenção que em 01 animal tratado com RF-11MAO foi

detectada nefrite intersticial discreta cuja ocorrência deve ser procurada nos estudos mais prolongados e com doses repetidas.

O tratamento de ratos com RF-11MAO diluída em 1/10, 1/30 e 1/100 da amostra original na dose (5,0 mL/Kg), durante 4 semanas consecutivas não interferiu com o ganho de peso dos animais tratados, não alterou a bioquímica plasmática, não modificou os parâmetros hematológicos e o tempo de sangramento dos ratos.

As alterações do peso dos órgãos relativamente aos pesos dos ratos controles só foram evidentes nos fígados dos animais tratados com a maior dose (20%). Nesses animais o exame histopatológico não detectou alteração anatômica que justificasse a hiperplasia e tampouco foram detectadas alterações nos parâmetros da bioquímica plasmática ou sanguínea nos parâmetros hematológicos avaliados que a indicassem.

Nenhum sinal foi indicativo de toxicidade da amostra testada em doses repetidas, não interferiu com o ganho de peso dos animais tratados, não houve abstinência de água ou ração.

A dose máxima (NOAEL-Dose) estabelecida para realização dos testes clínicos em humanos é de aproximadamente de 1,5 mg/kg da amostra RF-11MAO.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4ed. Illinois: Allured Books, 2009. 804 p.

ADEBAYO, J. O. *et al.* Effect of ethanolic extract of *Bougainvillea spectabilis* leaves on haematological and serum lipid variables in rats. *Biokemistri Journal*, Nigeria, v.17, n.1, p.45-50, jun. 2005.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AL SAHHAF, Z. Y. Toxicity of sumithion in albino rats: hematological and biochemical studies. *Journal of Applied Science*, v.6, n.14, p. 2959-2962, 2006.

ALDSWORTH, T.G.; MACFARLANE, T.W. A novel in vitro model system to grow films of oral bacteria for the study of human tooth root surface caries. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 139-146, jul. 2001.

AL-HABORI, M. *et al.* Toxicological valuation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, p.209-217. 2002.

ALZOLA, R. Curso de histologia, embriologia y teratologia guia de estudio: técnicas histológicas. UNCPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Del Centro de La provincia de Buenos Aires. 2001.

AMARAL, A. S. *et al.* Valores de referência de constituintes bioquímicos serviços para cães da região de Santa Maria, RS. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana*, v. 2-3, n. 1, p. 81-86, 1995-1996.

AMORIM, J. A. Fitoterapia Popular e Saúde da Comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba, Brasil. 1999. 316f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANDERSON, T. O. M. Dental treatment in Medieval England. *British Dental Journal*. v. 197, n. 7, p. 419-425, 2004.

AQUINO NETO, Francisco Radler; SOUZA NUNES, Denise da Silva. *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

ARAÚJO, E. J. A. *et al.* Hematologic and biochemical parameters of rats subjected to hypoproteic and hipercaloric diet. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, Umuarama*, v. 8, n.2, p.139-146, jul./dez. 2005.

ARCHER, J. Animal behaviour, 21: 205-235, 1973 In: LAPA, A. J. *et al.* Métodos de

avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Reimpressão, São Paulo, Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM. 2005. 156p.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behaviour*, v.21, n. 2, p. 205-235, 1973.

BAIN, B. J. Células sanguíneas: um guia prático. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 437 p.

BANDEIRA, P. N. *et al.* Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, p. 33-34, 2001

BANDEIRA, P. N. *et al.* Estudo dos constituintes fixos e voláteis da resina de *Protium heptaphyllum*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23, 2000, Poços de Caldas. Resumos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2000. Ref. PN 1447/2.

BANKS, W. J. *Histologia Veterinária Aplicada*. 2 ed. São Paulo, Manole, 1991.

BARBIERI, DICLER DE SANT'ANNA VITOR. Análise da aderência in vitro de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Natural products with antileprotic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Paraíba, v. 17, n. 1, p. 141-148, jan/mar. 2007.

BARRY, A. L., THORNSBERRY, C. 1991. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A., HAUSER, W. J., HERMANN, K. L., ISENBERG, H. D., SHAMODY, H. J. 1991. *Manual of clinical microbiology*. 5ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125.

BAYDAR, H. *et al.* Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, v. 15, n. 3, p. 169-172, apr. 2004.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. Manual de técnicas histopatológicas para histologia normal e patológica. EDART. São Paulo, 1976.

BENDAZZOLI, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. *Mundo Saúde*, v. 24, n. 2, p. 123-126, mar./abr. 2000.

BERNIMOULIN, J. P. Recent concepts in plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology*, Berlin, v. 30, n. 5, p. 7-9, 2003.

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 20ed. São Paulo: Melhoramentos, 1981. 1062 p.

BOISSIER, J. R. *et al.* *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v. 133, p. 29-32, 1961.

BORGES, L. F.; SIQUEIRA, L. O. Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, Passo Fundo, v.31, n. 4, p. 247-251, 2009.

BORSINI, F.; EVANGELISTA, S.; MELI, A. Effect of GABAergic drugs in the behavioral despair test in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 121, n. 2, p. 265-268, feb. 1986.

BRASIL 1988. Resolução nº 01, de 13 de junho de 1988 – Dispõe sobre normas de pesquisa em saúde. Brasília: Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.

BRASIL, 2000. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Resolução – RDC n.º 17, de 24 de fevereiro de 2000. Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL, 2001. Ministério da Saúde. Projeto SB 2000: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000: manual do coordenador. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. Brasília (DF); Ministério da Saúde.

BRASIL, 2004. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004: *Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. Instruções operacionais: informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Diário Oficial da União, de 5 de dezembro de 1988. No Capítulo VI, que trata do Meio Ambiente, o art. 225, inciso VII. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/constituicao.htm>, Consulta em: 28 de março de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. pp 124.

BRASIL. Poder Executivo Federal, Presidência da República Federativa do Brasil. Decreto lei nº 24.645, Diário Oficial da União. Suplemento ao número 162, de 14 de julho de 1934. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br>>, Consulta em: 22 de março de 2011.

BRASIL. Poder Executivo Federal, Presidência da República Federativa do Brasil. Decreto lei nº 3.688, Diário Oficial da União, de 3 de outubro de 1941. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br>>, Consulta em: 25 de março de 2011.

BRASIL. Poder Executivo Federal, Presidência da República Federativa do Brasil. Lei nº 11.794, Diário Oficial da União de 8 de outubro de 2008. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br>>, Consulta em: 22 de março de 2011.

BRASIL. Poder Executivo Federal, Presidência da República Federativa do Brasil. Decreto lei nº 6.899, Diário Oficial da União de 15 de julho de 2009. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br>>, Consulta em: 23 de março de 2011.

BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. *Scandinavian Journal of Dental Research*, v. 100, n. 1, p. 47-51, feb. 1992.

BRITO, Alba Souza. Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo. Campinas: Unicamp, 1995.

120 p.

BRUNI, R. *et al.* Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, v. 85, n. 3, p. 415-421, may. 2004.

BUFFON, M. C. M. *et al.* Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “in vitro”. *Revista Visão Acadêmica*, v. 2, n. 1, p. 31-38, 2001.

BUSH, B.M. Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 100-148.

CAREGARO, L. *et al.* Malnutrition in alcoholic and virus-related cirrhosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.63, n.4, p.602-609, 1996.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. *Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria*, v.1, p. 25-31, 1979.

CARSON, C. F. *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 35, n. 3, p. 421-424, 1995.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 78, n. 3, p. 264-269, mar. 1995.

CARVALHO-FILHO, J. L. S. *et al.* Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 1, p. 24-30, jan./mar. 2006.

CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Resultado de exames hematológicos para ratos Wistar - Laudo Clínico. In: Portal da Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>>. Acesso em Janeiro/2009.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, Índia, v. 91, n. 1, p. 105-108, mar. 2004.

CHATTOTADHYAY, D. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, India, v. 82, n. 2-3, p. 229-237, oct. 2002.

CHEW, D.J.; Di BARTOLA, S.P. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: ETTINGER, S.J. Tratado de medicina interna veterinária. São Paulo: Manole, 1992, v. 4, cap. 107, p. 1975-2046.

CHRISTOPH, F.; KAULFERS, P.M.; STAHL-BISKUP, E. A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s. l. with special reference to the activity of beta-triketones. *Planta Med*, v. 66, n. 6, p. 556-560, aug. 2000.

CHWEH, A. Y.; SWINYARD, E. A.; WOLF, H. H. Hypnotic action of pentobarbital in mice: a possible mechanism. *Experimental Neurology*, v. 97, n.1, p.70-76, 1987.

CIARDI, J. E.; ROSENTHAL, A. B.; BOWEN, W. H. Rapid quantitative determination of the effect of antiplaque agents and antisera on the growth, acid production, and adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, v. 60, n. 3, p. 756-762, mar. 1981.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 30, n. 5, p. 22-24, jun. 2003.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e AAALAC - Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, Institute of Laboratory Animals Recourses, Commission on Life Sciences, National Research Council. Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório / tradução Guillermo Riveira. Goiânia: COBEA e AAALAC, 2003. 162p.

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os princípios éticos da experimentação animal. São Paulo, 2003.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios básicos na experimentação animal, 1991. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm>>. Consulta em: 19 mai. 2009.

COELHO DE SOUZA, G. *et al.* Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, n. 1, p. 135-143, jan. 2004.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*. v. 257, n. 5073, p. 1050-1055, aug. 1992.

COLES, E.H. Patologia clínica veterinária. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984, 566 p.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Perina S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006. 453p.

COMARCK, D. H. Fundamentos de histologia. 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003, 371 p.

CORRÊA, R. F. *et al.* Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Active Formulations based on plant extracts; phytocosmetic and/or phytotherapeutic formulations comprising the same method for. A61K 36/8905; A61K 36/32; A61K 36/185; A61K 36/54; A61Q 11/00; A61Q 15/00; A61P 31/00; A61P 31/10; A61P 31/12; A61P 31/04. US 2010/0284943 A1. 25 jun 2010, 11 nov. 2010. www.wipo.int. Acesso: 15 de novembro de 2010.

CORRÊA, Renilto Frota. Efeitos antimicrobianos, antiácidos e removedores de biofilme de algumas espécies vegetais amazônicas sobre o *Streptococcus mutans*. 2007. 138f. Dissertação

(Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

CORTEZ, D. A. G. *et al.* Antibacterial activity of a biphenyl and xanthenes from *Kilmeyera coriacea*. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, n. 7, p. 485-489, apr. 2002.

COSTA, J. G. M. *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Ceará, v. 15, n. 4, p. 304-309, out./dez. 2005.

COSTA, M.A.S. *et al.* Cyperaceae, In: RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, 1999.

COX, S. D. *et al.* The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, n. 1, p. 170-175, jan. 2000.

CURY, J. A. Concentração de fluoreto em chás brasileiros e seu significado na prevenção de cárie. *Revista Gaúcha de Odontologia*. v. 29, n.2, p. 136-138, 1981.

CURY, J. A. *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Research*, v. 34, n. 6, p. 491-497, 2000.

DANTAS, J. A. *et al.* Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Revista Acta Scientiarum. Health Science*, v. 28, n. 2, p. 165-170, jul-dez, 2006.

DESCAT, F. Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme. 2002. 105p. Thèse - Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France.

DE-SOUZA, M. M. *et al.* Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. *Revista Brasileira Farmacognosia*, Santa Catarina, v. 16, n. 3, p. 365-371, jul./set. 2006.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Campinas, v. 97, n.2, p. 305-311, feb. 2005.

EICK, S. *et al.* Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 31, n. 3, p. 278-285, mar. 2004.

EL HENDY, H. A.; YOUSEF, M. I.; EL-NAGA, N. I. A. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper and iron in growing rats. *Toxicology*, v. 167, n. 2, p. 163-170, 2001.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, v. 64, n. 8, p. 711-713, dec. 1998.

F'ERES, C.A.O., MADALOSSO, R.C., ROCHA, O.A., LEITE, J.P.V., GUIMARÃES, T.M.D.P., TOLEDO, V.P.P., TAGLIATI, C.A., 2006. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 108, 450–456.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2004.

FAILACE, Renato. *Hemograma: Manual de Interpretação*. 4ed. Porto Alegre: Artemed, 2003. 298p.

FARLEY, J.R.; BAYLINK, D.J. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism*, v. 35, p. 563-571, 1986.

FARNSWORTH, N. R. *et al.* Medicinal plants in therapy. In: *Bulletin the World Health Organization*, 63, p. 965-981. 1985.

FEIJÓ, ANA MARIA. *Utilização de animais na Investigação e na Docência: uma reflexão necessária*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2005. 145p.

FENNEL, C. W. *et al.* Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, oct. 2004.

FERREIRA, S. H. *Medicamentos a partir de plantas medicinais do Brasil*. 1ed. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 142 p.

FIDLER P. *et al.* Prospective Evaluation of a Chamomile Mouthwash for Prevention of 5-FU – induced oral mucosites. *Cancer*, v. 77, n. 3, p. 522-525, feb. 1996.

FIN C. A.; RIGATTO K. *Utilização de animais em experimentação: Aspectos éticos, jurídicos e metodológicos*. Sociedade Rio-Grandense de Bioética, v. 1, n. 4, jul. 2007.

FISCHMAN, S. L. A clinician's perspective on antimicrobial mouthrinses. *Journal of the American Dental Association*, v. 125, n. 2, p. 20S-22S, aug. 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Animal production and health: nutritional metabolite kit protocols*. Seibersdorf: FAO/IAEA, 1993.

FRANCISCO, K. S. F. *Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico*, *Revista Saúde*, v. 4, n. 1, 2010.

FRANDSEN, E. V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 6, n. 3, p. 129-133, 1991.

GAINES, S. *et al.* A novel spectrofluorometric microassay for *Streptococcus mutans* adherence to hydroxylapatite. *Journal of Microbiological Methods*, v. 54, n. 3, p. 315-323. 2003.

GARTINER, L. P.; HIATT, J. L. *Atlas colorido de histologia*. 4ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, 431 p.

GIBBONS, R. J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Archs Oral Biol*, v. 13,

p. 62-1249, 1968.

GIRARD, J.; ASSAN, R. Régulation intracellulaire du métabolisme des substrats énergétiques. In: TCHOBROUTSKY, G. & GUY-GRAND, B. editors. Nutrition, métabolismes et diététique. 2^{ème} éd. Paris:Flammarion Médecine-Sciences, p.31-69, 1979.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology, v. 18, n. 11, p.1357-1364, 1973.

GOLDIM, José Roberto; RAYMUNDO, Marcia Mocelli. Pesquisa em Saúde e os direitos dos animais. 2 ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GONÇALVES, E. S. *et al.* Avaliação toxicológica crônica do extrato hidroalcoólico de *Operculina alata* (Ham.) Urban sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. Latin American Journal of Pharmacy, v.26, n. 3, p. 369-374, 2007.

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

GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. In: Ciência Hoje, v. 89, n. 15, p. 51-54, 1993.

GREENFIELD, J.; CAMPBELL, L. Insulin resistance and obesity. Clinical Dermatology, v. 22, n. 4, p. 289-295, 2004.

GRÖNROOS, L. Quantitative and Qualitative Characterization of *mutans* Streptococci in Saliva and in the Dentition. 2000. 80f. Dissertação Acadêmica. Department of Pedodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, Helsinki.

GROPPO, F. C. *et al.* Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. International Dental Journal. v. 52, n. 6, p. 433-437, 2002.

GUIMARÃES, Marco Aurélio; MÁZARO, Renata. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004. 167p.

HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. American Journal Infect Control, v. 32, p. 402-408, 2004.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. Journal Appl Microbiol, v. 86, p. 985-990, 1999.

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

HELLSTEN, Y. *et al.* AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. Journal of Physiology, v. 520, n. 3, p. 909-920, 1999.

HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 18 ed. São Paulo: Manole, 1998.

HO, K.Y. *et al.* Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. Journal Pharmacy Pharmacology, v. 53, p. 187-191, 2001.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. Journal Essential Oil Research, v. 15, p. 428-433, 2003.

IROBI, O. N.; ADEDAYO, O. Antifungal activity of aqueous extract of dormant fruits of *Hyphaene thebaica* (Palmae). Pharm Biol, v. 37, p. 114-117, 1999.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. 4ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 407p.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta Medica, v. 53, p. 395-398, 1987.

JARDIM, P. S.; JARDIM, E. G J. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. RGO, Porto Alegre, v. 46, n. 2, p. 79-84. 1998.

JIROVETZ, L. *et al.* Comparative analysis of the essential oil and SPME-headspace aroma compounds of *Cyperus rotundus* L. roots/tubers from South-India using GC, GC-MS and olfactometry. Journal Essential Oil-Bearing Plants, v. 7, p. 100-106, 2004.

JORGE, A. O. C. Microbiologia bucal. 2ed., São Paulo: Livraria Editora Santos, 1998. 104p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, 488 p.

KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). Journal of Ethnopharmacology, v. 90, p. 359-365, 2004.

KARAMAN, İ. *et al.* Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. Journal of Ethnopharmacology, v. 85, p. 231-235, 2003.

KESSEL, R.G. Histologia Médica Básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, 511 p.

KHAN, Z. K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. Pharm Biol, v. 38, p. 87-100, 2000.

KILANI, S. *et al.* Comparative Study of *Cyperus rotundus* Essential Oil by a Modified GC/MS Analysis Method. Evaluation of Its Antioxidant, Cytotoxic, and Apoptotic Effects.

Chemistry & Biodiversity, Tunisia, v. 5, n. 5, p. 729-742, may 2008.

KILANI, S. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) *Cyperus rotundus*. Journal Essential Oil Research. v. 17, p. 695-700, 2005.

KISMANN, K. G. Plantas infestantes e nocivas. BASF-Brasileira S/A. São Paulo. 1991. 608p.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. Annual Review of Microbiology, v. 54, p. 413-37, 2000.

KOŁODZIEJ, H. *et al.* Evaluation of the antimicrobial potency of tannin and related compounds using the microdilution broth method. Planta Med., v. 65, p. 444-446, 1999.

LANCEL, M. Role of GABAA receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. Sleep, v. 22, n.1, p.33-42, 1999.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p.181-196. 2003.

LAPA, A. J. *et al.* Medicinal plants research in Latin America. In: LUIJENDIJK, T.J.C.(ed.); 2000 years of natural products research – past, present and future. Holanda: Ed. Phytoconsul, 2000.

LAPA, A. J. *et al.* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Reimpressão, São Paulo, Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM. 2005. 156p.

LAPA, A. J. *et al.* The Brazilian folk medicine program to validate medicinal plants – a topic in new antihypertensive drug research., In: HOSTETTMANN, K. (ed.) Chemistry, biological and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas. 1. Ed. Panama: Ed. Harwood Academic Publishers, 1999.

LAPA, A. J. *et al.* Validation of medicinal plants in Latin America: reasons and goals. In: J. Ethnopharmacol. , submetido à publicação, 2001.

LAWAL, O. A; OYEDEJI, A. O. Chemical Composition of the Essential Oils of *Cyperus rotundus* L. from South Africa. Molecules, v. 14, p. 2909-2917, aug. 2009.

LEAL D.M., *et al.* Proteção funcional do rim com lovastatina após isquemia e reperfusão renal. Acta Cirurgica Brasileira, São Paulo, v.16, n.1, p. 7-8, 2001.

LEITÃO, S. G. *et al.* Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 6-11, 2006.

LEITE, B. *et al.* Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 9, p.1-41. 2001.

- LEITE, L. A. C. *et al.* Comparação entre a contagem de plaquetas pelos métodos manual e automatizado. *NewsLab*, v.81, p.106-114, 2007.
- LI-CHANG, L.; YUE-WEN, C.; CHENG-CHUN, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal Food Microbiology*, v. 102, p. 213-220, 2005.
- LILLIE, L. E.; TEMPLE, N. J.; FLORENCE, L. Z. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Human and Experimental Toxicology*, Houndmills, v. 15, n. 8, p. 612-616, 1996.
- LIMA JR, J.F.; DIMENSTEIN, M. A Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: Visão do odontólogo. *Saúde Rev.* v. 8, p. 1937-1944, 2006.
- LIMA, D. X. *et al.* Efeito da colestase nos aspectos funcionais e morfológicos renais após nefrectomia. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, n. 6, p. 513-516, 2008.
- LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais. In: *Das plantas medicinais aos fitoterápicos: abordagem científica*. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB. p. 58-59, 1997.
- LIMA, I. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 197-201, abr./jun. 2006.
- LIMA, T. C. M.; MORATO, G. S.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of the central properties of *Artemisia verloturum*. *Planta Medica*, v. 59, p. 326-329, 1993.
- LINDSEY, B.J. Amino acids and proteins. In: BISHOP, M.L.; DUBENENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P. *Clinical chemistry: principles, procedures and correlations*. Philadelphia: Lippincott, p.167-206, 1996.
- LIS-BACHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal Appl Bacteriol*, v. 82, p. 759-762, 1997.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, v. 50, p. 353-380, 1986.
- LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 544p.
- LORENZO, J. L. de; LORENZO, A. de. Etiologia da cárie dental: base da prevenção atual. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. *Odontopediatria: Prevenção*. São Paulo: Artes médicas, 2002, cap. 13, 317p.
- LUCIO, E. M. R. A. *et al.* Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 9-10, p. 23-25, 2000.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova*, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.
- MACKELLY, S. Estudo comparativo de métodos de contagem de reticulócitos para controle

de qualidade. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 8, p. 127-147, 1983.

MARQUES, D. D. *et al.* Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazonica*, v. 40, n. 1, p. 227-230, 2010.

MARTIN, D.W. *et al.* In: HARPER'S Review of Biochemistry. 18th ed. California: Lange Medical, 1981. 61 p.

MATANA, S.R. *et al.* Avaliação da contagem automatizada de plaquetas como um dos critérios de qualidade de hemocomponentes em banco de sangue. *Informativo científico da Roche diagnóstica*, São Paulo, ano 1, n.5, 2008.

MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150 p.

MATSUMOTO M. *et al.* Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of *mutans* streptococci. *Caries Research*, v. 33, n. 6, p. 441-445, 1999.

MATTOS, T. D. *et al.* Ação do cádmio na adrenal do rato durante a lactação. *Revista Investigação*, Franca: Universidade de Franca, v: 7, n. 1-3, 2007.

MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Cloning of the *Streptococcus mutans* gene end coding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infection and Immunity*, v. 69, p. 6931-6941, 2001.

MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. *Journal of Dental Research*, v. 79, p.1371-1377, 2000.

MCBRIDE, B.C. *et al.* Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strain of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, v. 44, p. 68-75, 1984.

MELLO, F. B. 2001. Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. Porto Alegre, 120 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MENG, J. C.; ZHU, Q. X.; THAN, R. X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. *Planta Medica*, v. 66, n. 6, p. 541-544, aug. 2000.

MESSIAS J. B. *et al.* Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado, *Medicina Veterinária*, Recife, v.3, n.2, p.1-8, abr-jun. 2009.

MICHELIN, D. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 316-320, 2005.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Esteatose e esteato-hepatite não alcoólicas. *Revista Brasileira de Medicina*, ed., Nov 06. v 63, n 11, Editora Moreira Jr, 2006, 564-570 pp.

MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. *Desenvolvimento de Fitoterápicos*. São Paulo: Tecmedd, 2004. 116 p.

MITRUKA, M.B.; RAWNSLEY, H.M. Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. 2.ed. New York : Masson Publishing, 1981. 314p.

MOBOT. MISSOURI BOTANICAL GARDEN-W3-TROPICOS. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?name=Guatteria+citriodora>. Acesso em: 01 de nov. 2009.

MONTANARO, L. *et al.* Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials, *Biomaterials*, v. 25, p. 4457-4463, 2004.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resurin byp-benzoquinones in polar solvents. *Dyes Pigments*, v. 64, p. 117-124, 2005.

MORAN, J.; ADDY, M.; ROBERTS, S. A Comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. *J. Clin. Periodontal*, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 578-582, 1992.

MORESCO, R.N. *et al.* Análise comparativa das técnicas manual e automatizada (ADVIA tm 120) para contagem de reticulócitos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 35, n. 1, p. 17-18, 2003.

NAGOYA, S. *et al.* Detection of bonetype alkaline phosphatase by monoclonal antibodies reacting with human osteosarcoma-associated antigen. *Japanese Journal of Cancer Research*, v. 82, p. 862-870, 1991.

NAHAS, T. R. O teste do campo aberto, In: XAVIER, G. F. *Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso*. São Paulo: Editora Plêiade, 1999. 241p.

NAKAYA, N. Hypertriglyceridemia as a cause of atherosclerosis. *Nippon Rinsho*. v. 60, n. 5, p. 860-867, 2002.

NAOUM, P. C. Academia de ciência e tecnologia. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/cien-news/inter-lab-hemo.htm>>. Acesso em: 10 out. 2008.

NEWBRUN, E. *Cariology*, 2ª ed, London, Williams and Williams, 1983. 52p.

NEWBRUN, E.; FINZEN, F.; SHARMA, M. Inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* to glass surfaces. *Caries Research*, v. 11, p. 153-159, 1977.

NIEMEIJER-KANTERS, S.D.J.M. *et al.* Lipid-lowering therapy in diabetes mellitus. The Netherlands journal of medicine, v. 58, n. 5, p. 214-222, 2001.

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. Microbiologia Oral e Imunologia. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, p. 110-308, 1997.

NISHIIOKA, SÉRGIO DE ANDRADE. Regulamentação da Pesquisa Clínica no Brasil: passado, presente e futuro. Prática Hospitalar, v. 48, p. 17-26, 2006.

NOSTRO, A., *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiol Lett, v. 230, p. 191-195, 2004.

NUNES, D. A. *et al.* A utilização de agentes fitoterápicos em odontologia. Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA, Salvador, v. 18, p.11-14, 1999.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology, v. 54, p. 49-79, 2000.

OECD 1995. Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodent. Paris: Head of Publications Service.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris: Head of Publications Service. Disponível em: <http://www.oecd.org/publications>. Acesso em: 18 dez. 2008.

OLIVEIRA, F. P. *et al.* Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 510-516, 2006b.

OLIVEIRA, F. Q. *et al.* Espécies vegetais indicadas na odontologia. Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, F. T.; FERRAZ, L. R. O Uso de Fitoterápicos na Odontologia. [Monografia – Bolsa de Extensão]. Juiz de Fora (MG): Universidade Federal de Juiz de Fora. 1998.

OLIVEIRA, M. F. S. Fitoterapia e Biodiversidade no Brasil: Saúde, Cultura e Sustentabilidade. Revista Ideas Ambientales. [Online]. 2005. Disponível em: http://www.manizales.unal.edu.co/modules/unrev_ideasAmb/documentos/IAedicion2Art05.pdf. Acesso em: 10 jun. 2010.

OLIVEIRA, R. A. G. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 77-82, 2006a.

OLIVEIRA, R. B. 2007. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e depressora do sistema nervoso central do extrato etanólico e de frações purificadas obtidos das folhas do *Synadenium umbellatum* Pax (cola-nota). Goiânia, 118 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás.

OVERHOLSER, C. D. *et al.* Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the

development of supragingival dental plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 17, p. 575-578, 1990.

OYEDJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. *Journal of Essential Oil Research*, v. 18, p. 57-59, 2006.

PALOMINO, J. C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAN, P. *et al.* Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 27, n. 4, p. 256-261, 2000.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia*. 2. ed. São Paulo:

PEREIRA, A. B. *et al.* Como avaliar o ritmo de filtração glomerular. *J Bras Nefrol*, v. 28, n. 2, p. S15-S8, 2006.

PEREIRA, J. V. Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico da *Punica granatum Linn* sobre Microorganismos Formadores de Placa Bacteriana. 1998. Dissertação (Mestrado em...). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

PINHEIRO, D. C. S. N. *et al.* Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. *Boletim Informativo COBEA*, São Paulo, n. 3, p. 6-9, 1997-98.

PINTO, T. J. A.; KANEKO T. M.; OHARA M. T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003, 325 p.

PRABU, G. R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin-plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 487-495, 2006.

PRASHAR, A. *et al.* Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, v. 63, p. 569-575, 2003.

RABANAL, R. M. *et al.* Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 287-292, 2002.

RABELO, Diego de Moura. Estudo Fitoquímico e Biológico de *Guatteria citriodora* Ducke. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

RAYMUNDO, MARCIA MOCELLIN; GOLDIM, JOSÉ ROBERTO. Aspectos éticos relativos ao manejo de animais utilizados em atividades didáticas e em experimentação científica, In: *Fisiologia Prática*. Organizado por Marroni, Norma Possa & Capp, Edison. Canoas: ULBRA, p 9-17, 2001.

RAZA, M. *et al.* Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

RHODEN E.L., *et al.* Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: Estudo experimental em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.13, p.73-9, 1998.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, 1999.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROSEN, S. Anticariogenic effects of tea in rats. *J. Dent. Res.*, v. 63, n. 1, p. 658-660, 1989.

ROSLAND, J. H. *et al.* Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacology & Toxicology*, v. 66, n. 5, p. 382-386, 1990.

ROSS, G. M.; PAWLINA, W. *Histologia-Texto e Atlas em Correlação com Biologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

ROSS, N. M.; CHARLES, C. H.; DILLS, S. S. Long-term effects of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Dentistry*, v. 1, n. 4, p. 92-95, 1989.

ROY-BURMAN, P. *et al.* Generally defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Journal of Endocrinology: Endocrine-Related Cancer*, v. 11, p. 225-254, 2004.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. *Fitoterapia*, v. 75, p. 204-208, 2004.

SAHM, D. F., WASHINGTON II, J. A. 1991. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H. J. *Manual of clinical microbiology*. 5ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 414, p. 799-806, 2001.

SAMPAIO, F. C. *Fitoterapia em Odontologia*. In: *Das Plantas Medicinais aos Fitoterápicos: abordagem científica*. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1997.

SAMUELSSON, G. Nature as a source of new drugs. In: *Acta Pharm. Nord*, v. 1, n. 3, p. 111-116, 1989.

SANTOS, Ana Lúcia Mendes dos. Contribuição ao Estudo Químico e Biológico de *Cyperus rotundus* L. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

- SANTOS, E. V.; MEIRELLES FILHO, J. Plaquetograma em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 26, n.3, p. 201-206, 2004.
- SANTOS, L.C. Laboratório Ambiental. 1. ed. Paraná: Edunioeste, 1999. p. 59-92.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 455- 465, 2007.
- SCAZZOCCHIO, F. *et al.* Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids. *Planta Medica*, v. 67, p. 561-564, 2001.
- SEYMOUR, R. Additional properties and uses of essential oils. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 30, n. 5, p. 19-21, 2003.
- SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. The laboratory rat. Boca Raton: CRC Press, p. 1-19. 1998.
- SIANI, A. C. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory-related activit of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 57-69, 1999.
- SIEGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. *Journal of Psychology: Interdisciplinary and Applied*, v. 21, p. 227-236, 1946.
- SIEGEL, P. S., *Journal of Psychology*, 21: 227, 1946 In: LAPA, A. J. *et al.* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Reimpressão, São Paulo, Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM. 2005. 156p.
- SILVA, J. R. A. *et al.* Analysis of the hexane extracts from seven oleoresins of *Protium* species. *Journal of Essential Oil Research*, v. 21, n. 4, p. 305-308, jul. 2009.
- SILVA, P. F. N. *et al.* Correlação entre o hemocitômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 4, p. 659-664, 2007.
- SILVA, P. F. N. *et al.* Correlação entre o hemocitômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (H.V.-UEL). *Semina: Ciências Agrárias*, v.28, n.4, p.659-664, 2007.
- SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. Contemporary Oral Microbiology. Moseby Year Book. St.Louis, 1999, 395 p.
- SONWA, M. M.; KÖNIG, W. A. Chemical study of essential oil *Cyperus rotundus*. *Phytochemistry*, v. 58, n. 5, p. 799-810, nov. 2001.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- SOYAMA P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. *Ciência e Cultura*. v. 59, n. 1, p.12-13, 2007.

SPRINGFIELD, E. P. *et al.* An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine*, v. 10, n. 5, p. 434-439, 2003.

STEVENS, A.; LOWE, J. *Histologia*. Editora Manole. São Paulo. 1995.

SWENSON, M. J. Propriedades fisiológicas e constituintes celulares e químicos do sangue. In: *Fisiologia dos animais domésticos*. 10ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.13-25, 1988.

TAKARADA, K. *et al.* A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 19, n. 1, p. 61-64, feb. 2004

TAM, C. U. *et al.* Optimization and comparison of three methods for extraction of volatile compounds from *Cyperus rotundus* evaluated by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, n. 2, p. 444–449, 2007.

TASSOU, C. C., KOUTSOUMANIS, K., NYCHAS, G.-J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, v. 33, n. 3-4, p. 273-280, apr. 2000.

TEIXEIRA, M.A.; CHAGURI, L.C.A.G.; CARISSIMI, A.S.; SOUZA, N.L.; MORI, C.M.C.; GOMES, V.M.W.; POLI NETO, A.; NONOYAMA, K.; MERUSSE, J.L.B. Hematological and biochemical profiles of rats (*Rattus norvegicus*) kept under microenvironmental ventilation system. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, n. 5, p. 341-347, 2000.

TEO, S. *et al.* A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, v. 179, p. 183-196, 2002.

TIMM, L.L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológica. *Caderno La Salle XI*, Canoas, v.2, n 1, 231-239, 2005.

TINOCO, E. M. B.; TINOCO, N. M. B. Diagnóstico e Prevenção das Doenças Periodontais. In: BUISCHI, Y. P. *Promoção de Saúde Bucal na Clínica Odontológica*. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p. 99-123.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 33, n. 3, p. 360-366, mar. 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2004, 920 p.

TRABULSI, L. R. *et al.* *Microbiologia*, 3ed., São Paulo: Etheneu, 2002.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n.2, p. 289 - 306, 2006.

VALBERG S.J. Skeletal muscle function, In: KANEKO J.J., HARVEY J.W. & BRUSS M.L.

Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. London: Academic Press, 2008. p.459-484.

VERGOUWEN, R. P. F. A. *et al.* Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cell and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 93, p. 233-243, 1991.

VIJAYALAKSHMI, T. *et al.* Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 9-15. 2000.

WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 2. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994, 377 p.

WOLFORD, S. T. *et al.* Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Washington, D. C., v. 18, p. 161- 188, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, Mental health. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 17 nov. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, Regional Office for the Western Pacific. Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila: WHO, 1993.

XAVIER, M. N.; RAMOS, I. N. C.; XAVIER-FILHO, L. A fitoterapia no combate às afecções bucais. João Pessoa: Idéia, 1995, p. 75-101.

YANO, A. *et al.* Real-Time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microb. Lettrs*, v. 217, p. 23-30, 2002.

YU, H.-H. *et al.* Anticariogenic Properties of the Extract of *Cyperus rotundus*. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 35, n. 3, p. 497-505, 2007.

YURTSEVER, F. V. *et al.* Avaliação de índices de CPOD e classificação dos dentes parciais dos estudantes de 18 anos da rede pública de Manaus - AM, Centro Universitário Nilton Lins, Manaus-AM. Supplement (Proceeding of the 21ndAnnual SBPqO Meeting). *Braz. oral Rev.*, v.18, p. 94, 2004.

ZAIA, D.A.M. *et al.* Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v.21, p.787-793, 1998.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol*, v. 39, p. 221-225, 2001.

ZOGHBI, M. D. G. B. *et al.* Comparison of the main Components of the essential oils of "priprioca": *Cyperus articulatus* var. *articulatus* L., *C. articulatus* var. *nodosus* L., *C. prolixus* Kunth and *C. rotundus* L. *Journal of Essential Oil Research*, v. 20, n. 1, p. 42-46, 2008.

8 ANEXOS

A - Autorização do Conselho do Patrimônio Genético - CGEN para realização da pesquisa



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
DEPARTAMENTO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SECRETARIA EXECUTIVA DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SEPN 505 Bloco "B" Ed. Marie Prendi Cruz, 5º Andar, Sala 517 CEP 70.730-542 – Asa Norte/Brasília - DF
Telefone: (61) 3105-2182 - <http://www.mma.gov.br/cgen> - cgen@mma.gov.br

Ofício nº 159/2009/CTEC/DPG/SBF/MMA

Brasília, 20 de julho de 2009.

A Sua Senhoria

Dr. ADALBERTO LUÍS VAL

Diretor do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

69.001-970 – Manaus – AM

Assunto: Solicitação de Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético para fins de Bioprospecção – Processo nº 02000.000022/2008-61.

Senhor Diretor,

1. Cumpre-nos informar que a vossa solicitação de autorização de acesso ao patrimônio genético para fins de **bioprospecção** referente ao projeto **“Estudo e desenvolvimento de fitoterápicos de uso odontológico com propriedade removedora de biofilme a partir de espécies vegetais amazônicas”** foi reanalisada após a publicação da Orientação Técnica CGEN nº 6, de 28 agosto de 2008 (anexo).
- 2.1. A partir da publicação da referida Orientação Técnica CGEN nº 6, em 29 de setembro de 2008, considera-se identificado o "potencial de uso comercial" de determinado componente do patrimônio genético no momento em que a atividade exploratória confirme a viabilidade de produção industrial ou comercial de um produto ou processo a partir de um atributo funcional desse componente.
- 2.2. Diante do exposto, a vossa solicitação foi reclassificada como acesso ao patrimônio genético com a finalidade de **pesquisa científica**, já que ainda não prevê a identificação de patrimônio genético com potencial de uso comercial.
3. Desse modo, informamos que, para fins de economia processual e agilidade administrativa, enviaremos o processo supracitado para o IBAMA, que é o órgão responsável pela

A Sua Senhoria
Dr. Luiz Antonio de Oliveira
Coordenador do Projeto
69.060- 001 - Manaus - AM

A Sua Senhoria
Dra. Lúcia Py-Daniel
Conselheira do CGEN
69.011-970 - Manaus – AM

A Sua Senhoria
Dra. Nadja Lepsch Cunha
Conselheira do CGEN
69.011-970 - Manaus - AM

Ministério do
Meio Ambiente



Fls. 2 do Ofício 159/2008/CTEC/DPG/SBF/MMA, de 20 de julho de 2009.

emissão e acompanhamento das autorizações de acesso para fins de pesquisa científica, aos cuidados da Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas.

4. Cabe alertar que o Contrato de Utilização do Patrimônio Genético e Repartição de Benefícios não é exigível para os casos de acesso para fins de pesquisa científica.
5. O IBAMA deverá entrar em contato para solicitação de outras informações necessárias para a continuidade da tramitação do processo.
6. Por fim, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos que julgar necessários.

Atenciosamente,


CARLA LEMOS
Coordenadora Técnica

B – Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEa-UFAM) para realização da pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa-UFAM)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 040/2011- CEEa, sobre “Estudo e desenvolvimento de fitoterápicos de uso odontológico com propriedade removedora de biofilme a partir de espécies vegetais amazônicas” sob responsabilidade de **Renilto Frota Corrêa**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa-UFAM) em reunião de 29/09/2011.

Manaus, 04 de outubro de 2011


Prof. Fábio Tonissi Moroni
Presidente da CEEa-UFAM