

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE CASCAVEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ESTUDO DA TOXICIDADE DE GARRAFADA DE USO POPULAR

DENISE MICHELLE INDRAS

**Cascavel - PR
2017**

DENISE MICHELLE INDRAS

ESTUDO DA TOXICIDADE DE GARRAFADA DE USO POPULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Itinose

Co-orientador: Profa. Dra. Carla Brugin
Marek

**Cascavel - PR
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

I34e Indras, Denise Michelle
Estudo da toxicidade de garrafada de uso popular./ Denise Michelle Indras. — Cascavel, 2017.
84 f.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Itinose
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Brugin Marek

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

1. Plantas medicinais. 2. Artemia salina. 3. Parâmetros bioquímicos. 4. Coagulação e hematológicos. I. Itinose, Ana Maria. II. Marek, Carla Brugin. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed.615.321
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9^ª/965

DENISE MICHELLE INDRAS

ESTUDO DA TOXICIDADE DE GARRAFADA DE USO POPULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Itinose

BANCA EXAMINADORA:

ANA MARIA ITINOSE

Profa. Dra. Ana Maria Itinose
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE
Orientador

SB

Profa. Dra. Silmara Baroni
15º Regional de Saúde
Maringá - Paraná

M. Marek

Profa. Dra. Carla Brugin Marek
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE

BIOGRAFIA

Denise Michelle Indras, nascida em 17 de setembro de 1985, em Cascavel-PR, com graduação no curso de Farmácia (2005-2009) pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pós-graduação *Strictu Sensu* em Residência Farmacêutica com especialidade em Análises Clínicas no Hospital Universitário do Oeste do Paraná (2009-2011). Farmacêutica bioquímica coordenadora técnica do Laboratório Biovel (2011-2017) e servidora pública Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório Municipal de Cascavel – PR (2017).

*“A aprendizagem é experiência. Todo o resto é informação.”
Albert Einstein*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucila e Sérgio, às minhas irmãs, Fabiana e Monica, e ao meu namorado, Diego.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio ao longo da minha carreira acadêmica e pela sensatez com que sempre me aconselharam.

Ao Diego, por sua ajuda, compreensão e companheirismo mostrado durante a finalização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Maria Itinose, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, com suas críticas, correções e sugestões relevantes, feitas durante a orientação.

À Professora Doutora Carla Brugin Marek, pelo seu conhecimento e co-orientação prestada.

À Professora Mestre Fernanda Coleraus Silva, pela sua ajuda e ensinamentos com as análises estatísticas.

À Ana Julia Penteado, aluna deste programa, pela sua ajuda e destreza com a gavagem dos ratos.

À Fabiana Ferreira Sari, aluna deste programa, pela sua ajuda com as coletas de sangue.

Ao Victor Mateus Prasniewski, estagiário do laboratório de toxicologia, pela sua ajuda com os ensaios de dosagem de álcool e da *Artemia salina*.

Aos meus amigos, pelo incentivo e companheirismo demonstrados ao longo deste percurso.

Ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas (PCF), pela oportunidade de realizar este curso.

À Unioeste e a todos os profissionais que a constituem, por ser esta Universidade que é destaque em conhecimento e pela excelente formação que me proporcionou.

Ao CNPq, CAPES e FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, pelas parcerias prestadas ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas (PCF).

Ao Laboratório Biovel – Análises e Pesquisas Clínicas, onde algumas análises foram realizadas e pela flexibilidade de horários que permitiram concluir este trabalho.

Ao Laboratório APC – Anatomia Patológica, especialmente ao Dr. Carlos Floriano de Moraes, médico patologista, pelo apoio prestado nas análises histopatológicas dos órgãos dos ratos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

ESTUDO DA TOXICIDADE DE GARRAFADA DE USO POPULAR

Resumo: O uso popular de plantas medicinais são práticas comuns e entre elas está a garrafada, produto a base de múltiplas plantas, que promete curar várias doenças. Muitos estudos com animais mostram alterações em enzimas hepáticas, renais e nos parâmetros hematológicos após administração de extratos vegetais. O objetivo deste estudo foi verificar a correlação entre o uso de múltiplas plantas medicinais com as alterações hepáticas, renais e hematológicas encontradas em um paciente que fez uso de garrafada, composta por equinácea, graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato. A garrafada possui $4,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ de álcool. Foram realizados testes farmacognósticos e UV/Varredura, mostrando algumas classes de metabólitos secundários nas espécies vegetais e na garrafada. Foi realizado bioensaio com *Artemia salina*, e a garrafada teve mortalidade até a concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Efeitos citotóxicos em eritrócitos revelaram atividade hemolítica para equinácea, graviola, ipê roxo e sucupira. O teste com *Escherichia coli* mostrou sensibilidade para graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato. No experimento *in vivo* utilizando ratos Wistar foram realizados dois tratamentos, dose única e 30 dias, administrando água, álcool e garrafada por gavagem. Foram avaliados parâmetros bioquímicos, de coagulação, hematológicos e histopatológicos. No tratamento com dose única foram encontradas alterações de ácido úrico, colesterol, creatinina, fosfatase alcalina, ferro e glicose ($p < 0,05$). Já no tratamento de 30 dias foram encontradas alterações de ácido úrico, bilirubinas total e indireta, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, triglicerídeos, hemácias e leucócitos ($p < 0,05$), além de dilatação sinusoidal hepática. Os dados mostraram que o álcool presente na garrafada pode alterar parâmetros bioquímicos, hematológicos e causar danos ao fígado de ratos. A garrafada, apesar de não mostrar alterações em parâmetros bioquímicos e hematológicos importantes, teve alterações histopatológicas hepáticas mais pronunciadas.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Artemia salina*, parâmetros bioquímicos, coagulação e hematológicos.

TOXICITY STUDY OF BOTTLE POPULAR USE

Abstract: The popular use of medicinal plants are common practices and among them is a bottle, a multiple plant base product, which promises to cure various diseases. Many animal studies show in hepatic, renal enzymes and our hematological parameters after administration of plant extracts. The objective of this study was to verify a correlation between the use of multiple medicinal plants with hepatic, renal and hematological found in a patient that made use of bottle, composed of echinacea, graviola, ipé purple, sucupira and cat's claw. The bottle has 4.32 mg.mL^{-1} of alcohol. Pharmacological and UV/Scan tests were performed, showing some classes of secondary metabolites in plant and bottle species. A bioassay was performed with *Artemia salina*, and a bottle had mortality up to a concentration of 0.1 mg.mL^{-1} . Cytotoxic effects on erythrocytes revealed hemolytic activity for echinacea, graviola, purple ipe and sucupira. The *Escherichia coli* test showed sensitivity to graviola, purple ipe, sucupira and cat's claw. *In vivo* experiment using mice. Two treatments were performed, single dose and 30 days, administering water, alcohol and bottle by gavage. Biochemical, coagulation, hematological and histopathological parameters were evaluated. In the single dose treatment were alterations of uric acid, cholesterol, creatinine, alkaline phosphatase, iron and glucose ($p < 0.05$). Already in the treatment of 30 days were alterations of uric acid, total and indirect bilirubins, creatinine, alkaline phosphatase, glucose, triglycerides, red blood cells and leukocytes ($p < 0.05$), beyond hepatic sinusoidal dilatation. The data showed that the alcohol present in the bottle can alter biochemical, hematological parameters and cause liver damage in rats. The bottle, although not showing alterations in important biochemical and hematological parameters, but had more pronounced hepatic histopathological alterations.

Key-words: Medicinal plants, *Artemia salina*, biochemical parameters, coagulation and haematological.

SUMÁRIO

1. LISTA DE TABELAS	xii
2. LISTA DE FIGURAS	xiii
3. INTRODUÇÃO	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo geral.....	16
4.2 Objetivos Específicos.....	16
5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
5.1 Equinácea.....	16
5.2 Graviola.....	19
5.3 Ipê roxo.....	22
5.4 Sucupira.....	25
5.5 Unha de gato.....	27
6. CAPÍTULO: ARTIGO	30
1. Introdução.....	30
2. Material e Métodos.....	31
2.1 Descrição do caso clínico.....	31
2.2 Aquisição da amostra e controles.....	33
2.3 Identificação da amostra e controles.....	33
2.3.1 Dosagem de álcool.....	33
2.3.2 Testes farmacognósticos.....	33
2.3.3 Espectrofotometria de absorção UV/Varredura.....	34
2.4 Experimentos <i>in vitro</i>	34
2.4.1 Citotoxicidade com eritrócitos humanos.....	34
2.4.2 Citotoxicidade com <i>Artemia salina</i>	34
2.4.3 Teste de sensibilidade antimicrobiana com cepa de <i>Escherichia coli</i>	35
2.5 Experimentos <i>in vivo</i>	35
2.5.1 Animais.....	35
2.5.2 Tratamento dose única.....	35
2.5.3 Tratamento de 30 dias.....	36
2.5.4 Coleta de sangue.....	36
2.5.5 Análises bioquímicas.....	36
2.5.6 Análises de coagulação.....	37
2.5.7 Análises hematológicas.....	37
2.5.8 Peso dos órgãos e Análises histopatológicas.....	37
2.6 Análise estatística.....	37
3. Resultados e Discussão.....	37
4. Conclusões.....	68
5. Agradecimentos.....	68
6. Referências.....	68
7. CONCLUSÕES GERAIS	76
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
9. REFERÊNCIAS FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	76
10. ANEXOS	84

1. LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1. Caracterização físico-química da garrafada e dos controles de extrato e tinturas	38
Tabela 2. Testes farmacognósticos da garrafada e dos controles de extrato e tinturas	38
Tabela 3. Intervalos de comprimentos de onda de máxima absorção da garrafada e dos controles de extrato e tinturas na concentração de 300 mg.L ⁻¹	39
Tabela 4. Percentuais de eritrócitos intactos e de hemólise após exposição da garrafada e dos controles de extrato, tinturas e álcool a 4,5 mg.mL ⁻¹ em eritrócitos humanos.....	43
Tabela 5. Percentuais de mortalidade de <i>A. salina</i> frente às diferentes concentrações da garrafada e dos controles de tinturas de sucupira e unha de gato.....	45
Tabela 6. Percentuais de mortalidade de <i>A. salina</i> frente às diferentes concentrações do controle de extrato de equinácea	45
Tabela 7. Avaliação da atividade antimicrobiana da garrafada e controles por difusão em disco frente à cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	47
Tabela 8. Variação de peso corporal dos ratos com os tratamentos utilizados.....	48
Tabela 9. Efeito dos tratamentos em parâmetros bioquímicos nos ratos tratados	49
Tabela 10. Efeito dos tratamentos em parâmetros de coagulação nos ratos tratados	61
Tabela 11. Efeito dos tratamentos em parâmetros hematológicos nos ratos tratados	62
Tabela 12. Efeito dos tratamentos nos índices de pesos de órgãos em ratos tratados	65

2. LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Foto da espécie vegetal <i>E. purpurea</i>	16
Figura 2. Foto da espécie vegetal <i>A. muricata</i>	19
Figura 3. Foto da espécie vegetal <i>T. avellaneda</i>	23
Figura 4. Fotos da espécie vegetal <i>P. emarginatus</i> e de suas sementes	25
Figura 5. Foto da espécie vegetal <i>U. tomentosa</i>	27

ARTIGO

Figura 1. Fotos da garrafada.....	33
Figura 2. Espectros de absorção na região UV-visível da garrafada na concentração de 300 mg.L ⁻¹	39
Figura 3. Espectros de absorção na região UV-visível do extrato hidroalcoólico de equinácea na concentração de 300 mg.L ⁻¹	40
Figura 4. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcoólica de graviola na concentração de 300 mg.L ⁻¹	40
Figura 5. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcoólica de ipê roxo na concentração de 300 mg.L ⁻¹	40
Figura 6. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcoólica de sucupira na concentração de 300 mg.L ⁻¹	41
Figura 7. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcoólica de unha de gato na concentração de 300 mg.L ⁻¹	41
Figura 8. Espectros de absorção por UV/Varredura da garrafada e dos controles de extrato e tinturas na concentração de 300 mg.L ⁻¹	41
Figura 9. Placa de Elisa com garrafada e controles após teste de hemólise	44
Figura 10. Disposição da garrafada e controles na placa de Elisa.....	44
Figura 11. Percentagem de mortalidade de <i>A. salina</i> frente à garrafada e aos controles das tinturas de sucupira e unha de gato	46
Figura 12. Percentagem de mortalidade de <i>A. salina</i> frente ao controle do extrato de equinácea.....	46
Figura 13. Foto da placa de ágar Müeller-Hinton após teste de atividade antimicrobiana da garrafada e controles frente à cepa de <i>E. coli</i>	47

Figura 14. Parâmetros bioquímicos Ácido úrico (mg.dL^{-1}) e Creatinina (mg.dL^{-1}) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias.....	51
Figura 15. Parâmetro bioquímico BT, BD e BI (mg.dL^{-1}) com o tratamento de 30 dias	52
Figura 16. Parâmetro bioquímico FA (U.L^{-1}) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias	53
Figura 17. Parâmetro bioquímico Glicose (mg.dL^{-1}) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias.....	55
Figura 18. Parâmetros bioquímicos Colesterol (mg.dL^{-1}) com tratamento de Dose única (a) e Triglicerídeos (mg.dL^{-1}) e 30 dias (b).....	57
Figura 19. Parâmetro bioquímico Ferro ($\mu\text{g.dL}^{-1}$) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias.....	59
Figura 20. Parâmetros hematológicos Hemácias ($10^6.\mu\text{L}^{-1}$) (a) e Leucócitos (μL^{-1}) (b) com tratamento de 30 dias	63
Figura 21. Hemácias normais de rato controle (a) e hemácias em forma de codócitos de rato tratado com álcool (b). Alterações eritrocitárias visualizadas no tratamento de 30 dias.....	64
Figura 22. Fotos dos fígados de ratos com tratamento de 30 dias. (a) Fígado de rato controle; (b) Fígado de rato tratado com álcool; (c) Fígado de rato tratado com garrafada.....	66
Figura 23. Análise histopatológica de tecido de fígado de ratos com o tratamento de 30 dias. Coloração HE, 200 X	67

3. INTRODUÇÃO

A cultura popular do uso de plantas medicinais em preparações como garrafadas são práticas comuns e são transmitidas ao longo das gerações.

A garrafada é uma formulação medicinal popular preparada com componentes de origem vegetal, mineral, animal, especiarias, álcool utilizado como veículo e ainda complementada com elementos de cunho religioso. São produtos vendidos em feiras livres, pastorais de saúde, sem qualquer tipo de registro ou controle de qualidade e que prometem curar vários tipos de doenças.

No entanto, a combinação de diversas plantas medicinais, a interação entre elas e a falta de informações sobre as mesmas favorecem o aparecimento de um agravo à saúde. Muitas plantas são tóxicas e podem causar problemas graves, como reações alérgicas, disfunções gastrintestinais, neurológicas, hepáticas, hematológicas e renais, podendo até mesmo levar à morte.

Diversos estudos demonstram que a administração de infusões de extratos vegetais em experimentos laboratoriais com animais, tanto em exposições aguda como crônica, causam alterações em parâmetros bioquímicos, principalmente nas enzimas hepáticas, em marcadores renais e também nos parâmetros hematológicos.

Na medicina popular, são usados muitos extratos de plantas para o tratamento e profilaxia de diversos tipos de doenças, entre elas a equinácea (*Echinacea purpurea*), a graviola (*Annona muricata*), o ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*), a sucupira (*Pterodon emarginatus*) e a unha de gato (*Uncaria tomentosa*), que são plantas comumente encontradas em garrafadas de uso popular.

A escassez de estudos sobre a toxicidade dessas espécies vegetais e as alterações fisiológicas causadas no organismo humano justificam a necessidade desta pesquisa.

Este trabalho tem como objetivo verificar a correlação entre o uso de múltiplas plantas medicinais com as alterações hepáticas, hematológicas e renais encontradas em um paciente que fez uso de garrafada.

Os resultados deste trabalho poderão consolidar melhor a hipótese de que produtos à base de múltiplas plantas, como a garrafada, podem colocar em risco a saúde das pessoas por causarem alterações fisiológicas importantes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

a) Verificar a correlação entre o uso de plantas medicinais com alterações fisiológicas importantes.

4.2 Objetivos específicos:

a) Verificar a correlação entre plantas medicinais e alterações hepática, renal e hematológica apresentadas em um paciente durante o uso de garrafada.

b) Verificar quais os possíveis mecanismos de toxicidade apresentados pelos diferentes tipos de plantas encontradas na garrafada.

5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

5.1 Equinácea

A *Echinacea purpurea* (L.) Moench, Figura 1, é utilizada popularmente no tratamento de resfriado, bronquite, gripe, infecções do trato urinário, inflamação da boca, faringite, infecções, ferimentos e queimaduras. Os estudos químico-farmacológicos com a planta levaram ao estabelecimento científico de suas propriedades como imunoestimulante, anti-inflamatória, protetor do colágeno, antimicrobiana e antiviral, o que justifica o seu uso. Possui como princípios ativos alcamidas, glicoproteínas, ácido cafeico, echinosídeos, polissacarídeos, óleo essencial, ácidos graxos, proteínas, taninos, vitaminas A, C e E (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008) e flavonóides (KURKIN et al., 2011).



Figura 1. Foto da espécie vegetal *E. purpurea*. Fonte: <http://www.benary.com/en/product/L7431>

Uma série de experimentos demonstraram que os extratos de *E. purpurea* possuem atividades imunomoduladoras. Entre as muitas propriedades farmacológicas relatadas, a ativação de macrófagos tem sido vista de forma mais convincente. Índices fagocitóticos e as concentrações de citocinas derivadas de macrófagos demonstraram ser sensíveis a esta planta em muitos ensaios. A ativação de leucócitos polimorfonucleares e células natural killer também tem sido verificada. As alterações nos números e nas atividades dos leucócitos das células T e B também foram reportadas. Apesar desta evidência celular de imunoestimulação, os mecanismos que levam a uma maior resistência a doenças infecciosas não foram descritos adequadamente (BARRETT, 2003).

Em relação à toxicidade aguda da equinácea em humanos, foram relatadas reações alérgicas raras com administração parenteral, porém, o mesmo não se observou pela via oral (PARNHAM, 1996). Os sintomas identificados após administração parenteral incluem calafrios, febre e fraqueza muscular. Um gosto desagradável e breve formigamento ou entorpecimento da língua é frequentemente relatado após administração oral (MILLER, 1998), sendo as isobutilamidas encontradas em altas concentrações nas raízes da equinácea as responsáveis por esse efeito dormente (BAUER et al., 1988).

Estudos *in vitro* mostraram diminuição da motilidade espermática frente a altas concentrações de equinácea (ONDRIZEK et al., 1999), estimulação da atividade proliferativa e angiogênica do sangue, com produção de leucócitos mononucleares, estimulação da atividade de granulócitos e aumento da relação de marcadores dos linfócitos CD4/CD8, mostrando seu efeito na hematopoese (SKOPIŃSKA-RÓŻEWSKA et al., 2003).

A hepatotoxicidade de equinácea é devida à presença de alcaloides pirrolizidínicos na planta e inibição do citocromo CYP3A4 *in vitro* (MILLER, 1998; SCHRØDER-AASEN, 2012).

Já o efeito *in vivo* de extrato de raízes de *E. purpurea* sobre a atividade do citocromo P450 foi avaliado em indivíduos saudáveis com o uso de drogas dependentes de CYP como cafeína (CYP1A2), tolbutamida (CYP2C9), dextrometorfano (CYP2D6) e midazolam (CYP3A hepático e intestinal). Essas drogas foram administradas antes e após um curto período de tratamento com equinácea (400 mg, 4 vezes ao dia por 8 dias). A administração de equinácea

reduziu a depuração oral de cafeína e aumentou o clearance sistêmico de midazolam, sendo que a disponibilidade hepática diminuiu e a intestinal aumentou. A equinácea reduziu a depuração oral dos substratos de CYP1A2 e modula seletivamente a atividade catalítica de CYP3A em sítios hepáticos e intestinais. Atenção deve ser dada quando a equinácea é co-administrada com drogas dependentes de CYP3A ou CYP1A2 para a sua eliminação (GORSKI et al., 2004).

A equinácea, por alterar a atividade de CYP, não deve ser utilizada com outros agentes tóxicos ao fígado, pois aumenta os efeitos de outras drogas, como os esteróides, amiodarona, metotrexato, cetoconazol e halotano (LEAK, 2000).

Embora o mecanismo molecular pelo qual a equinácea aumenta a atividade de CYP3A seja desconhecido, é possível que um ou mais componentes de equinácea sejam ligantes para o Receptor *Pregnano X* (PXR) (GORSKI et al., 2004). Portanto, a expressão de outras enzimas e transportadores que são regulados pelo PXR, tais como uridina difosfato-glucuronosiltransferases (MACKENZIE et al., 2003), sulfotransferases (SONODA et al., 2002) e P-glicoproteína (ABCB1) (GEIK et al., 2001), também pode exibir atividade aumentada após administração de equinácea.

Receptores nucleares como o PXR estão relacionados a processos biológicos, e ligantes sintéticos ou naturais possuem a capacidade de ativá-los ou inibi-los. O PXR exerce função crucial na homeostase de metabolização e eliminação de endobióticos e xenobióticos por meio da regulação de enzimas do citocromo P450, especialmente a CYP3A4. A utilização concomitante de fármacos com determinados tipos de fitoterápicos, que apresentem agonismo ou antagonismo com receptores nucleares, pode interferir na terapêutica (SANTOS, 2012).

Contrariamente, em estudos de investigação de toxicidade laboratorial com amostras de sangue, urina e órgãos de camundongos e ratos tratados diariamente com produtos de *E. purpurea* na concentração de 8 g.Kg⁻¹ de peso corporal, tanto via oral ou intravenosa, não conseguiram causar efeitos adversos mensuráveis em leucócitos, hemácias, plaquetas, enzimas hepáticas, creatinina, ureia, colesterol, triglicerídeos, glicose e no peso dos ratos. Testes de mutagenicidade e de carcinogenicidade em embriões de camundongos também mostraram resultados negativos (MENGS et al., 2000).

Além de outros trabalhos demonstrarem efeitos anti-inflamatórios na toxicidade hepática induzida por arsênico (HEIDARI et al., 2012) e também efeitos

protetores hepáticos e renais das partes aéreas do extrato de *E. purpurea* sobre lesões induzidas pela dietilnitrosamina em ratos (REZAIIE et al., 2013).

5.2 Graviola

A *Annona muricata* L., Figura 2, possui diversas utilizações populares e está relacionada com cada parte da planta. As folhas cozidas são usadas como antidiarreica, contra espasmos, como emagrecedor e contra o câncer. As sementes são consideradas adstringentes e eméticas, enquanto as cascas têm ação antidiabética e espasmolítica. A eficácia e a segurança das preparações populares com *A. muricata* não foram ainda comprovadas cientificamente, apesar das folhas, ao contrário da fruta, serem consideradas potencialmente tóxicas para o homem (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008).

A composição fitoquímica das folhas mostrou óleo essencial rico em beta-cariofileno, gama-cadineno e alfa-elemeno. Já o fruto apresenta açúcares, taninos, ácido ascórbico, pectinas e vitaminas A, C e do complexo B, enquanto que nas folhas, casca e raiz foram identificados alcaloides como a reticulina, coreximina, coclarina e anomurina. Nas sementes, foram identificados o ciclopeptídeo anomuricatina A e várias acetogeninas, que também são encontradas nas folhas, casca e raízes desta planta. As acetogeninas são compostos naturais muito ativos como antitumoral e inseticida, sendo a mais ativa delas a anonacina (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008). Ácidos fenólicos, flavonóides, glicosídeos e saponinas também foram relatados (REIS, 2011; LARBIE et al., 2011).



Figura 2. Foto da espécie vegetal *A. muricata*. Fonte: <http://kupsicaj.cz/exoticke-ovoce/484-anona-ostnita-graviola-annonamuricata-semena-gravioly-5-ks.html>

Seus compostos bioativos mostraram atividades imunossupressora (KIM et al., 1998), pesticida (ABDULLAH & SINA, 2003), antifúngica, antiviral, antitumoral, inibição enzimática (WU et al., 2007), antioxidante (BASKAR et al., 2007), antibacteriana, antiparasitária, antiespasmódica, citotóxica, hipotensiva e vasodilatadora (BARATA et al., 2013).

O extrato etanólico do caule de *A. muricata* possui capacidade para inibir o efeito citopático do HSV-1 (Herpes simplex vírus-1) em células de rim de macaco (PADMA et al., 1998). O extrato de acetato de etila do pericarpo da *A. muricata* revelou atividade anti-leishmania (JARAMILLO et al., 2000). O extrato etanólico das folhas mostrou-se tóxico para larvas do mosquito *Aedes aegypti* e efetiva nos bioensaios com larvas de *A. salina* (LUNA et al., 2006), além de apresentar atividade moluscicida significativa contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (BARATA et al., 2013).

A lectina, uma glicoproteína isolada das sementes da *A. muricata*, é capaz de aglutinar eritrócitos humanos e inibir o crescimento de alguns fungos (DAMICO et al., 2003).

Um estudo que analisa a atividade antimicrobiana e sinérgica do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* mostrou a presença de vários metabólitos, principalmente taninos, flavonas e flavonóides, todas substâncias relacionadas à atividade antimicrobiana e modulatória. O extrato, quando combinado com aminoglicosídeos, aumentou a atividade de antibióticos frente às bactérias testadas (BENTO et al., 2013).

As acetogeninas presentes na *A. muricata* possuem atividade antioxidante (BASKAR et al., 2007), além de serem descritas como citotóxicas para várias linhagens de células tumorigênicas humanas e estão sob domínio de patentes (BARATA et al., 2013).

Numerosas investigações têm fundamentado as atividades desta planta, incluindo anticancerígenas, anticonvulsivantes, anti-artríticas, antiparasitárias, antipalúdicas, hepatoprotetoras e antidiabéticas às acetogeninas (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Há relato científico de que, em locais onde há alta frequência de parkinsonismo levodopa-resistente, existe relação com o consumo de frutas e infusões de plantas tropicais, especialmente a graviola. Estudo com o extrato total

de alcaloides da raiz de *A. muricata* em cultura de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo mostrou efeitos à população de células dopaminérgicas e também em neurônios GABAérgicos. Núcleos de neurônios morreram, com condensação do DNA ou fragmentação, sugerindo que a morte neuronal ocorreu por apoptose. Esse estudo sugere que os alcaloides de *A. muricata* são capazes de modular a função e a sobrevivência de células nervosas dopaminérgicas *in vitro* (LANNUZEL et al., 2002). Estudo posterior demonstrou que a anonacina promove a morte de neurônios dopaminérgicos, por diminuição da produção de energia (LANNUZEL et al., 2003).

A anonacina, uma acetogenina contida na *A. muricata*, é um inibidor lipofílico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Em estudos realizados em camundongos, essa acetogenina também provocou lesões cerebrais similares às lesões presentes em pacientes com o Mal de Parkinson atípico. Isso pode suportar a teoria de que acetogeninas de anonáceos podem implicar na etiologia do Mal de Parkinson atípico e suportar a hipótese de que algumas formas desta doença podem ser induzidas por toxinas ambientais. Como indicação do potencial de toxicidade, um adulto que consuma uma fruta de graviola por dia, em um ano ingere uma quantidade de anonacina equivalente à que foi capaz de induzir lesões cerebrais em camundongos que receberam esta substância por via intravenosa (CHAMPY et al., 2005).

A *A. muricata* também produz amino açúcares, que inclui neste grupo o alcaloide neurotóxico swainsonina. Este é um inibidor potente da manosidase que provoca neurotoxicidade através da inibição lisossomal da alfa manosidase ácida. A dose tóxica para seres humanos e os sintomas ainda não são conhecidos, mas podem estar envolvidos em distúrbios neurológicos associados com o consumo da planta (MOHANTY et al., 2008).

Estudo para avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do extrato aquoso das folhas de *A. muricata* em animais mostrou valor de toxicidade DL50 inferior a 5 g.kg⁻¹ de peso corporal. O extrato reduziu os níveis de glicose plasmática e lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e aumentou os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) em ratos machos e fêmeas. Parâmetros hematológicos, albumina, ALT, AST, fosfatase alcalina e ureia não foram afetados. Já os níveis de creatinina aumentaram significativamente no tratamento com dose elevada, 2500 mg.kg⁻¹, de extrato aquoso de *A. muricata*. O nível de glicose plasmática e os efeitos

positivos do extrato nos fatores de risco cardiovascular foram indicadores de que o extrato poderia ter boa atividade antidiabética (LARBIE et al., 2011).

O efeito desse extrato aquoso das folhas de *A. muricata* nos ratos mostrou potencial para causar danos à célula renal e diminuição de sua função em casos de exposição prolongada. Os efeitos incluem aumento da concentração da creatinina sérica, especialmente pelo mecanismo de infiltração renal, sendo que os danos nas células tubulares são proporcionais ao aumento das doses empregadas (LARBIE et al., 2011) e lesão grave das células tubulares renais demonstrada por estudos histológicos levando a insuficiência renal (DAYEEF et al., 2013).

O infiltrado inflamatório túbulo-intersticial renal ocorre pela infiltração de células mononucleares, que é o evento precoce e está associado à queda de filtração glomerular. Os linfócitos e os monócitos predominam no infiltrado intersticial. Linfócitos T CD4+ associam-se à diminuição da função renal (RIYUZO & SOARES, 2002).

Em outro experimento com camundongos, verificou-se o efeito tóxico do chá das folhas de graviola, administrado por via oral, sobre parâmetros hematológicos, urinários e histopatológicos. No hemograma, constatou-se um grande aumento na percentagem de linfócitos nos animais. Nos camundongos, os resultados ainda revelaram uma diminuição significativa dos níveis séricos de proteínas, diminuição do volume urinário e diminuição da depuração de creatinina (BARATA et al., 2013).

Já outros estudos demonstraram efeitos benéficos desta planta. Resultados do tratamento com extrato aquoso das folhas de *A. muricata* em fígado com dano hepático induzido indicaram atividade hepatoprotetora e melhora da icterícia hepática, ao detectar queda dos níveis de bilirrubinas total e indireta (ARTHUR et al., 2012).

O extrato aquoso das folhas de *A. muricata* possui ainda atividade antidiabética com ação antioxidante e protetora sobre as células β pancreáticas, que por sua vez melhoram o metabolismo da glicose (FLORENCE et al., 2014)

5.3 Ipê roxo

A *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb, Figura 3, é uma espécie muito utilizada na medicina popular sob a forma de chá, como anti-infeccioso, antifúngico, diurético, adstringente, no tratamento do impetigo, contra alguns tipos de câncer,

lúpus, Mal de Parkinson, psoríase e alergias (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008).

Os resultados de sua análise fitoquímica registram como componentes da casca naftoquinonas, principalmente o lapachol, a lapachona, a lapachenol, a quercetina e o ácido hidroxibenzóico (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008).



Figura 3. Foto da espécie vegetal *T. avellanedae*. Fonte: <http://www.jagtapnursery.com/plants/trees/pink-trumpet-tree-673.php>

Além destas substâncias, outras classes de metabólitos secundários também estão presentes nesta espécie, como saponinas, flavonóides, cumarinas, taninos e antibióticos naturais (MACHADO et al., 2003; SILVA, 2006).

Os ensaios farmacológicos confirmaram sua ação no tratamento local de inflamações da pele e mucosas e sua ação antitumoral. O extrato aquoso da madeira mostrou moderada atividade antineoplásica, sendo tóxico em dose elevada, levando à perda de peso, anorexia e diarreia. Várias substâncias isoladas desta planta, principalmente o lapachol, têm apresentado atividade antineoplásica, antiparasitária, ação anticoagulante, anti-inflamatória e antimicrobiana (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008).

Doses altas de lapachol estão associadas com depressão do sistema nervoso central, exaustão física, dificuldades respiratórias por provável anemia hemolítica, sugerida pelo achado de depósito de ferro livre no fígado, bilirrubina urinária e normoblastose, além de trombocitopenia (MORRISON, 1970).

Outros distúrbios apresentados em animais, além de anemia e aumento do tempo de coagulação, foram diminuição temporária de peso, diarreia, apatia, eritema

de pálpebras, enurese, palidez e urina escura, além de alterações de cabelos, que se tornaram ressecados e amarelados em humanos (AUSTIN, 1974).

Os distúrbios da coagulação causados pelo ipê roxo acontecem devido à similaridade estrutural do lapachol com a vitamina K. Essa vitamina é um co-fator essencial para a conversão do ácido glutâmico em ácido γ -carboxiglutâmico e tem papel importante na hemostasia através da ativação de fatores de coagulação (II, VII, IX, X), estando assim intimamente ligada a distúrbios hemorrágicos (SHEARER, 1990). O Lapachol é um potente e reversível inibidor da Vitamina K epóxido redutase e Vitamina K quinona redutase, sendo que a sua forma oxidada é o verdadeiro inibidor da primeira enzima, causando o efeito de hipoprotrombínico do lapachol e 2-hidroxi-naftoquinonas relacionadas (PREUSCH & SMALLEY, 1990).

O ipê roxo não é indicado para pacientes em uso de medicamentos que interferem na coagulação sanguínea, bem como para pacientes com distúrbios da hemostasia (como hemofilia, hepatopatia grave) ou outras doenças hemorrágicas (como doença de von Willebrand ou trombocitopenia), gestantes, lactantes e para crianças. Deve-se evitar seu uso concomitante com anticoagulantes, pois pode haver potencialização dos efeitos. Os compostos hidroquinônicos como a tabebuina possuem efeitos tóxicos comprovados (FETROW & AVILA, 2000).

O lapachol também mostrou anemia hemolítica em estudos com animais. A toxicidade humana foi verificada em doses superiores a 1,5 g por dia (DUKE, 2002).

Estudo com infusão de casca de *T. avellanae* em ratos mostrou hepatotoxicidade significativa. O ipê roxo provocou no fígado de rato um quadro de congestão vascular, inflamação focal entre os hepatócitos e no espaço-porta (JUNIOR et al, 2006). Os componentes pirrolizidínicos presentes na planta são hepatotóxicos (CRAIG, 2004).

Em um trabalho em que se fez uso da planta por meses seguidos, ocorreram alterações histopatológicas hepáticas e renais nos animais. A administração de lapachol por via parenteral a ratos adultos, concomitantemente a um carcinógeno químico (20-metilcolantreno) administrado por via oral, demonstrou o lapachol como um potente promotor oncogênico. Além disso, o lapachol se comportou como um produto hepato e nefrotóxico, produzindo notáveis alterações histopatológicas nestes órgãos (SANDOVAL et al., 1996).

Efeitos benéficos de *T. avellanae* foram demonstrados em estudo com

ratas ovariectomizadas, alimentadas com extrato butanólico da casca de ipê roxo. As ratas apresentaram perda de peso, diminuição da gordura corporal e dos níveis plasmáticos de triglicerídeos. Esse efeito antiobesidade do extrato se deveu à capacidade de prevenir a acumulação de triglicerídeos em adipócitos mostrada no estudo (IWAMOTO, 2016).

5.4 Sucupira

A planta *Pterodon emarginatus* Vogel, Figura 4, é muito usada na medicina popular. A casca produz um óleo volátil e aromático, eficiente no tratamento do reumatismo. As túberas radiculares são empregadas no tratamento do diabetes. Estudos farmacológicos constataram que o óleo dos frutos inibe a penetração na pele humana da cercária do *Schistosoma mansoni*. Essa propriedade pode ser usada para propósitos profiláticos e foi detectada pela presença no óleo da substância 14,15-epoxigeranilgeraniol. Análises fitoquímicas nessa planta isolaram as substâncias ativas isoflavonas e diterpenos (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008), flavonóides, cumarinas, saponinas, triterpenos, esteróides e óleo essencial (DUTRA⁴ et al., 2012).



Figura 4. Fotos da espécie vegetal *P. emarginatus* e de suas sementes. Fonte: http://laszlo.ind.br/campanhas/Oleo_essencial_de_Sucupira-branca-Pterodon-emarginatus.pdf

Testes *in vitro* com óleo das sementes de *P. emarginatus* mostraram atividades hipoglicêmica (MACEDO & FERREIRA 2004), antimicrobiana, antifúngica e leishmanicida (DA SILVA et al., 2007; DUTRA¹ et al., 2009), além de efeitos anti-ulcerogênicos, anti-inflamatórios (DUTRA² et al., 2009) e também toxicidade à *Artemia salina* (DUTRA³ et al., 2012).

Em um trabalho realizado com camundongos submetidos a um tratamento dérmico com óleo de sucupira, os animais não apresentaram sinais de intoxicação, porém, a injeção de doses de 0,5 e 1,0 mL do óleo das sementes de *P. emarginatus* induziu efeitos tóxicos (LUZ DIAS et al., 1995). Em outro estudo, comprovou-se a ação genotóxica dos decotos de *P. emarginatus* em linfócitos T humanos (MACHADO et al., 2011).

Já em estudo para demonstrar os possíveis efeitos colaterais tóxicos de um extrato de *P. emarginatus* nos sistemas hematológico e hemostático, foram realizados estudos em ratos Wistar e coelhos da Nova Zelândia, respectivamente. Um extrato oleoso da planta foi administrado oralmente na dose de 0,5 mL.kg⁻¹ durante 30 dias. Foram determinados o tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e agregação plaquetária; entretanto, essas determinações não mostraram alterações significativas (PEDRAZZI, 1997).

Relata-se mortalidade de 40 bovinos nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul relacionada ao consumo de folhas de *P. emarginatus* após a queda de árvores nessas regiões. A intoxicação foi reproduzida em um trabalho com administração de folhas de *P. emarginatus* em bovinos e ovinos. A dose tóxica mínima foi 20 g.kg⁻¹ para ovinos e 6 g.kg⁻¹ para bovinos. Os sinais clínicos iniciaram-se entre 24 e 72 horas após o consumo da planta e a evolução clínica da doença letal foi de 12 a 36 horas. Os sinais clínicos caracterizaram-se por apatia, depressão, andar a esmo, pressão da cabeça contra objetos. Em dois dos surtos, os bovinos que sobreviveram à fase aguda da doença desenvolveram fotossensibilização. Os achados macroscópicos nos casos espontâneos e experimentais foram no fígado, com hepatomegalia e evidenciação do padrão lobular na superfície capsular. Notaram-se também hemorragias nas serosas abdominais e torácicas. Microscopicamente, observou-se necrose coagulativa hepatocelular, que variou de centrolobular a massiva, por vezes associada a congestão e hemorragia. Ocorreu também marcada tumefação e vacuolização de hepatócitos na região periacinar (CRUZ et al, 2012).

Outro surto de intoxicação por *P. emarginatus* em bovinos ocorreu no estado de Goiás, sendo que 84 bovinos comeram avidamente folhas e frutos da planta também após a queda acidental de uma árvore. Todos os animais adoeceram e sete morreram. Os sinais clínicos observados foram eriçamento dos pelos, retração do

flanco, apatia profunda, prostração, tremores musculares, tenesmo, incoordenação, relutância em movimentar-se e decúbito esternal prolongado. As atividades séricas de AST, ALT, GGT e os teores de bilirrubina estavam acentuadamente elevados. As principais alterações macroscópicas consistiam de hepatomegalia e áreas multifocais de necrose no fígado, além de hemorragias no coração, pleura parietal, mesentério, omento, serosa do rúmen, baço, pulmão, subcutâneo, musculatura esquelética intercostal e torácica. Microscopicamente, observou-se degeneração e necrose hepatocelular massiva moderada a acentuada, hiperplasia biliar multifocal moderada e bilestase multifocal leve. Adicionalmente, notou-se degeneração vacuolar multifocal moderada nos túbulos contorcidos dos rins (DE SANT'ANA et al., 2012).

5.5 Unha de gato

A espécie *Uncaria tomentosa* (Wild. Ex Roem. & Schult) DC., Figura 5, é amplamente empregada na medicina tradicional no tratamento da asma, artrite, reumatismo, como anti-inflamatório do trato urinário, para ferimentos profundos, controle de úlceras gástricas, dores ósseas e câncer (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008).



Figura 5. Foto da espécie vegetal *U. tomentosa*.

Fonte: <http://huertodeurbano.com/consejos-mr-urbano/una-de-gato-o-uncaria-tomentosa>

Nas suas raízes e cascas, encontram-se alcaloides oxindólicos, que possuem potencial de estimular o sistema imunológico. Possui também intensa atividade anti-inflamatória, devido aos glicosídeos de ácido quinóico, considerados os mais

potentes anti-inflamatórios encontrados em plantas. Esta planta contém ainda outros alcaloides que demonstram atividades hipotensiva e vasodilatadora (LORENZI & DE ABREU MATOS, 2008), além de taninos e flavonóides (BERTOL et al., 2012). Atividades antimutagênica e antimicrobiana também foram relatadas (DE SÁ et al., 2014).

Os polifenóis, como taninos e fitatos, dificultam a absorção do ferro. Os taninos inativam enzimas digestivas, pela sua ligação seletiva, formando complexos insolúveis e a capacidade de complexação com minerais, diminuindo a absorção principalmente de ferro, pois são quelantes naturais desse mineral (GEIL & ANDERSON, 1994), podendo levar a anemia ferropriva.

O extrato aquoso bruto de *U. tomentosa* mostrou efeito nas células brancas do sangue, induzindo leucopenia em animais. O mecanismo de ação nos leucócitos ainda não é conhecido (SHENG et al., 2000), porém, os alcaloides oxindólicos pentacíclicos podem estar associados ao estímulo de células endoteliais *in vitro* na produção de fatores de regulação da proliferação de linfócitos (KEPLINGER et al., 1998).

Um estudo *in vitro* realizado com extratos de espécies de *Uncaria* mostrou uma atividade inibidora da enzima alfa-glicosidase (AHMAD et al., 2011). Os inibidores competitivos da alfa-glicosidase agem como antagonistas enzimáticos da amilase e sucrase, diminuindo a absorção intestinal da glicose (SEGAL et al., 1997), além de esta planta conter ácido ursólico, um constituinte químico que apresenta atividade antidiabética (HEITZMAN et al., 2005).

Estudos detalhados sobre a toxicidade aguda (dose única - 150 mg.kg⁻¹), subaguda (7 dias - 50 mg.kg⁻¹) e crônica (90 dias - 10 mg.kg⁻¹) de cápsulas de *U. tomentosa* foram realizados em ratos, analisando possíveis alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. Na toxicidade aguda, verificou-se aumento no peso de fígado e rins. Estudos hematológicos revelaram redução nos níveis de glóbulos brancos e aumento na contagem de plaquetas. Na toxicidade subaguda, houve aumento de peso do fígado e corporal. Aumento dos níveis das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), diminuição nos níveis de leucócitos e a histopatologia revelou leve congestão hepática e pulmonar. Durante a toxicidade crônica, houve aumento de peso do fígado, coração, baço e

corporal, e redução do peso dos pulmões. Verificou-se aumento de AST, ALT e ligeiro aumento na contagem de plaquetas (IBRAHIM et al., 2009).

Em estudo com ratos utilizando extrato seco das cascas desta planta, foi observado aumento nos níveis de ALT na dose de 75 mg.kg⁻¹ e diminuição dos níveis de glicose sérica nos animais tratados nas doses de 75 e 150 mg.kg⁻¹. Já as enzimas AST, fosfatase alcalina e GGT (gamaglutamiltransferase) não sofreram alterações. Neste estudo também foi observado que altas doses do extrato mostraram uma ligeira vacuolização hepática centrolobular. Assim, o uso de unha de gato em longo prazo e em concentrações elevadas pode promover a hepatotoxicidade, além da hipoglicemia. Não houve alterações renais e hematológicas neste experimento (HUEZA et al., 2014).

A hipoglicemia é um efeito adverso potencialmente grave, que pode variar de uma leve tontura com tremores e palpitações cardíacas aos efeitos mais graves, como perda de consciência, convulsões, coma e morte. Assim, atenção deve ser dada devido ao efeito hipoglicemiante da *U. tomentosa* em ratos não diabéticos (HUEZA et al., 2014).

Em outro estudo, utilizando-se ratos com lesão renal aguda isquêmica induzida, verificou-se atividade renoprotetora desta planta com a administração via oral de 20 mg de extrato seco de *U. tomentosa* durante 5 dias. O pré-tratamento dos grupos com *U. tomentosa* induziu melhora da função renal com aumento dos valores de clearance de creatinina, além de redução de peróxidos urinários verificada pela diminuição dos valores de marcadores de lesão celular, melhora essa provavelmente relacionada às atividades antioxidantes desta planta (VATTIMO & SILVA, 2011). Sua ação antioxidante parece ser consequência da alta concentração de flavonóides que sequestram espécies oxigênio reativas, diminuindo o estresse oxidativo no processo inflamatório (WILLIAMS, 2001).

6. CAPÍTULO: ARTIGO

Estudo da Toxicidade de Garrafada de Uso Popular

Denise Michelle Indras¹, Ana Maria Itinose², Carla Brugin Marek²

¹Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Estadual do Oeste Paraná, Rua Universitária 1619, 85819110 Cascavel, PR, Brasil.

²Centro de Assistência em Toxicologia (Ceatox), Hospital Universitário do Oeste Paraná, Avenida Tancredo Neves 3224, 85806470, Cascavel, PR, Brasil.
Correspondência: ana.itinose@unioeste.br

Resumo

Este estudo verificou a correlação entre o uso de múltiplas plantas medicinais com alterações hepáticas, renais e hematológicas encontradas em um paciente que fez uso de garrafada, composta por equinácea, graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato. A garrafada possui $4,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ de álcool. Foram realizados testes farmacognósticos e UV/Varredura mostrando algumas classes de metabólitos secundários nos controles das tinturas e na garrafada. Foi realizado ensaio com *Artemia salina*, e a garrafada teve mortalidade até a concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. As CL_{50} foram encontradas para equinácea e sucupira. Efeitos citotóxicos em eritrócitos revelaram atividade hemolítica para equinácea, graviola, ipê roxo e sucupira. O teste com *Escherichia coli* mostrou sensibilidade para graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato. No experimento *in vivo* utilizando ratos Wistar foram realizados dois tratamentos, dose única e 30 dias, administrando água, álcool e garrafada por gavagem. Avaliaram-se parâmetros bioquímicos, de coagulação, hematológicos e histopatológicos. No Tratamento dose única, foram encontradas alterações de ácido úrico, colesterol, creatinina, fosfatase alcalina, ferro e glicose ($p < 0,05$). Já no tratamento de 30 dias, foram encontradas alterações de ácido úrico, bilirubinas total e indireta, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, triglicerídeos, hemácias e leucócitos ($p < 0,05$), além de dilatação sinusoidal hepática. Os dados mostraram que o álcool presente na garrafada pode alterar parâmetros bioquímicos, hematológicos e causar danos ao fígado de ratos. A garrafada, apesar de não mostrar alterações em parâmetros bioquímicos e hematológicos importantes, teve alterações histopatológicas hepáticas mais pronunciadas.

1. Introdução

A cultura popular do uso de plantas medicinais em preparações como garrafadas são práticas comuns, sendo utilizadas na profilaxia e no tratamento de muitas enfermidades [1].

A garrafada é uma formulação medicinal popular, preparada com componentes de origem vegetal, mineral, animal, especiarias e álcool como veículo [2]. São produtos vendidos em feiras livres, distribuídos por pastorais de saúde, sem qualquer tipo de registro ou controle de qualidade e que prometem curar vários tipos de doenças. É importante ressaltar fatores que podem representar riscos para os consumidores dessas preparações populares, como o conhecimento insuficiente sobre as plantas comercializadas, a falta de controle de qualidade do material vegetal e o uso de misturas de plantas sem considerar as suas interações.

Diversos estudos na literatura científica demonstram que a administração de infusões de extratos vegetais em experimentos com ratos, tanto em exposições aguda como crônica, causa alterações em parâmetros bioquímicos, principalmente enzimas hepáticas, a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina, ácido úrico, glicose e parâmetros hematológicos [3, 4].

Na medicina popular, são usados muitos extratos de plantas para o tratamento de diversos tipos de doenças, entre elas a equinácea (*Echinacea purpurea*), a graviola (*Annona muricata*), o ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*), a sucupira (*Pterodon emarginatus*) e a unha de gato (*Uncaria tomentosa*), que são plantas comumente encontradas em garrafadas de uso popular [5].

Estudos mostram que a *E. purpurea* possui, *in vitro*, efeito na hematopoese, com estimulação da atividade proliferativa do sangue [6], além de mostrar-se hepatotóxica, pois seu metabolismo acontece no citocromo P450 [7]. A *A. muricata* mostrou efeito tóxico sobre parâmetros hematológicos, histopatológicos [8] e renais [9, 10]. Estudos com *T. avellanedae* mostram alterações hematológicas [11], distúrbios da coagulação [12] e hepatotoxicidade em ratos [13]. A planta *P. emarginatus* apresenta relatos de hepatotoxicidade [14, 15], atividade hipoglicemiante [16] e *U. tomentosa* demonstrou alterações hematológicas, hepáticas e renais [17].

Este estudo tem como objetivo verificar a correlação entre o uso de múltiplas plantas medicinais com as alterações hepáticas, renais e hematológicas encontradas em um paciente que fez uso de garrafada.

2. Material e Métodos

Este estudo é do tipo hipotético-dedutivo, cujo objetivo é construir e testar uma possível resposta para o caso clínico apresentado.

O estudo decorre a partir de uma notificação ao Ceatox (Centro de Assistência em Toxicologia) do Hospital Universitário do Oeste do Paraná, de um caso registrado no Datatox (Sistema Brasileiro de Dados de Intoxicações) sobre um paciente internado no Hospital de Clínicas de Curitiba-PR, que fez uso de garrafada com diversas plantas medicinais e que evoluiu com alterações hepáticas, hematológicas e renais.

Os ensaios foram realizados no setor de Toxicologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), localizado no Hospital Universitário do Oeste do Paraná, integrando o grupo de pesquisa em Toxicologia Celular do Centro de Assistência em Toxicologia (Ceatox) e também em um laboratório privado da cidade de Cascavel-PR.

2.1 Descrição do caso clínico

J.M.S., masculino, 59 anos, funileiro de automóveis, residente em Toledo-PR, sendo hipertenso e com gota, em uso de enalapril 10 mg 12/12h, anlodipino 5 mg/dia e alupurinol quando em crise de gota. Trabalho de longos anos com tintura artesanal de veículos e há 1 ano afastado da exposição. Evoluiu a partir de 01/10/2014 com quadro febril inespecífico (38,5° C a 39° C) vespertino durando 6 dias. Para resolução da febre, fez uso de garrafada contendo equinácea, graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato. Associado ao quadro, apresentou cefaleia frontal, náuseas, vômitos frequentes, artralgiás/mialgiás e astenia. Esteve internado por 20 dias em um hospital de Toledo-PR, concluindo ser um quadro de febre de origem indeterminada (FOI).

Na tomografia computadorizada de tórax, abdome e pelve, apresentou dilatação de hepatocolédoco. Fígado, pâncreas, bexiga e rins sem alterações. Ultrassonografia de abdome e pelve com imagem nodular hiperecogênica, sem sombra acústica, sugerindo pólipos. Ecocardiografia com disfunção diastólica de ventrículo esquerdo com relaxamento alterado. Hérnia hiatal incipiente, gastrite enantematosa moderada de antro, uréase negativa, colonoscopia normal. Sorologias para hepatites B, C, HIV (vírus da imunodeficiência humana), VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*), citomegalovírus IgM, *Epstein barr* IgM, toxoplasmose IgG e IgM, dengue e leptospirose todas não reagentes. Sorologia reagente para anticorpos treponêmicos fluorescente (FTA), citomegalovírus IgG e *E. barr* IgG.

Exame de fezes, sangue oculto, coprocultura, hemocultura, pesquisa de bacilo álcool ácido resistente (BAAR), pesquisa de fator antinuclear (FAN) e crioaglutininas foram todos negativos. Eletroforese de proteínas sem alterações. Velocidade de sedimentação das hemácias (VHS) 18 mm, hemoglobina (HB) 12,5 g.dL⁻¹, hematócrito (HTC) 36,6%, leucócitos 27.206 mm³, bastões 278 mm³, plaquetas 432.000 mm³. Relação normatizada internacional (RNI) 1,61 e Ratio 1,10. Bilirrubina total (BT) 0,93 mg.dL⁻¹, bilirrubina direta (BD) 0,83 mg.dL⁻¹, AST 99,5 U.L⁻¹, ALT 124,7 U.L⁻¹, creatinina 0,9 mg.dL⁻¹, ureia 21 mg.dL⁻¹. Exame de urina com densidade 1,026 e pH 6, sem outras alterações.

Apresentou perda de 2 kg em 3 meses. O paciente foi internado novamente na infectologia do Hospital das Clínicas em Curitiba-PR para investigação de FOI. Na admissão, o paciente apresentava-se hipocorado, hidratado, ausculta cardiopulmonar sem alterações. Abdome plano flácido, indolor, sem massas palpáveis. Extremidades sem edema, lesões hiperemiadas em ombros e abdome, esparsas. Articulações sem alterações. HB 8,9 g.L⁻¹, HTC 28,1%, volume corpuscular médio (VCM) 69,2 fL, hemoglobina corpuscular média (HCM) 21,9 pg.L⁻¹, leucócitos 10.380 mm³, bastões 34 mm³, linfócitos 1453 mm³, plaquetas 212.000 mm³, sódio 139 mEq/L, potássio 5,1 mEq/L, RNI 1,61 e ratio 1,10, BT 0,46 mg.L⁻¹, BD 0,21 mg.L⁻¹, AST 19,0 U.L⁻¹, ALT 12,0 U.L⁻¹, fosfatase alcalina (FA) 113,0 U.L⁻¹, gama glutamiltransferase (GGT) 131,0 U.L⁻¹, creatinina 1,9 mg.L⁻¹, ureia 48 mg.L⁻¹, ferro 9,2 µg.L⁻¹, capacidade total de ligação do ferro (CTLF) 165 µg.L⁻¹, índice de saturação (IS) 5,67%, ferritina 2371 ng.L⁻¹, VHS 49 mm, proteína C reativa (PCR) 10,62 mg.L⁻¹, clearance de creatinina 46,4 mL.min⁻¹, proteinúria de 24 horas 6,9 mg.L⁻¹, parasitológico de fezes apresentando ovos de *Ascaris lumbricoides*. Exames de VDRL, FAN, Anti-LKM (*Liver Kidney Microsomes*), Anti-músculo liso e Anti-Mitocôndria, HIV e hepatites, todos não reagentes. FTA reagente, complementos C3 136 mg.L⁻¹ e C4 14 mg.L⁻¹, chumbo sérico 2,4 µg.L⁻¹.

As hipóteses diagnósticas levantadas para este paciente foram hepatopatia medicamentosa, colestase crônica, doença autoimune, intoxicação por fitoterapia/ervas/garrafas mais disfunção renal, anemia microcítica hipocrômica com perfil de ferro sugerindo doença crônica, síndrome hemofagocítica, intoxicação por chumbo e colagenose.

O paciente teve tratamento para sífilis com benzetacil 2.400.000 U por 3 semanas e albendazol 400 mg dose única para *A. lumbricoides*.

Diversas especialidades médicas avaliaram o caso; a biópsia renal foi indicada, mas não realizada devido à relação risco/benefício. A biópsia de medula óssea mostrou-se hipocelular para a idade e biópsia hepática mostrou alguns espaços-porta com mínimo infiltrado inflamatório linfocítico, moderado depósito de hemossiderina (azul da prússia positivo) em células de Küpfer.

O paciente recebeu alta e manteve medicações iniciais, exceto o enalapril, além de colchicina 0,5 mg 12/12h por 6 meses, amitriptilina 25 mg/noite, sulfato ferroso 40 mg 12/12h, dipirona e bromoprida se necessário.

Houve um contato com a esposa do paciente em 01/03/2015, a qual relatou que o paciente estava bem, apenas com queixas de fraqueza.

No dia 27/07/2015, encerrou-se o caso. Durante a investigação, não foram detectadas outras patologias que justificassem os achados, ficando por exclusão o diagnóstico plausível de intoxicação pelas múltiplas plantas utilizadas.

2.2 Aquisição da amostra e controles

A garrafada, Figura 1, foi disponibilizada pelo serviço Datatox de Curitiba-PR no mês de agosto de 2015. Foram utilizados como controles extrato hidroalcoólico de equinácea a 50%, tinturas hidroalcoólicas de unha de gato a 20% e sucupira a 20% (Farmácia de manipulação, Cascavel, Brasil). E tinturas hidroalcoólicas de graviola a 20% e de ipê roxo a 20% (Farmácia de manipulação, Curitiba, Brasil).



Figura 1. Fotos da garrafada.

2.3 Identificação da amostra e controles

A amostra e os controles foram analisadas quanto as suas características físico-químicas, como concentração (especificada no material), cor, odor, densidade (em refratômetro), pH a frio (25°C) e a quente (40°C) (pHmetro Alpax®), solubilidade, características macroscópicas e microscópicas, teor de álcool, testes farmacognósticos e espectro UV-Varredura.

2.3.1 Dosagem de álcool

Empregou-se processo de destilação para separar o álcool da matriz vegetal, obtendo-se o destilado. O destilado contendo álcool foi oxidado a frio por solução nitrocromica. A quantidade de álcool foi calculada pelo consumo de solução nitrocromica utilizada na oxidação do álcool [18]. Foi determinada a quantidade de álcool presente na garrafada e nos controles. O teor de álcool foi expresso em mg de álcool por mL de extrato.

2.3.2 Testes farmacognósticos

A caracterização fitoquímica da garrafada e dos controles foi realizada

através de testes farmacognósticos com desenvolvimento de cor ou precipitação. Foram pesquisadas a presença de saponinas (teste de espuma), esteróides e triterpenóides (reação de Liebermann-Burchard), alcaloides (reação de Dragendorff Mayer), taninos (reação com cloreto férrico), cumarinas (reação com KOH e UV) e flavonóides (reação de Shinoda) [19].

2.3.3 Espectrofotometria de absorção UV/Varredura

Para determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max.}$) e da absorbância máxima ($A_{\max.}$), foram preparadas soluções aquosas da garrafada e dos controles na concentração de 300 mg.L^{-1} . Foi realizada a varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm, com resolução de 2 nm [20]. Utilizou-se água destilada para a linha de base e espectrofotômetro UV/Visível, modelo DR5000, HACH®.

2.4 Experimentos in vitro

2.4.1 Citotoxicidade com eritrócitos humanos

No teste de hemólise para demonstrar ação citotóxica [21], utilizou-se eritrócitos humanos, coletados com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de indivíduo saudável. Em tubos contendo $500 \mu\text{L}$ de eritrócitos humanos a 2%, foram adicionados $500 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$ e $10 \mu\text{L}$ da garrafada, dos controles de extrato e tinturas (equinácea, graviola, ipê roxo, sucupira, unha de gato), álcool a $4,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e completou-se com PBS (tampão fosfato salino) para um volume final de 1 mL. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora e, depois da incubação, as células foram sedimentadas a $377 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante ($200 \mu\text{L}$) foi repassado para placa de Elisa e a absorbância foi determinada usando espectrofotômetro (BioteK®) em 450 nm. No controle negativo, suspensões de eritrócitos e tampão PBS foram utilizados, enquanto, para o controle positivo, foi usado um tampão de lise (ácido acético 2%). A percentagem de hemólise foi calculada para avaliar possíveis efeitos citotóxicos da garrafada, das tinturas controle e do álcool a $4,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em eritrócitos humanos. O álcool utilizado no ensaio foi álcool etílico absoluto (Merck®) $0,789 \text{ g.cm}^{-3}$. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de hemólise.

2.4.2 Citotoxicidade com Artemia salina

Para o ensaio, empregaram-se 10 exemplares da fase larval de náuplio criado em laboratório em solução de NaCl 30 g.L^{-1} , pH 8,5, com aeração constante e mantidas em temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$ [22]. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando a garrafada e os controles das tinturas de sucupira e unha de gato nas concentrações de 200 mg.mL^{-1} ; 20 mg.mL^{-1} ; 10 mg.mL^{-1} ; 2 mg.mL^{-1} ; 1 mg.mL^{-1} ; $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ e do extrato de equinácea nas concentrações de 500 mg.mL^{-1} ; 50 mg.mL^{-1} ; 25 mg.mL^{-1} ; 5 mg.mL^{-1} ; $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,0625 \text{ mg.mL}^{-1}$ diluídos em 5 mL de solução salina.

Os náuplios mortos foram contados após 24 horas de exposição às amostras. Além dos tubos contendo as diferentes concentrações da garrafada e das tinturas controle, também foram utilizados tubos controle com solução salina (controle negativo) e hidróxido de sódio a 1% (controle positivo). Os resultados foram expressos como percentagem de mortalidade. O teste foi considerado efetivo quando a mortalidade do controle negativo não ultrapassou 50% e o controle positivo apresentou valores maiores que 80%.

2.4.3 Teste de sensibilidade antimicrobiana com cepa de *Escherichia coli*

Para determinação da atividade antimicrobiana, foi utilizado meio de cultura ágar Müeller-Hinton (Newprov®); o micro-organismo utilizado foi a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 (Cefar®). O inóculo microbiano foi preparado com colônias bacterianas das placas de pré-inoculação (cultivo jovem de 24 horas de incubação) e suspendendo-as em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até ajuste da turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, obtendo-se uma concentração bacteriana final em torno de $1,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Avaliou-se a atividade antimicrobiana das amostras vegetais frente à cepa padrão, determinando-se a sua suscetibilidade através do método de disco-difusão [23] adaptado [24].

Foram utilizados discos de papel de filtro estéreis (Quanty®) com 6 mm de diâmetro, previamente impregnados com 20 µL da garrafada e dos controles das tinturas nas concentrações de 200 mg.mL⁻¹; 20 mg.mL⁻¹ e 2 mg.mL⁻¹ para graviola, ipê roxo, sucupira, unha de gato e 500 mg.mL⁻¹; 50 mg.mL⁻¹ e 5 mg.mL⁻¹ para o extrato controle de equinácea. Como controles negativos, foram utilizados discos estéreis impregnados com álcool etílico a 4,50 mg.mL⁻¹ e água destilada. Como controle positivo, utilizou-se o disco de ceftazidima, 30 µg (Sensifar®).

Os discos estavam marcados com a amostra, tinturas e controles, sendo que foram mantidos em estufa à temperatura de 37° C por 10 minutos para uma breve secagem e em seguida foram distribuídos, com o auxílio de pinça estéril, sobre a superfície do meio de cultura previamente semeado com inóculo bacteriano. As placas foram incubadas invertidas a 37° C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata, em dois dias diferentes e os resultados foram determinados pela média do diâmetro dos halos de inibição de crescimento bacteriano. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram halos de inibição de crescimento maior ou igual a 8 mm de diâmetro.

2.5 Experimentos in vivo

2.5.1 Animais

Foram utilizados 30 animais, *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, machos, adultos e saudáveis, pesando em média 250 g, provenientes do biotério central da Unioeste. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, ambiente climatizado (22° C ± 2° C), ciclo claro-escuro de 12 horas, sistema de exaustão constante, receberam água e alimento *ad libitum*. Após 1 semana de adaptação, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais com 5 animais em cada grupo.

Foram empregadas as doses de 0,6 mL.Kg⁻¹ da garrafada por peso corporal, dose usual para adultos apresentada no rótulo da garrafada e de 0,005 mL.Kg⁻¹ de álcool por peso corporal, referente ao teor de álcool encontrado na garrafada. Os grupos controle receberam água.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados para a execução pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Unioeste.

2.5.2 Tratamento dose única

Esse experimento foi baseado em metodologia de análise toxicológica qualitativa e semi-quantitativa [25]. Após jejum *overnight*, os animais foram tratados por gavagem, uma única vez, conforme:

Grupo Controle [CON1]: recebeu água (1,0 mL.Kg⁻¹ de peso corporal);

Grupo Álcool [ALC1]: recebeu álcool (0,005 mL. Kg⁻¹ de peso corporal);

Grupo Garrafada [GRF1]: recebeu garrafada (0,6 mL.Kg⁻¹ de peso corporal).

Após o tratamento, todos os animais receberam água e alimento *ad libitum*. Todos os animais foram observados quanto aos sinais e sintomas nos tempos 0, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos; 2, 4, 6 e 24 horas; e, por fim, 2, 4 e 7 dias. Foram observados: atividade motora, coordenação motora, tremores corporais, fasciculações, ptose palpebral, lacrimejamento, salivação, branqueamento das orelhas, hiperemia das orelhas, paralisia das pernas, piloereção, analgesia, anestesia, reflexo da córnea e auricular, temperatura, diarreia e outros sinais e sintomas conforme proposta pela metodologia [25]. O peso corporal dos animais foi monitorado diariamente. Após o sétimo dia do experimento, todos os animais ficaram em jejum *overnight*, foram eutanasiados com overdose de quetamina (300 mg.Kg⁻¹) e xilazina (45 mg.Kg⁻¹) para a coleta de sangue por punção intracardíaca; seus órgãos (baço, cérebro, coração, estômago, fígado, intestino, pulmões, rins, tecido adiposo e testículos) foram removidos, pesados, observados macroscopicamente e histologicamente. Nesses grupos, também foram avaliados parâmetros bioquímicos, de coagulação e hematológicos.

2.5.3 Tratamento de 30 dias

Esse experimento foi baseado em metodologia de análise toxicológica após 30 dias de tratamento [26]. Após jejum *overnight*, os animais foram tratados por gavagem, uma única vez, conforme:

Grupo Controle [CON2]: recebeu água (1,0 mL.Kg⁻¹ de peso corporal);

Grupo Álcool [ALC2]: recebeu álcool (0,005 mL. Kg⁻¹ de peso corporal);

Grupo Garrafada [GRF2]: recebeu a garrafada (0,6 mL.Kg⁻¹ de peso corporal).

O comportamento geral foi observado, durante os 30 dias de experimento, nos tempos de 5 e 30 minutos; 1, 2, 4 e 6 horas após a gavagem. Foram observadas alterações respiratórias, alteração na locomoção, tremor, convulsões, excitabilidade, redução da atividade, ataxia, piloereção, sonolência, ptose palpebral, constrição abdominal, salivação e diarreia. O peso corporal dos animais foi monitorado diariamente. Após o trigésimo dia do experimento, todos os animais ficaram em jejum *overnight*, foram eutanasiados com overdose de quetamina (300 mg.Kg⁻¹) e xilazina (45 mg.Kg⁻¹) para a coleta de sangue por punção intracardíaca; seus órgãos (baço, cérebro, coração, estômago, fígado, intestino, pulmões, rins, tecido adiposo e testículos) foram removidos, pesados, observados macroscopicamente e histologicamente. Nesses grupos, também foram avaliados parâmetros bioquímicos, de coagulação e hematológicos.

2.5.4 Coleta de sangue

O sangue coletado foi distribuído em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,2% (1,8 mL) para as determinações da coagulação e em tubos com anticoagulante heparina sódica a 151,58 UI (10 mL) para as dosagens bioquímicas e hematológicas. Uma gota de sangue dos animais sem anticoagulante foi dispensada em lâmina para confecção do esfregaço sanguíneo. Os tubos para as determinações dos parâmetros bioquímicos e de coagulação foram centrifugados durante 10 minutos a 2500 x g para a separação do plasma.

2.5.5 Análises bioquímicas

Foram dosados ácido úrico, ALT, AST, bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), colesterol, creatinina, glicose, GGT, ferro, fosfatase alcalina (FA), proteína C reativa (PCR), triglicerídeos e ureia. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através de analisador automatizado AU680 (Beckman Coulter®). Os

analitos ácido úrico, ALT, AST, bilirrubinas, colesterol, fosfatase alcalina, glicose, GGT, triglicerídeos e ureia por método enzimático, ferro por método colorimétrico, creatinina por método cinético e PCR por método nefelométrico (Beckman Coulter®).

2.5.6 Análises de coagulação

Foram determinados o tempo de ativação da protrombina (TAP), RNI, tempo de ativação parcial da tromboplastina (KPTT) e ratio. As determinações de TAP foram realizadas por equipamento automatizado de coagulação, pelo método de detecção de coágulo, CA500 (Siemens®). As dosagens de KPTT foram realizadas por método manual por detecção do coágulo utilizando reagente composto por cefalina de cérebro de coelho, ácido elágico e cloreto de cálcio (0,025 mol.L⁻¹).

2.5.7 Análises hematológicas

Foram avaliados hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), curva de distribuição das hemácias de acordo com o variação do volume eritrocitário (RDW), leucócitos totais, valores relativos de bastões, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e reticulócitos. Os parâmetros hematológicos foram analisados através de contador automatizado LH700 (Beckman Coulter®) pelo método de resistividade, impedância e colorimétrico. As lâminas foram avaliadas através de microscopia óptica após coloração de May Grünwald Giemsa realizada com kit comercial (NewProv®).

Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções e protocolos dos fabricantes.

2.5.8 Peso dos órgãos e Análises histopatológicas

Baço, cérebro, coração, estômago, fígado, intestino delgado, pulmão, rins, tecido adiposo e testículos foram isolados e pesados. Todos os órgãos dos animais foram examinados macroscopicamente. Órgãos com alterações macroscópicas foram fixados em formol a 10% e órgãos dos grupos controle também foram analisados histologicamente. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para examinação microscópica.

2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente no software para as análises estatísticas, Statistica7®. Os resultados obtidos com os diferentes grupos foram avaliados pelo método de análise de variâncias One-way ANOVA, seguidos pelo teste post-hoc de Fisher, sendo utilizado para análise das variáveis não paramétricas o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão médio (SEM) de n que reflete o número de animais. Foi aceito como estatisticamente significativo $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

A identificação e caracterização físico-química da garrafada e dos controles de extrato e tinturas estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química da garrafada e dos controles de extrato e tinturas.

	Cor/Odor	Conc. (mg.mL ⁻¹)	IR (°Bx)	pH (25°C)	pH (40°C)	Sol.	TAlc. (mg.mL ⁻¹)
Garrafada	Escura/própolis	200	20,0	3,12	3,09	Água	4,32
Equinácea	Escura/própolis	500	21,8	5,27	5,20	Água	4,41
Graviola	Verde/álcool	200	21,1	6,70	6,40	Água	4,50
Ipê roxo	Clara/álcool	200	20,0	5,70	5,40	Água	4,32
Sucupira	Amarela/ floral	200	20,0	6,05	5,26	Água	4,03
Unha de gato	Escura/álcool	200	21,7	5,06	4,63	Água	4,50

Conc.: Concentração; IR: Índice de refração; Sol.: Solubilidade; TAlc.: Teor de álcool.

A garrafada, macroscopicamente, é um produto líquido industrializado, de coloração escura e pouco viscosa, solúvel em água, de odor característico de própolis, com diferença de pH com a variação de temperatura, mostrando a presença de compostos voláteis. Possui índice de refração de 20,0 °Bx, ou seja, aproximadamente 20% de compostos solúveis correspondentes ao total de todos os compostos dissolvidos em água [27]. Microscopicamente, apresenta-se com artefatos vegetais avermelhados. Na sua formulação, estão descritas as plantas de uso popular equinácea, graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato. O rótulo traz a informação de que é isenta de registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), não contém álcool e nenhum produto tóxico. A indicação de dosagem são 2 colheres de sopa 3 vezes ao dia para adultos e 1 colher de sopa 3 vezes ao dia para crianças. Diferentemente do anunciado em seu rótulo, a dosagem de álcool mostrou teor de 4,32 mg.mL⁻¹. O pH da garrafada se mostrou extremamente ácido, 3,12 a 25° C. O consumo de líquidos com pH ácido, especialmente abaixo de 5,5, é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de lesões de erosão dental [28].

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes farmacognósticos realizados com a garrafada e com os controles de extrato e tinturas, mostrando a presença de algumas classes de metabólitos secundários.

Tabela 2. Testes farmacognósticos da garrafada e dos controles de extrato e tinturas.

	Garrafada	Equinácea	Graviola	Ipê roxo	Sucupira	Unha de gato
Saponinas (Espuma)	+	+	+	-	-	+
Esteróides e Triterpenóides (Liebermann-Burchard)	-	-	-	-	-	-
Alcaloides (Dragendorff Mayer)	-	-	-	-	-	+
Taninos (Cloreto férrico)	-	+	-	-	-	+
Cumarinas (KOH/UV)	+	-	-	-	-	-
Flavonóides (Shinoda)	+	-	+	-	+	+

(-): ausência e (+): presença

Após a análise dos dados da Tabela 2, verificou-se que na garrafada foram encontrados metabólitos secundários, como saponinas, cumarinas e flavonóides. Segundo dados da literatura, entre as plantas citadas, as cumarinas são metabólitos encontrados no ipê roxo [29]; já os flavonóides são encontrados no ipê roxo, equinácea, sucupira, unha de gato e graviola [29, 30, 31, 32, 33]. E as saponinas, apenas nas espécies vegetais ipê roxo e graviola [29, 32].

O extrato de equinácea apresentou positividade para saponinas e taninos, diferentemente de outros estudos que mostraram a presença de flavonóides, alcaloides e esteróis nesta planta [30].

A tintura de graviola mostrou saponinas e flavonóides. Para a tintura de

sucupira, verificou-se apenas a presença de flavonóides e estas tinturas apresentaram poucos metabólitos, se comparados com dados de outros trabalhos [32, 33]. Já para a tintura de ipê roxo, nenhum metabólito secundário foi encontrado pela triagem fitoquímica.

A tintura de unha de gato mostrou alcaloides, taninos e flavonóides, o que condiz com a literatura, exceto para saponinas, que foram positivas nesta triagem [31].

O conhecimento da composição química das plantas usadas na medicina popular envolve um sistema complexo de diferentes ferramentas capazes de elucidar estruturalmente as inúmeras classes que constituem a planta [34]. A Espectrofotometria é uma das técnicas de análise mais difundidas e é fundamentada na lei de Lambert Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético [35] e permite análises qualitativas e quantitativas de misturas moleculares, possibilitando a visualização dos perfis espectrais e indicando a presença dos constituintes de uma mistura [34].

Pela espectrofotometria de absorção UV, os intervalos de comprimento de onda de máxima absorção obtidos estão representados na Tabela 3 e os picos detectados estão apresentados nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 para a garrafada e para os controles de extrato e tinturas na concentração de 300 mg.L⁻¹. Na Figura 8, todas as varreduras estão representadas em um único gráfico para melhor comparação.

Tabela 3. Intervalos de comprimentos de onda de máxima absorção da garrafada e dos controles de extrato e tinturas na concentração de 300 mg.L⁻¹.

Amostras vegetais	Intervalos λ máximo (nm)
Garrafada	278
Equinácea	282, 316
Graviola	326, 332, 342
Ipê roxo	254, 324, 330, 340, 352, 370, 380, 390
Sucupira	318, 328, 342, 388, 396
Unha de gato	278

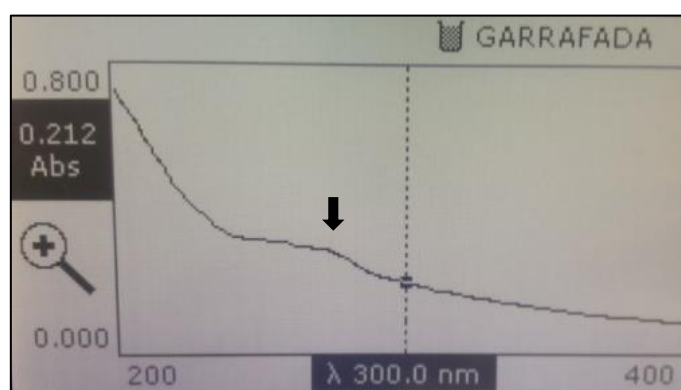


Figura 2. Espectros de absorção na região UV-visível da garrafada na concentração de 300 mg.L⁻¹.

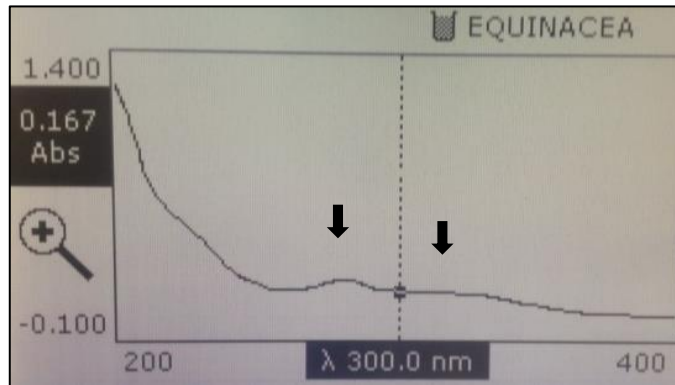


Figura 3. Espectros de absorção na região UV-visível do extrato hidroalcolólico de equinácea na concentração de 300 mg.L⁻¹.

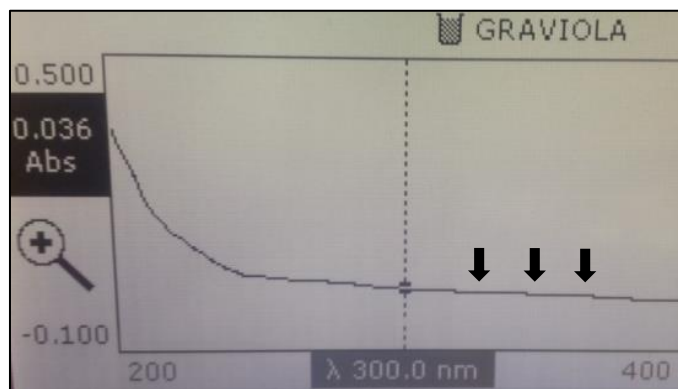


Figura 4. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcolólica de graviola na concentração de 300 mg.L⁻¹.

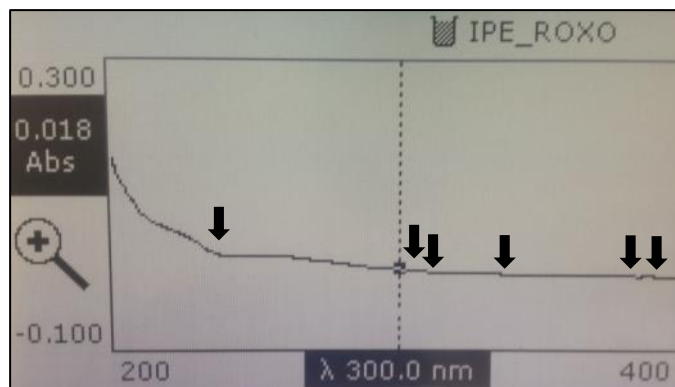


Figura 5. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcolólica de ipê roxo na concentração de 300 mg.L⁻¹.

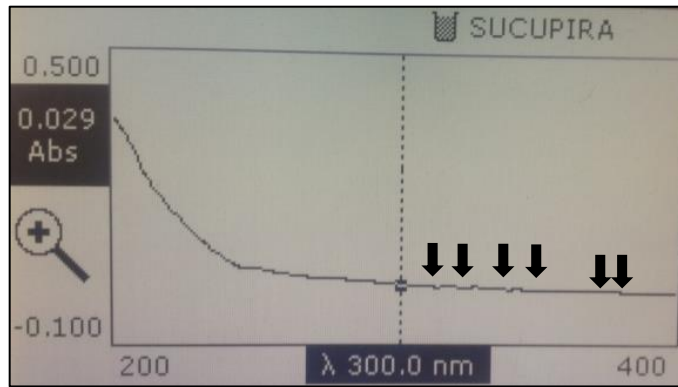


Figura 6. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcolica de sucupira na concentração de 300 mg.L⁻¹.

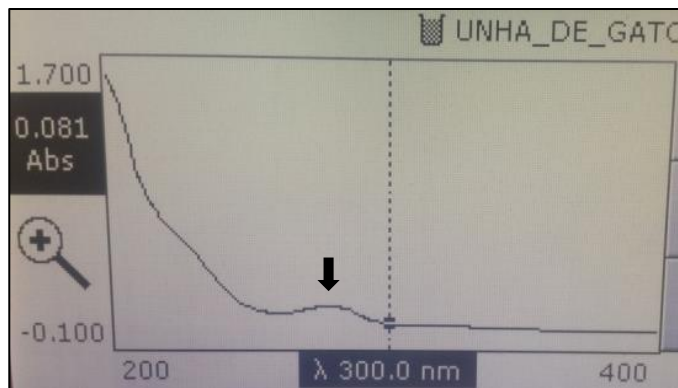


Figura 7. Espectros de absorção na região UV-visível da tintura hidroalcolica de unha de gato na concentração de 300 mg.L⁻¹.

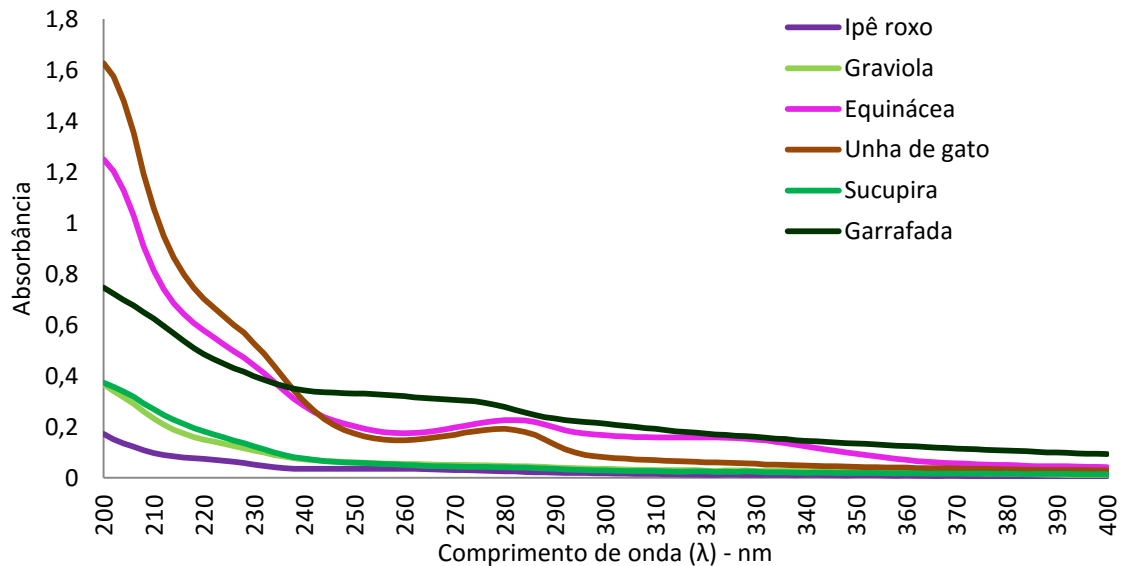


Figura 8. Espectros de absorção por UV/Varredura da garrafada e dos controles de extrato e tinturas na concentração de 300 mg.L⁻¹.

Trabalhos demonstraram que as plantas que absorvem na região ultravioleta apresentam, em sua composição complexa, diferentes moléculas, destacando-se

metabólitos especiais como os flavonóides, taninos, antraquinonas, alcaloides e polifenóis [36].

Os metabólitos secundários de interesse e seus respectivos picos de absorção foram compostos fenólicos com absorção máxima entre 220-280 nm [37], esteróides em 254-366 nm [38], flavonóides em duas bandas entre 250-285 nm e 320-385 nm [39], alcaloides em 254-365 nm [40], taninos em 280 nm [41], cumarinas entre 290-320 nm [42] e as saponinas em pico de 284 nm [43].

Os prováveis metabólitos encontrados pelo UV/Varredura foram os alcaloides na região entre 254-365 nm detectados para unha de gato, garrafada e ipê roxo. As saponinas que são detectadas em pico de 284 nm e taninos observados no comprimento de onda de 280 nm podem ser atribuídas para equinácea, unha de gato e garrafada. Esteróides foram detectados na tintura de ipê roxo no comprimento de 254-366 nm. Flavonóides nos picos entre 254 nm e 340-352 nm na tintura de ipê roxo. Cumarinas e compostos fenólicos não foram detectados nas varreduras realizadas.

Nem todos os metabólitos secundários encontrados pelo teste farmacognóstico detectados pelo UV/Varredura se assemelham aos realizados com as amostras vegetais. Pelo UV/Varredura foi possível identificar alcaloides, esteróides e flavonóides na tintura de ipê roxo. Esteróides não haviam sido identificados nas amostras vegetais e a tintura de ipê roxo não havia apresentado positividade para qualquer metabólito pelo teste farmacognóstico.

O teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais, visto que as plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, mas, também, por reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contato direto com a mesma [44].

A Tabela 4 apresenta as médias percentuais de eritrócitos intactos e da atividade hemolítica obtida pela exposição da garrafada e dos controles de extrato, tinturas e também do álcool a $4,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em eritrócitos humanos. O álcool na concentração de $4,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi testado para verificar se esse teor presente na garrafada causava hemólise ou se uma possível hemólise seria provocada apenas às espécies vegetais presentes na garrafada.

Tabela 4. Percentuais de eritrócitos intactos e de hemólise após exposição da garrafada e dos controles de extrato, tinturas e álcool a 4,5 mg.mL⁻¹ em eritrócitos humanos.

Amostras	Concentração (mg.mL ⁻¹)	% Eritrócitos Intactos	% Hemólise
Garrafada	200	100,00	0,00
	20	100,00	0,00
	2	100,00	0,00
Equinácea	500	64,64	35,36
	50	100,00	0,00
	5	100,00	0,00
Graviola	200	61,96	38,04
	20	60,72	39,28
	2	100,00	0,00
Ipê roxo	200	52,57	47,43
	20	47,17	52,83
	2	99,60	0,40
Sucupira	200	88,04	11,96
	20	66,20	33,80
	2	93,95	6,05
Unha de gato	200	100,00	0,00
	20	100,00	0,00
	2	99,02	0,98
Álcool	4,5	99,75	0,25
C (-)	PBS	100,00	0,00
C (+)	Ácido acético 2%	6,45	93,55

Os dados da Tabela 4 mostraram que os tubos de ensaio contendo solução PBS, utilizados como controle negativo, não tiveram hemólise após exposição aos eritrócitos humanos, indicando que os eritrócitos resistiram às condições experimentais do teste e aqueles expostos ao ácido acético, como controle positivo, tiveram lise significativa, validando o teste.

Os efeitos citotóxicos dos extratos em eritrócitos humanos revelaram atividade hemolítica para as amostras de equinácea na concentração de 500 mg.mL⁻¹ (35,36%), de graviola nas concentrações de 200 mg.mL⁻¹ (38,04%) e 20 mg.mL⁻¹ (39,27%), de ipê roxo nas concentrações de 200 mg.mL⁻¹ (47,42%) e 20 mg.mL⁻¹ (52,82%), de sucupira nas concentrações de 200 mg.mL⁻¹ (11,95%) e 20 mg.mL⁻¹ (33,80%), sendo que a maior percentagem de hemólise foi encontrada na concentração de 20 mg.mL⁻¹ com a tintura de ipê roxo (52,82%). Já a tintura de unha de gato e a garrafada não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas.

O efeito citotóxico do álcool a 4,5 mg.mL⁻¹ em eritrócitos humanos revelou uma atividade hemolítica muito fraca, mostrando 0,25% de hemólise. Assim, a hemólise encontrada é proveniente das amostras vegetais e não do álcool presente em sua formulação.

A Figura 9 mostra a placa de Elisa com os sobrenadantes das amostras vegetais após teste de hemólise. A placa está identificada de A a H no lado esquerdo e de 1 a 12 no canto superior. A Figura 10 mostra a disposição das amostras na placa.

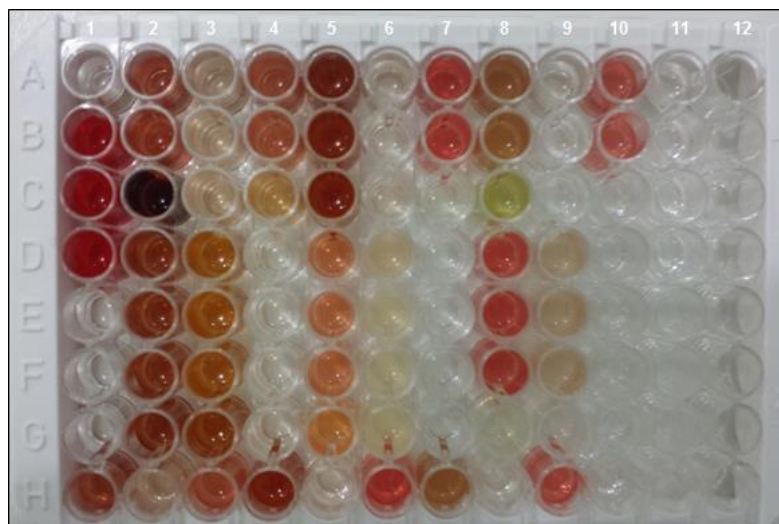


Figura 9. Placa de Elisa com garrafada e controles após teste de hemólise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	GRF 200	GRF 2	E20	U 200	U 2	S 20	GRA 200	GRA 2	IR 20	ALC	-
B	C (+)	GRF 200	GRF 2	E20	U 200	U 2	S 20	GRA 200	GRA 2	IR 20	ALC	-
C	C (+)	GRF 200B	GRF 2B	E20B	U 200B	U 2B	S 20B	GRA 200B	GRA 2B	IR 20B	ALCB	-
D	C (+)	GRF 20	E 200	E 2	U 20	S 200	S 2	GRA 20	IR 200	IR 2	-	-
E	C (-)	GRF 20	E 200	E 2	U 20	S 200	S 2	GRA 20	IR 200	IR 2	-	-
F	C (-)	GRF 20	E 200	E 2	U 20	S 200	S 2	GRA 20	IR 200	IR 2	-	-
G	C (-)	GRF 20B	E 200B	E 2B	U 20B	S 200B	S 2B	GRA 20B	IR 200B	IR 2B	-	-
H	GRF 200	GR F2	E 20	U 200	U 2	S 20	GRA 200	GRA 2	IR 20	ALC	-	-

B: Branco, C (+): Controle positivo, C (-): Controle negativo, GRF: Garrafada, E: Equinácea, U: Unha de gato, S: Sucupira, GRA: Graviola, IR: Ipê roxo, ALC: Álcool 4,5 mg.mL⁻¹, 200: 200 mg.mL⁻¹, 20: 20 mg.mL⁻¹ e 2: 2 mg.mL⁻¹.

Figura 10. Disposição da garrafada e controles na placa de Elisa.

O teste de hemólise mostrou efeito citotóxico das amostras de equinácea, graviola, ipê roxo e sucupira aos eritrócitos humanos. Diferentemente dos resultados encontrados com o bioensaio de *A. salina*, em que a tintura de unha de gato foi a mais tóxica às larvas e a garrafada que apresentou sensibilidade ao microcrustáceo. Neste teste de ação hemolítica, a tintura de unha de gato e a garrafada não mostraram citotoxicidade.

A ação hemolítica se deve à presença de alguns metabólitos secundários, como os alcaloides, que mesmo em pequenas quantidades são substâncias naturalmente tóxicas [44], aos taninos que interagem com proteínas e outras macromoléculas que lhe conferem atividades tóxicas e aglutinantes [45] e principalmente as saponinas. O efeito hemolítico das saponinas é resultante da sua capacidade de interagir com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com consequente extravasamento do conteúdo intracelular [44].

Em relação à hemólise encontrada, apenas as espécies de equinácea (saponinas e taninos) e graviola (saponinas) possuem metabólitos com ação hemolítica. A alta atividade hemolítica apresentada pela tintura de ipê roxo na concentração de 20 mg.mL⁻¹ pode ser justificada pelos alcaloides evidenciados no UV/Varredura, pois essas substâncias possuem poder citotóxico [44].

O fracionamento e isolamento de compostos naturais de classes distintas, tais como flavonóides, triterpenos, esteróis e compostos aromáticos simples, podem ser

guiados por ensaio de letalidade com microcrustáceo, pois é um método útil na avaliação de bioatividade, poupando a necessidade de ensaios posteriores *in vitro* e *in vivo* mais dispendiosos [46].

As Tabelas 5 e 6 apresentam as médias percentuais da mortalidade das larvas de *A. salina* expostas a diferentes concentrações da garrafada e dos controles de tinturas de sucupira, unha de gato e do controle do extrato de equinácea, respectivamente.

Tabela 5. Percentuais de mortalidade de *A. salina* frente às diferentes concentrações da garrafada e dos controles de tinturas de sucupira e unha de gato.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Garrafada	Sucupira	Unha de gato
200	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)
20	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)
10	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)
2	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)	100,00 ± 0,00 (3)
1	93,33 ± 6,67 (3)	93,33 ± 3,33 (3)	90,00 ± 5,77 (3)
0,2	70,00 ± 5,77 (3)	70,00 ± 5,77 (3)	90,00 ± 0,00 (3)
0,1	60,00 ± 0,00 (3)	70,00 ± 10,00 (3)	76,67 ± 8,82 (3)
0,05	40,00 ± 11,55 (3)	66,67 ± 3,33 (3)	66,67 ± 8,82 (3)
0,025	43,33 ± 6,67 (3)	50,00 ± 17,32 (3)	70,00 ± 10,00 (3)
C (-)	43,33 ± 3,33 (3)	30,00 ± 15,28 (3)	46,67 ± 6,67 (3)
C (+)	96,67 ± 3,33 (3)	96,67 ± 3,33 (3)	86,67 ± 8,82 (3)

C (-): Controle negativo; C (+): Controle positivo. Os números entre parênteses representam o número de triplicatas (n). Resultados expressos em média ± SEM de n triplicatas.

Tabela 6. Percentuais de mortalidade de *A. salina* frente às diferentes concentrações do controle de extrato de equinácea.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Equinácea
500	100,00 ± 0,00 (3)
50	100,00 ± 0,00 (3)
25	100,00 ± 0,00 (3)
5	100,00 ± 0,00 (3)
2,5	86,67 ± 13,33 (3)
0,50	100,00 ± 0,00 (3)
0,25	60,00 ± 10,00 (3)
0,0625	50,00 ± 10,00 (3)
C (-)	30,00 ± 15,28 (3)
C (+)	96,67 ± 3,33 (3)

C (-): Controle negativo; C (+): Controle positivo. Os números entre parênteses representam o número de triplicatas (n). Resultados expressos em média ± SEM de n triplicatas.

Os dados das Tabelas 5 e 6 mostraram que os tubos de ensaio contendo solução salina, utilizados como controles negativos, tiveram baixa mortalidade para os microcrustáceos, indicando que as larvas sobreviveram nas condições experimentais do teste, durante o período do bioensaio.

Verificou-se que até a concentração de 2 mg.mL⁻¹ houve mortalidade de 100% dos microcrustáceos para a garrafada, sucupira e unha de gato. Já para o extrato de equinácea ainda houve mortalidade de 100% na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹. Verificaram-se valores maiores de mortalidade frente às concentrações das tinturas de unha de gato, seguido de sucupira. Outro trabalho também demonstrou toxicidade da espécie vegetal sucupira à *A. salina* [47]. Na concentração de 0,025 mg.mL⁻¹ da tintura de unha de gato ainda houve mortalidade de 70%, sendo a amostra mais tóxica. A garrafada teve mortalidade significativa até a concentração

de 0,1 mg.mL⁻¹, mostrando-se menos tóxica que as outras amostras às larvas de *A. salina*.

As Figuras 11 e 12 foram construídas com dados das Tabelas 5 e 6, respectivamente. Estes gráficos permitiram encontrar os valores da percentagem de mortalidade das larvas de *A. salina* em relação às concentrações das amostras. A concentração letal de extrato capaz de eliminar 50% das larvas é chamada de CL₅₀ e foi encontrada nas concentrações de 0,025 mg.mL⁻¹ para sucupira e de 0,0625 mg.mL⁻¹ para equinácea.

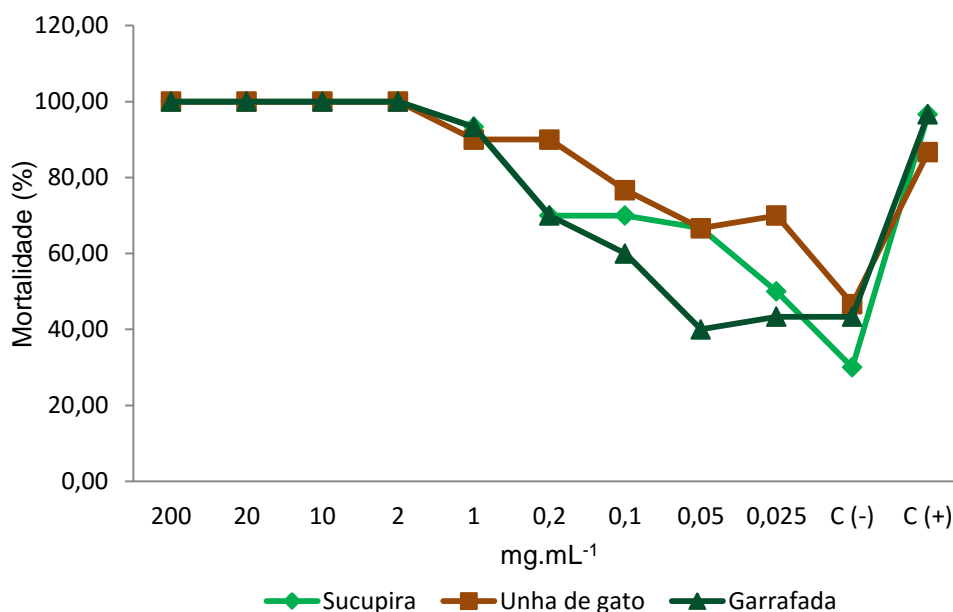


Figura 11. Percentagem de mortalidade de *A. salina* frente à garrafada e aos controles das tinturas de sucupira e unha de gato.

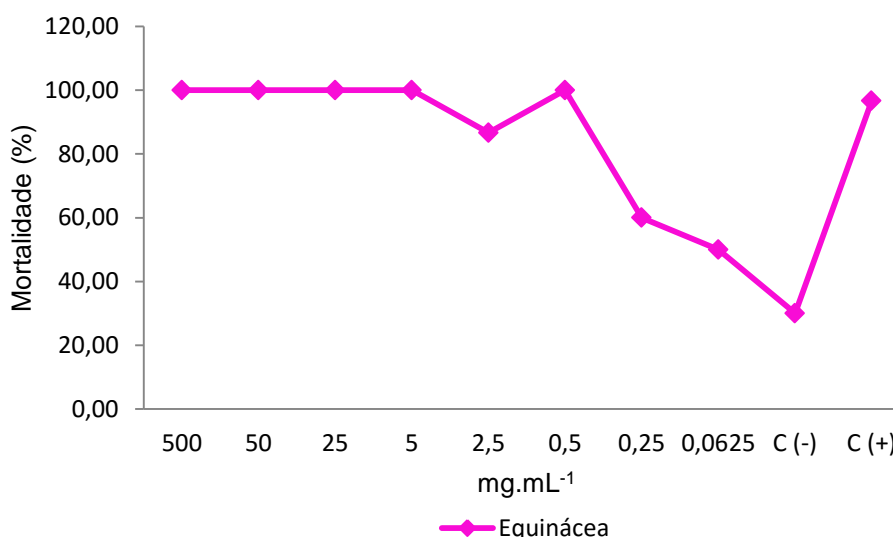


Figura 12. Percentagem de mortalidade de *A. salina* frente ao controle do extrato de equinácea.

O ensaio de toxicidade à *A. salina* mostrou sensibilidade do microcrustáceo à garrafada, aos controles de sucupira, unha de gato e de equinácea. A tintura de unha de gato foi a mais tóxica à fase larval em relação às outras amostras. Essa tintura também foi a que mais apresentou metabólitos secundários, como saponinas, alcaloides, taninos e flavonóides que podem estar relacionados diretamente com essa atividade. Em relação à garrafada, a presença de saponinas, flavonóides e cumarinas ou outras substâncias, cujas classes foram indicadas pelos testes farmacognósticos pode ser responsável pela atividade biológica evidenciada neste ensaio.

Para avaliação da atividade antimicrobiana, apresentam-se, na Tabela 7, as médias dos halos de inibição para determinação da atividade da garrafada e dos controles de extrato e tinturas frente à cepa de *E. coli* ATCC 25922, obtidas pelo teste mostrado na Figura 13.

Tabela 7. Avaliação da atividade antimicrobiana da garrafada e controles por difusão em disco frente à cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Amostras	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Médias do diâmetro do halo de inibição (mm)
Garrafada	200	0
Equinácea	500	0
Graviola	200	12
Ipê roxo	200	10
Sucupira	200	8
Unha de gato	200	8
Álcool	4,5	0
Água destilada	-	0
Ceftazidima	30 µg	28

0: ausência de halo de inibição de crescimento

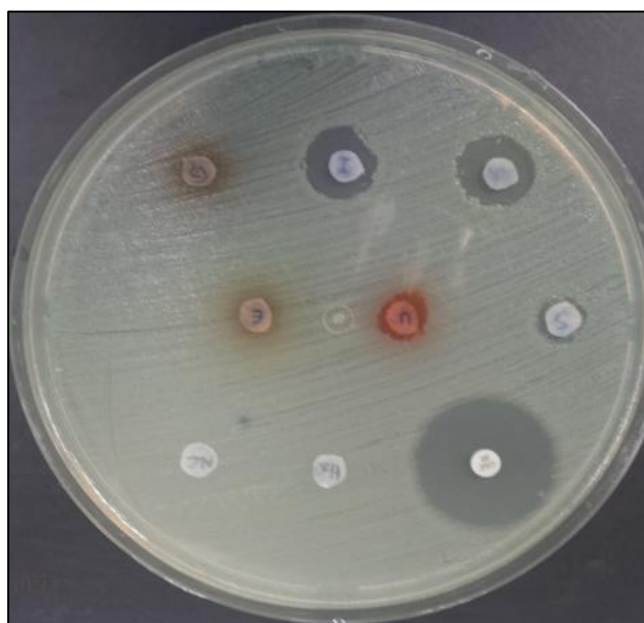


Figura 13. Foto da placa de ágar Mueller-Hinton após teste de atividade antimicrobiana da garrafada e controles frente à cepa de *E. coli*.

Os dados da Tabela 7 mostraram que os discos contendo água e álcool a 4,5 mg.mL⁻¹, utilizados como controles negativos, não inibiram o crescimento bacteriano e o disco de ceftazidima, utilizado como controle positivo; mostrou halo significativo

de inibição bacteriana, validando o teste.

Verificou-se que o micro-organismo teste mostrou sensibilidade a algumas espécies vegetais. As tinturas de graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato mostraram-se ativas frente à cepa testada, apresentando halos de inibição de crescimento de 12, 10, 8 e 8 mm de diâmetro respectivamente. As concentrações de 20 mg.mL⁻¹ e 2 mg.mL⁻¹ para graviola, ipê roxo, sucupira, unha de gato e garrafada e as concentrações de 50 mg.mL⁻¹ e 5 mg.mL⁻¹ para equinácea não apresentaram atividade.

A presença de sensibilidade das amostras vegetais frente à bactéria Gram negativa *E. coli* está de acordo com informações contidas na literatura para as tinturas de sucupira [47], unha de gato [48], graviola [49] e ipê roxo [50], pois há relatos de atividade antibacteriana. A ação antimicrobiana atribuída às plantas, muitas vezes está relacionada à presença de saponinas [51], substâncias que foram encontradas nas espécies de unha de gato e graviola pela triagem farmacognóstica.

Já o extrato de equinácea e a garrafada não apresentaram sensibilidade neste teste. Comparando-se a garrafada com as demais tinturas testadas, pode-se verificar que a mistura de substâncias ou concentrações inferiores de extratos de plantas presentes na garrafada podem estar relacionadas com a ausência de sensibilidade ao micro-organismo testado. Além disso, a dupla membrana apresentada pelas bactérias Gram negativas forma um envelope complexo, sendo responsável pela menor sensibilidade desses micro-organismos frente aos extratos vegetais [52], o que poderia explicar os halos de inibição próximos ao valor de referência e a inatividade apresentada pela equinácea e garrafada.

Estudos de toxicidade *in vitro* foram utilizados inicialmente, pois permitiram prever a toxicidade de uma substância aos seres humanos com a utilização de micro-organismos testes [53]. Esses ensaios permitiram limitar o número das variáveis experimentais e serviram como um estudo precedente ao teste *in vivo* [54].

Em relação ao teste *in vivo*, verificou-se, nos tratamentos de dose única e 30 dias, decréscimo da atividade motora em 3 animais (n=5) do grupo [ALC1] e 2 animais (n=5) do grupo [ALC2], respectivamente, após a administração de álcool na concentração de 0,005 mL.Kg⁻¹. Esse efeito foi reversível e ocorreu entre 4 a 6 horas após a administração. O efeito depressor do álcool sobre o sistema nervoso central já está bem caracterizado, atuando principalmente no aumento da resposta inibitória do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) e também pela inibição de resposta do neurotransmissor excitatório glutamato em receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) [55]. Outros sinais e sintomas não foram observados durante os tratamentos.

A Tabela 8 mostra a variação média de peso corporal dos animais durante os tratamentos com uma única dosagem e de 30 dias.

Tabela 8. Variação de peso corporal dos ratos com os tratamentos utilizados.

Variação de peso (g)	Tratamento dose única		
	CON1	ALC1	GRF1
	42,20 ± 6,08 (5)	50,80 ± 5,14 (5)	47,75 ± 3,06 (5)
Variação de peso (g)	Tratamento de 30 dias		
	CON2	ALC2	GRF2
	47,00 ± 10,33 (5)	70,80 ± 6,01 (5)	59,00 ± 9,09 (5)

Os números entre parênteses representam o número de animais (n). Resultados expressos em média ± SEM de n animais.

Apesar das variações de peso observadas entre os grupos, o ganho de peso corporal dos ratos neste estudo não foi significativo com a exposição ao álcool na concentração de 4,5 mg.mL⁻¹. Já outros autores mostraram alterações significativas de peso, sendo que as diminuições e aumentos de peso ocorreram de acordo com a quantidade de álcool exposta [26, 56].

Na Tabela 9, verificam-se os resultados das análises bioquímicas com os tratamentos utilizados.

Tabela 9. Efeito dos tratamentos em parâmetros bioquímicos nos ratos tratados.

	Tratamento dose única		
	CON1	ALC1	GRF1
Ácido úrico (mg.dL ⁻¹)	0,89 ± 0,07 (4)	1,82 ± 0,37 (5) **	1,64 ± 0,06 (4) *
ALT (U.L ⁻¹)	36,05 ± 4,67 (4)	34,12 ± 2,19 (5)	30,18 ± 0,82 (5)
AST (U.L ⁻¹)	85,20 ± 6,65 (4)	78,18 ± 6,03 (5)	88,42 ± 6,44 (5)
BD (mg.dL ⁻¹)	0,01 ± 0,01 (4)	0,03 ± 0,02 (5)	0,04 ± 0,02 (5)
BI (mg.dL ⁻¹)	0,06 ± 0,02 (4)	0,10 ± 0,05 (5)	0,04 ± 0,01 (5)
BT (mg.dL ⁻¹)	0,07 ± 0,02 (4)	0,13 ± 0,05 (5)	0,08 ± 0,03 (5)
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	75,15 ± 4,66 (4)	89,13 ± 2,98 (4) *	84,72 ± 3,89 (5)
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0,29 ± 0,01 (4)	0,29 ± 0,02 (5) §	0,24 ± 0,01 (5) *
FA (U.L ⁻¹)	170,58 ± 22,87 (4)	159,90 ± 4,48 (4)	139,38 ± 19,36 (5) *
Ferro (µg.dL ⁻¹)	175,73 ± 29,71 (4)	115,05 ± 2,88 (4)	182,46 ± 16,86 (5) §
GGT (U.L ⁻¹)	0,00 ± 0,00 (4)	0,14 ± 0,14 (5)	0,00 ± 0,00 (5)
Glicose (mg.dL ⁻¹)	103,60 ± 9,61 (4)	67,48 ± 10,89 (5) *	116,06 ± 14,24 (5) §
PCR (mg.dL ⁻¹)	0,00 ± 0,00 (4)	0,01 ± 0,01 (5)	0,00 ± 0,00 (5)
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	56,75 ± 6,35 (4)	58,95 ± 6,92 (4)	69,30 ± 13,61 (4)
Ureia (mg.dL ⁻¹)	33,85 ± 3,47 (4)	36,10 ± 2,54 (5)	35,10 ± 2,03 (5)
	Tratamento de 30 dias		
	CON2	ALC2	GRF2
Ácido úrico (mg.dL ⁻¹)	0,45 ± 0,11 (4)	3,38 ± 0,17 (5) *	0,63 ± 0,12 (4)
ALT (U.L ⁻¹)	35,60 ± 1,08 (5)	32,45 ± 2,53 (4)	31,06 ± 2,16 (5)
AST (U.L ⁻¹)	101,90 ± 15,85 (5)	108,52 ± 25,18 (5)	76,50 ± 10,13 (4)
BD (mg.dL ⁻¹)	0,01 ± 0,01 (5)	0,02 ± 0,01 (5)	0,02 ± 0,01 (5)
BI (mg.dL ⁻¹)	0,17 ± 0,02 (5)	0,08 ± 0,01 (5) ***	0,09 ± 0,02 (5) **
BT (mg.dL ⁻¹)	0,17 ± 0,02 (5)	0,10 ± 0,01 (5) *	0,10 ± 0,01 (5) *
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	67,73 ± 2,47 (4)	75,70 ± 2,44 (4)	73,96 ± 1,34 (5)
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0,29 ± 0,01 (5)	0,23 ± 0,01 (5) *	0,28 ± 0,02 (5) §
FA (U.L ⁻¹)	86,15 ± 6,03 (4)	110,00 ± 4,56 (4) *	77,25 ± 6,91 (4) §§
Ferro (µg.dL ⁻¹)	172,98 ± 7,76 (4)	229,48 ± 13,65 (4) **	164,98 ± 4,45 (4) §§§
GGT (U.L ⁻¹)	0,00 ± 0,00 (5)	0,28 ± 0,16 (5)	0,18 ± 0,11 (5)
Glicose (mg.dL ⁻¹)	140,63 ± 9,46 (4)	163,35 ± 12,91 (4)	118,64 ± 4,45 (5) §§
PCR (mg.dL ⁻¹)	0,00 ± 0,00 (5)	0,00 ± 0,00 (5)	0,00 ± 0,00 (5)
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	55,83 ± 7,35 (4)	60,53 ± 5,48 (4) §	35,70 ± 3,27 (4) *
Ureia (mg.dL ⁻¹)	39,88 ± 2,82 (5)	37,38 ± 1,30 (5)	38,60 ± 2,00 (5)

ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; BD, bilirrubina direta; BI, bilirrubina indireta; BT, bilirrubina total; FA, fosfatase alcalina; GGT, gama glutamiltransferase; PCR, proteína C reativa. Os números entre parênteses representam o número de animais (n). Resultados expressos em média ± SEM de n animais.

* $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle.

** $p < 0.005$, p valor comparado com o grupo controle.

*** $p < 0.001$, p valor comparado com o grupo controle.

§ $p < 0.05$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

§§ $p < 0.005$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

§§§ $p < 0.001$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

Os ratos tratados com álcool e garrafada mostraram um nível elevado e significativo de ácido úrico. Este aumento ocorreu com os grupos [ALC1], [GRF1] e [ALC2]. A Figura 14 (a) mostra que o ácido úrico aumentou em 104% no grupo

[ALC1] ($p < 0,005$) e em 84% ($p < 0,05$) no grupo [GRF1] em comparação com o controle. O aumento de ácido úrico nesses grupos provavelmente é decorrente da presença de álcool na garrafada. Esse aumento é relevante, pois, apenas com uma dosagem, houve alteração significativa deste parâmetro.

No grupo [ALC2], o aumento de ácido úrico foi ainda mais expressivo, sendo que mostrava valores de $0,45 \pm 0,11 \text{ mg.dL}^{-1}$ de ácido úrico no controle, aumentando para $3,38 \pm 0,17 \text{ mg.dL}^{-1}$ de ácido úrico ($p < 0,05$), conforme Figura 14 (b). Já para o grupo [GRF2], este analito não foi significativo, porém, manteve-se em baixas concentrações.

Tem sido demonstrado que o uso de álcool induz à hiperurcemia [57], assim como ocorreu com os grupos [ALC1], [GRF1] e [ALC2]. Com o tratamento de 30 dias, algumas substâncias presentes na garrafada atenuaram o efeito hiperuricêmico do álcool em ratos [GRF2] por algum mecanismo desconhecido. O nível de ácido úrico é controlado pela taxa de degradação de purinas endógenas e exógenas em ácido úrico e também pela taxa de excreção desse analito [58]. Qualquer fator que altere a função hepática ou renal pode influenciar nos níveis séricos de ácido úrico [59].

Na Figura 14 (a) e (b), é possível verificar ainda que os níveis de creatinina dos grupos [GRF1] e [ALC2] se mostraram significativamente menores em relação aos grupos controles ($p < 0,05$). O que ocasionou a diminuição do nível de creatinina sérica não está esclarecido, visto que a função renal dos ratos pode estar prejudicada pelo aumento considerável de ácido úrico encontrado.

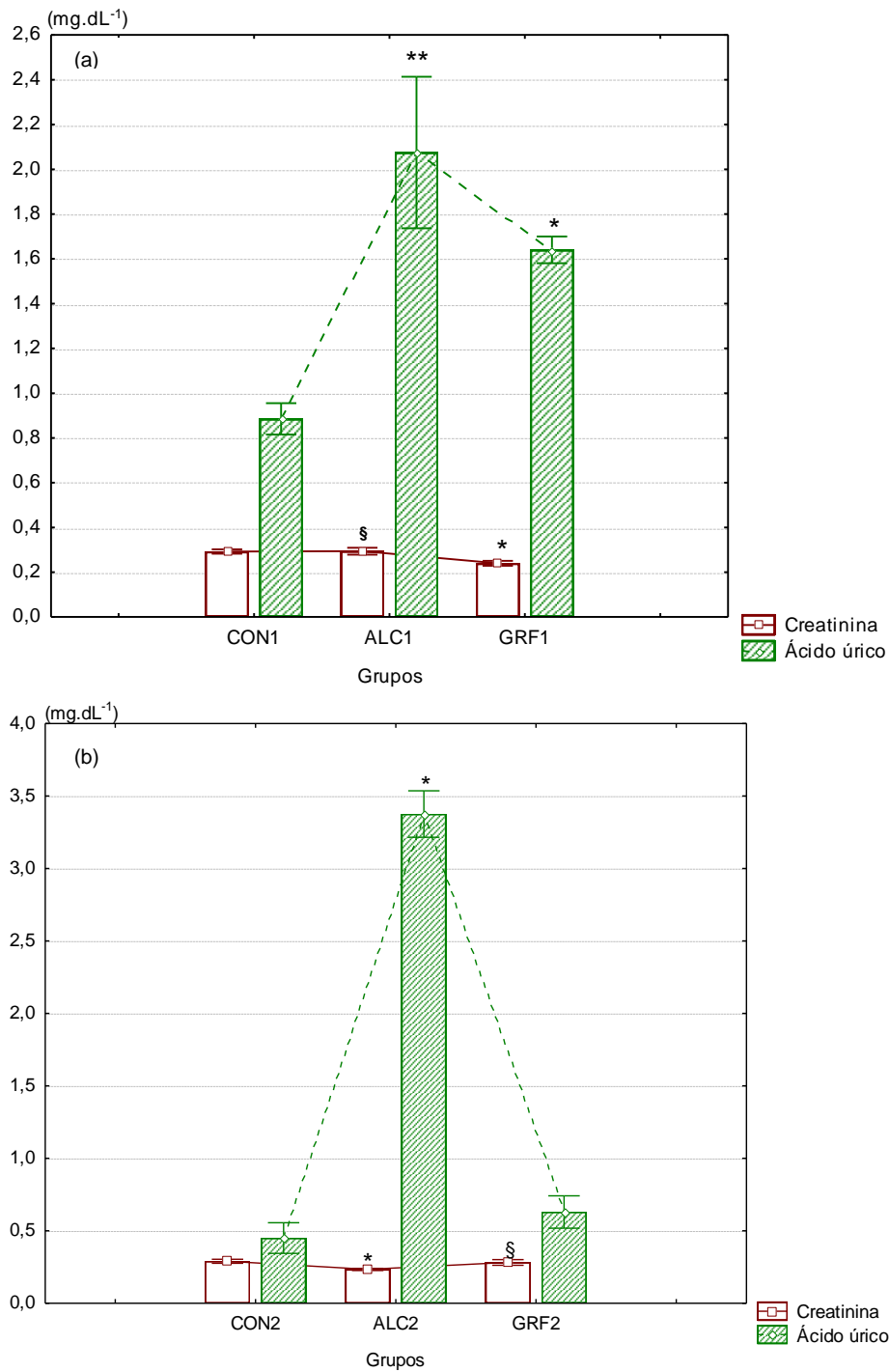


Figura 14. Parâmetros bioquímicos Ácido úrico (mg.dL⁻¹) e Creatinina (mg.dL⁻¹) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias. * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle. ** $p < 0.005$, p valor comparado com o grupo controle. § $p < 0.05$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

No tratamento de 30 dias, as bilirrubinas total e indireta dos grupos [ALC2] e [GRF2] tiveram seus níveis diminuídos significativamente em relação ao grupo controle. Os níveis de significância de p valor estão representados na Figura 15.

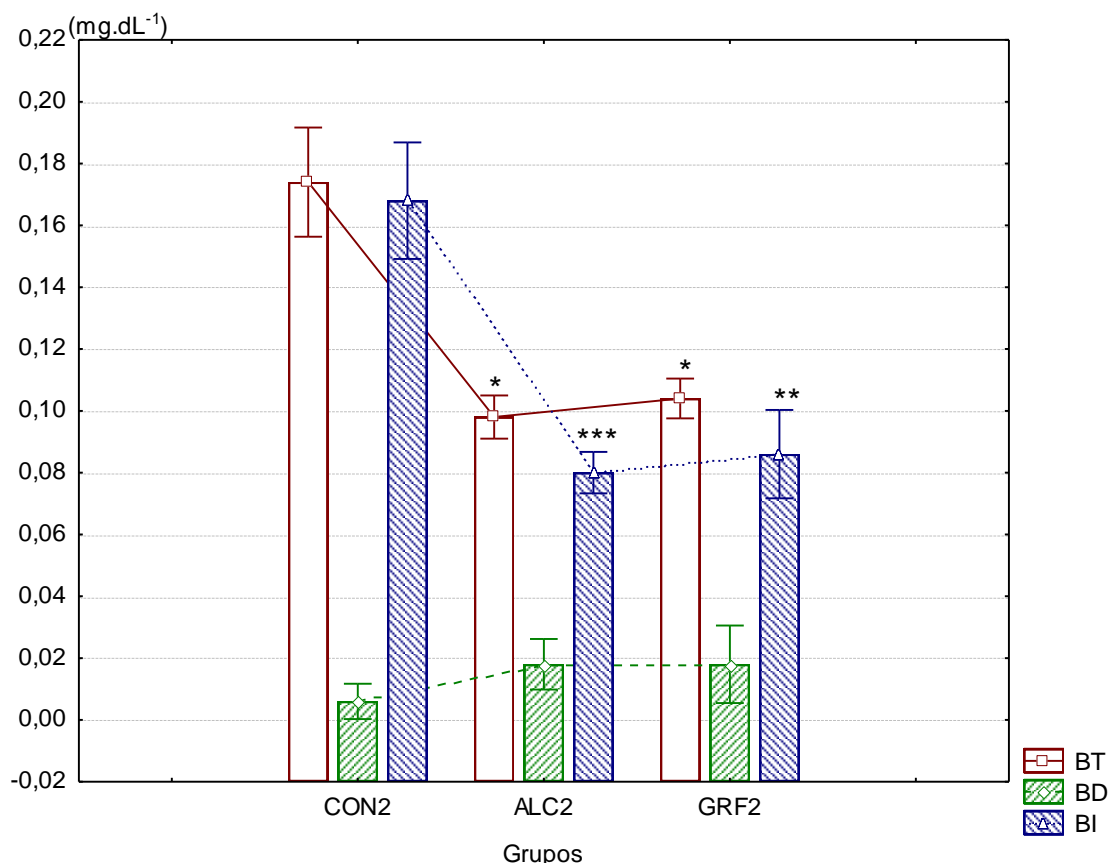


Figura 15. Parâmetro bioquímico BT, BD e BI (mg.dL⁻¹) com o tratamento de 30 dias. * $p < 0,05$, p valor comparado com o grupo controle. ** $p < 0,005$, p valor comparado com o grupo controle. *** $p < 0,001$, p valor comparado com o grupo controle.

Sabe-se que a diminuição dos níveis de bilirrubinas mostra melhora da função hepática. Alterações precoces na bilirrubinemia é um importante fator prognóstico em pacientes com hepatite alcóolica [60]. Neste estudo, foram encontrados níveis diminuídos de bilirrubinas, tanto para o grupo da garrafada como para o grupo tratado com álcool. Esse achado se mostra diferente do esperado, visto que o consumo de álcool leva ao aumento da bilirrubina sérica, por inibir competitivamente a sua conjugação [61].

Na Figura 16 (a), observa-se que as unidades de FA diminuíram significativamente do grupo [GRF1] em relação ao controle ($p < 0,05$). Já no tratamento de 30 dias, Figura 16 (b), as unidades de FA do grupo [ALC2] se elevaram em 28% com relação ao controle ($p < 0,05$). As unidades de FA do grupo [GRF2] se mantiveram baixas, porém, apenas significativas em relação ao grupo [ALC2] ($p < 0,005$).

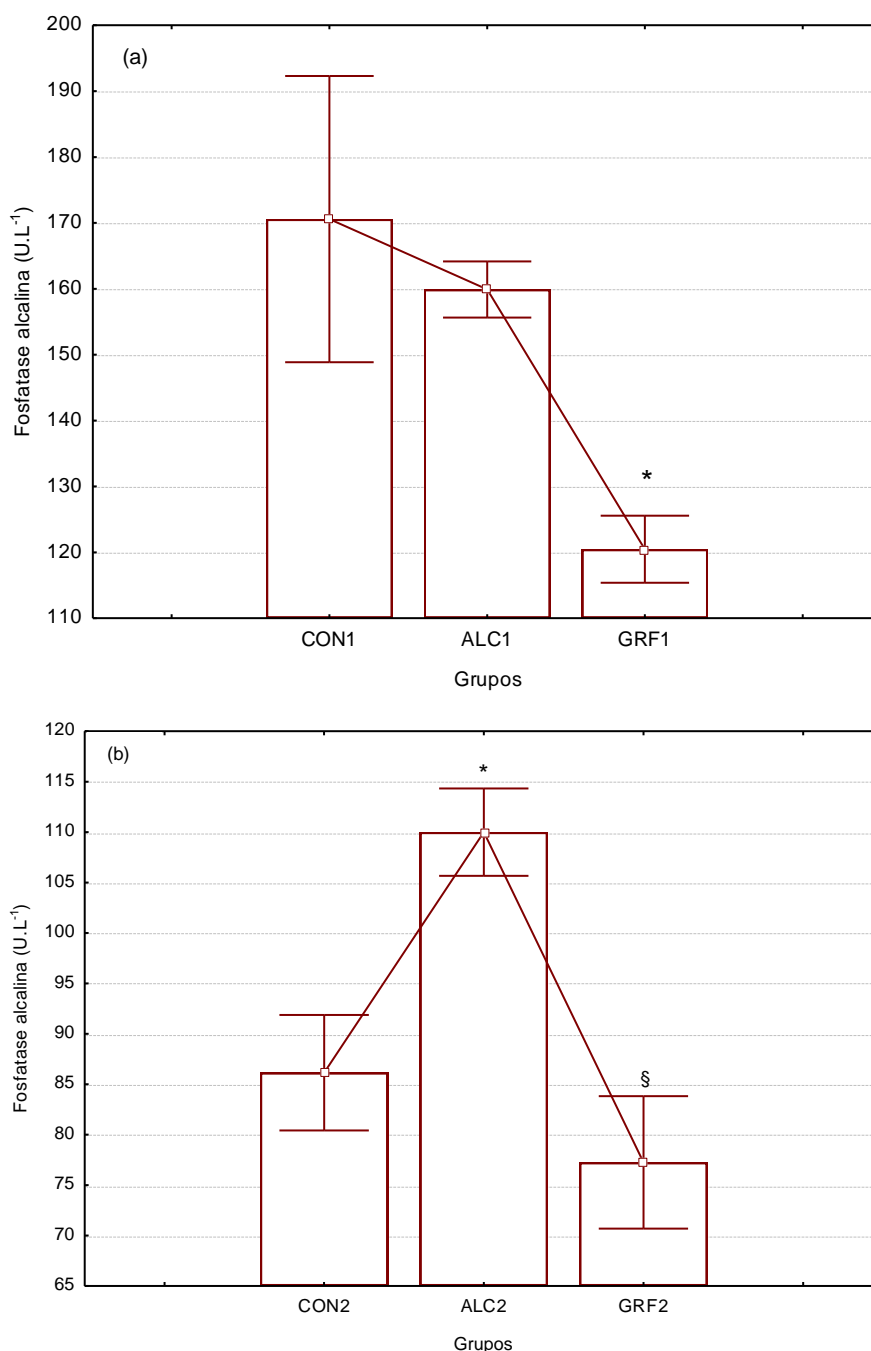


Figura 16. Parâmetro bioquímico FA (U.L⁻¹) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias. * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle e § $p < 0.05$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

Já é bem conhecido que aumentos nos níveis séricos de fosfatase alcalina são observados em resposta à exposição crônica ao etanol [62] e também em doenças hepáticas não alcólicas [63]. No fígado, a FA é formada por hepatócitos e por células da mucosa do trato biliar. Embora a FA de origem hepática possa estar aumentada no soro devido a qualquer tipo de hepatopatia ativa, o nível sérico se mostra especialmente sensível à obstrução do trato biliar, seja ela intra-hepática ou extra-hepática, e grau leve ou intenso, localizada numa pequena área do fígado ou numa região mais intensa [62].

No fígado, a fosfatase alcalina está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares. Como a fosfatase alcalina está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, essa enzima está elevada nas desordens do trato biliar. Pelo impedimento do fluxo biliar, esses aumentos são devidos, fundamentalmente, ao incremento na síntese da enzima, retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a fosfatase alcalina e a removem da membrana plasmática dos hepatócitos e regurgitação da enzima para a circulação pelo impedimento da excreção [64].

Assim, como descrito na literatura, também encontrou-se aumento desta enzima sérica em ratos após 30 dias de tratamento com álcool. Substâncias presentes na garrafada podem ter atenuado a ação do álcool, visto que no grupo [GRF2] as unidades de FA mantiveram-se significativamente baixas. Já foram demonstrados efeitos protetores hepáticos e renais das partes aéreas do extrato de *E. purpurea* sobre lesões induzidas pela dietilnitrosamina em ratos [65] e também efeitos anti-inflamatórios na toxicidade hepática induzida por arsênico [66].

As dosagens de glicose do grupo [ALC1] mostraram-se inferiores em comparação com o grupo [CON1] ($p < 0,05$) e do grupo [GRF1] superiores em relação ao grupo [ALC1] ($p < 0,05$), conforme apresentado na Figura 17 (a). Já no tratamento de 30 dias, os níveis de glicose de [GRF2] reduziram em relação ao grupo [ALC2] ($p < 0,005$), como demonstrado na Figura 17 (b).

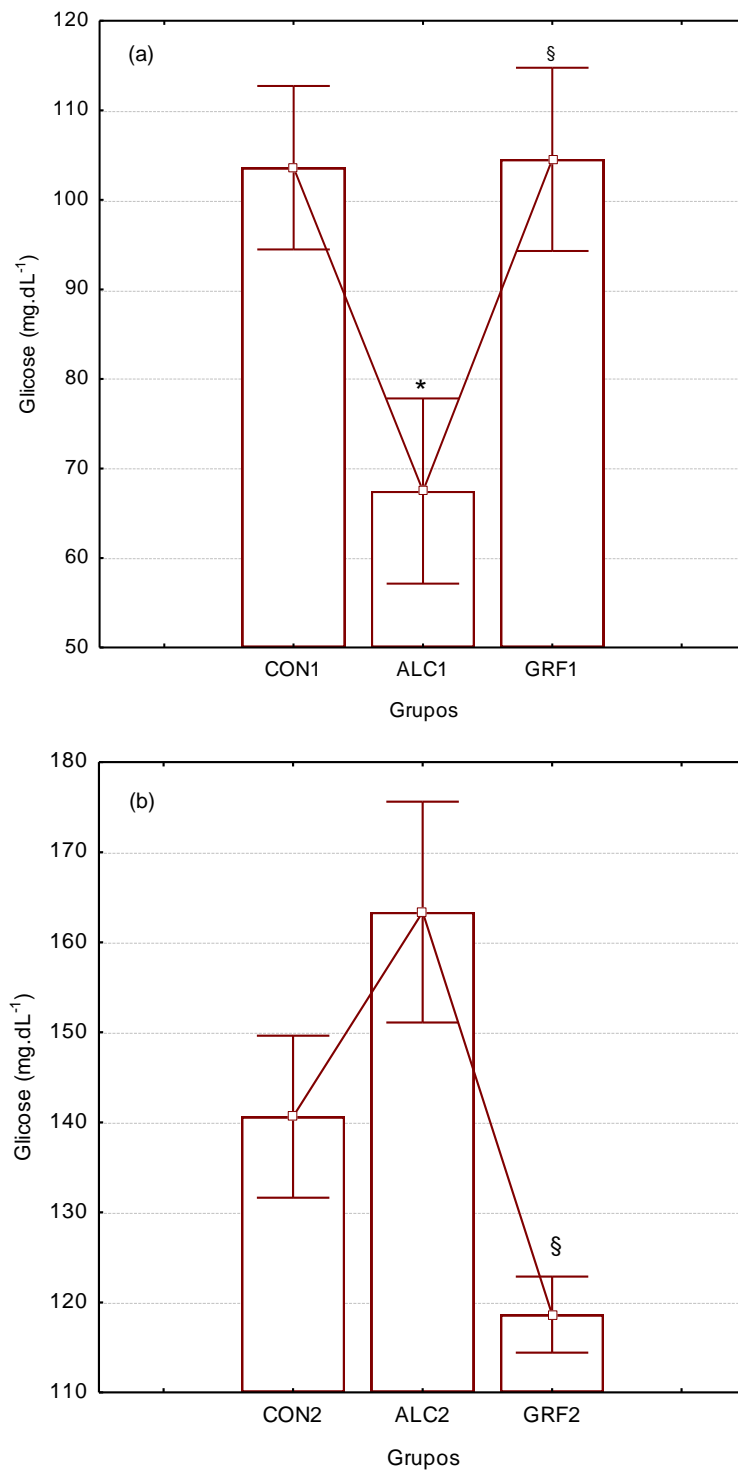


Figura 17. Parâmetro bioquímico Glicose (mg.dL⁻¹) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias. * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle. § $p < 0.05$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

O álcool também demonstra ter relação direta com alterações sobre o metabolismo da glicose [67]. Baixas doses de álcool têm sido associadas ao aumento na sensibilidade à insulina, sendo este um efeito benéfico. Além disso, a influência do álcool no metabolismo da glicose exige que sejam considerados fatores como o tempo de tratamento e a concentração ingerida de álcool [68]. Também

influencia no metabolismo da glicose, inibindo tanto a gliconeogênese quanto a glicogenólise. A ingestão aguda de álcool em jejum pode provocar hipoglicemia, especialmente nos casos de depósitos de glicogênio esgotados. Estudos em animais sugeriram que o etanol causa hipoglicemia por interferir com a gliconeogênese, bem como a síntese de glicogênio [69], justificando as baixas concentrações de glicose encontradas nos grupo [ALC1].

O grupo [GRF1] apresentou aumento significativo da glicemia em relação ao grupo [ALC1]. A intoxicação alcoólica aguda pode desencadear uma hiperglicemia moderada e transitória pelo efeito do stress oxidativo devido à produção de acetaldéido [70]. Já em uma segunda fase, o consumo crônico de álcool pode desencadear a diminuição dos níveis glicêmicos [71]; tal situação ocorre devido ao bloqueio do ciclo de Krebs [70].

Os animais do grupo [GRF2] apresentaram diminuição dos níveis glicêmicos. Como no grupo tratado com álcool não obteve-se o mesmo resultado, provavelmente esse efeito hipoglicemiante é resultante de compostos das espécies vegetais presentes na garrafada. O extrato aquoso de *A. muricata*, por exemplo, possui atividade antidiabética com ação antioxidante e protetora sobre as células β pancreáticas, que, por sua vez, melhoram o metabolismo da glicose [72] e também com a espécie *P. emarginatus* [16], em que foi descrita atividade hipoglicêmica em um estudo sobre o uso de plantas tradicionais.

Na Figura 18 (a), verifica-se que as determinações de colesterol foram significativas para o grupo [ALC1] em relação ao controle com ($p < 0,05$), aumentando em 19%. Já os níveis de triglicerídeos, representados na Figura 18 (b), foram significativos para o grupo [GRF2], diminuindo em 36% em relação ao controle ($p < 0,05$) e aumentando os níveis em [ALC2] em relação a [GRF2] ($p < 0,05$).

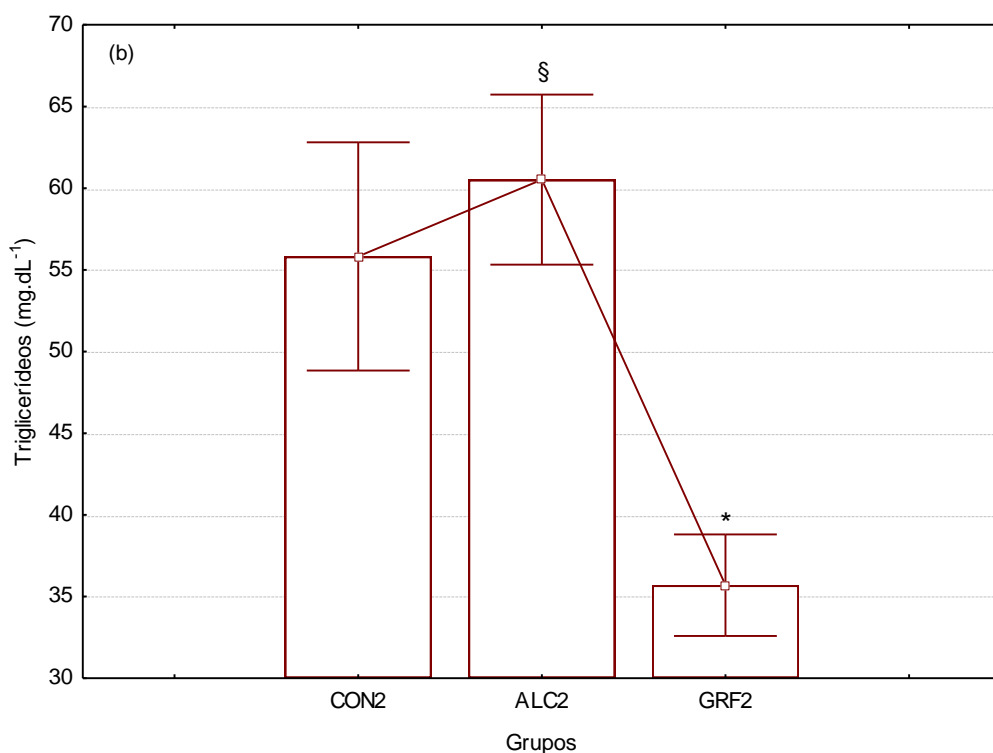
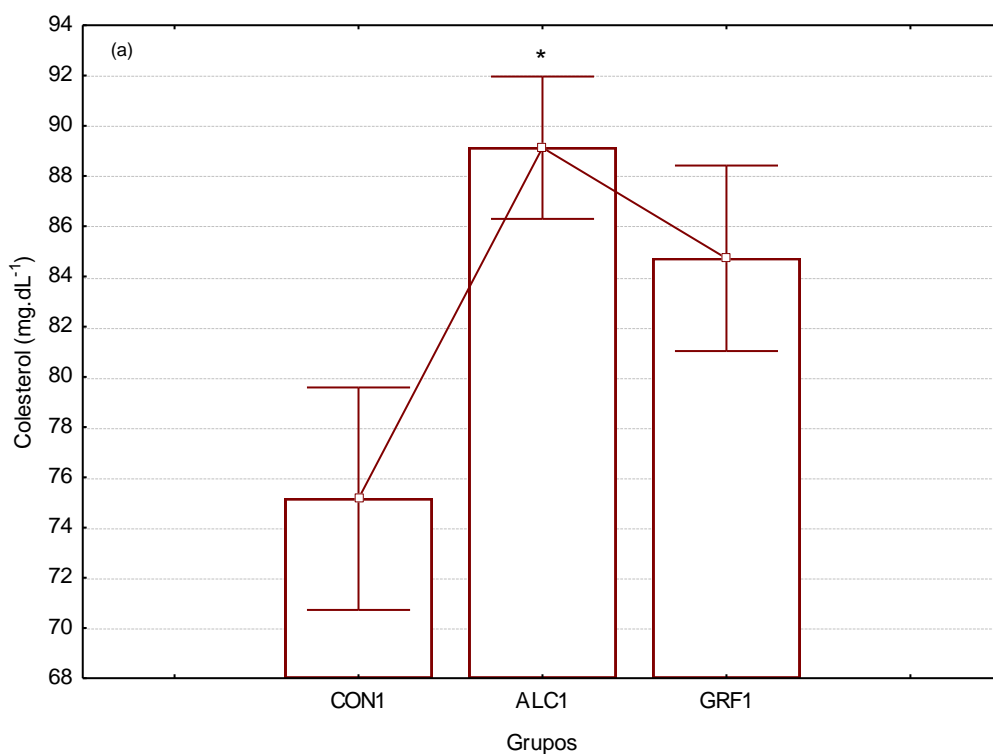


Figura 18. Parâmetros bioquímicos Colesterol (mg.dL^{-1}) com tratamento de Dose única (a) e Triglicerídeos (mg.dL^{-1}) e 30 dias (b). * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle. § $p < 0.05$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

Os efeitos sobre os níveis de colesterol e de triglicerídeos foram diferentes nos dois tratamentos. O aumento dos níveis de colesterol em $13,98 \text{ mg.dL}^{-1}$ no grupo [ALC1] pode refletir no aumento da absorção do colesterol dietético ou na indução da absorção de colesterol pelo álcool [73]. Como o colesterol é solúvel em álcool, a

transferência de colesterol sólido para micelas de sais biliares no intestino pode ter sido aumentada na presença de álcool [74]. Esses achados foram consistentes com estudos anteriores, indicando que o álcool afetou o metabolismo lipídico [75], com aumento dos níveis de colesterol em ratos tratados com álcool [26].

Os níveis de triglicerídeos diminuíram significativamente no grupo da garrafada ($20,13 \text{ mg.dL}^{-1}$) e aumentaram no grupo do álcool ($24,83 \text{ mg.dL}^{-1}$) em comparação com a garrafada. A queda nos níveis de triglicerídeos no grupo [GRF2] pode estar relacionada com um efeito encontrado em extrato de *T. avellanedae*. Nesse estudo, ratas ovariectomizadas alimentadas com extrato de ipê roxo apresentaram perda de peso, diminuição da gordura corporal e dos níveis de triglicerídeos. Esse efeito antiobesidade do extrato deveu-se à capacidade de prevenir a acumulação de triglicerídeos em adipócitos mostrado no estudo [76].

Já o álcool causa acumulação de triglicerídeos hepáticos, podendo levar a esteatose e a uma hipertrigliceridemia álcool dependente. Esse acúmulo de triglicerídeos é devido a um aumento da síntese hepática das VLDL diretamente ligada ao aumento da relação NADH/NAD, que é responsável pelo bloqueio da oxidação dos ácidos graxos e do ciclo de Krebs. O excesso de ácidos graxos é utilizado para a síntese dos triglicerídeos [70].

O acúmulo de gordura e depósitos de colesterol [77] também reduz a função hepática. Alguns autores consideram que essa deterioração é progressiva, começando com algumas alterações do perfil lipídico, seguidas por uma fase potencialmente compensatória e, finalmente, resultando em insuficiência hepática. Além disso, essa deterioração progressiva do fígado pode ser responsável pelo desaparecimento da hiperlipidemia encontrada em alguns casos de consumo crônico de álcool [78], o que explicaria nossos achados de colesterol em animais tratados por 30 dias.

Na dosagem do ferro sérico, verificou-se aumento dos níveis no grupo [GRF1], porém, não foram significativos em relação ao controle ($p > 0,05$), conforme Figura 19 (a). Já com o tratamento de 30 dias, houve aumento significativo dos níveis no grupo [ALC2] em relação ao controle ($p < 0,005$), como demonstra a Figura 19 (b), e esse aumento foi de 33%.

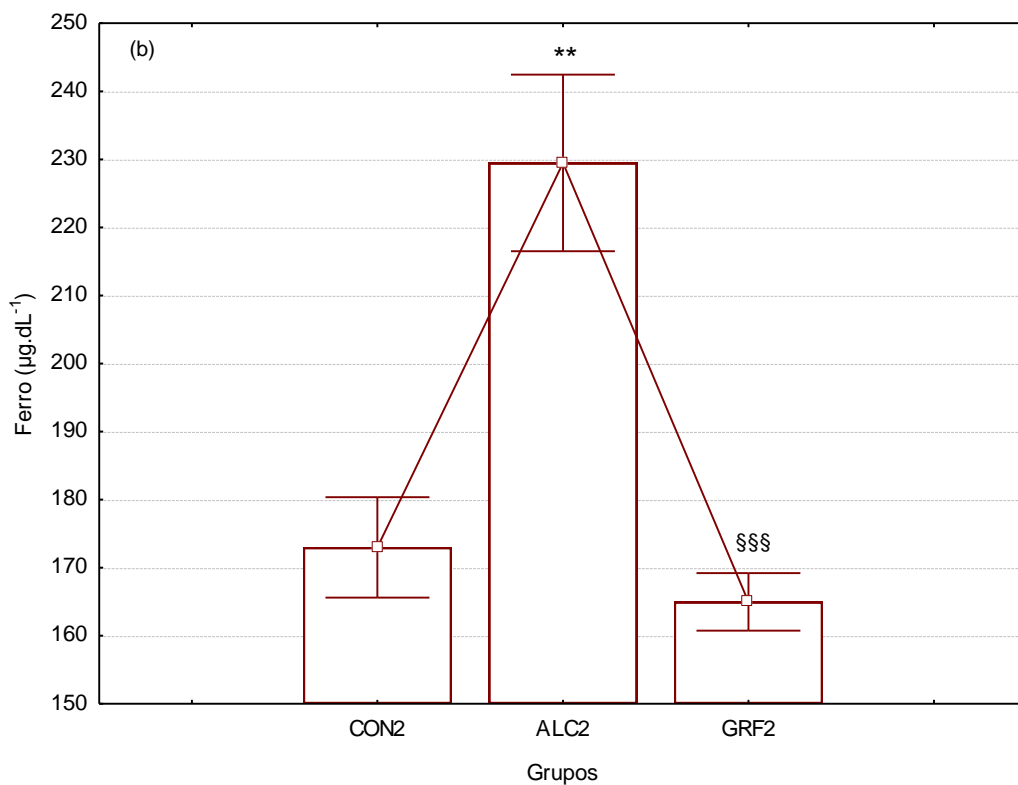
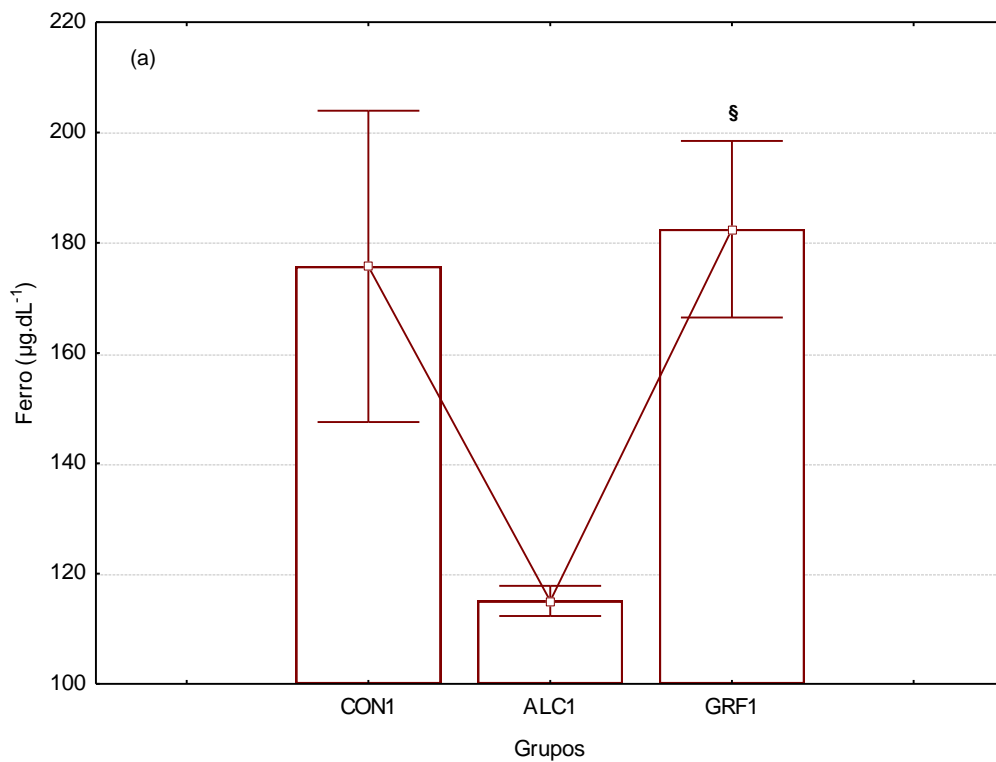


Figura 19. Parâmetro bioquímico Ferro ($\mu\text{g.dL}^{-1}$) com os tratamentos de (a) Dose única e (b) 30 dias. * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle. § $p < 0.05$, p valor comparado entre os grupos da garrafada e do álcool.

Sabe-se que o consumo regular de álcool é responsável pela interrupção do metabolismo normal do ferro, resultando no excesso e deposição desse elemento no fígado. É provável que as duas principais proteínas do seu metabolismo, a ferritina e

a transferrina, estejam envolvidas nesse processo. A ferritina é a forma de armazenamento de ferro, enquanto a transferrina é a proteína transportadora de ferro. O álcool afeta a estrutura da molécula de transferrina, fazendo com que se torne carboidrato deficiente, resultando num aumento da concentração de ferritina no plasma [79].

Os danos teciduais na doença hepática alcoólica e na hemocromatose são causados pelo excesso de álcool e ferro, respectivamente. Acredita-se que os mecanismos desses danos sejam semelhantes em ambas as doenças e envolvem a toxicidade mediada por radicais livres. Se o ferro e o álcool estiverem em excesso, é provável que possa ocorrer eventos hepatotóxicos sinérgicos [79].

Mecanismos definitivos de danos hepáticos devidos ao ferro, álcool e sua interação não são claramente compreendidos, embora mecanismos semelhantes são relacionados a ambas as condições. O estresse oxidativo, resultando em peroxidação lipídica e lesão celular, tem sido implicado como fator causal [80].

Efeitos nocivos do álcool e seus produtos derivados sobre a função hepatocelular são pertinentes. A exposição ao álcool causa esteatose, disfunção das membranas mitocondriais e celulares, hipóxia e estresse oxidativo. Em concentrações milimolares, o álcool afeta diretamente a função microtubular e mitocondrial e a fluidez da membrana. A patogénia da toxicidade hepática pelo álcool está relacionada com o acetaldeído (o principal metabólito intermediário do álcool), induz peroxidação e formação do aduto acetaldeído-proteína, desorganizando ainda mais o citoesqueleto e a função das membranas. O metabolismo pelo citocromo P-450 produz espécies reativas de oxigênio (ROS), que reagem com proteínas celulares, danificam as membranas e alteram a função hepatocelular. Além disso, o prejuízo do metabolismo hepático da metionina induzido pelo álcool provoca diminuição dos níveis intra-hepáticos de glutatona, consequentemente sensibilizando o fígado à lesão oxidativa. A indução de CYP2E1 e outras enzimas do citocromo P-450 no fígado pelo álcool aumenta o catabolismo do álcool no retículo endoplasmático e intensifica a conversão em metabólitos tóxicos [81].

Os resultados dos demais parâmetros bioquímicos, AST, ALT, BD, GGT, PCR e ureia, dos tratamentos de dose única e de 30 dias, não foram significativos entre os grupos ($p > 0,05$).

A Tabela 10 mostra as determinações das análises de coagulação, sendo que TAP, RNI, KPTT e ratio não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 10. Efeito dos tratamentos em parâmetros de coagulação nos ratos tratados.

	Tratamento dose única		
	CON1	ALC1	GRF1
TAP (s)	16,53 ± 0,51 (4)	17,05 ± 0,47 (4)	16,06 ± 0,44 (5)
TAP Atividade (%)	79,07 ± 3,30 (4)	75,64 ± 3,06 (4)	82,24 ± 3,00 (5)
RNI	1,25 ± 0,04 (4)	1,29 ± 0,04 (4)	1,21 ± 0,03 (5)
KPTT (s)	19,75 ± 0,48 (4)	20,50 ± 0,65 (4)	20,60 ± 0,75 (5)
Ratio	0,99 ± 0,02 (4)	1,00 ± 0,04 (4)	1,01 ± 0,04 (5)
	Tratamento de 30 dias		
	CON2	ALC2	GRF2
TAP (s)	19,75 ± 0,63 (4)	19,02 ± 0,26 (5)	20,23 ± 1,11 (4)
TAP Atividade (%)	63,53 ± 1,08 (4)	65,16 ± 1,11 (5)	61,36 ± 3,58 (4)
RNI	1,47 ± 0,03 (4)	1,43 ± 0,02 (5)	1,53 ± 0,09 (4)
KPTT (s)	21,50 ± 0,65 (4)	19,25 ± 0,25 (4)	21,00 ± 0,91 (4)
Ratio	1,08 ± 0,03 (4)	0,97 ± 0,01 (4)	1,05 ± 0,05 (4)

Os números entre parênteses representam o número de animais (n). Resultados expressos em média ± SEM de n animais.

Na literatura, há fortes evidências de que o álcool prejudique a função dos fatores de coagulação. O Acetaldeído, produto do metabolismo do álcool, medeia estes efeitos pela inativação da trombina, fator Xa, fibrinogênio, II, VII e X, inibe a atividade da transglutaminase do factor XIIIa e forma complexos com glicosaminoglicanos para sinergicamente inibir os fatores IX, IXa, X e Xa [82] com consequente prolongamento dos tempos de coagulação. Além disso, um composto presente na *T. avellanedae*, o lapachol, também mostrou alterações na hemostasia, por ter estrutura similar à vitamina K, porém, é um inibidor reversível dessa vitamina [12, 83]. Apesar desses relatos científicos sobre os produtos estudados, não foram observadas alterações na coagulação em nosso estudo.

Na Tabela 11, apresentam-se os resultados dos diferentes parâmetros hematológicos dosados. Apenas o número de hemácias ($p < 0,05$) e de leucócitos ($p < 0,05$) do grupo [ALC2] foram significativos em relação ao controle. Esses resultados estão representados na Figura 20 (a) e (b), respectivamente.

Tabela 11. Efeito dos tratamentos em parâmetros hematológicos nos ratos tratados.

	Tratamento dose única		
	CON1	ALC1	GRF1
Hemácias ($10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	7,65 ± 0,09 (4)	8,18 ± 0,17 (5)	7,92 ± 0,24 (5)
HB (g.dL ⁻¹)	13,85 ± 0,21 (4)	15,03 ± 0,34 (5)	14,33 ± 0,46 (5)
HTC (%)	41,47 ± 0,67 (4)	44,80 ± 0,97 (5)	43,20 ± 1,46 (5)
VCM (fL)	53,86 ± 0,71 (4)	54,64 ± 0,68 (5)	54,45 ± 0,59 (5)
HCM (pg)	18,05 ± 0,18 (4)	18,41 ± 0,18 (5)	18,11 ± 0,22 (5)
CHCM (g.dL ⁻¹)	33,51 ± 0,11 (4)	33,71 ± 0,09 (5)	33,15 ± 0,07 (5)
RDW (%)	14,01 ± 0,44 (4)	13,56 ± 0,27 (5)	13,94 ± 0,27 (5)
Reticulócitos (%)	9,82 ± 0,43 (4)	13,15 ± 1,78 (5)	9,87 ± 0,49 (5)
Leucócitos (%)	5050 ± 710 (4)	5300 ± 1064 (5)	4940 ± 708 (5)
Basófilos (%)	0,00 ± 0,00 (4)	0,00 ± 0,00 (5)	0,00 ± 0,00 (5)
Bastões (%)	0,50 ± 0,29 (4)	0,00 ± 0,00 (5)	0,60 ± 0,40 (5)
Eosinófilos (%)	0,00 ± 0,00 (4)	0,00 ± 0,00 (5)	0,00 ± 0,00 (5)
Linfócitos (%)	73,25 ± 2,53 (4)	76,20 ± 1,39 (5)	71,80 ± 4,83 (5)
Monócitos (%)	3,25 ± 0,85 (4)	1,60 ± 0,75 (5)	2,60 ± 1,17 (5)
Neutrófilos (%)	23,00 ± 2,16 (4)	22,20 ± 1,66 (5)	25,00 ± 4,02 (5)
Plaquetas (μL^{-1})	656000 ± 55514 (4)	671480 ± 115983 (5)	589975 ± 72667 (4)
VPM (fL)	6,55 ± 0,16 (5)	6,59 ± 0,27 (5)	6,07 ± 0,15 (5)
	Tratamento de 30 dias		
	CON2	ALC2	GRF2
Hemácias ($10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	8,50 ± 0,23 (5)	7,84 ± 0,18 (5) *	7,96 ± 0,14 (5)
HB (g.dL ⁻¹)	15,20 ± 0,48 (5)	14,56 ± 0,25 (5)	14,96 ± 0,29 (5)
HTC (%)	43,20 ± 1,47 (5)	40,60 ± 0,91 (5)	41,00 ± 0,94 (5)
VCM (fL)	50,61 ± 0,73 (5)	51,29 ± 0,41 (5)	51,09 ± 0,53 (5)
HCM (pg)	17,86 ± 0,11 (5)	18,56 ± 0,15 (5)	18,67 ± 0,18 (5)
CHCM (g.dL ⁻¹)	35,30 ± 0,36 (5)	36,19 ± 0,19 (5)	36,55 ± 0,12 (5)
RDW (%)	15,48 ± 0,52 (5)	14,58 ± 0,42 (5)	15,08 ± 0,10 (5)
Reticulócitos (%)	13,42 ± 1,37 (5)	14,84 ± 3,14 (5)	14,37 ± 2,21 (5)
Leucócitos (μL^{-1})	6360 ± 1231 (5)	3400 ± 731 (5) *	4260 ± 449 (5)
Basófilos (%)	0,00 ± 0,00 (5)	0,00 ± 0,00 (5)	0,00 ± 0,00 (5)
Bastões (μL^{-1})	0,40 ± 0,27 (5)	0,80 ± 0,65 (5)	0,40 ± 0,27 (5)
Eosinófilos (μL^{-1})	0,40 ± 0,45 (5)	0,00 ± 0,00 (5)	0,20 ± 0,22 (5)
Linfócitos (μL^{-1})	64,40 ± 3,03 (5)	68,80 ± 4,63 (5)	72,40 ± 6,47 (5)
Monócitos (μL^{-1})	1,80 ± 1,02 (5)	3,60 ± 1,15 (5)	2,20 ± 0,74 (5)
Neutrófilos (μL^{-1})	33,00 ± 2,74 (5)	25,40 ± 3,55 (5)	24,80 ± 5,80 (5)
Plaquetas (μL^{-1})	692600 ± 90073 (4)	647840 ± 74957 (5)	629860 ± 69280 (5)
VPM (fL)	6,55 ± 0,23 (5)	6,45 ± 0,14 (5)	6,26 ± 0,21 (5)

HB: Hemoglobina, HTC: Hematócrito, VCM: Volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW: Variação do volume eritrocitário, VPM: Volume plaquetário médio. Os números entre parênteses representam o número de animais (n). Resultados expressos em média ± SEM de n animais. * $p < 0,05$, p valor comparado com o grupo controle.

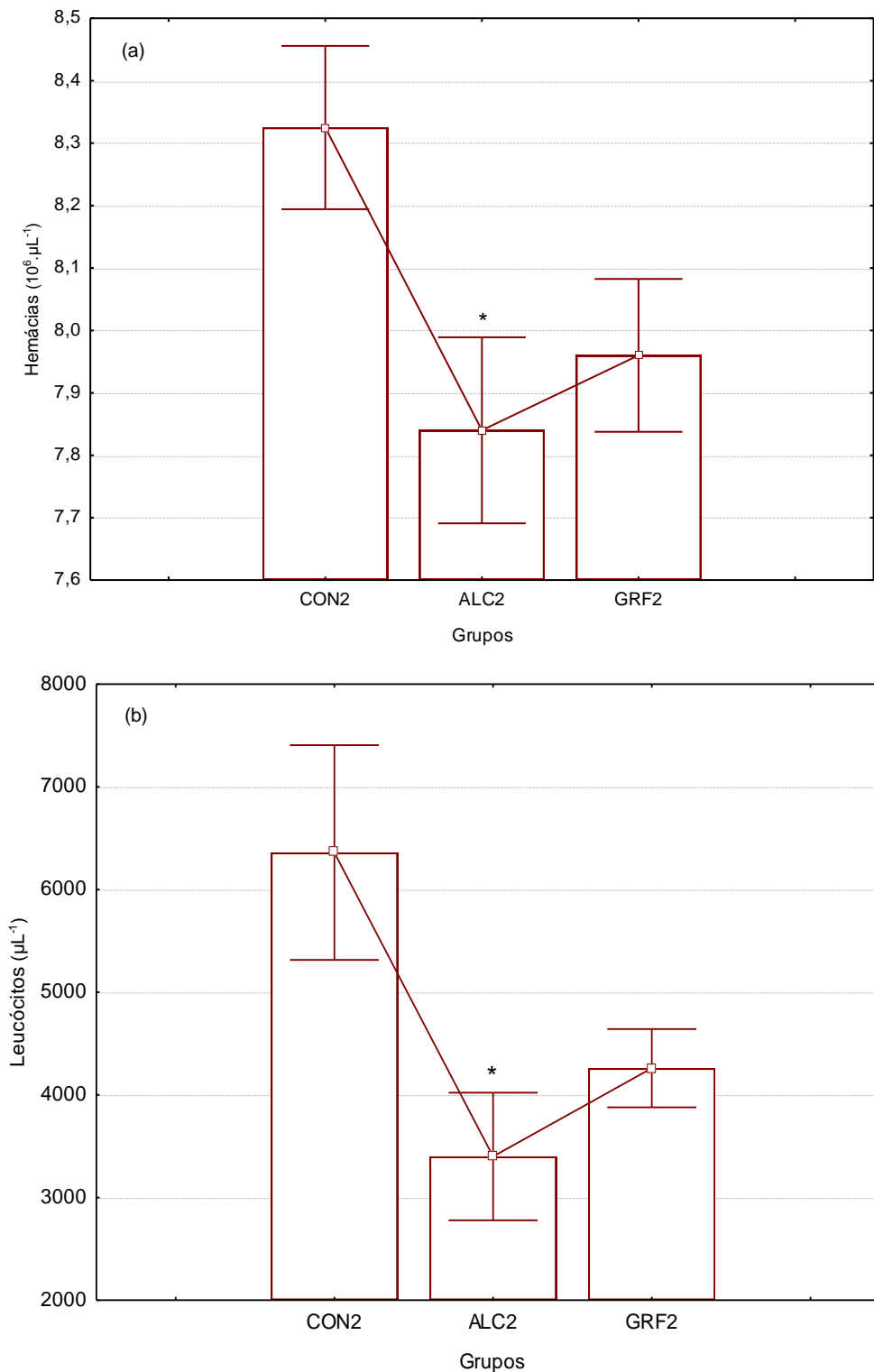


Figura 20. Parâmetros hematológicos Hemácias ($10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (a) e Leucócitos (μL^{-1}) (b) com tratamento de 30 dias. * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle com tratamento de 30 dias.

Tanto as hemácias como os leucócitos diminuíram no grupo exposto ao álcool, e essa redução foi de 8% e 47% para os respectivos parâmetros. Esses parâmetros hematológicos também se mostraram diminuídos no grupo da garrafada, porém, não significativos. Compostos presentes na garrafada amenizaram este

efeito do álcool, apesar de que há estudos com o ipê roxo, por exemplo, que mostram alterações hematológicas importantes, como a anemia [11].

As consequências do álcool no sistema hematológico incluem seus efeitos tóxicos sobre a medula óssea, sobre os precursores celulares, na maturação das hemácias, na cinética e na função dos leucócitos e nas plaquetas. O álcool causa supressão na produção das células vermelhas, pois interfere no metabolismo do ácido fólico, ferro, fosfato e vitamina B12, que possuem papel essencial no desenvolvimento das células hematopoiéticas [84], provocando assim anemia, leucopenia, trombocitopenia e aumento do VCM no sangue periférico [85], o que explicaria os valores diminuídos de hemácias e leucócitos encontrados em nosso estudo.

Algumas pecilocitoses são usualmente esperadas em sangue periférico pela exposição ao álcool. Hemácias em forma de estomatócitos, as quais possuem defeito de membrana por mecanismo não conhecido, porém, a abstinência alcóolica as fazem desaparecer do sangue. E acantócitos, pela incorporação do excesso de colesterol na membrana celular [84].

Diferente disso, encontraram-se alterações eritrocitárias na forma de codócitos (indicada por setas) na microscopia das 5 lâminas do grupo [ALC2] (n=5), mostradas na Figura 21 (b).

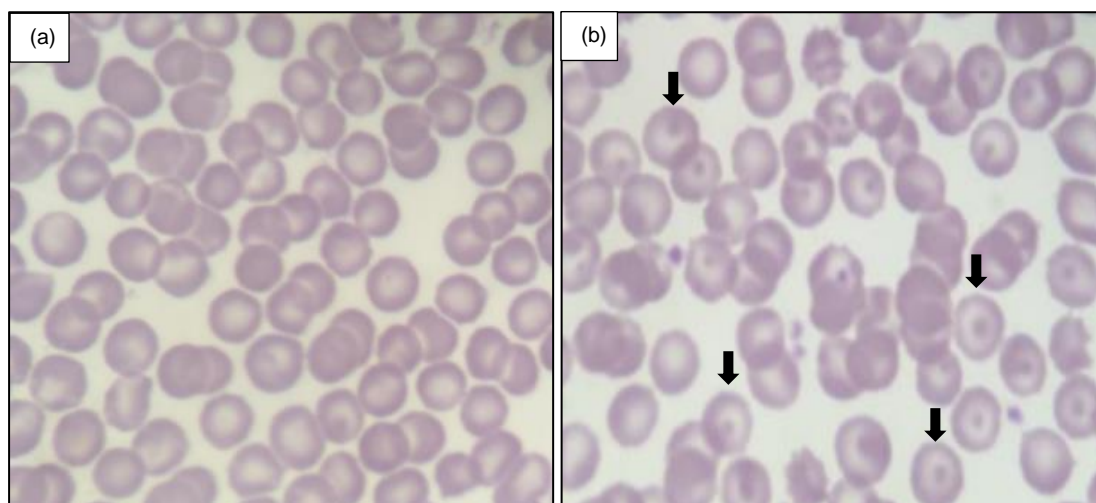


Figura 21. Hemácias normais de rato controle (a) e hemácias em forma de codócitos de rato tratado com álcool (b). Alterações eritrocitárias visualizadas no tratamento de 30 dias.

Codócitos são hemácias que apresentam halo central, uma concentração de hemoglobina na forma arredondada, o que lhe confere o aspecto de alvo, também designadas de *targets cells*. Essas células são características de anemia ferropriva, hemoglobinopatias e talassemias [86]. Mas também ocorrem quando há alterações da composição lipídica do plasma, cujas moléculas de colesterol e lecitina estão em contínua troca com as da membrana do eritrócito, sendo este fenômeno responsável pela codocitose das icterícias obstrutivas [87]. Alterações na composição lipídica poderiam explicar estes achados nos ratos tratados com álcool, visto que foram observadas alterações nos níveis de triglicérides deste grupo.

Os outros parâmetros hematológicos, como hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW, reticulócitos, bastões, basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, plaquetas e VPM não foram estatisticamente significativos ($p>0,05$). Com o tratamento dos ratos, não houve anemia microcítica hipocrômica, como ocorreu com o paciente.

A Tabela 12 mostra os índices de peso dos órgãos, sendo que não foram observadas alterações nas análises macroscópica e histopatológica no experimento de dose única. No experimento de 30 dias, foi significativa a diminuição de peso do pulmão do grupo [ALC2] em relação ao controle, porém, alterações macroscópicas e histopatológicas dos pulmões foram encontradas tanto no grupo do álcool como no controle, invalidando-a.

Tabela 12. Efeito dos tratamentos nos índices de pesos de órgãos em ratos tratados.

Índice dos órgãos	Tratamento dose única		
	CON1	ALC1	GRF1
Baço	0,0024 ± 0,0001 (5)	0,0022 ± 0,0001 (5)	0,0022 ± 0,0001 (5)
Cérebro	0,0063 ± 0,0005 (5)	0,0055 ± 0,0001 (5)	0,0056 ± 0,0002 (5)
Coração	0,0042 ± 0,0003 (5)	0,0037 ± 0,0001 (5)	0,0037 ± 0,0001 (5)
Estômago	0,0057 ± 0,0003 (5)	0,0058 ± 0,0001 (5)	0,0057 ± 0,0003 (5)
Fígado	0,0352 ± 0,0022 (5)	0,0333 ± 0,0008 (5)	0,0356 ± 0,0014 (5)
Intestino delgado	0,0013 ± 0,0001(5)	0,0010 ± 0,0002 (5)	0,0009 ± 0,0001 (5)
Pulmão	0,0060 ± 0,0002 (5)	0,0060 ± 0,0003 (5)	0,0058 ± 0,0002 (5)
Rins	0,0083 ± 0,0003 (5)	0,0084 ± 0,0001 (5)	0,0089 ± 0,0002 (5)
Tecido adiposo	0,0011 ± 0,0002 (5)	0,0012 ± 0,0001 (5)	0,0011 ± 0,0001 (5)
Testículos	0,0110 ± 0,0005 (5)	0,0102 ± 0,0001 (5)	0,0106 ± 0,0003 (5)
Índice dos órgãos	Tratamento de 30 dias		
	CON2	ALC2	GRF2
Baço	0,0019 ± 0,0001 (5)	0,0018 ± 0,0001 (5)	0,0019 ± 0,0001 (5)
Cérebro	0,0053 ± 0,0003 (5)	0,0054 ± 0,0001 (5)	0,0051 ± 0,0002 (5)
Coração	0,0035 ± 0,0001 (5)	0,0034 ± 0,0002 (5)	0,0034 ± 0,0001 (5)
Estômago	0,0051 ± 0,0003 (5)	0,0048 ± 0,0002 (5)	0,0047 ± 0,0001 (5)
Fígado	0,0335 ± 0,0025 (5)	0,0304 ± 0,0005 (5)	0,0300 ± 0,0009 (5)
Intestino delgado	0,0008 ± 0,0000 (5)	0,0009 ± 0,0000 (5)	0,0008 ± 0,0001 (5)
Pulmão	0,0062 ± 0,0003 (5)	0,0053 ± 0,0003 (5) *	0,0060 ± 0,0002 (5)
Rins	0,0081 ± 0,0002 (5)	0,0076 ± 0,0001 (5)	0,0077 ± 0,0003 (5)
Tecido adiposo	0,0028 ± 0,0003 (5)	0,0028 ± 0,0003 (5)	0,0043 ± 0,0005 (5)
Testículos	0,0076 ± 0,0005 (4)	0,0079 ± 0,0002 (5)	0,0083 ± 0,0005 (5)

Os números entre parênteses representam o número de animais (n). Resultados expressos em média ± SEM de n animais. * $p < 0.05$, p valor comparado com o grupo controle.

Embora as transaminases hepáticas não tenham sido alteradas, foram observadas alterações macroscópicas e histopatológicas dos fígados dos grupos [ALC2] e [GRF2], conforme Figura 22 (a), (b), (c), em relação ao controle.

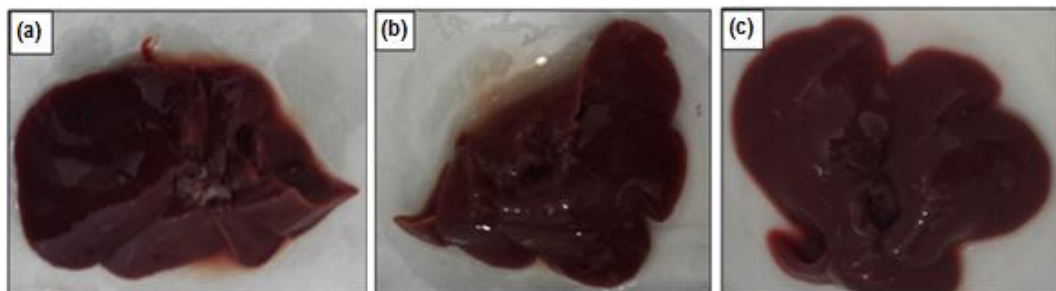


Figura 22. Fotos dos fígados de ratos com tratamento de 30 dias. (a) Fígado de rato controle; (b) Fígado de rato tratado com álcool; (c) Fígado de rato tratado com garrafada.

O estudo histopatológico dos fígados de ratos do grupo [ALC2] e do grupo [GRF2], com tratamento de 30 dias, mostraram alterações histológicas importantes em relação ao controle, as quais podem ser visualizadas na Figura 23.

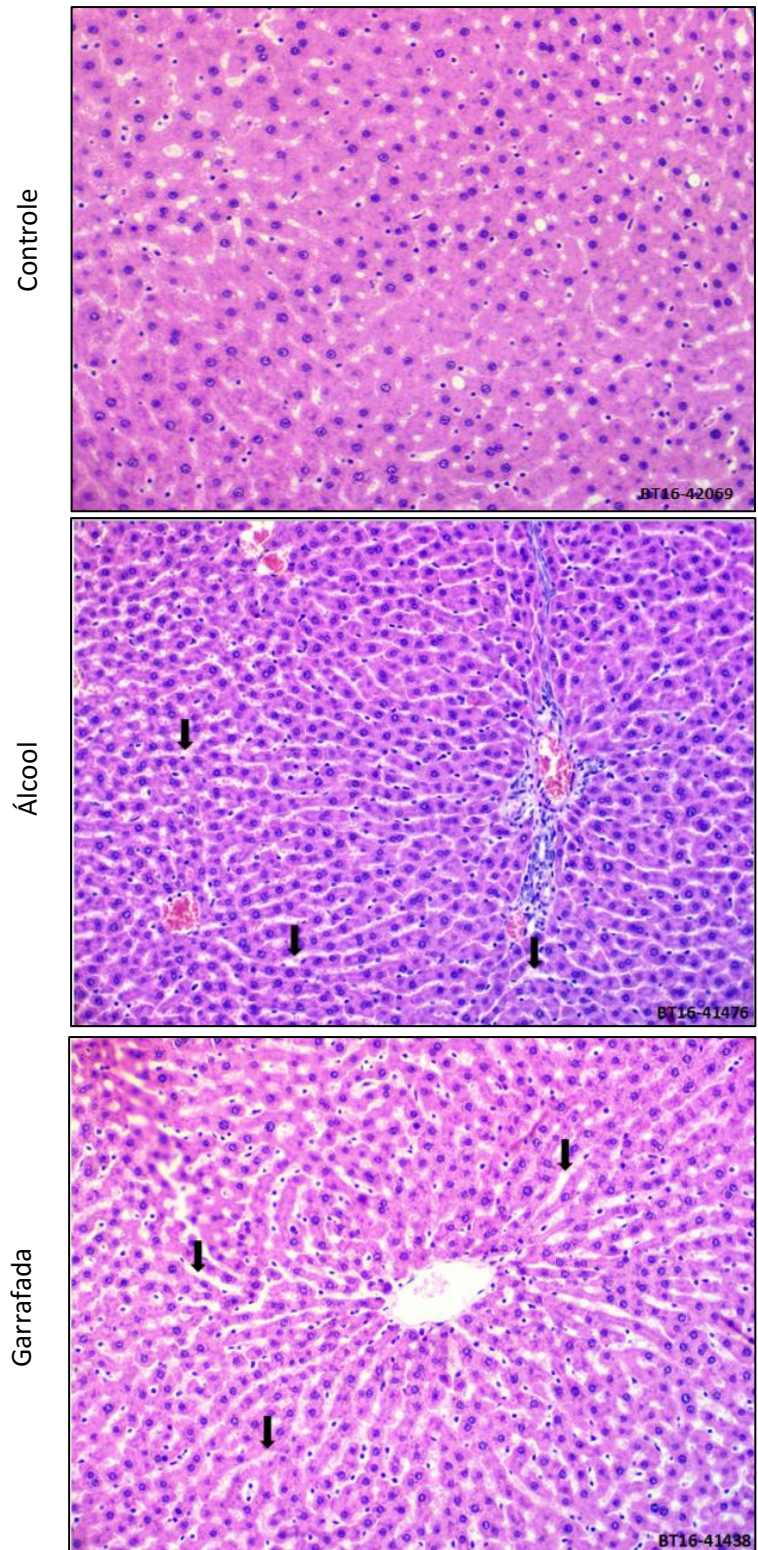


Figura 23. Análise histopatológica de tecido de fígado de ratos com o tratamento de 30 dias. Coloração HE, 200 X. Controle: Nenhuma alteração patológica foi observada. Álcool: Leve dilatação de sinusóides peri-veias. Garrafada: Dilatação de sinusóides, maior grau e difuso.

Na imagem histopatológica do fígado do grupo álcool, nota-se o espaço porta e trabéculas hepatocitárias separadas por espaços intratrabeculares, ou seja, sinusóides peri-veias dilatados (indicado pelas setas). A dilatação sinusoidal é leve.

E na imagem histopatológica do fígado do grupo garrafada, também notou-se trabéculas hepatocitárias separadas por dilatação de sinusóides, porém, de maior grau e mais difuso (indicado pelas setas) que o grupo do álcool.

A dilatação sinusoidal ocorre quando há aumento da pressão das veias hepáticas, atrofia dos hepatócitos ou interrupção das fibras de reticulina sinusoidais [88]. Os sinusóides podem mostrar um espectro de alterações patológicas, da dilatação e congestão para lesões, afetando o subendotelial (Espaço de Disse). A largura dos sinusóides em amostras de biópsia hepática é variável, e está relacionada com a quantidade de tecido conectivo da parede sinusoidal. Entre as diversas causas que levam ao aumento dos sinusóides, estão a doença hepática alcoólica e outros produtos tóxicos [89].

O uso crônico do álcool causa doença hepática, que progride de esteatose simples com os estágios de esteatohepatite, fibrose, cirrose e falência hepática [90]. A hepatotoxicidade pelo álcool causa hipertensão portal, com aumento da gordura hepática e de inflamação. Isso aumentará o volume intra-hepático e o grau de compressão das vênulas hepáticas, sinusóides e comunicações intersinusoidais [91]; isso pode explicar os achados histopatológicos dos tecidos hepáticos dos ratos.

Como os achados histopatológicos hepáticos foram encontrados tanto no grupo [ALC2] como no grupo [GRF2], pode-se afirmar que essas alterações microscópicas estão relacionadas com o álcool. Porém, as alterações microscópicas encontradas no grupo da garrafada foram mais proeminentes, ou seja, além do álcool, há outros compostos presentes na garrafada que comprometeram ainda mais o tecido hepático.

4. Conclusões

Os dados apresentados neste estudo demonstram que o álcool presente na garrafada pode alterar diversos parâmetros bioquímicos, hematológicos e causar danos ao fígado de ratos. A garrafada, apesar de não mostrar alterações em parâmetros bioquímicos e hematológicos, teve alterações histopatológicas hepáticas mais pronunciadas. Portanto, as alterações hepática e hematológica apresentadas pelo paciente durante o uso de garrafada provavelmente foram exacerbadas pelo álcool presente em sua formulação.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pelas parcerias prestadas ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PCF). Ao Laboratório Biovel – Análises e Pesquisas Clínicas, onde foram realizadas as análises sanguíneas e ao Laboratório APC – Anatomia Patológica, pelas análises histopatológicas.

6. Referências

[1] T. S. Silva and E. M. X. Freire, “Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil,” *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 12, no. 4, pp. 427-435, 2010.

- [2] M. T. L. De Arruda Camargo, "A garrafada na medicina popular: uma revisão historiográfica," *Dominguezia*, vol. 27, pp. 1, 2011.
- [3] J. da Paz, M. R. Baldochi, M. G. D. Contrera et al., "Hepatotoxicidade de plantas medicinais. XXXII. Ação da infusão de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC no rato," *INVESTIGAÇÃO*, vol. 5, no. 1-6, 2010.
- [4] L. M. L. Campelo, C. G. Sá, C. M. Feitosa et al., "Chemical constituents and toxicological studies of the essential oil extracted from *Citrus limon* Burn (Rutaceae)," *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 15, no. 4, pp. 708-716, 2013.
- [5] H. Lorenzi and F. J. A. Matos, "Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas," 2. Ed, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, pp. 67-288, 2008.
- [6] E. Skopińska-Różewska, I. R. E. N. A. Sokolnicka, D. Radomska-Leśniewska et al., "The in vivo effect of *Echinacea purpurea* succus on various functions of human blood leukocytes," *Centr Eur J Immunol*, vol. 28, pp. 126-130, 2003.
- [7] J. A. Leak, "Perioperative considerations in the management of the patient taking herbal medicines" *Current Opinion in Anesthesiology*, vol. 13, no. 3, pp. 321-325, 2000.
- [8] K. P. Minami, M.C. Valadaresm, M.L.S. Queiroz, "Efeitos do fitoterápico *Annona muricata* sobre o crescimento e diferenciação de células hematopoéticas normais" *XII Congresso Interno de Iniciação Científica, UNICAMP*, Campinas, Anais do Congresso, B-137, 2004.
- [9] F. K. N. Arthur, E. Woode, E. O. Terlabi et al., "Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona muricata* (Linn.) aqueous extract in animals," *Eur J Exp Biol*, vol. 1, no. 4, pp. 115-124, 2011.
- [10] A. Y. M. Dayeef, S. Karyono, H. Sujuti, "The influence of *Annona muricata* leaves extract in damaging kidney cell and inducing caspase-9 activity," *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 8, no. 3, pp. 48-52, 2013.
- [11] R. K. Morrison, D. E. Brown, J. J. Oleson et al., "Oral toxicology studies with lapachol," *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 17, no. 1, pp. 1-11, 1970.
- [12] P. C. Preusch and D. M. Smalley, "Vitamin K, 2, 3-Epoxyde And Quinone Reduction: Mechanism And Inhibition," *Free radical research communications*, vol. 8, no. 4-6, pp. 401-415, 1990.
- [13] C. G. E. Junior, D. Carvalho, M. A. De Souza et al., "Hepatotoxicidade de plantas medicinais. LIII. Ação da infusão de *Tabebuia avellaneda* lor. ex griseb. no rato," *INVESTIGAÇÃO*, vol. 6, no. 1, 2006.
- [14] R. A. Cruz, L. P. D. Oliveira, F. H. Caldeira et al., "Spontaneous and experimental poisoning by *Pterodon emarginatus* (Fabaceae Faboideae) in cattle

and experimental poisoning in sheep," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 32, no. 11, pp. 1087-1094, 2012.

[15] F. J. De Sant'Ana, J. N. Perin, U. O. Bilego, "Spontaneous poisoning of cattle by *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) in Goiás, Brazil," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 32, no. 6, pp. 485-489, 2012.

[16] M. Macedo and A. R. Ferreira, "Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guapore, Mato Grosso-Brasil," *Revista Brasileira De Farmacognosia*, vol. 14, pp. 45-47, 2004.

[17] K. E. Ibrahim, R. M. Al-Ashban, S. A. El-Sammani, "A Study of the Toxicity of Cat's Claw Herbal Medicine" *Research Journal of Pharmacology*, vol. 3, no. 3, pp. 52-57, 2009.

[18] E. M. P. Widmark, "Blood alcohol," in *Chemical Methods of Medical Investigation*, A. G. Merck, Ed., p. 7275, E. Merck KG, Darmstadt, Germany, 10th edition, 1964.

[19] A. F. Costa, "Farmacognosia," Ed.: Fundação Colouste Guibenkian, 3 ed., Lisboa, vol. 3, pp. 1032, 1982.

[20] C. B. Marek, A. M. Itinose, T. C. M. Jorge et al., "Influence of leaf extracts from *Melia azedarach* L. on butyrylcholinesterase activity in rat liver," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, no. 22, pp. 3931-3938, 2012.

[21] C. Latoud, F. Peypoux, G. Michel et al., "Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 856, no. 3, pp. 526-535, 1986.

[22] B. N. Meyer, N. R., Ferrigni, J. E. Putnam et al., "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents," *Planta medica*, vol. 45, no. 05, pp. 31-34, 1982.

[23] A. W. Bauer, W. M. M. Kirby, J. C. Sherris et al., "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." *American journal of clinical pathology*, vol. 45, no. 4, pp. 493, 1966.

[24] S. C. W. De Souza Eller, V. A. Feitosa, T. A. Arruda et al., "Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro," *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, vol. 36, no. 1, 2015.

[25] M. H. Malone and R. C. Robichau, "A Hippocratic screen for pure or crude drug materials," *Lloydia*, vol. 25, no. 4, 1962.

[26] F. C. Silva, J. G. D. L. de Souza, A. M. Reichert et al., "Influence of the Alcohol Present in a Phytotherapeutic Tincture on Male Rat Lipid Profiles and Renal Function," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, 2015.

- [27] J. R. A. Leme Filho, "Estudo comparativo dos métodos de determinação e de estimativa dos teores de fibra e de açúcares redutores em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)," Diss. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
- [28] L. A. Ehlen, T. A. Marshall, F. Qian et al., "Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion," *Nutrition research*, vol. 28, no. 5, pp. 299, 2008.
- [29] T. B. Machado, A. V. Pinto, M. C. F. R. Pinto et al., "In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 21, no. 3, pp. 279-284, 2003.
- [30] Y. Chávez Morales, "Evaluación farmacológica de extractos de raíz y de callos originados de distintos explantes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench," 2014.
- [31] G. Bertol, L. Franco, B. H. Oliveira, "HPLC analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimisation by factorial design," *Phytochemical Analysis*, vol. 23, no. 2, pp. 143-151, 2012.
- [32] C. N. Reis, "Annona muricata: análise química e biológica dos frutos de graviroleira," Rio de Janeiro, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Dissertação de Mestrado, 2011.
- [33] R. C. Dutra, P. S. Silva, F. Pittella et al., "CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E CITOGENÉTICA DAS SEMENTES DE *Pterodon emarginatus* VOGEL," *Revista Técnico Científica do IFSC*, vol. 1, no. 2, pp. 99, 2012.
- [34] C. A. Carvalho, M. B. Silva, T. G. Oliveira, J. M. Lima, M. B. Rosa, "Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. capitata," *Rev Bras Farmacogn*, vol. 18, no. 2, pp. 249-257, 2008.
- [35] H. H. Perkampus, "UV-VIS Spectroscopy and Its Applications," Berlin: Springer-Verlag, pp. 244, 1992.
- [36] M. B. Falkenberg, R. I. Santos, C. M. O. Simões, "Introdução à análise fitoquímica. Farmacognosia: da planta ao medicamento," vol. 5, pp. 229-246, 2003.
- [37] J. L. Owades, G. Rubin, M. W. Brenner, "Food tannins measurement, determination of food tannins by ultraviolet spectrophotometry," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 44-46, 1958.
- [38] R. Takeara, J. L. C. Lopes, N. P. Lopes et al., "Chemical constituent from the ascidian *didemnum psammatoedes* (sluiter, 1895) collector on the shores of ceara state," *Química Nova*, vol. 30, no. 5, pp. 1179-1181, 2007.
- [39] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi et al., "Flavonoids in food and their health benefits," *Plant foods for human nutrition*, vol. 59, no. 3, pp. 113-122, 2004.
- [40] H. Wagner, "Bland, S-and Zgainski. Plant Drug Analysis," 1984.

- [41] M. Pinelo, M. Rubilar, J. Sineiro et al., "Effect of bubbling nitrogen and pulsed flow on the antiradical activity of grape residues," *Journal of food engineering*, vol. 73, no. 3, pp. 269-275, 2006.
- [42] A. De Carvalho Osório and J. L. S. Martins, "Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem," *Braz. J. Pharm. Sci*, vol. 40, no. 4, 2004.
- [43] C. L. S. Vigo, E. Narita, L. C. Marques, "Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen-Amaranthaceae," *Rev Bras Farmacogn*, vol. 13, pp. 46-49, 2003.
- [44] P. M. Dewick, "Medicinal natural products: a biosynthetic approach," John Wiley & Sons, 2002.
- [45] J. M. Monteiro, U. P. Albuquerque, E. L. Araújo, "Taninos: uma abordagem da química à ecologia," *Química Nova*, vol. 28, no. 5, pp. 892, 2005.
- [46] F. Cepleanu, "Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation," Doctoral thesis, 1993.
- [47] M. C. S. Marques, L. Hamerski, F. R. Garcez et al., "In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado, 2013.
- [48] D. S. De Sá, G. E. Ribeiro, L. R. A. Rufino et al., "Atividade Antimicrobiana da *Uncaria Tomentosa* (Willd) DC," *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 35, no. 1, pp. 53-57, 2014.
- [49] L. E. S. Barata, A. A. J. Alencar, M. Tascone et al., "Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona muricata* L.(Graviola)," *Revista Fitos Eletrônica*, vol. 4, no. 1, pp. 132-138, 2013.
- [50] D. T. Silva, "O uso do Ipê-Roxo (*Tabebuia vellanedae*) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos," 2006.
- [51] M. A. Lacaille-Dubois and H. Wagner, "A review of the biological and pharmacological activities of saponins," *Phytomedicine*, vol. 2, no. 4, pp. 363-386, 1996.
- [52] L. N. Francescato, R. A. N. Deuschle, C. A. Mallmann et al., "Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichus* DC.(Asteraceae)," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 43, no. 2, pp. 240-245, 2007.
- [53] V. O. Bednarczyk, M. C. S. Verdam, M. D. Miguel et al., "Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais," *Visão Acadêmica*, vol. 11, no. 2, 2010.

[54] S. O. Rogero, A. B. Lugão, T. I. Ikeda et al., "Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias," *Materials Research*, vol. 6, no. 3, pp. 317-320, 2003.

[55] I. Imam, "Alcohol and the central nervous system," *British Journal of Hospital Medicine*, vol. 71, no. 11, pp. 635-639, 2010.

[56] K. Lauing, R. Himes, M. Rachwalski et al., "Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength," *Alcohol*, vol. 42, no. 8, pp. 649-656, 2008.

[57] D. H. Kang, T. Nakagawa, L. Feng et al., "A role for uric acid in the progression of renal disease," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 13, no. 12, pp. 2888-2897, 2002.

[58] H. K. Choi and G. Curhan, "Beer, liquor, and wine consumption and serum uric acid level: the Third National Health and Nutrition Examination survey," *Arthritis Care & Research*, vol. 51, no. 6, pp. 1023-1029, 2004.

[59] G. Bugdayci, Y. Balaban, O. Sahin, "Causes of hypouricemia among outpatients," *Laboratory Medicine*, vol. 39, no. 9, pp. 550-552, 2008.

[60] P. Mathurin, M. Abdelnour, M. J. Ramond et al., "Early change in bilirubin levels is an important prognostic factor in severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone," *Hepatology*, vol. 38, no. 6, pp. 1363-1369, 2003.

[61] S. S. O'Malley, R. Gueorguieva, R. Wu et al., "Acute alcohol consumption elevates serum bilirubin: An endogenous antioxidant," *Drug and alcohol dependence*, vol. 149, pp. 87-92, 2015.

[62] R. Ravel, "Laboratório clínico: aplicações clinicas dos dados laboratoriais," 6 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 275, 2009.

[63] M. W. Pantsari and S. A. Harrison, "Nonalcoholic fatty liver disease presenting with an isolated elevated alkaline phosphatase," *Journal of clinical gastroenterology*, vol. 40, no. 7, pp. 633-635, 2006.

[64] V. T. Motta, "Bioquímica clínica: princípios e interpretações" Editora: Médica Massau, 2000.

[65] A. Rezaie, A. Fazlara, M. H. Karamolah et al., "Effects of Echinacea purpurea on hepatic and renal toxicity induced by diethylnitrosamine in rats," *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, vol. 8, no. 2, pp. 60, 2013.

[66] M. Heidari, A. Rezaie, B. M. Pourmahdi et al., "Histopathologic effects of Echinacea purpurea extract on sodium arsenite-induced hepatic disorders," *Comparative Clinical Pathology*, vol. 21, no. 6, pp. 1629-1632, 2012.

- [67] J. W. Ting and W. W. Lutt, "The effect of acute, chronic, and prenatal ethanol exposure on insulin sensitivity," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 11, no. 2, pp. 346-373, 2006.
- [68] D. T. Furuya, R. Binsack, M. E. Onishi et al., "Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats," *Life Sciences*, vol. 77, no. 15, pp. 1813-1824, 2005.
- [69] N. Freinkel, D. L. Singer, C. K. Silbert et al., "Studies on the pathogenesis and clinical features of "alcoholic hypoglycemia"," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 41, no. 6, pp. 1359, 1962.
- [70] M. Mincis, J. M. Chebli, S. T. Khouri et al., "Ethanol and the gastrointestinal tract," *Arquivos de gastroenterologia*, vol. 32, no. 3, pp. 131-139, 1994.
- [71] A. Parés and J. Caballería, "Patología orgânica," *Adicciones*, vol. 14, no. 5, 2002.
- [72] N. T. Florence, M. Z. Benoit, K. Jonas et al., "Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 151, no. 2, pp. 784-790, 2014.
- [73] M. A. Latour, B. W. Patterson, R. T. Kitchens et al., "Effects of alcohol and cholesterol feeding on lipoprotein metabolism and cholesterol absorption in rabbits," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 598–604, 1999.
- [74] E. Baraona and C. S. Lieber, "Intestinal lymph formation and fat absorption: stimulation by acute ethanol administration and inhibition by chronic ethanol feeding," *Gastroenterology*, vol. 68, pp. 495–502, 1975.
- [75] M. C. F. Toffolo, A. S. de Aguiar-Nemer, V. A. da Silva-Fonseca, "Alcohol: effects on nutritional status, lipid profile and blood pressure," *Journal of Endocrinology and Metabolism*, vol. 2, no. 6, pp. 205–211, 2012.
- [76] K. Iwamoto, Y. Fukuda, C. Tokikura et al., "The anti-obesity effect of Taheebo (*Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb) extract in ovariectomized mice and the identification of a potential anti-obesity compound," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 478, no. 3, pp. 1136-1140, 2016.
- [77] B. Thoolen, R. R. Maronpot, T. Harada et al., "Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system," *Toxicologic Pathology*, vol. 38, no. 7, pp. 5S–81S, 2010.
- [78] M. Sozio and D. W. Crabb, "Alcohol and lipid metabolism," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 295, no. 1, pp. E10–E16, 2008.
- [79] L. Fletcher and J. Halliday, L. Powell, "Interrelationships of alcohol and iron in liver disease with particular reference to the iron-binding proteins, ferritin and

transferrin," *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 14, no. 3, pp. 202-214, 1999.

[80] H. Ishii, I. Kurose, S. Kato, "Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 12, no. 9-10, pp. S272-S282, 1997.

[81] R. N. Mitchell, V. Kumar, A. K. Abbas et al., "Robbins & Cotran: fundamentos de patologia," 8. Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, pp. 867, 2012.

[82] E. A. Suchocki and A. S. Brecher, "The effect of acetaldehyde on human plasma factor XIII function," *Digestive diseases and sciences*, vol. 52, no. 12, pp. 3488-3492, 2007.

[83] J. R. G. Castellanos, J. M. Prieto, M. Heinrich, "Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)—a global ethnopharmacological commodity?," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 121, no.1, pp. 1-13, 2009.

[84] H. S. Ballard, "The hematological complications of alcoholism," *Alcohol health and research world*, vol. 21, pp. 42-52, 1997.

[85] A. C. Costa, B. Ribeiro, E. Costa, "Índices plaquetários em indivíduos com doença hepática alcoólica crônica," *Arquivo de Gastroenterologia*, vol. 44, no. 3, pp. 201- 204, 2007.

[86] P. H. Silva, Y. Hashimoto, H. B. Alves, "Hematologia Laboratorial," Rio de Janeiro: Ed. Revinter, pp. 84, 2009.

[87] R. Failace, "Hemograma: manual de interpretação," Poro Alegre: Artmed Editora, 2015.

[88] R. N. M. Macsween, P. P. Anthony, P. J. Scheuer et al., "Pathology of the liver," Churchill Livingstone, Third Edition, pp. 546, 1994.

[89] J. H. Lefkowitz, "Liver biopsy interpretation," Ninth Edition, Elsevier, pp. 256-257, 2016.

[90] M. Setshedi, J. R. Wands, S. M. De La Monte, "Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 3, no. 3, pp. 178-185, 2010.

[91] M. Mincis and R. Mincis, "Álcool e o fígado," *GED gastroenterol. endosc. dig*, vol. 30, no. 4, pp. 152-162, 2011.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os dados apresentados neste estudo demonstram que o álcool presente na garrafada pode alterar diversos parâmetros bioquímicos, hematológicos e causar danos ao fígado de ratos. A garrafada, apesar de não mostrar alterações em parâmetros bioquímicos e hematológicos, teve alterações histopatológicas hepáticas mais pronunciadas. Portanto, as alterações hepática e hematológica apresentadas pelo paciente durante o uso de garrafada provavelmente foram exacerbadas pelo álcool presente em sua formulação.

Esses dados têm repercussões importantes, pois demonstram a relevância de considerar as possíveis ações do álcool presente em preparações farmacêuticas como a garrafada.

Vale ressaltar que, mesmo com uma dose relativamente baixa de 0,005 mL de álcool.kg⁻¹ de peso corporal dos ratos, a exposição contínua a essa quantidade de álcool pode causar alterações significativas em marcadores biológicos. Isso é de suma importância, porque as garrafadas são geralmente consideradas atóxicas por serem à base de plantas e por isso utilizadas sem supervisão profissional adequada.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coloração escura da tintura de unha de gato e da garrafada podem ter influenciado no teste de hemólise. Isto é, o valor do branco excedeu o do tratamento com eritrócitos humanos, zerando esta atividade, sendo uma limitação metodológica a ser esclarecida.

Um tratamento de animais com a garrafada, utilizando a mesma dose e via de administração, porém, por tempo superior a 30 dias, avaliando também parâmetros bioquímicos, de coagulação, hematológicos e histológicos seria interessante para verificar outras possíveis alterações.

9.REFERÊNCIAS FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ABDULLAH, F.; SINA, I. The potential of soursop seed extract *Annona muricata* Linn as a biopesticide against aphids *Aphis gossypii* glover (Homoptera: Aphididae) on chilly. **Malaysian Journal of Science**, v. 22, n. 2, p. 11-16, 2003.

AHMAD, R.; HASHIM, H. M.; NOOR, Z. M.; ISMAIL, N. H.; SALIM, F.; LAJIS, N. H.; SHAARI, K. Antioxidant and antidiabetic potential of Malaysian Uncaria. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, p. 587-595, 2011.

ARTHUR, F.; WOODE, E.; TERLABI, E.; LARBIE, C. Evaluation of hepatoprotective effect of aqueous extract of *Annona muricata* (Linn.) leaf against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced liver damage. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 25-25, 2012.

AUSTIN, F. G. *Schistosoma mansoni* chemoprophylaxis with dietary lapachol. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 3, p. 412-19, 1974.

BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 4, n. 01, p. 132-138, 2013.

BARRETT, B. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. **Phytomedicine**, v. 10, n. 1, p. 66-86, 2003.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. Sathish. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian journal of experimental biology**, v. 45, n. 5, p. 480, 2007.

BAUER, R.; REMIGER, P.; WAGNER, H. New Alkamides from *Echinacea angustifolia* and *E. purpurea* Roots. **Planta medica**, v. 54, n. 06, p. 563-564, 1988.

BENTO, E. B.; MATIAS, E. F.; BRITO JR, F. E.; OLIVEIRA, D. R.; COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R Association Between Food and Drugs: Antimicrobial and Synergistic Activity of *Annona muricata* L. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 4, p. 738-744, 2013.

BERTOL, G.; FRANCO, L.; OLIVEIRA, B. H. HPLC analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimisation by factorial design. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 2, p. 143-151, 2012.

CHAMPY, P.; MELOT, A.; GUÉRINEAU ENG, V.; GLEYE, C.; FALL, D.; HÖGLINGER, G. U.; HOCQUEMILLER, R. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Movement Disorders**, v. 20, n. 12, p. 1629-1633, 2005.

CRAIG, W. J. The Therapeutic Use and Safety of Common Herbal Beverages. In: **Beverages in Nutrition and Health**. Humana Press, p. 187-201, 2004.

CRUZ, R. A.; OLIVEIRA, L. P. D.; CALDEIRA, F. H.; MENDONÇA, F. S.; BACHA, F. B.; POTT, A.; COLODEL, E. M. Spontaneous and experimental poisoning by *Pterodon emarginatus* (Fabaceae Faboideae) in cattle and experimental poisoning in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1087-1094, 2012.

DA SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; DA ROCHA, M. R.; DA CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2007.

DAMICO, D. C. S.; FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. R. Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. **Journal of protein chemistry**, v. 22, n. 7-8, p. 655-661, 2003.

DAYEEF, A. Y. M.; KARYONO, S.; SUJUTI, H. The influence of *Annona muricata* leaves extract in damaging kidney cell and inducing caspase-9 activity. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 8, n. 3, p. 48-52, 2013.

DE SÁ, D. S.; RIBEIRO, G. E.; RUFINO, L. R. A.; OLIVEIRA, N. D. M. S.; FIORINI, J. E. Atividade Antimicrobiana da *Uncaria Tomentosa* (Willd) DC. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 53-57, 2014.

DE SANT'ANA, F. J.; PERIN, J. N.; BILEGO, U. O.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A.; PAULA, E. Spontaneous poisoning of cattle by *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) in Goiás, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 485-489, 2012.

DUKE, J. A. (Ed.). **CRC handbook of medicinal spices**. CRC press, 2002.

DUTRA¹, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Rev. bras. farmacogn**, v. 19, n. 2a, p. 429-435, 2009.

DUTRA², R. C.; FAVA, M. B.; ALVES, C.; FERREIRA, A. P.; BARBOSA, N. R. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 243-250, 2009.

DUTRA³, R. C.; PITTELLA, F.; DITZ, D.; MARCON, R.; PIMENTA, D. S.; LOPES, M. T.; RAPOSO, N. R. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 971-978, 2012.

DUTRA⁴, R. C.; SILVA, P. S.; PITTELLA, F.; VICCINI, L. F.; LEITE, M. N.; RAPOSO, N. R. B. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E CITOGENÉTICA DAS SEMENTES DE *Pterodon emarginatus* VOGEL. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 2, p. 99, 2012.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **The complete guide to herbal medicines**. Simon and Schuster, 2000.

FLORENCE, N. T.; BENOIT, M. Z.; JONAS, K.; ALEXANDRA, T.; DÉSIÉ, D. D. P.; PIERRE, K.; THÉOPHILE, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784-790, 2014.

GEICK, A.; EICHELBAUM, M.; BURK, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14581-14587, 2001.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 549-558, 1994.

GORSKI, J. C.; HUANG, S. M.; PINTO, A.; HAMMAN, M. A.; HILLIGOSS, J. K.; ZAHEER, N. A.; HALL, S. D. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity in vivo. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 1, p. 89-100, 2004.

HEIDARI, M.; REZAIE, A.; POURMAHDI BROOJENI, M.; NAJAFZADEH, H.; MOHAMMADIAN, B. Histopathologic effects of *Echinacea purpurea* extract on sodium arsenite-induced hepatic disorders. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 6, p. 1629-1632, 2012.

HEITZMAN, M. E.; NETO, C. C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5-29, 2005.

HUEZA I. M.; MENDES, P. F.; PONCE, F.; FRAGA, D. D.; PÍPOLE, F.; PERAZZO, F. F. High doses of *uncaria tomentosa* (cat's claw) reduce blood glucose levels in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 410-415, 2014.

IBRAHIM, K. E.; AL-ASHBAN, R. M.; EL-SAMMANI, S. A. A Study of the Toxicity of Cat's Claw Herbal Medicine. **Research Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 52-57, 2009.

IWAMOTO, K.; FUKUDA, Y.; TOKIKURA, C.; NODA, M.; YAMAMOTO, A.; YAMAMOTO, M.; MORIYAMA, T. The anti-obesity effect of Taheebo (*Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb) extract in ovariectomized mice and the identification of a potential anti-obesity compound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 3, p. 1136-1140, 2016.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZALEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M.; VELEZ, I. D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 183-186, 2000.

JUNIOR, C. G. E.; CARVALHO, D.; DE SOUZA, M. A.; KASAI, A.; LOPES, R. A.; DE PAULA LOPES, P. E. V.; PETENUSCI, S. O. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. LIII. Ação da infusão de *Tabebuia avellanedae* lor. ex griseb. no rato. **INVESTIGAÇÃO**, v. 6, n. 1, 2006.

KEPLINGER, K.; LAUS, G.; WURM, M.; DIERICH, M. P.; TEPPNER, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 23-34, 1998.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; SASTRODIHARDJO, S.; MCLAUGHLIN, J. L. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata* in honour of professor GH Neil Towers 75th birthday. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 565-571, 1998.

KURKIN, V. A.; AKUSHSKAYA, A. S.; AVDEEVA, E. V.; VELMYAIKINA, E. I.; DAEVA, E. D.; KADENTSEV, V. I. Flavonoids from *Echinacea purpurea*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 905-906, 2011.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P. P.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ABAUL, J.; HOCQUEMILLER, R.; RUBERG, M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Movement Disorders**, v. 17, n. 1, p. 84-90, 2002.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P. P.; HÖGLINGER, G. U.; CHAMPY, P.; JOUSSET, A.; MEDJA, F.; HOCQUEMILLER, R. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience**, v. 121, n. 2, p. 287-296, 2003.

LARBIE, C.; ARTHUR, W. E.; TERLABI, E. O. Evaluation of Acute and Subchronic Toxicity of *Annona Muricata* (Linn) Aqueous Extract in Animal. **European Journal of Experimental Biology**, v. 1, n. 4, p. 115-24, 2011.

LEAK, J. A. Perioperative considerations in the management of the patient taking herbal medicines. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 13, n. 3, p. 321-325, 2000.

LORENZI, Harri; DE ABREU MATOS, Francisco José. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUNA, J. D. S.; DE CARVALHO, J. M.; DE LIMA, M. R. F.; BIEBER, L. W.; BENTO, E. D. S.; FRANCK, X.; SANT'ANA, A. E. G. Acetogenins in *Annona muricata* L.(Annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Natural product research**, v. 20, n. 3, p. 253-257, 2006.

LUZ DIAS, F.; TAKAHASHI, C.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; VICHNEWSKI, W.; SARTI, S.J. Genotoxicity of the natural cercaricides "sucupira" oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 26, n. 4, p. 338-344, 1995.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 45-47, 2004.

MACHADO, R.C.; HANUSCH, A.L.; MANSO, J.A.X.; DA SILVA, C.C.; DA CRUZ A. D. Investigação da genotoxicidade do decocto de *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) em linfócitos t do sangue periférico humano. **Anais da 2ª Reunião Brasileira de Citogenética,  guas de Lindóia, SP**. 2011.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; NETTO-DOS SANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 21, n. 3, p. 279-284, 2003.

MACKENZIE, P. I.; GREGORY, P. A.; GARDNER-STEPHEN, D. A.; LEWINSKY, R. H.; JORGENSEN, B. R.; NISHIYAMA, T.; RADOMINSKA-PANDYA, A. Regulation of UDP glucuronosyltransferase genes. **Current drug metabolism**, v. 4, n. 3, p. 249-257, 2003.

MENGS, U.; LEUSCHNER, J.; MARSHALL, R. R. Toxicity studies with Echinacin [Abstract—Third International Conference on Phytomedicine, Munich, Germany, October 11–13]. **Phytomedicine Supplement II**, v. 32, 2000.

MILLER, L. G. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Archives of internal medicine**, v. 158, n. 20, p. 2200-2211, 1998.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.

MOHANTY, S.; HOLLINSHEAD, J.; JONES, L.; JONES, P. W.; THOMAS, D.; WATSON, A. A.; NASH, R. J. *Annona muricata* (Graviola): Toxic or therapeutic. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 1, p. 31-33, 2008.

MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J.; COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 1970.

ONDRIZEK, R. R.; CHAN, P. J.; PATTON, W. C.; KING, A. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 16, n. 2, p. 87-91, 1999.

PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; KHOSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 81-83, 1998.

PARNHAM, M. J. Benefit-risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 95-102, 1996.

PEDRAZZI, A. H. P.; RODRIGUES, E. R.; ZANARDO FILHO, A.; FRANCO, J. J.; RIBEIRO, W. O. Preclinical (hematologic and hemostatic) evaluation of the possible toxic side effects of a *Pterodon Emarginatus* Vog extract. In: **II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicine, Toxicology 501**. 1997. p. 63-68.

PREUSCH, P. C.; SMALLEY, D. M. Vitamin K, 2, 3-Epoxy And Quinone Reduction: Mechanism And Inhibition. **Free radical research communications**, v. 8, n. 4-6, p. 401-415, 1990.

REIS, C. N. **Annona muricata: análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. 2011. 105f. 2011. Dissertação (Mestrado)–Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

REZAI, A.; FAZLARA, A.; KARAMOLAH, M. H.; SHAHRIARI, A.; ZADEH, H. N.; PASHMFOROSH, M. Effects of Echinacea purpurea on hepatic and renal toxicity induced by diethylnitrosamine in rats. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 8, n. 2, p. 60-64, 2013.

RIYUZO, M. C.; SOARES, V. Revisão: Papel do infiltrado inflamatório na fibrose túbulo-intersticial e evolução das glomerulopatias. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 40-7, 2002.

SANDOVAL, N. D.; RODRIGUEZ, C.; POCH, M.; DE MARTÍNEZ, N. R. Tumores provocados por metilcolantreno y lapachol. Seguimiento del desarrollo mediante citología. **Acta physiol. pharmacol. ther. latinoam**, v. 46, n. 4, p. 257-64, 1996.

SANTOS, N. C. Avaliação da ação agonista no receptor de pregnano X (PXR) de drogas vegetais constantes na RDC 10/10 da Anvisa. 2012.

SCHRØDER-AASEN, T. Effects of Purple Coneflower (Echinacea purpurea) on CYP3A4 Metabolism and P-glycoprotein Mediated Transport in Vitro. 2012.

SEGAL, P.; FEIG, P. U.; SCHERNTHANER, G.; RATZMANN, K. P.; RYBKA, J.; PETZINNA, D.; BERLIN, C. The efficacy and safety of miglitol therapy compared with glibenclamide in patients with NIDDM inadequately controlled by diet alone. **Diabetes Care**, v. 20, n. 5, p. 687-691, 1997.

SHEARER, M. J. VITAMIN K AND VITAMIN K-DEPENDENT PROTEINS. **British journal of haematology**, v. 75, n. 2, p. 156-162, 1990.

SHENG, Y.; PERO, R. W.; WAGNER, H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from Uncaria tomentosa. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 137-143, 2000.

SILVA, D. T. **O uso do Ipê-Roxo (Tabebuia vellanedae) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**, 2006.

SKOPIŃSKA-RÓŻEWSKA, E.; SOKOLNICKA, I. R. E. N. A.; RADOMSKA-LEŚNIEWSKA, D.; KAPALKA, B. E. A. T. A.; SOMMER, E.; BIAŁAS-CHROMIEC, B. E. A. T. A.; DEMKOW, U. R. S. Z. U. L. A. The in vivo effect of Echinacea purpurea succus on various functions of human blood leukocytes. **Centr Eur J Immunol**, v. 28, p. 126-130, 2003.

SONODA, J.; XIE, W.; ROSENFELD, J. M.; BARWICK, J. L.; GUZELIAN, P. S.; EVANS, R. M. Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13801-13806, 2002.

VATTIMO, M. D. F. F.; SILVA, N. O. D. Uncaria tomentosa and acute ischemic

kidney injury in rats. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 1, p. 194-198, 2011.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative medicine review**, v. 6, n. 6, p. 567-580, 2001.

WU, L.; LU, Y.; ZHENG, Q. T.; TAN, N. H.; LI, C. M.; ZHOU, J. Study on the spatial structure of anomuricin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Molecular Structure**, v. 827, n. 1, p. 145-148, 2007.

10. ANEXOS



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Estudo da toxicidade de garrafada de uso popular", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como APROVADO para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Ingresso na UNIOESTE - emblema minúsculo

Cascavel, 05/10/2016

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE