



BIOTECNOLOGIA



UNIVERSIDADE FEDERAL
DA GRANDE DOURADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Graduação em Biotecnologia

LORENA PEREIRA BATISTA

ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DE *Cecropia pachystachya* Trécul E *Cuphea calophylla* Cham. & Schltidl EM RATOS WISTAR

DOURADOS – MS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

LORENA PEREIRA BATISTA

ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DE *Cecropia pachystachya* Trécul E *Cuphea calophylla* Cham. & Schlttdl EM RATOS WISTAR

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como pré-requisito para obtenção do Bacharelado em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleide Adriane Signor Tirloni.

Área de Concentração: Biotecnologia

DOURADOS – MS

2020

LORENA PEREIRA BATISTA

**ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DE *Cecropia pachystachya* Trécul E
Cuphea calophylla Cham. & Schltld EM RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Cleide Adriane Signor Tirloni

Aprovado em 26 de novembro de 2020

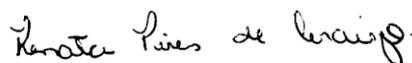
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Cleide Adriane Signor Tirloni



Me. Alex Santos Oliveira



Me. Renata Pires de Araújo

Dourados – MS, 26 de novembro de 2020

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Silvia Daniela Pereira, por sempre ter me proporcionado uma boa educação nunca ter deixado de me apoiar e lutado para que eu chegasse aonde estou.

À minha irmã Ana Luiza Pereira Pigosso, por todo o amor e admiração, por ter uma irmã estudando na profissão cientista, segundo ela.

À Universidade Federal da Grande Dourados e todos os professores que nessa jornada acadêmica contribuíram para minha formação e me ajudaram a desenvolver meu potencial acadêmico, assim como o laboratório para o desenvolvimento desse estudo.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cleide Adriane Signor Tirloni, pelo apoio, paciência, dedicação e orientação desse trabalho.

Aos Veterinários Patologistas Dr. Roosevelt Isaias Carvalho Souza e prof^a. Dr^a. Ariany Carvalho dos Santos.

Ao Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, pela orientação na iniciação científica e oportunidade de participar do grupo de pesquisa do seu laboratório de Farmacologia Cardiovascular.

À Camila Dias Machado e Lislaine Kidler, por toda a contribuição nesse trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pelo companheirismo e a apoio para realização desse estudo.

À minha terapeuta, Juliana Cabral e minha psiquiatra Dr^a. Carolina Alves Paredes por todo o suporte mental durante a minha graduação.

Aos meus amigos Anna Carolina Berta Montemor, Mariana Angélica da Silva Miranda, Bruna Maldonado Oliveira, Isabelle Azevedo Borges, Rodrigo Almeida Florentino por sempre me ajudarem em diversas situações durante a graduação, e proporcionar uma amizade que levarei para a vida.

Dentre meus amigos, agradeço especialmente Raquel Areias, por todo o apoio nesses últimos anos de graduação, todos os momentos passados juntas e tudo que aprendi. Sempre lembro da amizade com carinho.

Em memória de Beatriz Frandsen

À Camila Machado Chagas por toda a contribuição e paciência para que esse trabalho fosse finalizado.

A todos que me ajudaram de forma direta e indireta para que esse trabalho fosse possível, meu muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C. pachystachya – *Cecropia pachystachya* Trécul

C. calophylla – *Cuphea calophylla* Cham. & Schltdl

DL50 - Dose Letal 50

EPM – Erro Padrão Médio

ESCC – Extrato aquoso de *C. calophylla*

ESCP – Extrato aquoso *C. pachystachya*

FCS – Faculdade de Ciências da Saúde

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

TOA – Toxicidade Oral Aguda

UEPG – Universidade Estadual de Ponta Grossa

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

Análise da Toxicidade Aguda *Cecropia pachystachya* Trécul e *Cuphea calophylla* Cham. & Schltl em ratos Wistar

BATISTA, L.P.¹; TIRLONI, C.A.S.^{1*}

¹ – Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Rodovia Dourados- Itahum, 12 Km, 79.804-970 Dourados, MS, Brasil.

* Autor correspondente: Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Rodovia Dourados- Itahum, 12 Km, 79.804-970 Dourados, MS, Brasil.

E-mail: cleidetirloni@ufgd.edu.br (C.A. Signor Tirloni)

RESUMO: O uso de plantas medicinais pela população brasileira é uma prática comum e antiga, devido à grande biodiversidade ao longo de todo território nacional diversas espécies são empregadas no tratamento de diferentes enfermidades. *Cecropia pachystachya* Trécul, conhecida popularmente como embaúba e *Cuphea calophylla* Cham. & Schltl, conhecida como sete-sangrias são duas espécies utilizadas para diversos fins curativos na medicina popular, porém até o momento não foi avaliada a sua segurança farmacológica. Assim o objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade oral aguda (TOA) destas espécies utilizando o protocolo Nº 425 da OECD. Foi utilizado extratos aquosos das duas espécies denominados ESCP e ESCC. Três grupos de ratas da linhagem Wistar foram divididos em cinco animais cada e receberam 2000 mg/kg de ESCP, ou ESCC ou água (5 mL/kg Controle). Por 14 dias os animais foram pesados e o consumo de água e de ração foram avaliados. No 15º dia os animais foram eutanasiados e os órgãos vitais foram avaliados macro e microscopicamente. O estudo indicou que o uso de ESCP ou de ESCC na concentração de 2000mg/kg não apresentou toxicidade oral aguda no modelo animal utilizado. Concluímos que o presente estudo evidenciou segurança farmacológica destes extratos neste modelo de estudo abrindo caminho para que estudos mais aprofundados em termos de segurança farmacológica sejam realizados.

Palavras-chave: Ensaio pré-clínico, embaúba, sete-sangrias, plantas medicinais.

Analysis of acute toxicity *Cecropia pachystachya* Trécul and *Cuphea calophylla* Cham. & Schltldl in Wistar rats.

BATISTA, L.P.¹; TIRLONI, C.A.S.^{1*}

¹ – Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Rodovia Dourados- Itahum, 12 Km, 79.804-970 Dourados, MS, Brasil.

* Autor correspondente: Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Rodovia Dourados- Itahum, 12 Km, 79.804-970 Dourados, MS, Brasil.

E-mail: cleidetirloni@ufgd.edu.br (C.A. Signor Tirloni)

ABSTRACT: The use of medicinal plants by the Brazilian population is a common and ancient practice, due to the great biodiversity throughout the national territory, several species are used in the treatment of different diseases. *Cecropia pachystachya* Trécul, popularly known as embaúba and *Cuphea calophylla* Cham. & Schltldl, known as Sete-sangrias are two species used for various curative purposes in popular medicine, but until now, their pharmacological safety has not been evaluated. Taking this in consideration, the aim of this study was to investigate the acute oral toxicity (TOA) of these species using protocol No. 425 of the OECD. Aqueous extracts of the two species called ESCP and ESCC were used. Three groups of female Wistar rats were divided into five animals each and received 2000 mg / kg of ESCP, or ESCC or water (5 mL / kg Control). For 14 days the animals were weighed and the consumption of water and food was evaluated. On the 15th day, the animals were euthanized and the vital organs were evaluated macro and microscopically. The study indicated that the use of ESCP or ESCC at a concentration of 2000mg / kg did not present acute oral toxicity in the animal model used. We conclude that the present study showed pharmacological safety of these extracts in this study model, opening the way for further studies in terms of pharmacological safety to be carried out.

Keywords: Pre-clinical trial, embaúba, sete-sangrias, medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país mais extenso da América do Sul compreendendo uma área de cerca de 8.515.767,049 m² (IBGE, 2012). Sendo o país com a maior biodiversidade do planeta, contendo seis biomas terrestres e possuindo mais de 46.097 espécies vegetais (FLORA DO BRASIL, 2019). Essa vasta flora desperta interesse em comunidades científicas internacionais e nacionais para fins acadêmicos de conservação e utilização racional destes recursos (SCARIOT et al, 2005). Devido a essa grande variedade, cada espécie acaba por possuir uma série de características próprias, sendo o uso dessas comumente empregado contra os sintomas ou causas de enfermidades (BOTSARIS, MEKLER, 2004).

O uso de plantas para tratamento de doenças ocorre desde os primórdios da humanidade, popularizando o uso das plantas medicinais (FRANÇA et al., 2008). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam de práticas tradicionais em seus cuidados básicos e cerca de 85% usam plantas medicinais ou preparações destas (BRASIL, 2006)

O Ministério da Saúde (MS), por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), em 2006, implementou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) com o objetivo de garantir a integralidade na atenção à saúde. Esta política visa à inclusão de técnicas para prevenção de agravos, promoção e manutenção de saúde como práticas alternativas, tal qual fitoterapia nas práticas da rede pública de saúde. Esta ação do MS estimula o uso de plantas medicinais como práticas integrativas no SUS, bem como projeta a necessidade de estudo e pesquisa de novas espécies com potenciais medicinais e com segurança terapêutica (BRASIL, 2006).

No que diz respeito as plantas medicinais, deve-se estabelecer critérios para incluir e excluí-las baseadas no conceito de eficácia e segurança e identificar as necessidades emergenciais da população a partir de dados epidemiológicos das doenças que podem ser tratadas com plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Diversas espécies medicinais são utilizadas pelas populações de nosso país e muitas delas ainda não tiveram sua eficácia e segurança farmacológica comprovadas. Dentre estas espécies podemos citar a *Cecropia pachystachya* Trécul, conhecida como Embaúba, e a *Cuphea calophylla* Cham. & Schltidl, conhecida como Sete-sangrias, as quais são amplamente utilizadas popularmente pelas suas possíveis propriedades diuréticas, anti-inflamatória, anti-hipertensivos e antiateroscleróticas (HARRI, MATOS, 2002).

A segurança farmacológica é de extrema importância para o uso de medicamentos em geral, bem como das plantas medicinais. Em 1999 foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pela Lei nº 9.782, que se faz responsável por garantir e promover a proteção da saúde populacional brasileira por intermédio do controle sanitário da produção e comercialização de produtos, responsáveis pelo monitoramento dos medicamentos existentes no mercado, buscando a qualidade, eficácia e segurança, tendo como base a agência governamental americana Food and Drug Administration (FDA) (FERREIRA et al., 2009).

Antes de realizar testes em seres humanos é necessário realizar estudos pré-clínicos, cujo objetivo principal é a avaliação farmacológica em sistema *in vitro* e em modelo animal *in vivo* para o maior conhecimento acerca das propriedades e efeitos adversos do fármaco, garantindo assim a segurança farmacológica (FERREIRA et al., 2009).

Para os estudos pré-clínicos são seguidos os protocolos estipulados pela ANVISA que se orienta pelos guias internacionais da The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Um estudo pré-clínico bem estabelecido é o teste de toxicidade oral aguda (TOA) onde altas doses de substâncias químicas são testadas para avaliar os índices de mortalidade de animais de laboratório (ANVISA, 2013, OECD, 2008).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo testar a TOA dos extratos de *Cecropia. pachytachya* Trécul e *Cuphea. calophylla* Cham. & Schltldem em modelo animal de ratos Wistar, a fim de investigar a sua segurança farmacológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Recursos provenientes da natureza, como as plantas medicinais, são utilizados tanto em centros urbanos, quanto rurais como recursos alternativos ou complementar à medicina tradicional (RUTKANSKINS, CRUZ-SILVA, 2009). Apesar de existir uma crença errônea que todos produtos advindos de plantas são considerados seguros (EKOR, 2014), as plantas medicinais precisam ser investigadas e utilizadas corretamente, pois podem apresentar efeitos colaterais e até mesmo risco de intoxicação (CARNEIRO et. al, 2014).

O Brasil, por possuir grande diversidade não só vegetal como também cultural, tem o histórico de atribuir conhecimentos empíricos sobre tratamentos alternativos como o uso

de plantas medicinais e investe em práticas públicas para difundir tais conhecimentos e implementar no SUS de forma gratuita tratamentos à base destas plantas (BRASIL, 2006).

Nesse contexto os estudos toxicológicos pré-clínicos com plantas medicinais surgem de forma preditiva, pois permitem avaliar os efeitos tóxicos da amostra e também vantajoso, pois possibilita o controle em relação as condições de exposição, grupo exposto e a determinação dos efeitos decorrentes da exposição aguda e crônica (SILVA et al.,2012).

Devido a crescente busca por conhecimentos que possam agregar terapias alternativas aos tratamentos convencionais, diversos estudos vem sendo realizados em território nacional a fim de investigar a segurança do uso destas espécies vegetais. Assim os estudos investigando a TOA trata-se de um importante método de rastreio inicial de toxicidade.

2.1.1 *Cecropia pachystachya* Trécul

A *C. pachystachya* Trécul é uma planta que se distribui principalmente no continente americano e em grande quantidade no Brasil (Figura 1). Conhecida popularmente como Embaúba, é uma angiosperma pertencente à família Urticaceae e se apresenta como árvores de 2,5 - 12m. Possui lâminas foliares lobadas com face arredondada a aguda ou acuminada, inflorescência espatas, flores estaminadas glaba (Fig. 2), sendo as flores e frutos coletados ao longo do ano (GAGLIOTI, ROMANUIC-NETO, 2012). Além do seu uso na indústria de celulose, as folhas secas são utilizadas como chá diurético, possuindo também ação expectorante, antiasmática (YURQUINA et al., 2008) anti-hipertensiva e anti-inflamatória (HARRI, MATOS, 2002). Quando realizado ensaio fitoquímico registrou-se a presença de beta-sitosterol e alfa-amirina entre substâncias triterpenoides e a isovitexina, um flavonoide de ação anti-hipertensiva (UCHÔA, 2009).



FONTE: Global Biodiversity Information Facility (GBIF).

Figura 1. Distribuição geográfica de *C. pachystachya* Trécul.



FONTE: Global Biodiversity Information Facility (GBIF).

Figura 2. Folhas e Flores de *Cecropia pachystachya* Trécul

2.1.2 *Cuphea calophylla* Cham. & Schltl

A *C. calophylla* Cham. & Schltl é uma planta distribuída no continente americano, sendo que na porção norte-americana está presente no oeste e sul do México e na porção sul-americana encontra-se presente na Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Fig. 3) (FACCO, 2015). É também comumente utilizada com fins terapêuticos, ocorrendo desde a região central do Brasil, estendendo-se ao sudeste e sul do país. Conhecida popularmente como Sete-sangrias, é uma angiosperma da família Lythraceae, sendo subarbustos de até 70 cm, glabro ou piloso tendo folhas opostas pecioladas, oblongas, manifestando inflorescência em racemos ou tirso, com flores zigomorfas e alternas (CAVALCANTI, GRAHAM, 2002).

Toda a planta é comumente utilizada, podendo ser feito tradicionalmente o chá das folhas e da planta picada, xarope e compressas locais, apresentando propriedades diaforética, diurética, laxativa, sendo também usada contra hipertensão arterial e arteriosclerose (HARRI, MATOS, 2002).

Com base em estudos da composição química da *C. calophylla* Cham. & Schltl, destaca-se a presença de óleos essenciais, taninos, pigmentos, mucilagens, saponinas e flavonoides (HARRI, MATOS, 2002).



FONTE: Global Biodiversity Information Facility (GBIF).

Figura 3. Distribuição Geográfica de *Cuphea calophylla* Cham. & Schlttdl



FONTE: Global Biodiversity Information Facility (GBIF).

Figura 4. Inflorescência de *C. calophylla* Cham. & Schlttdl

3. TOXICIDADE ORAL AGUDA (TOA)

Dentro da segurança farmacológica, diversos testes são realizados para investigar e avaliar a presença de algum possível risco ou efeito que possa ser nocivo para o ser humano. Esses testes são chamados de testes pré-clínicos, os quais podem ser conduzidos *in vitro* e *in vivo* (BERKOWITZ, 2006). Um dos testes realizados *in vivo* é o TOA, em que se investiga a toxicidade produzida por uma substância teste na concentração máxima de 2000 mg/kg e quando justificável na concentração máxima de 5000 mg/kg (OECD, 2008).

O teste de toxicidade oral aguda é uma etapa fundamental dentro da pesquisa por um novo composto com potencial farmacológico pois permite avaliar a toxicidade de uma amostra quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 h, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. É utilizado como um rastreio inicial de toxicidade, permitindo estimar a dose letal (DL50) e classificar a amostra de acordo com os critérios do Globally Harmonised System (GHS) (ANVISA, 2013; 2016).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a toxicidade oral aguda dos extratos aquosos das folhas de *C. pachystachya* (ESCP) e *C. calophylla* (ESCP) em ratos Wistar

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos da administração de ESCP e ESCC na alteração do consumo de água ou alimento em relação à animais tratados com água (Controle);

Avaliar se os tratamentos com os extratos alteraram o peso corporal dos animais em relação ao controle;

Mensurar a possível alteração macro e microscópicas de órgãos vitais de animais tratados com os extratos;

Avaliar alteração do peso dos órgãos dos animais tratados com os extratos;

Investigar sinais de toxicidade através de possíveis alterações comportamentais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta do Material Vegetal

O material botânico da *C. calophylla* Cham. & Schltidl foi coletado no município de Curitiba – PR (24° 18' S e 49° 37' N) sendo devidamente processado para a realização dos

testes e submetido à identificação e registro (confecção da exsicata) no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF sob o número 101547. As folhas de *C. pachystachya* Trécul foram coletadas no município de Tuneiras do Oeste - PR (23° 52' 14" S e 52° 52' 34" W), sendo a amostra da espécie devidamente identificada pela taxonomista Dra. Inês Janete Matozzo Takeda e foi elaborada e depositada a exsicata sob número 22306 no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

5.1.2 Preparo dos extratos aquosos purificados

As partes aéreas da *C. calophylla* foram utilizadas para o preparo dos extratos pela metodologia de infusão, mimetizando assim o uso popular (HARRI; MATOS, 2002), com algumas modificações. Já para o preparo do extrato da *C. pachystachya* as folhas foram utilizadas também pelo processo de infusão de acordo com o uso popular na Argentina (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017), com algumas modificações.

O material vegetal das duas espécies foi seco em estufa a 40 °C, moído (100 g) e submetido ao processo de extração por infusão com 1L de água fervente, sendo realizada a extração até que fosse atingida a temperatura ambiente. Foi empregada a técnica de filtração para que houvesse a separação dos resíduos, que foram desprezados. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório até um volume de 200 mL. Para cada 200mL obtido foi misturado 600 ml de etanol (PA) para a precipitação das proteínas e polissacarídeos, obtendo-se um precipitado e um sobrenadante etanólico do infuso que da *C. calophylla* foi chamado de ESCC e da *C. pachystachya* foi chamado de ESCP. O ESCC e o ESCP após o processo de rotaevaporação e liofilização foram armazenados em formato de pó no freezer até posterior utilização nos experimentos.

5.2 Animais

O emprego e manutenção dos animais se adequa a legislação brasileira de bem-estar animal. Os procedimentos experimentais empregados neste estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética da UFGD (autorização número 31/2017 e 40/2017). Quinze ratos Wistar fêmeas foram adquiridos no biotério da UFGD, com a idade de 8 semanas. Foi realizado a adaptação dos animais durante duas semanas às novas condições no biotério setorial da faculdade de ciências da saúde (FCS/UFGD). Os animais foram mantidos em número de 5 por gaiola e foram mantidos sob condições ambientais

para o padrão da espécie (temperatura média de 22 ± 2 ° C, $50 \pm 20\%$ de umidade relativa, ciclo claro-escuro de 12:12 h).

5.2.1 Teste Toxicidade Oral Aguda

A TOA dos extratos foi avaliada de acordo com os parâmetros da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico através do protocolo 425 (OECD, 2008). Os animais foram divididos em três grupos experimentais: Grupo ESCC (que recebeu 2000 mg/kg do extrato da *C. calophylla*); Grupo ESCP (que recebeu 2000 mg/kg do extrato da *C. pachystachya*) e Grupo Controle (que recebeu 5 ml/kg de água tratada). Os tratamentos foram administrados via oral, por gavagem, em dose única após um período de 12 horas de jejum. A alimentação foi reestabelecida aos animais após uma hora do tratamento.

5.2.2 Comportamento dos Animais

Os animais ficaram em constante observação imediatamente após a administração dos tratamentos seguindo-se por um período observacional de 8 horas. O comportamento dos animais foi diariamente observado segundo o screening hipocrático (MALONE; ROBICHAUD, 1962). As animais fêmeas foram analisadas quanto a atividade do sistema nervoso central (SNC) estimulantes (hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, piloereção, movimento intenso das vibrissas e outras) e atividades depressoras (hipnose, ptose, sedação, anestesia, ataxia, reflexo corneal e perda do reflexo auricular). Outros comportamentos também foram analisados como ambulação, bocejo excessivo, limpeza, levantar, escalar, vocalizar, sacudir a cabeça, contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior e garra. As atividades eram avaliadas de 0 a 4 quanto à intensidade (OCDE, 2008).

5.2.3 Peso dos Animais

O peso dos animais que foi avaliado em todos os dias de tratamento tendo início no dia 0, procedendo-se a pesagem antes do tratamento com o ESCP e ESCC e o grupo Controle, além de também ter sido realizada uma última pesagem dos animais no dia 15, seguido pelo procedimento de eutanásia. Foi padronizado 100g/ peso corporal do animal.

5.2.4 Consumo de água e ração

A ingestão de água foi avaliada a cada 24 horas durante os 14 dias de tratamento, sendo disponibilizado 500ml de água por caixa contendo os cinco animais dos respectivos grupos Controle, ESCP e ESCC, sendo subtraído o valor consumido pelo valor repostado e chegou-se numa relação do consumo em média de cada animal por caixa. Para o consumo de ração foi realizado o mesmo procedimento, porém, foi disponibilizado 200g de ração por caixa dos respectivos grupos citados anteriormente, havendo a subtração do valor consumido pelo valor repostado.

5.2.5 Peso dos órgãos

No 15º dia, após um jejum de 8 horas, os animais foram eutanasiados e os órgãos vitais como coração, pulmão, fígado, baço e rins e reprodutivos (ovários e útero) foram retirados para análises macroscópica (peso e observação de alterações aparentes) e microscópica (análise histopatológica) para identificar possível anormalidade e/ou lesão. O peso relativo dos órgãos de cada animal foi calculado da seguinte maneira: peso absoluto x 100% / peso corporal dos animais no dia da eutanásia.

5.2.6 Avaliação histopatológica

Para a análise histopatológica, as amostras dos órgãos foram cuidadosamente coletadas, acondicionadas em formol à 10%, desidratadas com álcool e xilenol, embebidas em cera de parafina, seccionadas, montadas em lâminas de vidro, coradas com hematoxilina/ eosina, sendo avaliadas posteriormente pelos veterinários patologistas prof. Dr. Roosevelt Isaias Carvalho Souza e prof^a. Dr^a. Ariany Carvalho dos Santos.

5.3 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas foram realizados os testes T de Student com o programa GraphPad Prism 7 comparando os dados dos grupos ESCP e ESCC com o grupo Controle. Os resultados expressos são da média de cada grupo e do erro padrão médio (EPM).

6. RESULTADOS

6.1 Rendimento dos extratos

Após o preparo dos extratos ESCP e ESCC, o rendimento final das duas espécies foi menor do que 5% do peso da massa verde inicial.

6.2 Screening comportamental

Quanto ao comportamento dos animais, nenhum dos animais tratados com os extratos ESCP e ESCC apresentaram qualquer alteração nos parâmetros estabelecidos segundo MALONE et al. (1962), bem como nenhum óbito foi observado, indicando a ausência de toxicidade.

6.3 Peso dos animais

Nos animais tratados com o ESCC e o ESCP não apresentaram quaisquer alterações quanto ao peso corpóreo quando comparado ao controle como podemos observar na tabela 1, assim sugerindo que os extratos não promovem ganho ou perda de peso.

Tabela 1: Análise do peso corporal dos animais dos grupos Controle, ESCP e ESCC

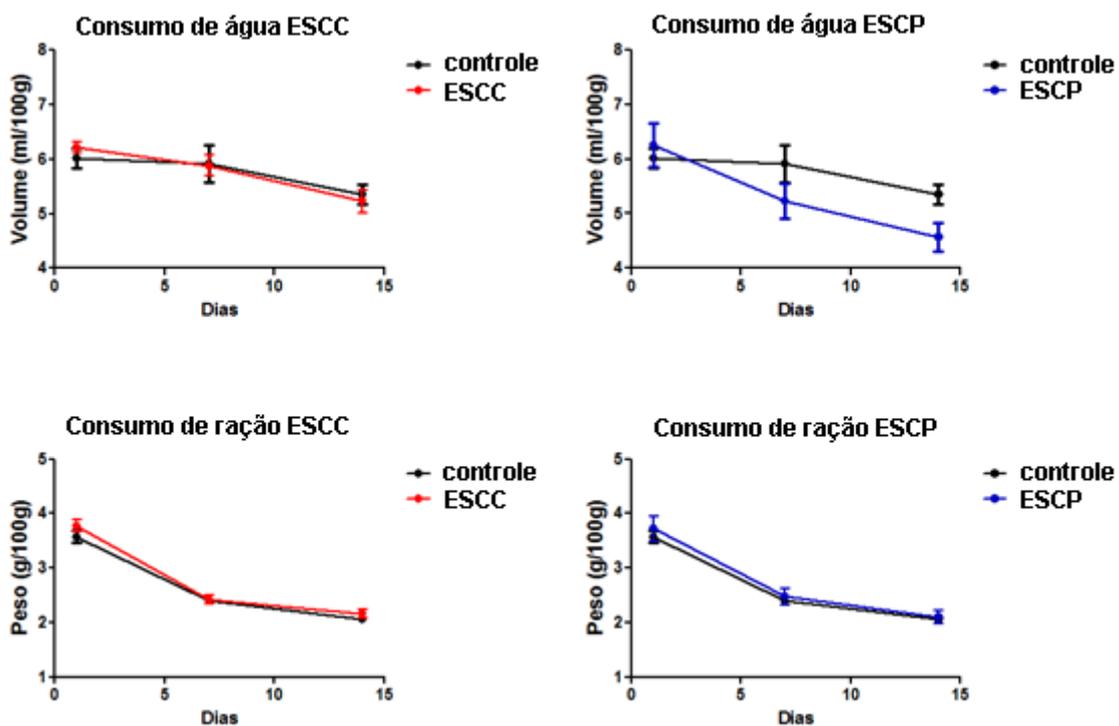
Tratamentos	Controle	ESCP	ESCC
Dia 0	245.00 ± 7.29	253.67 ± 13.97	261.50 ± 7.76
Dia 7	275.40 ± 8.31	271.00 ± 13.02	284.00 ± 6.02
Dia 15	254.40 ± 8.46	249.20 ± 11.18	264.00 ± 7.82

Os resultados apresentados são a média do peso corporal por animal de cada grupo por 100g de peso corporal.

6.4 Consumo de Água e Ração

Na Fig. 5 podemos observar que não houve alteração de consumo de água e de ração no grupo de animais tratados com os extratos ESCC e o ESCP quando comparado com o grupo controle.

Figura 5: Análise do consumo de água e ração dos grupos Controle, ESCP e ESCC. Os resultados apresentados são do consumo médio diário por animal de cada grupo para cada 100g de peso corporal nos dias 0, 7 e 15.



6.5 Peso dos órgãos

Os pesos dos órgãos dos animais não revelaram diferenças significativas quando comparamos o grupo controle e os grupos tratados com ESCP e ESCC como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Análise do peso dos órgãos dos grupos Controle, ESCP e ESCC.

Órgão	Controle	ESCP	ESCC
Coração	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Fígado	3.32 ± 0.35	3.32 ± 0.13	3.04 ± 0.19
Rim direito	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Rim esquerdo	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Baço	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Pulmão	0.45 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.48 ± 0.01
Útero	0.28 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.17 ± 0.01
Ovário direito	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001
Ovário esquerdo	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001

Os resultados apresentados são da média de peso dos órgãos de cada animal por grupo para cada 100g de peso corporal.

6.6 Avaliação Histopatológica

As análises macroscópicas e microscópicas dos órgãos vitais (coração, fígado, rins, baço e pulmões) e dos órgãos reprodutivos (ovário e útero) do grupo Controle, ESCP e ESCC estão presentes na figura 6. Macroscopicamente não se observou qualquer alteração morfológica. Em todos os grupos dos animais estudados, microscopicamente foram observados infiltrados mononucleares e sinais de hiperemia, porém não é um resultado que indique toxicidade.

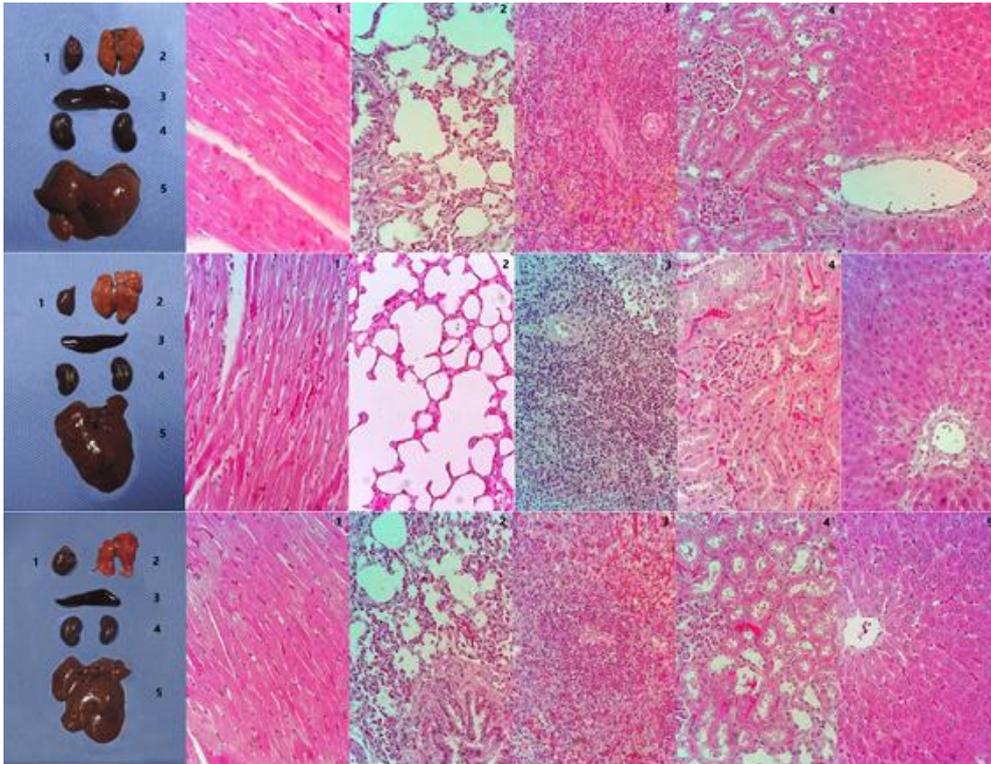


Figura 6: Imagens macroscópica e microscópica dos grupos Controle, ESCP e ESCC respectivamente. (1= Coração, 2= Pulmão, 3= Baço, 4= Rins, 5= Fígado).

7. DISCUSSÃO

Plantas medicinais são utilizadas, popularmente, para o tratamento de muitas enfermidades, porém, a ausência de dados toxicológicos associada a capacidade das plantas medicinais de apresentarem efeitos adversos alertam para estudos que forneçam informações confiáveis sobre os efeitos toxicológicos que tais plantas possam acarretar. Assim, ensaios pré-clínicos, como estudos de toxicidade de dose única (aguda) é uma ferramenta que garante a eficácia, qualidade e segurança farmacológica das plantas medicinais (HANDAM et al., 2017).

O experimento toxicológico apresentado neste trabalho comprovou a ausência de toxicidade dos extratos aquosos das duas plantas avaliadas neste estudo, onde até a dose de 2000 mg/kg, os animais não apresentaram sintomas clínicos, sendo assim, a DL50 estabelecida foi maior que 2000 mg/kg segundo os critérios da OECD (2008), além de não ter sido observada a morte de nenhum animal. Portanto, os extratos podem ser considerados seguros nas condições experimentais utilizadas nesse estudo. Alguns estudos toxicológicos já foram conduzidos com outras espécies de *Cuphea*, tais como de

ESPINOSA et al. (2013), que retratou que a administração oral da infusão de *Cuphea aequipetala* Cav. (5000 mg/kg) não apresentou efeitos tóxicos agudos, nem diferenças no peso corporal ou divergências no comportamento dos animais, estimando-se, portanto, DL50 acima de 5000 mg/kg corroborando com os resultados deste trabalho.

Em outros estudos, com outras espécies de *Cecropia*, como de Cunha (2006), mostrou que a administração do extrato de *Cecropia peltata* apresenta DL50 em doses superiores à 2000mg/kg, sendo observado qualquer sinal de toxicidade somente em doses de 2,205mg/kg num período de 24 horas corroborando com os resultados apresentados neste trabalho.

Na figura 6, podemos observar os achados histopatológicos e macroscópicos do grupo ESCP. Macroscopicamente os órgãos avaliados estão com morfologia dentro do normal, microscopicamente houve alterações discretas como hiperemia, porém, a causa provável deve-se ao uso de isoflurano, utilizado para a eutanásia dos animais (MOUTINHO, 2010). Observamos também a presença de infiltrados mononucleares que conforme Costa e colaboradores (2011) não indicam sinais de toxicidade no tecido, levantando a hipótese de ser decorrente à um fator ambiental onde os animais se mantiveram em todo o estudo. Nos achados histopatológicos e macroscópicos do grupo ESCC, a morfologia dos órgãos estão normais e microscopicamente não houve nenhuma alteração evidente além dos infiltrados mononucleares e hiperemia anteriormente relatada.

Os resultados encontrados neste estudo, analisando o uso em dose única de altas concentrações das espécies *C. pachystachya* Trécul e *C. calophylla* Cham. & Schldtl em ratas Wistar, mostram que estas plantas não apresentaram toxicidade neste modelo animal. O estudo da TOA é um dos estudos iniciais importantes para garantir a segurança destas espécies. Os estudos de toxicidade, com tempo prolongado e em novos modelos experimentais, são fundamentais para garantir a segurança do consumo destas espécies em humanos.

8. REFERÊNCIAS

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Brasília, 2013. Disponível em: <www.gov.br/anvisa> Acesso em: 10 de fev. de 2019

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os critérios para**

classificação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira e

para comparação da ação tóxica de agrotóxicos e afins no âmbito da Anvisa. Brasília, 2016. Disponível em: <www.gov.br/anvisa> Acesso em: 27 de nov. de 2020

BERKOWITZ, BA. **Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas.** In: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica & Clínica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.5, p.53-61.

BOTSARIS, A. S.; MEKLER, T. **Medicina complementar: vantagens e questionamentos sobre as terapias não convencionais.** Rio de Janeiro: Record Nova Era, 2004.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS.** Brasília, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde.** Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

CARNEIRO, F et. al. **Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil.** Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais – UEG/Câmpus de Iporá, v.3, n. 2, p.44-75, 2014.

CAVALCANTI, TB; GRAHAM. S. Lythraceae. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo.** Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 2, pp: 163-180.

COSTA, GM; SCHENKEL, EP; REGINATTO, FH. **Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus Cecropia.** Natural Product Communications. UFSC/ Santa Catarina, v.6, n.6, p.913-920, 2011

CUNHA, MRH. **Efeitos agudos e crônicos do tratamento com o extrato hidroalcoólico de folhas de *Cecropia peltata* L. sobre os sistemas cardiovascular e renal em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.** 2006. Dissertação (Doutorado – Área de Concentração em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória

EKOR, M. **The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and**

challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*. v.4, n.177, 2014.

FACCO, MG. **Estudo taxonômico do gênero *Cuphea* P. BROWNE (Lythraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2015. 163 p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FERREIRA, FG et al. **Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado**. Revista Eletrônica de Farmácia. Goiás, v.6, n.1, p.14-24, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.5216/ref.v6i1.5857>> Acesso em: 2 de fev. de 2019

FLORA DO BRASIL. **Jardim botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <http://ipt.jbrj.gov.br/jbrj/resource?r=lista_especies_flora_brasil>. Acesso em: 15 de nov. de 2019.

FRANÇA, ISX. et al. **Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais**. Revista Brasileira de Enfermagem, Brasília 2008, 61(2), 201-8 , mar-abr de 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/S0034-71672008000200009>> Acesso em: 5 de fev. de 2019

GAGLIOTI, AL; ROMANUIC-NETO, S. Urticaceae. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 7, pp: 331-362.

HARRI, L; MATOS, FJA. **Plantas Medicinais do Brasil. Nativas e Exóticas**.1.ed. São Paulo: Nova Odessa. Instituto Plantarum, 2002.527p

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; IBGE. **IBGE apresenta nova área territorial brasileira: 8.515.767,049 km²**. Agência de Notícias IBGE. 2012. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/14318-asi-ibge-apresenta-nova-area-territorial-brasileira-8515767049-km>> Acesso em: 22 de set. de 2018.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD. R. C. **A hippocratic screening for pure or drug materials**. *Lloydia*, v.25, p.23-53, 1962.

MOUTINHO, IIM. **Estudo Comparativo dos Anestésicos Sevoflurano vs Isoflurano em Coelho (*Oryctolagus Cuniculi*)**. 2010. 123 p. Dissertação (Mestrado- Área de Concentração em Medicina Veterinária), Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Organisation for Economic Co-operation and Development. **OECD guidelines for the testing of chemicals.** p.1-27. 2008. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en> Acesso em: 20 de set. de 2018.

RIVERA-MONDRAGÓN, A et al. **Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia***, *Pharmaceutical Biology*, 2017. 55:1, 1500-1512.

RUTKANSKIN, AMRA; CRUZ-SILVA, CTA. **Utilização de plantas medicinais pelos acadêmicos da área da saúde da Faculdade Assis Gurgacz no município de Cascavel – PR.** *Cultivando o saber*, v.2, n.4, p.69-85, 2009. Disponível em: <https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/59272b9f36e9c.pdf> Acesso em: 2 de set. de 2020

SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C; FELFILI, J.M. **CERRADO: Ecologia, Biodiversidade e Conservação.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 439 p.: il, color; PDF

SILVA, E.R.; DIEDRICH, D.; BOLZAN, R.C.; GIACOMELLI, S.R. **Toxicological and pharmacological evaluation of *Discaria Americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae) in mice.**

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. v.48, n.2, 2012.

UCHÔA, VT. **Estudo fitoquímico e farmacológico das espécies *Ximenia amricana* L. e *Cecropia pachystachya* Tréc.** 2009. 248 p. Dissertação (Doutorado – Área de Concentração em Ciências, Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas. Maceió.

YURQUINA, R. S. *et al.* **Morphoanatomical studies and antineumococcal and antioxidant activities of leaves from *Tetrapanax papyriferum* (Hook) K. Koch.** *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 27, n. 1, p. 5-9, 2008.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1 – Normas da revista – Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS

Scope and policy

The Brazilian Journal of Medicinal Plants [BJMP] is a quarterly publication devoted to the dissemination of original articles, reviews and preliminary notes, which must be inedited, covering the broad areas of medicinal plants. Manuscripts involving clinical trials must be accompanied of an authorization by the Ethics Committee of the Institution where the experiment was carried out. The articles can be written in Portuguese, English or Spanish; however, an abstract in both English and Portuguese is obligatory, independently of the used language. Papers should be sent by e-mail to rbpm.sbp@gmail.com, typed in Arial 12, double space, 2cm margins, Word for Windows. Telephone numbers for any urgent contact should also be included in the submission e-mail. The articles should not exceed 20 pages.

For publication of articles submitted to RBPM after 1 st April 2013, there is a cost of \$ 300 (three hundred reais) to be paid by the authors only by receiving the acceptance letter, when they will receive also the invoice and payment instruction.

Format and preparation of manuscripts

ARTICLES

Articles must be structured as follows:

TITLE: The title must be clear and concise, typed in bold, with only the first letter in uppercase, and centralized on the top of the page. A subtitle, if available, must follow the title, in lowercase letters, and may be preceded by a roman numeral. The common names of medicinal plants must be followed by their scientific names in parentheses, available at www.tropicos.org and www.ipni.org.

AUTHORS: Cite first the last name of authors in full (use only the initials of first and intermediate names without spaces and separated by commas), in uppercase letters and

bold, starting two lines below the title. Following each author's name, a superscript number must indicate the respective Institution and address (street, zip code, town, country). The corresponding author must be identified with an e-mail address. Authors' names must be separated by a semicolon.

RESUMO: "Resumo" must be on the title page, starting two lines below the authors' names. It must be written in only one paragraph containing aims, summarized material and methods, main results, and conclusion. No literature citations must be included. **Palavras-chave:** "Palavras-chave" must start one line below "Resumo" at the left margin, typed in bold, and should include up to five words separated by commas.

ABSTRACT: It must contain the title and the abstract in English, with the same format as that in Portuguese (single paragraph), except for the title which must be typed in bold with the first letter in uppercase and included after the word ABSTRACT.

Key words: The key words in English must be typed below the **ABSTRACT** and should include up to five words separated by commas

INTRODUCTION: The introduction must contain a brief literature review and the aims of the work. Authors must be cited in the text according to the following examples: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986), or when there are more than two authors, Santos et al. (1996).

MATERIAL AND METHOD: The employed original techniques must be completely described or references to previous works reporting these methods should be included. Statistical analyses must also contain references. In the methods, the following data regarding the studied species must be presented: scientific name and author, name of the Herbarium where the voucher species is stored and its respective number (Voucher Number).

RESULT AND DISCUSSION: These can be presented separately or as a single section, including a summarized conclusion at the end.

ACKNOWLEDGEMENT: If necessary, acknowledgements must be written in this section.

REFERENCE: References must follow the examples below:

TABLES: Tables must be inserted within the text and typed in Arial 10, single space. The word TABLE must be typed in uppercase letters followed by Arabic numerals; in the text, tables must be typed in lowercase letters (Table). The Table title must be typed in Arial 12 while the data within the Table must be in Arial 10.

FIGURES: Illustrations (graphs, photographs, drawings, maps) must be typed in uppercase letters followed by Arabic numerals, Arial 12, inserted within the text. When cited in the text, lowercase letters should be used (Figure). Captions and axes must be typed in Arial 10. Photographs must be sent in separate files of 300 DPI resolution, 800 x 600, JPEG extension, for publication printing.

Review Process: The manuscripts are analyzed by at least two reviewers, according to a guide for evaluation mainly based on the scientific approach. The reviewers will recommend the acceptance, with or without the need of reevaluation, rejection or changes; in the latter case, the rewritten article will return to the reviewer for a final evaluation. When at least 2 reviewers approve the manuscript, with no need of a reevaluation, it will be ready for publication and the author will receive the acceptance letter and instructions for cost payment (R\$ 300/manuscript)*. Reviewers' names are hidden, and the authors' names are also concealed from reviewers.

* Only approved articles submitted after 1st April 2013 must pay for publication costs.

Copyright: When submitting an article to the journal, the authors must be aware that if it is accepted for publication, its copyright, including rights for reproduction in all media and formats, will be exclusively ceded to the Brazilian Journal of Medicinal Plants. The journal will not refuse legitimate requests by the authors to reproduce their articles.

ATTENTION: Articles not consistent with these standards will be returned to authors.

Note: Opinions and concepts reported in the papers constitute the author's exclusive responsibility. However, the Editorial Board has the right to suggest or require the modifications they judge necessary.

Submission of manuscripts

Papers should be sent by e-mail to rbpm.sbp@gmail.com.

9.2 Anexo 2 – Autorizações do Comitê Institucional de Ética de Uso de Animais da UFGD



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 25 de março de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Investigação etnofarmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de *Cuphea calophylla* CHAM. & SCHTDL. Subsp. mesostemon (KOEHNE) LOURTEIG”**, registrada sob o protocolo de nº 31/2017, sob a responsabilidade de Arquimedes Gasparotto Junior – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 17/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2018 a 30/10/2020
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus - Wistar
Nº de animais	50
Peso/idade	60 dias
Sexo	40 machos e 10 fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 –
Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 25 de março de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Padronização botânica e avaliação cardiovascular de Cecropia pachystachya TRÉCUL (URTICACEAE)”**, registrada sob o protocolo de nº 40/2017, sob a responsabilidade de Arquimedes Gasparotto Junior – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 17/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2018 a 31/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus - Wistar
Nº de animais	72
Peso/idade	60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 –
Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br