



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE CICATRIZANTE E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO
FITOTERÁPICO SANATIVO[®]**

Cristiano Ribeiro de Lima

RECIFE
2006

Cristiano Ribeiro de Lima

**ATIVIDADE CICATRIZANTE E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO
FITOTERÁPICO SANATIVO[®]**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**RECIFE
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Recife, 15 de março de 2006

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 15 de março de 2006 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Vanderley
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____



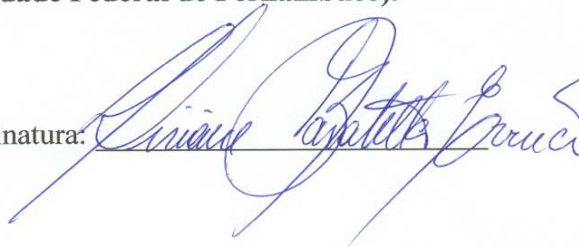
EXAMINADOR INTERNO: Profa.. Dra. Simone S.L. Lafayette
(Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____



EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Liriane B. Evêncio (Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____



Lima, Cristiano Ribeiro de
Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo® / Cristiano Ribeiro de Lima. – Recife : O Autor, 2006.
xiii, 77 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Farmacêuticas, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Ciências farmacêuticas – Plantas medicinais - Toxicologia. 2. Produtos naturais – Toxicidade aguda e subcrônica – Atividade cicatrizante. 3. – Fitoterápico Sanativo® - Eficácia e segurança pré-clínica. I. Título.

615.9
615.9

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-158

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

REITOR:

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR:

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE:

Prof. José Thadeu Pinheiro

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Celso Pinto de Melo

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE:

Prof. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS:

Profa. Jane Sheila Higino

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS:

Profa. Miracy Muniz Albuquerque

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, ANASTÁCIO e EUNICE;
meus irmãos, TACIANA e LUCIANO;
minha namorada MARIA HELENA;
e minha avó ADALGISA (*in memoriam*).**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o caminho, a verdade e a vida.

Aos meus pais, José Anastácio de Lima e Maria Eunice Ribeiro de Lima, pelo amor, carinho, educação e apoio a mim dedicados durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Luciano Vitor e Taciana Cristina.

Aos meus avós Severino Anastácio (*in memorian*) e Adalgisa Rita (*in memorian*); José Martins e Clarice Ribeiro.

A Maria Helena Uchôa Veiga (Lena), pelo seu amor, incentivo e compreensão durante todo o período de realização do Mestrado, bem como a todos os seus familiares.

Ao meu professor, orientador e amigo Almir Gonçalves Wanderley, pelos ensinamentos, confiança, incentivo e oportunidade.

A todos os meus familiares e amigos que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho.

As professoras Simone Sette e Maria do Carmo pela disponibilidade, orientação e apoio na realização da pesquisa.

A professora Liriane Evêncio e a sua equipe técnica do Departamento de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco.

A João Henrique da Costa-Silva, amigo desde a graduação em Farmácia, e durante todo o Mestrado. Companheiro de laboratório que muito contribuiu para que chegasse a conclusão deste trabalho.

A Alice Valença, Ana Paula, Ana Catarina Leite, Daniela Carvalho, Erick Silva, Joana Vilar, Márcia Brasil, Mariana Lyra, Regimara Tenório, Viviane Martins, seu Fredisson e Rejane Ferreira da Silva por todo o auxílio, amizade e dedicação em todo o trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Naturais e Bioativos.

A Gustavo Santiago Dimech, por sua contribuição na execução das análises Hematológicas e Bioquímicas.

Ao Laboratório Pernambucano Ltda (Laperli) pelo apoio a pesquisa.

A todos os professores e amigos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Aos professores e amigos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Professores, técnicos e alunos que contribuem para o desenvolvimento científico, cultural e social deste país, particularmente da Região Nordeste.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. - FITOTERÁPICOS: MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS	5
2.2. - ATIVIDADE CICATRIZANTE DE PLANTAS MEDICINAIS	6
2.3. - ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS DE PRODUTOS NATURAIS	8
2.3.1. - TOXICIDADE AGUDA	9
2.3.2. - TOXICIDADE SUBCRÔNICA	10
2.4. - O PRODUTO FITOTERÁPICO SANATIVO®	11
2.4.1. - <i>PIPTADENIA COLUBRINA</i>	12
2.4.1.1. - BOTÂNICA	12
2.4.1.2. - FITOQUÍMICA	12
2.4.1.3. - FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA	13
2.4.2. - <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS</i>	15
2.4.2.1. - BOTÂNICA	15
2.4.2.2. - FITOQUÍMICA	16
2.4.2.3. - FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA	17
2.4.3. - <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	18
2.4.3.1. - BOTÂNICA	18
2.4.3.2. - FITOQUÍMICA	19
2.4.3.3. - FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA	19
2.4.4. - <i>CEREUS PERUVIANUS</i>	21
2.4.4.1. - BOTÂNICA	21
2.4.4.2. - FITOQUÍMICA	22
	IX

2.4.4.3. - FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. - GERAL	25
3.2. - ESPECÍFICOS	25
4. ARTIGO I: Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®	26
RESUMO	27
SUMMARY	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
5. ARTIGO II: Avaliação Toxicológica Pré-clínica do Fitoterápico Sanativo® em Ratos Wistar	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	53
AGRADECIMENTOS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
ARTIGO I	26
Figura 1: Efeito tópico do Sanativo [®] (SAN) a 4% na cicatrização de ferida aberta (área de lesão 4cm ²) induzida cirurgicamente no dorso de ratos Wistar. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=8/grupo).	43
Figura 2. Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), sobre o ganho de massa corporal administrado por via oral a ratas Wistar adultas, por 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=10/grupo).	44
ARTIGO II	45
Figura 1. Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), sobre o ganho de massa corporal administrado por via oral a ratos Wistar adultos, por 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=10/grupo).	62

LISTA DE TABELAS

	Página
ARTIGO I	26
Tabela 1: Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas, tratadas por 30 dias consecutivos.	40
Tabela 2. Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas, tratadas por 30 dias consecutivos.	41
Tabela 3: Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), administrados por via oral a ratas Wistar adultas sobre a massa dos órgãos (g/100g), tratadas por 30 dias consecutivos.	42
ARTIGO II	45
Tabela 1. Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos, tratados por 30 dias consecutivos.	58
Tabela 2. Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos, tratados por 30 dias consecutivos.	59
Tabela 3: Efeito do Sanativo [®] (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), administrados por via oral a ratos Wistar adultos sobre a massa dos órgãos (g/100g), tratados por 30 dias consecutivos.	60

RESUMO

O Sanativo[®] (SAN) é um produto fitoterápico composto de uso tradicional na região Nordeste do Brasil. Este medicamento sob a forma de extrato fluido é indicado no tratamento de feridas, queimaduras, inflamações de garganta e de tecidos epiteliais lesionados. Sua fórmula é constituída por 20% de angico (*Piptadenia colubrina*, Benth), que possui ação hemostática e cicatrizante; 20% de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), usada em processos inflamatórios e infecções bacterianas; 1,7% de camapu (*Physalis angulata*, Linné), empregada por sua atividade balsâmica e analgésica e 1,7% de mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller), com o qual procura-se a assepsia das regiões afetadas. Tendo em vista a inexistência de trabalhos científicos que descrevam a eficácia e segurança de uso da utilização da associação destas espécies vegetais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade cicatrizante, bem como os possíveis efeitos tóxicos da administração oral aguda e sub-crônica do Sanativo[®] em ratos Wistar. Para isso, foram realizados testes de atividade cicatrizante, no modelo de ferida aberta em dorso de rato, utilizando o SAN a 4% sob a forma de spray. Avaliação da toxicidade aguda por via oral. Efeito da administração sub-crônica do SAN por via oral sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos nas doses de 0,067; 0,335 e 1,675g/kg por dia. Os resultados mostraram que o SAN produziu uma diminuição significativa no tempo requerido para a completa reepitelialização da área lesionada. Na administração oral de até 5,0g/kg o SAN não produziu morte nos animais. O tratamento por 30 dias consecutivos com SAN produziu uma redução no ganho de massa corporal dos animais, particularmente na dose de 1,675g/kg e sendo mais acentuada nos machos. Os perfis hematológico e bioquímico sofreram pequenas variações pontuais estatisticamente significativas, porém todas permanecendo dentro da faixa de referência para a espécie. Não foram verificadas alterações nas massas relativas e morfologia macroscópica externa dos órgãos analisados, com exceção de um aumento nas massas do estômago e ovário nas fêmeas tratadas com SAN 1,675g/kg. A análise histológica dos diferentes órgãos não revelou alterações. O conjunto dos resultados permitiu concluir que o Sanativo[®] possui significativa propriedade cicatrizante no modelo de ferida aberta e que o tratamento oral com o SAN produz baixa toxicidade em ratos Wistar.

Palavras-chave: Sanativo[®], atividade cicatrizante, toxicidade aguda e sub-crônica

ABSTRACT

The Sanativo[®] (SAN) is a phytotherapeutic product traditionally used in the Northeast of Brazil. This medicine, in fluid extract, is indicated for healing, burns, inflammations of throat and of hurt epithelial tissue. Its fórmula is composed by 20% of Angico (*Piptadenia colubrina*, Benth), wich have hemostatic and healing actions; 20% of Aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), used in inflammatory processes and bacterial infection, 1,7% of Camapu (*Physalis angulata*, Linné), used because of its balsamic and analgesic properties; and 1,7% of Mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller), wich is used for asepsis. Because there are no reports that describe the efficacy and safety of the use of the association of these vegetal species, the aim of the present study was to evaluate the healing activity, as well as possible hazardous effects of the acute and sub-chronic administration of Sanativo[®] in Wistar rats. Healing activity tests were made by the open wounds in rat dorsum, using the SAN 4%, in a form of spray. Acute toxicity evaluation by oral route. The effects of the sub-chronic administration of SAN in hematological, biochemical and morphologic parameters were studied at the doses of 0,067; 0,335 and 1,675g/kg per day. The results showed that the SAN produced a significant decrease on the required time to the complete re-epithelialisation of the hurt área. In the acute administration, at the doses of untill 5,0g/kg, the SAN did not produce deaths. The treatment with SAN for 30 consecutive days produced a decrease in the body mass gain, particularly at the dose of 1,675g/kg, and it was more accentuated in males. The hematological and biochemical parameters showed little statistically significant punctual variations, but all of them remained on the reference rate to the species. There was no alterations in the relative weight and macroscopic external morphology of the organs, except for an increase in the stomach and ovarian weight of the female treated with SAN 1,675g/kg. The histological analysis of the various organs did not show any alteration. Taken together, these results conclude that the Sanativo[®] have significative healing property in the open wounds model and that the oral treatment with SAN produce low toxicity in Wistar rats.

Key words: Sanativo[®], Healing activity, Acute and Sub-chronic toxicity

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Na história da humanidade, as plantas sempre foram utilizadas como instrumentos de cura para o tratamento de diversas enfermidades, representando muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O homem, que no período de dominação da natureza lançava-se de forma empírica às fontes vegetais na busca de soluções para suas chagas, com o passar do tempo, estreitou a relação do uso das plantas medicinais com os avanços da ciência. O resgate da sabedoria popular do uso terapêutico de plantas passou a oferecer assim, um suporte científico para o desenvolvimento de novos medicamentos (GOMES; GOMES, 2000).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (MONTANARI *et al.*, 2001).

Estima-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos são derivados, direta ou indiretamente de plantas. Somente no período de 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Nos últimos anos tem sido constatado um crescimento no interesse por terapias naturais, em especial na utilização de ervas medicinais. Nesse contexto, o mercado mundial de medicamentos fitoterápicos tem crescido, com a participação inclusive de grandes multinacionais do setor farmacêutico. No ano de 1997 o mercado europeu de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 7 bilhões, com a Alemanha respondendo por metade deste montante (cerca de US\$ 3,5 bilhões ou US\$ 42,90 *per capita*). Na Ásia e Japão, o mercado de medicamentos naturais tem alcançado valores em torno de US\$ 2 bilhões. E em relação ao mercado norte-americano, em 1999, a movimentação financeira do setor chegou a US\$ 5 bilhões (CALIXTO, 2000).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), devido à pobreza e à falta de acesso aos medicamentos utilizados pela medicina moderna, cerca de 65 a 80% das populações que vivem nos países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas medicinais para tratarem de problemas relacionados à atenção primária da saúde (AKERELE, 1993).

O mercado brasileiro de medicamentos fitoterápicos apresenta-se com poucas espécies vegetais nativas, sendo predominante a utilização de plantas européias e asiáticas. Isso se deve ao incipiente desenvolvimento do seguimento no Brasil, com poucos investimentos e pesquisas clínicas na área para comprovar a eficácia do medicamento. A balança comercial brasileira é altamente deficitária neste item. O país exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de alcaçuz, aloés, bardana, catuaba, ipeca e quina. Por outro lado, importa uma quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos e de fonte natural. Um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil ou na possibilidade de exportação é a falta de medicamentos que garantam eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário (PINTO *et al.*, 2002).

Nesse contexto, a avaliação da eficácia e segurança dos fitoterápicos deve ser considerada como fator decisivo para a aceitação e permanência desses produtos no mercado, e para que eles possam assim, assumir seu importante papel social na promoção da saúde coletiva.

2. Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fitoterápicos: medicamentos a partir de plantas medicinais

Agentes fitoterápicos ou fitomedicamentos são preparações vegetais padronizadas, consistindo em misturas complexas de uma ou mais plantas que são utilizadas em diversos países para o tratamento de várias doenças. De acordo com a definição proposta pela OMS, os fitomedicamentos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado. Os constituintes responsáveis pela atividade farmacológica são, em geral, pouco conhecidos e se acredita que a ação farmacológica desses produtos envolva a interação de inúmeras moléculas presentes no extrato (CALIXTO, 2003).

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos terapêuticos que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de plantas medicinais, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Neste contexto, a seleção etnofarmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento, baseada na alegação feita por seres humanos, pode ser um valioso atalho para descoberta de novos fármacos. Desta forma, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica (MACIEL *et al.*, 2002; ELISABETSKY, 2003).

Os produtos naturais podem ser tão eficazes quanto os produzidos pela síntese química, contudo, a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esse objetivo, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agronômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (TOLEDO *et al.*, 2003).

2.2. Atividade cicatrizante de plantas medicinais

Entre as principais prioridades da OMS no seu Programa de Medicina Tradicional se destaca a importância da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, particularmente os de uso externo, produzidos a partir de plantas medicinais que apresentem comprovada atividade anti-séptica e que favoreçam o processo de cura (AKERELE, 1984).

A cicatrização é um processo biológico natural, por meio da qual tecidos danificados tentam restabelecer a sua integridade. Entretanto, fatores de risco como infecções ou reações inflamatórias excessivas podem comprometer o sucesso do reparo (LOPES *et al.*, 2005).

Neste processo, três fases são reconhecidas em resposta às lesões ocorridas na pele de mamíferos adultos: inflamação, epitelialização e remodelagem. Quando a lesão alcança a camada dérmica, ocorre a destruição de vasos capilares resultando na formação de um coágulo, o qual funciona como uma barreira temporária e como uma fonte de sinais quimiotáticos, que promovem a atração de vários tipos de células ao local lesionado (COULOMBE, 1997).

A restauração da continuidade epitelial é definida pelo fechamento da lesão. Este processo é acompanhado por uma combinação de dois mecanismos: a migração de queratinócitos para o local danificado e a contração de miofibroblastos ao redor da ferida, os quais exercem uma força centrípeta movendo suas extremidades e assim fechando a lesão (MONTANDON *et al.*, 1977; COULOMBE, 1997).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse por drogas obtidas de plantas que contenham altos teores de taninos, tanto para uso humano quanto veterinário, pois elas seriam potenciais promotores de cura no tratamento de feridas e queimaduras de tecidos epiteliais (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

Os taninos são compostos fenólicos do metabolismo secundário vegetal, sendo amplamente empregados na medicina tradicional em tratamento de feridas, queimaduras e inflamações. A atividade anti-séptica dos taninos pode ser explicada por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas dos tecidos, formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos (HASLAM, 1996).

Os taninos têm forte propriedade adstringente, devido a esse efeito, quando são aplicados topicamente na pele ou em membranas mucosas, provocam uma precipitação protéica que torna as camadas superficiais mais seguras e encolhe as estruturas coloidais, causando vasoconstricção capilar (ação hemostática). A diminuição da permeabilidade vascular é equivalente ao efeito antiinflamatório local. A ação adstringente nos tecidos priva as bactérias de um meio de crescimento favorável, produzindo um efeito antibacteriano indireto, além de promover uma leve ação anestésica tópica, que reduz a dor e a irritação (SCHULZ *et al.*, 2002).

Pesquisas foram desenvolvidas no intuito de comprovar o efeito positivo dos taninos sobre o processo de cicatrização. Algumas espécies vegetais têm demonstrado resultados significativos no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações de tecidos epiteliais lesionados, em que a elevada concentração de taninos dessas plantas tem sido relacionada com seu potencial terapêutico.

Em estudo realizado por Lopes e colaboradores (2005) foi avaliada a influência dos extratos da *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e da *Stryphnodendron obovatum* Benth. sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas produzidas em dorso de ratos. Essas espécies contêm 12 e 19% de taninos em suas entrecascas, respectivamente. Os extratos obtidos das suas entrecascas demonstraram significativa atividade cicatrizante, observada principalmente pelo aumento do crescimento de tecido epitelial no 4º, 7º e 10º dia de tratamento após a lesão inicial.

O extrato aquoso da entrecasca da *Rhizophora mangle* apresentou um efeito benéfico no tratamento de feridas abertas em pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas. A área da lesão do grupo tratado topicamente com o extrato, uma ou duas vezes ao dia, demonstrou uma significativa redução quando comparado com o grupo tratado com mercurocromo. O extrato utilizado é constituído por cerca de 80% de polifenóis, representados em sua maioria por taninos poliméricos e por taninos hidrolizáveis (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

A influência dos taninos sobre o processo cicatrizante de feridas também foi constatado pela utilização do extrato etanólico obtido da entrecasca da *Terminalia arjuna*, espécie descrita como sendo rica em taninos. Também utilizando o modelo de ferida aberta em dorso de ratos, o tratamento com o extrato promoveu um aumento no percentual de

redução da área da ferida, assim como na presença do tecido de granulação, quando comparado com o grupo controle, indicando uma ação cicatrizante de feridas da espécie (RANE *et al.*, 2003).

2.3. Estudos toxicológicos pré-clínicos de produtos naturais

A Toxicologia é a ciência dos efeitos adversos das substâncias químicas sobre os organismos vivos. Paracelsus (1493-1541) assinalou... “Todas as substâncias são venenosas; nenhuma delas deixa de sê-lo. A dose correta diferencia um veneno e um remédio” (KLAASSEN, 1983).

Toda substância pode ser considerada como um agente tóxico em potencial, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição (doses únicas ou múltiplas), via de administração (oral, inalatória, dérmica, parenteral). Por outro lado, estas substâncias podem ser empregadas de forma segura mantendo-se as condições de exposição abaixo dos níveis de tolerância (CASTRO, 1993).

A avaliação toxicológica compreende a análise dos dados toxicológicos de uma substância ou composto químico com o objetivo de classificá-lo toxicologicamente e, ao mesmo tempo, fornecer informações a respeito da forma concreta de seu emprego, bem como as medidas preventivas e curativas quando do uso inadequado. No desenvolvimento de um novo medicamento para uso humano são necessários estudos que garantam a sua eficácia e segurança. A avaliação desses parâmetros ainda continua sendo amplamente dependente de um estudo toxicológico animal bem planejado e cuidadosamente executado (MORTON, 1998).

Os estudos de segurança pré-clínica são importantes na determinação do perigo (dose-dependente) de um potencial candidato a medicamento, como também na identificação dos possíveis órgãos mais afetados e em avaliar o tipo de toxicidade produzida. Normalmente, esses estudos são executados em linhagens padronizadas e bem caracterizadas de animais, sendo importante que estes sejam mantidos sob condições adequadas, em ambiente livre de patógenos e que seu estado de saúde seja rigorosamente controlado (BOELSTERLI, 2003).

Embora, atualmente, os protocolos da maioria dos estudos toxicológicos sigam um formato padrão, a seleção cuidadosa da espécie mais apropriada é essencial para a obtenção de resultados mais confiáveis e significativos. Esta seleção, normalmente, é baseada em um estudo toxicológico preliminar e na farmacologia geral aplicada a espécies de roedores e não-roedores, junto com informações sobre a biodisponibilidade e perfil metabólico da droga. O conhecimento sobre o metabolismo celular humano, utilizando preparações *in vitro* também pode ser particularmente valioso (MORTON, 1998).

De acordo com a OMS, muitos efeitos de drogas observados em animais podem ter, até certo ponto, elevados valores de aplicação para a espécie humana, motivo do largo emprego dos testes farmacológicos e toxicológicos na determinação da eficácia e toxicidade de drogas (WHO, 1978).

Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como as ações sinérgicas, ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2005).

2.3.1. Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda é considerado como o primeiro passo na avaliação de substâncias suspeitas de possuírem alguma atividade biológica. O teste está baseado na administração de dosagens gradativas da substância em relação à massa corporal. O objetivo primário é gerar estimativas de dose-resposta ou curva de letalidade e a dose letal mediana (DL₅₀) que corresponde ao ponto médio desta curva (LORKE, 1983; HILL, 1993).

A DL₅₀ representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população, este parâmetro é útil na identificação da toxicidade relativa de uma substância. Estes estudos são feitos administrando-se dose única ou doses múltiplas dentro de um período de 24 horas. A via oral é mais indicada, porém, outras vias

de administração podem ser escolhidas, levando-se em consideração o tipo de exposição humana a determinados agentes químicos (FOWLER; RUTTY, 1983).

Em função das finalidades do conhecimento dos valores de DL_{50} , alguns autores recomendam que seu cálculo exato, é válido somente para as substâncias que apresentam uma dose letal média no intervalo de 1 a 5000mg/kg. Por outro lado, diversas instituições internacionais, ligadas à regulamentação da toxicidade dos compostos químicos, recomendam o limite máximo de 2000mg/kg para a execução da DL_{50} (LORKE, 1983; BOTHAM, 2003).

O valor dos resultados obtidos em um teste toxicológico agudo é significativamente aumentado pelo exame detalhado de cada animal, como também, pela observação do tempo e das doses para que ocorra sua morte ou recuperação.

2.3.2. Toxicidade Subcrônica

A exposição crônica tende a ser uma exposição a pequenas quantidades de uma substância tóxica por um longo período de tempo, o que com frequência provoca o lento acúmulo de concentrações tóxicas do composto no organismo. A avaliação dos efeitos tóxicos cumulativos vem sendo objeto de crescentes estudos por causa da exposição a doses repetidas a baixas concentrações de diversas substâncias químicas naturais e sintéticas do ambiente (KLAASSEN, 1983).

A avaliação toxicológica subcrônica tem como principal objetivo estabelecer os níveis nos quais não mais se observam efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados, bem como, o grau de comprometimento dos mesmos (FAUSTMAN, 1994).

Da mesma forma da toxicidade aguda, os animais utilizados nos testes subcrônicos devem ser saudáveis, estar em idade adulta jovem e serem de linhagens bem definidas, geralmente a via oral constitui a principal via de administração. Durante o experimento, os animais devem ser observados diariamente, com relação a manifestações de sinais indicativos de toxicidade. Os principais parâmetros avaliados são: as modificações no consumo de água e ração, na massa corporal, na cor e textura dos pêlos, alterações respiratórias e circulatórias, anormalidades motoras e de comportamento (BARNES; DOURSON, 1988).

Ao final do tratamento são retiradas amostras sanguíneas dos animais para que sejam realizadas análises hematológica e bioquímica. Em seguida os principais órgãos são removidos para que sejam avaliados quanto as suas características anatomopatológicas.

2.4. O produto fitoterápico Sanativo®

O Sanativo® é um fitoterápico composto constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais nativas da região Nordeste do Brasil. Na sua composição estão presentes 20% de angico (*Piptadenia colubrina*, Benth), 20% de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), 1,7% de camapu (*Physalis angulata*, Linné) e 1,7% de mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller).

Este produto tradicional, apresentado na forma de extrato fluido, é produzido desde 1888 pela empresa Laperli (Laboratório Pernambucano Ltda), tem seu efeito terapêutico relacionado às propriedades farmacológicas apresentadas pelas espécies vegetais que compõem sua fórmula.

O angico, devido a sua propriedade adstringente, tem sido aplicado no tratamento de anginas, diarreias, leucorréias e lesões de pele (CORRÊA, 1978a; MONTEIRO *et al.*, 2005).

A ação da aroeira é direcionada a processos inflamatórios e infecções bacterianas (JAIN *et al.*, 1995; MARTINEZ *et al.*, 1996). O extrato hidroalcoólico da sua entrecasca tem sido empregado no tratamento de feridas da pele, gastrites, úlceras gastroduodenais e infecções urogenitais (QUEIRES; RODRIGUES, 1998; AMORIM; SANTOS, 2003).

Com o camapu busca-se sua atividade balsâmica e analgésica. Ao infuso desta planta têm sido atribuídas propriedades sedativa, depurativa, antiinflamatória e antireumática (TOMASSINI *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2005).

E com o mandacaru procura-se a assepsia necessária das regiões lesionadas, já que o mesmo tem seu uso popular ligado a ações deterativa. No conjunto obtém-se um produto indicado no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações de garganta e de tecidos epiteliais lesionados.

2.4.1. *Piptadenia colubrina*

2.4.1.1. Botânica

A *Piptadenia colubrina*, Benth é uma árvore nativa das florestas tropicais da América do Sul, estando amplamente distribuída no Norte da Colômbia e em boa parte do Brasil, aonde sua ocorrência vai desde o Maranhão até o Paraná e Goiás, crescendo em altitudes superiores a 400 m (DELGOBO *et al.*, 1998).

Pertencendo à família Leguminosae-Mimosoideae tem como principal sinonímia botânica a *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan, sendo a espécie popularmente conhecida como: angico, angico branco, angico vermelho e cambuí-angico. Em relação às suas características morfológicas, o angico apresenta-se como uma árvore com altura entre 12-15 m, com tronco de 30-50 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas bipinadas, com 15 a 20 jugas, folíolos opostos, de 4-6 mm de comprimento, com 20-80 jugos. Suas flores são melíferas e florescem a partir do mês de novembro, prolongando-se até janeiro. A maturação de seus frutos ocorre durante os meses de julho-agosto, produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 1998a).

2.4.1.2. Fitoquímica

As espécies desse gênero são bem conhecidas por demonstrarem elevadas concentrações de tanino, particularmente na sua entrecasca, e por serem consideradas plantas com atividades medicinais, dentro da tradição popular (PIACENTI *et al.*, 1999; GUTIERREZ-LUGO *et al.*, 2004).

Segundo Corrêa (1978a), essa espécie apresenta em suas cascas aproximadamente 32% de tanino, sendo este constituinte fitoquímico considerado o principal responsável pelas atividades terapêuticas atribuídas à espécie.

Em estudo recente, foi avaliado a concentração de taninos presentes na entrecasca e nas folhas da *Anadenanthera colubrina*, em diferentes épocas do ano. Foi verificado que a entrecasca e as folhas apresentaram maiores teores de taninos (7,2 e 15,3%, respectivamente) na estação mais seca do ano (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Em investigação química das partes aéreas da *Anadenanthera colubrina* realizada por Gutierrez-Lugo e colaboradores (2003) foi isolado um novo flavonóide chamado anadantoflavona, junto com ele foram encontrados mais 11 compostos já conhecidos: alnusenol, lupenona, lupeol, ácido betulínico, α -amirina, β -amirina, β -sitosterol, estigmasterol, apigenina, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido cinâmico.

Desta árvore ainda é retirado um exsudado gomoso, conhecido como “goma arábica”, a qual é empregada na indústria e também contra infecções pulmonares e das vias respiratórias. Segundo Delgobo e colaboradores (1998) o exsudado gomoso produzido pelo angico consiste em um complexo heteropolissacarídeo ácido formado principalmente por moléculas de galactose e arabinose, esta estrutura foi batizada por ele de ARAGAL. Ele encontrou ainda a presença de mono e oligossacarídeos como: ramosa, arabinose, manose, galactose e ácido glicorônico (DELGOBO *et al.*, 1999).

2.4.1.3. Farmacologia e Toxicologia

Algumas atividades medicinais são atribuídas ao angico, sendo a sua entrecasca a parte mais empregada para esses fins. O decócto produzido com esta parte da planta tem sabor amargo e adstringente, apresentando propriedades hemostática, depurativa e cicatrizante. Devido a sua ação adstringente, o angico vem sendo aplicado no tratamento de anginas, diarreias, leucorréia, gonorréia e ulcerações. O nome angico é comum em várias espécies da mesma família, todas fornecendo cascas taníferas, com emprego na indústria do curtume (CORRÊA, 1978a).

A utilização do angico por tribos indígenas brasileiras nas suas cerimônias místico-religiosas despertou a curiosidade de pesquisadores quanto a possíveis efeitos narcóticos relacionados a esta espécie vegetal. Os índios utilizavam as sementes torradas e pulverizadas, sendo consumidas na forma de rapé. Foi constatado que as sementes do angico eram, assim como as demais espécies desta família, ricas no alcalóide bufotenina, apresentando um rendimento de 2,1% na extração realizada com etanol (PACHTER *et al.*, 1959).

Em trabalho recente realizado por Monteiro e colaboradores (2005) foi quantificado o conhecimento popular sobre o uso da *Anadenanthera colubrina* em relação a sua

atividade medicinal. Foi verificado que a sua maior aplicação medicinal está ligado ao tratamento de problemas respiratórios e de inflamações de um modo geral, sendo a entrecasca a parte mais utilizada.

Em uma avaliação farmacológica inicial dos efeitos do extrato aquoso obtido das cascas do angico sobre o sistema nervoso central (SNC) de ratos e camundongos observou-se ações sinérgicas, depressoras, com o pentobarbital sódico, clorpromazina e o diazepam (SARSUR-NETO *et al.*,1989).

A anadantoflavona isolada das partes aéreas da *Anadenanthera colubrina* demonstrou uma ação inibitória sobre as atividades das lipoxigenases 12 e 15, presentes nas plaquetas e nos reticulócitos humanos, apresentando valores da Concentração inibitória média (IC₅₀) de $13 \pm 3\mu\text{M}$ e $17 \pm 3\mu\text{M}$, respectivamente. A apigenina inibiu seletivamente a atividade da 15-lipoxigenase, com IC₅₀ de $4,0 \pm 1\mu\text{M}$. A lupenona, o lupeol e a α -amirina também demonstraram relativa atividade inibitória na ação das lipoxigenases (GUTIERREZ-LUGO *et al.*, 2003).

Em trabalho realizado por Moretão e colaboradores (2003) foi demonstrado o efeito do ARAGAL sobre o sistema imunológico, como potencial modificador da resposta biológica. A presença de macrófagos ativados com citoplasma aumentado, núcleos grandes, projeções citoplasmáticas e com maior habilidade de propagação foram observadas tanto em células *in vitro* expostas ao ARAGAL quanto em células obtidas de animais tratados. No teste *in vitro*, 82% das células foram ativadas na presença de 300 mg/ml de ARAGAL após 24h de incubação e de 91% depois de 48h. A ocorrência de macrófagos ativados também ficou evidente em preparações de células obtidas de ratos tratados com ARAGAL nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg proporcionando um aumento de 60, 75 e 75%, respectivamente na ativação de macrófagos, caracterizando assim, uma relação tempo e dose dependente.

O tratamento de camundongos com 50, 100 ou 200mg/kg de ARAGAL aumentou o número de células fagocitárias presentes no exsudado de peritônio em 18, 44, e 88%, respectivamente. O ARAGAL também promoveu um crescimento na produção do α -fator de necrose tumoral (α -TNF) por parte dos macrófagos. Macrófagos tratados *in vitro* por 18h com ARAGAL foram capazes de destruir 180 células de Sarcoma (S-180), isto pode ser constatado pela presença dessas estruturas no interior do citoplasma dessas células. Na

concentração de 100mg/kg, o ARAGAL mostrou atividade antitumoral contra S-180 em ascites ou tumores sólidos, a inibição tumoral foi de 63 e 38%, respectivamente (MORETÃO *et al*, 2004).

2.4.2. *Schinus terebinthifolius*

2.4.2.1. Botânica

A espécie *Schinus terebinthifolius*, Raddi, é um membro da família Anacardiaceae, nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil nos estados de Minas Gerais e Bahia até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais. Apresenta várias sinonímias botânicas: *S. acutifolia* Engl., *S. glazioviana* Engl., *S. pohliana* Engl., *S. raddiana* Engl., *S. aroeira* Vell. e *S. mucronulatus* M. (CORRÊA, 1978b).

Popularmente é conhecida no Brasil por aroeira, aroeira vermelha, aroeira mansa, pimenta-do-reino do Brasil, cabuí, fruto de sabiá; “pink peper”, “pink berries”, nos Estados Unidos; “pfeffer” e “rosa beeren”, na Alemanha; “baies roses de bourbon” na França e “aguará-mi-ybá”, no Paraguai (PIERIBATTEST *et al.*, 1981; PIRES *et al.*, 2004).

A aroeira é uma planta perenifólia, heliófita e pioneira, comum em beira de rios, córregos e em várzeas úmidas de formações secundárias; entretanto, cresce também em terrenos secos e pobres. Sua altura varia de 5-10 m, dotada de copa arredondada, seu tronco é tortuoso, de 30-60 cm de diâmetro, com casca grossa e fissurada. Apresenta folhas compostas imparipinadas, folíolos subcoriáceos, glabros, em número de 3-10 pares, de 1-5 cm de comprimento por 1-3 cm de largura. Pelo porte pequeno, é indicada para a arborização de ruas estreitas e sob fios elétricos; no entanto, pode causar alergia a pessoas sensíveis que entram em contato com suas folhas. As suas flores são melíferas, florescendo principalmente durante os meses de setembro a janeiro e frutifica predominantemente no período de janeiro a julho. Suas sementes são amplamente disseminadas por pássaros, o que explica sua boa regeneração natural (LORENZI, 1998b).

2.4.2.2. Fitoquímica

O emprego de diferentes partes da aroeira tem sido relatado na medicina tradicional de vários países. A espécie já foi relativamente bem pesquisada, apresentando um bom número de trabalhos relacionados à identificação das substâncias presentes na planta, bem como relacionados à comprovação de suas atividades terapêuticas.

Em trabalho realizado por Kaistha e Kier (1962a), foi identificada a estrutura da terebintona, um triterpeno isolado dos frutos da espécie. No mesmo ano foi isolado o schinol pelos mesmos pesquisadores. Bório e colaboradores (1973) estudando a entrecasca da planta verificaram a presença de 13,9% de taninos; 0,12% de óleo essencial, resinas e saponinas.

Em estudo realizado por Campelo e colaboradores (1974), foram isoladas das cascas da espécie: bauerenona, α -amirina, α -amirenona e ácido terebintefólico. No ano seguinte, investigando as folhas da espécie os mesmo autores isolaram alguns triterpenos: o ácido 3 α -hidroximasticadienóico, o sitosterol e o simiarenol (CAMPELO *et al.*, 1975).

Nos frutos da aroeira foram isolados ainda os seguintes componentes: ácido masticadienóico, hidroximasticadienóico e ácido ursólico (LLOYD *et al.*, 1977). As sementes moídas da espécie são irritantes de mucosa. Stahl (1982) separou os compostos fenólicos responsáveis pela ação, através de cromatografia de camada delgada. No ano seguinte, o cardanol, substância irritante cutânea, foi isolado dos frutos da espécie (STAHL *et al.*, 1983).

No seu óleo essencial foram identificados α -pineno, β -pineno, sabineno, Δ^3 -careno, α -felandreno, limoneno, β -felandreno, p-cimeno e terpinoleno, cis-sabinol, carvotanacetona, β -cariofileno, α e β -cubeneno, simiarenol, simiarenona, α -amirina e α -amirenona (LLOYD *et al.*, 1977).

Em pesquisa realizada por Lawrence (1984) foi verificada a presença de 23 compostos no óleo essencial, não detectados anteriormente. Em outro estudo químico do óleo essencial dos frutos da aroeira foram identificados os triterpenos: α -pineno, β -pineno, γ -terpineno, limoneno, α -terpinoleno, anetol, timol, carvacrol e β -cariofileno (SANTOS *et al.*, 1986).

Queires e colaboradores (1998) demonstraram a variabilidade quantitativa na distribuição de fenóis totais nos diversos órgãos que constituem a parte aérea da aroeira. Os valores médios encontrados, com base no peso úmido (P.U.) foram: fruto = 9,5; flor = 43,8; folha = 40,3; caule córtex = 32,1 e caule lenho = 18,1 mg/g P.U.

Na análise obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule da *Schinus terebinthifolius*, Raddi foi encontrado uma predominância de compostos polifenólicos e terpenóides. Dentre os polifenóis, confirma-se a existência de forte concentração de taninos catéquicos, sendo atribuída a estes, boa parte da bioatividade dessa planta (ARAÚJO, 2002).

Em análise fitoquímica mais recente realizada por Lima e colaboradores (2005) no extrato etanólico obtido da entrecasca da espécie, foram identificadas as presenças de fenóis, triterpenos pentacíclicos e antraquinonas, na extração com hexano utilizando a mesma parte da planta, os teste foram positivos para a presença de flavonas, flavonóides, xantonas, esteróides livres, antraquinonas e triterpenos pentacíclicos.

2.4.2.3. Farmacologia e Toxicologia

Com relação à avaliação farmacológica da aroeira, verificou-se que o extrato aquoso obtido das suas folhas apresentou atividade antiinflamatória do tipo não-esteroidal, no modelo de granuloma induzido por algodão em dorso de rato (MOURELLE *et al.*, 1993).

Em pesquisa desenvolvida por Jain e colaboradores (1995) foi verificado que os triterpenos, ácido masticadienóico e o ácido masticadienólico (schinol), presentes nos frutos da aroeira, apresentam atividade antiinflamatória por serem inibidores competitivos específicos da fosfolipase A₂.

O extrato hidroalcoólico obtido das folhas da aroeira apresentou significativa atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), além de uma ação antifúngica contra a *Candida albicans* (MARTINEZ *et al.*, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2000).

Resultado semelhante foi obtido por Schmourlo e colaboradores (2005), utilizando um extrato aquoso obtido a partir das partes aéreas do vegetal (folhas, talos e flores) também observou uma atividade antifúngica significativa frente à *Candida albicans*. O

extrato etanólico da entrecasca do caule da espécie demonstrou excelente atividade antibacteriana, particularmente frente a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (LIMA *et al.*, 2005).

A emulsão preparada a partir do extrato hidroalcoólico obtido da entrecasca da espécie demonstrou significativa atividade cicatrizante e antiinflamatória, frente os modelos de ferida aberta em dorso de rato e o teste de edema de pata induzido por carragenina, respectivamente (DA SILVA, 1999).

Em relação à avaliação toxicológica, poucas informações são descritas na literatura. Em trabalho realizado por Ruiz e colaboradores (1996) foi verificada a ausência de efeitos genotóxicos no extrato hidroalcoólico das folhas da aroeira.

Amorim e Santos (2003) constataram que o gel vaginal produzido com aroeira demonstrou-se seguro e eficaz no tratamento da vaginose bacteriana, promovendo 84% de cura nas pacientes tratadas.

Em uma análise preliminar da toxicidade aguda e da dose letal mediana (DL₅₀) dos frutos da aroeira em camundongos, foi determinada uma DL₅₀ acima de 5,0 g/kg na administração por via oral. Já pela via intraperitonal o valor obtido foi de 3,5 g/kg (PIRES *et al.*, 2004).

Em estudo realizado por Araújo (2002) avaliando a toxicidade aguda do extrato metanólico bruto obtido das cascas da aroeira em ratos, não foi revelado qualquer sinal de toxicidade ou morte relacionada ao tratamento.

2.4.3. *Physalis angulata*

2.4.3.1. Botânica

O gênero *Physalis* inclui cerca de 120 espécies com caracteres herbáceos e hábitos perenes, que se distribuem pelas zonas temperadas do mundo principalmente nas Américas Central e Sul. O nome *Physalis* é oriundo do grego onde “*physis*” significa bolha ou bexiga, referindo-se ao cálice que encerra seus frutos, comestíveis na maioria das vezes (TOMASSINI *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003).

Sua ocorrência vai do Pará até o Rio de Janeiro. Popularmente é conhecida no Brasil por camapu, camambu, camaru, bucho de rã, joá ou juá de capote e mata-fome, e por lulucai na Cochinchina. A *Physalis angulata*, Linné (*P. arenaria* Hort., *P. dúbia* Lk., *P. flexuosa* Russ., *P. ixorcarpa* Hort., *P. linkiana* Ness) é uma erva ramosíssima e lisa, de caule verde; folhas longo-pecioladas, ovado-oblongas, agudas; flores amarelas, pequenas, sem mácula e com anteras azuladas ou violáceas; fruto baga verde-amarelado com o cálice 4-anguloso cobrindo-o totalmente; semente rufescente com minúsculas pontuações (CORRÊA, 1978c).

2.4.3.2. Fitoquímica

No gênero *Physalis* são encontradas uma variável e extensa presença de constituintes químicos, incluindo flavonóides simples ou glicosilados (campferol, quercetina, rutina, com uma, duas ou três unidades de açúcares); esteróides (β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, 24-metileno-colesterol, dentre outros); ácidos graxos de cadeia linear (C_6 a C_{24}), hidroxilados, epoxidados; carotenóides; ácido ascórbico e alcalóides (BASEY *et al.*, 1992; TOMASSINI *et al.*, 2000).

As fisalinas correspondem ao grupo de moléculas que têm sido isoladas em maior quantidade e variedade da *Physalis* sp. Estas foram caracterizadas como derivados esteroidais do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano, carbonilados em C -15 (VASINA, *et al.*, 1986, MAKINO *et al.*, 1995).

Dessa espécie já foram isoladas e identificadas várias substâncias com propriedades biológicas. Em pesquisa desenvolvida por Shingu e colaboradores (1992) foram obtidas do extrato metanólico das folhas frescas e do caule da *Physalis angulata*, Linné três vitaesteróides nomeadas de fisagulinas A, B e D.

2.4.3.3. Farmacologia e Toxicologia

A seiva produzida pela espécie é calmante e depurativa, útil contra reumatismo, e os frutos são comestíveis desobstruentes, resolventes e diuréticos (CORRÊA, 1978c).

A presença da acetilcolina foi encontrada nos frutos da *Physalis angulata*, sua identificação foi baseada nas seguintes observações: contração isotônica no reto anterior do sapo, efeito inotrópico e cronotópico negativo no coração isolado de sapo e contração isotônica no jejuno de rato (MELO *et al*, 1985).

Um novo flavonóide glicosilado, o miricetin-*O*-neoesperidosídeo foi isolado do extrato metanólico das folhas do camapu. Este composto apresentou uma notável citotóxicidade *in vitro* contra as células P-388 na leucemia, frente as KB-16 da nasofaringe no carcinoma epidermóide e nas A-549 no adenocarcinoma de pulmão com valores da Dose efetiva média (DE₅₀) de 0,048; 0,50 e 0,55 µg/ml⁻¹, respectivamente (ISMAIL, 2001).

Em pesquisa desenvolvida por Soares e colaboradores (2003) foi demonstrado que as fisalinas purificadas de extratos da *Physalis angulata* apresentaram atividade supressora em culturas de macrófagos estimuladas com lipopolissacarídeos e interferon-γ. A administração das fisalinas B, F ou G preveniu a morte induzida em camundongos após a injeção letal de lipopolissacarídeos. Estes resultados demonstraram que estas substâncias são potentes imunomoduladores.

O extrato hidroalcoólico obtido das folhas do camapu foi testado *in vitro*, quanto a sua possível ação contra a gonorréia. A espécie apresentou um halo de inibição de aproximadamente 9 mm frente a cepas da *Neisseria gonorrhoeae* penicilino-resistentes, demonstrando assim sua efetividade no tratamento da gonorréia (CÁCERES *et al*, 1995).

Em estudo realizado por Drummond e colaboradores (2000) foi avaliada a atividade antimicrobiana dessa espécie. Foram utilizando extratos e frações de extratos obtidos dos seus frutos e raízes. Foi verificado que as frações do extrato obtidas com butanol, diclorometano e acetato de etila apresentaram atividade frente à cepa ATCC 6538 de *Staphylococcus aureus*, quando comparados ao controle.

O potencial antibacteriano do extrato metanólico obtido das flores da espécie foi evidenciado contra a cepa da bactéria *Streptococcus mutans*, uma das principais causadoras da cárie dentária (HWANG *et al.*,2004).

Em outro trabalho, verificou-se que os extratos aquosos e metanólicos da *Physalis angulata*, Linné inibiram o crescimento do *Staphylococcus aureus* e da *Escherichia coli* (SANCHES *et al.*,1997, SILVA *et al.*, 1999). No ensaio de difusão em meio Agar, a

fisalina B (200 µg/ml) isolada da *Physalis angulata*, provocou uma inibição de 80% sobre o *Staphylococcus aureus* (SILVA *et al.*, 2005).

Uma atividade tripanossomicida presente nos extratos de *Physalis angulata*, Linné foi descrita por Freiburghaus e colaboradores (1996). Os autores apresentaram em seus resultados um IC₅₀ abaixo de 1mg/ml, mostrando assim um índice de seletividade superior a produtos farmacêuticos aplicados nas tripanossomíases. Extratos utilizando acetona, acetato de etila e metanol a partir das folhas, talos e raízes da espécie, foram analisados quanto as suas atividades contra a *Biomphalaria tenagophila*, todos demonstraram resultados positivos para a atividade moluscicida (SANTOS *et al.*, 2003).

Em trabalho realizado por Choi e Hwang (2003) foi demonstrado que o extrato metanólico das flores da *P. angulata*, exibiu ação antiinflamatória frente ao modelo de edema de pata induzido por carragenina, no edema de orelha induzido por ácido araquidônico e na artrite induzida por formaldeído, bem como propriedades antialérgicas na reação de hipersensibilidade por contato induzido por 2,4-dinitrofluorbenzeno.

O extrato aquoso obtido das raízes dessa espécie produziu marcante ação antinociceptiva na dor visceral induzida por ácido acético, como também, na dor produzida no processo inflamatório induzido por formalina. O tempo de latência dos animais tratados com o extrato foi significativamente aumentado no ensaio de chapa aquecida, caracterizando sua ação analgésica (BASTOS *et al.*, 2005).

O extrato etanólico preparado, utilizando a planta inteira apresentou uma significativa atividade antihepatoma frente às células de hepatoma humano Hep G2, Hep 3B e PLC/PRF/5, além de não causar efeitos citotóxicos em células (BALB/C) saudáveis de fígado de ratos (WU *et al.*, 2004).

2.4.4. *Cereus peruvianus*

2.4.4.1. Botânica

A *Cereus peruvianus* Mill, pertencente à família das Cactáceas, popularmente é conhecida no Brasil por mandacaru e urumbeva, “torch thistle”, na Inglaterra e “cierge du perou”, na França. As cactáceas são plantas características de regiões áridas e desérticas,

desta forma estão amplamente presentes na vegetação de caatinga característica do semi-árido do Nordeste do Brasil. O mandacaru é uma planta arborescente, alcançando até 8m de altura, de ramos lenhosos em forma de candelabro, sulcados e com arestas e acúleos agrupados; flores grandes, brancas ou róseas, com sépalas verdes; fruto, baga ovóide, purpúreo. Sua ocorrência se estende desde o Piauí até São Paulo e Mato Grosso. Ocupa o segundo lugar entre os cactos gigantes. Apresenta a variedade *variegatus* Hort, que se distingue por ter manchas amarelas no caule (CORRÊA, 1978d).

2.4.4.2. Fitoquímica

As cactáceas têm atraído à atenção de cientistas devido à ampla variedade de compostos biologicamente ativos, como alcalóides, saponinas, esteróides, triterpenos, glicosídeos, gorduras, óleos e ceras presentes nestas espécies (HUGHES; RAMOS; MOYNA, 1980; DE OLIVEIRA; DA SILVA, 2003).

A maioria das plantas xerófitas produz sementes que são excelentes fontes de óleo. Da mesma forma, a cutícula que envolve a superfície externa dessas plantas é rica em ceras de ésteres, tornando-as impermeáveis à água. Durante a época das chuvas os cactos absorvem boa quantidade de água, a qual é conservada em seu interior, a existência desta camada cerosa que envolve a planta favorece a sua sobrevivência frente às condições adversas encontradas no ambiente de deserto (DEMBITSKY E REZANCA 1995).

Em pesquisa fitoquímica realizada por Kringstad (1980) foi encontrado o ácido cereptárico, presente em grande quantidade nessa espécie. No mesmo ano, Kringstad e colaboradores identificaram na mesma espécie de cactaceae o ácido 2-c-metilaldotetrônico. No caule da *Cereus peruvianus* Mill foi identificado ainda a presença do ácido fórbico (NORDAL; KROGH; OGNER, 1965).

Em trabalho realizado por Dembitsky e Rezanca (1995) foram detectados vários compostos presentes nesta cera produzida pela *C. peruvianus*. Em sua maioria são ésteres alquilados com cadeia carbônica longa (C₂₆ a C₅₈). Estas ceras esterificadas são compostas principalmente por álcoois e ácidos graxos. Já foram identificados mais de 600 isômeros desses ésteres cerídeos presentes nas folhas da espécie. Os mesmos autores dois anos

depois encontraram mais 80 novos ésteres alquilados com cadeia muito longa (C₆₂) presentes na cera da mesma espécie vegetal (REZANCA; DEMBITSKY, 1997).

2.4.4.3. Farmacologia e Toxicologia

A medicina popular tem utilizado a raiz e o caule dessa planta como cardiotônica, peitoral para bronquite, antiescorbútica, cicatrizante, deterativa, vermífuga, contra perturbações hepáticas e renais, reumatismo, febre gástrica e biliosa, afecções pulmonares, tosse persistente, úlcera sórdida e tumor glandular (CORRÊA, 1978; SEPLANTEC, 1979).

Com pedaços do caule, cortados transversalmente, faz-se um doce, apreciado no interior do Brasil. Extraída a casca, é comido cru; em épocas de escassez; nessa ocasião queimados os acúleos ou espinhos, serve de forragem para o gado. Seu fruto é comestível. Plantado em linhas a pequenas distâncias um do outro serve para cercar fazendas e pastagens (CORRÊA, 1978).

O fruto produzido pela *Cereus peruvianus* Mill. tem sido responsável pelo desenvolvimento de algumas pesquisas ligadas ao cultivo, manejo e melhor aproveitamento desta espécie. Isto tem ocorrido principalmente em Israel, já que neste país o consumo da fruta é bastante apreciado, apresentando uma significativa importância comercial (NINIO *et al.*, 2003; SITRIT *et al.*, 2004).

O produto fitoterápico Sanativo® apesar de seu uso tradicional, com mais de um século de comercialização, não possui estudos sistematizados com a associação dos quatro vegetais que descrevam a sua atividade sobre o processo de cicatrização, bem como sua segurança de uso. Neste contexto, a verificação da atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica deste fitomedicamento deve ser considerada como uma etapa importante do processo para avaliar sua eficácia e segurança.

3. Objetivo

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Verificar a atividade cicatrizante e avaliar a toxicidade pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

3.2. Específico

- Verificar a atividade cicatrizante do fitoterápico Sanativo® no modelo de ferida aberta em dorso de rato.
- Estimar o valor de DL₅₀ em ratos de ambos os sexos por via oral.
- Investigar o efeito da administração subcrônica do Sanativo® sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos de ambos os sexos.
- Avaliar o efeito da administração subcrônica do Sanativo® sobre a morfologia e massa dos tecidos em ratos de ambos os sexos.

4. Artigo I

Artigo submetido à *Acta Farmacêutica Bonaerense*

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®

Healing Activity and Pre-Clinical Toxicologic Study of Phytotherapeutic Sanativo®

Cristiano Ribeiro de LIMA¹, João Henrique da COSTA-SILVA¹, Mariana M.A. LYRA¹,
Alice V. ARAÚJO⁴, Viviane M. ARRUDA¹, Gustavo S. DIMECH², Liriane
BARATELLA-EVÊNCIO³, Maria do Carmo C.A. FRAGA⁴, Simone S.L. LAFAYETTE⁴,
Almir Gonçalves WANDERLEY^{4*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
PE, Brasil.

²Hospital da Aeronáutica, Recife, PE, Brasil.

³Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
PE, Brasil.

⁴Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
PE, Brasil.

RESUMO. A atividade cicatrizante de ferida do Sanativo® (SAN) e os possíveis efeitos tóxicos da sua administração subcrônica foram avaliados em ratos. O SAN reduziu significativamente a área das feridas abertas no dorso dos ratos. Na toxicidade subcrônica, o SAN na dose de 1,675g/kg reduziu significativamente o ganho de massa corporal das ratas apenas na primeira semana de administração. O SAN produziu alterações significativas pontuais nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, embora dentro da faixa de referência para espécie. A análise histológica dos tecidos não mostrou alteração.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

Em conclusão, o Sanativo® possui significativa propriedade cicatrizante no modelo avaliado e baixa toxicidade em ratos Wistar.

PALAVRAS-CHAVE: Sanativo®, Atividade cicatrizante, Toxicologia pré-clínica.

SUMMARY. The wound healing activity of phytotherapeutic Sanativo® (SAN) and the possible hazard effects of the subchronic administration of SAN were evaluated in rats. SAN induced significant decrease in the area of the open wound in the rat dorsum. In the sub-chronic toxicity studies, SAN in doses of 1,675g/kg, decreased the gain in body mass, but this was significant only in the first week of administration. SAN produced only a few significant alterations in the hematological and biochemical parameters, although without dose-response correlation and were within the parameters of this species. The histological analysis of the tissues did not show changes. In conclusion, Sanativo® possesses significant healing property in the open wound model and low toxicity in Wistar rats.

KEY WORDS: Sanativo®, Healing activity, Pre-clinical toxicology.

INTRODUÇÃO

O Sanativo® (SAN) é um medicamento fitoterápico composto, de uso tradicional na região Nordeste do Brasil, utilizado sob a forma de um extrato fluido. Sua fórmula é constituída por angico - *Piptadenia colubrina* Benth (20%), aroeira - *Schinus terebinthifolius* Raddi (20%), camapu - *Physalis angulata* Linné (1,7%) e mandacaru - *Cereus peruvianus* Miller (1,7%). A ação terapêutica do produto é atribuída às propriedades medicinais dos vegetais que fazem parte da sua composição. A presença do angico está relacionada a uma ação hemostática e cicatrizante^{1,2}, e, devido à propriedade adstringente, desta espécie, o SAN vem sendo aplicado no tratamento de feridas, queimaduras, inflamações de garganta e de tecidos epiteliais lesionados. A aroeira possui atividade antiinflamatória e antimicrobiana^{3,4}, sendo o extrato hidroalcoólico da sua entrecasca empregado no tratamento de feridas da pele, gastrites, úlceras gastroduodenais e infecções urogenitais^{5,6,7}. Ao camapu são atribuídas propriedades sedativa, depurativa, antiinflamatória e antireumática^{8,9}. Já o mandacaru produz a assepsia necessária nas regiões lesionadas, devido às ações deterativas. Tendo em vista a inexistência de estudos sistematizados que descrevam a eficácia e segurança da utilização da associação destas espécies vegetais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade cicatrizante, bem como os possíveis efeitos tóxicos da administração subcrônica do Sanativo® em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

O material botânico utilizado corresponde: a cascas do caule da *Piptadenia colubrina* Benth (n°38.384) e da *Schinus terebinthifolius* Raddi (n° 8758), a planta inteira da *Physalis angulata* Linné (n° 18.109) e ao caule da *Cereus peruvianus* Miller (n° 23.763). Todas as

espécies foram identificadas no Herbário Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, onde encontram-se depositadas amostras com seus respectivos n° de registro.

Preparação do Produto Fitoterápico

Os extratos hidroalcoólicos utilizados (angico a 50%, aroeira a 50%, camapu a 20% e mandacaru a 20% em etanol 70°GL) foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório Laperli-PE, Brasil. Em nosso laboratório, estes extratos foram concentrados em rota evaporador, sob pressão reduzida, e em seguida liofilizados. O material obtido foi estocado a -20°C. No momento da utilização foram pesados, associados na mesma proporção do produto acabado: angico (20%), aroeira (20%), camapu (1,7%) e mandacaru (1,7%), e suspensos em água destilada.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. *albinus*, entre 3-5 e 2-4 meses de idade, respectivamente para machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos em condições controle de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, processo n° 23076.005975/2005-69.

Atividade Cicatrizante

Vinte e quatro animais (n=8/grupo) de ambos os sexos foram aleatoriamente divididos nos grupos controle (NaCl 0,9%), controle positivo (fibrinase®, Cristália), e SAN a 4% para o teste de cicatrização. Em cada animal, foi induzida uma ferida de acordo com o seguinte procedimento: o animal foi anestesiado com pentobarbital sódico (35mg/kg, i.p.) e, em seguida, em local pré-determinado do dorso, foi realizada uma tricotomia digital e posteriormente uma incisão com auxílio de bisturi e gabarito de plástico de 4cm² de área sendo retirada a pele, segundo metodologia adaptada de Hunt e colaboradores¹⁰ e Da Silva¹¹. Após a cirurgia, cada animal foi mantido em gaiola individual até o final do experimento. Os animais foram tratados diariamente (duas vezes ao dia), durante 24 dias consecutivos, com aplicações tópicas do SAN a 4% na forma de spray e fibrinase® na forma de pomada em quantidade suficiente para cobrir a ferida. A área da lesão foi estimada por planimetria, em intervalos de 2 dias, sendo considerada como 100% a lesão inicial de 4 cm².

Toxicidade Subcrônica

Quatro grupos de ratas (n=10/grupo) foram tratados durante 30 dias consecutivos com SAN, por via oral, nas doses de 0,067; 0,335; 1,675g/kg e água destilada (controle, C). Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e os grupos avaliados diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade: consumo de água, de ração e atividade comportamental. Ao final do tratamento os animais foram submetidos a um jejum de 14h e, sob anestesia etérea, procedeu-se à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro¹². O sangue foi coletado em um tubo

contendo EDTA, para avaliação dos parâmetros hematológicos, e um tubo sem o anticoagulante, para avaliar os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros Hematológicos

Na avaliação hematológica, os parâmetros: eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta, através do analisador automático de células hematológicas Coulter STKS. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram contadas¹³.

Parâmetros Bioquímicos

Para determinação bioquímica, o sangue coletado foi centrifugado a 3500 rpm, durante 10 minutos, para obtenção do soro. Em seguida, os níveis de: glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, cloreto, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamiltanspeptidase (GGT), colesterol total, HDL, triglicérides, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta, proteínas totais e albumina foram determinados através do analisador automático Cobas Miras (Roche) com sistemas comerciais da Labtest^{®13}.

Análise morfológica macro e microscópica

Após a coleta do sangue, procedeu-se à eutanásia por aprofundamento da anestesia etérea e à necrópsia para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos. O fígado, rins, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestinos, ovário, útero, baço e glândulas adrenais

foram cuidadosamente removidos, dissecados e tiveram suas massas úmidas determinadas em balança analítica, Gehaka modelo BG 440, a qual foi expressa em termos de massa relativa g/100g¹³. A análise histopatológica foi realizada em 4 animais selecionados aleatoriamente do grupo tratado com a maior dose (1,675g/kg) do SAN e em 4 animais pertencentes ao grupo controle. Os animais foram perfundidos via transcardíaca com formaldeído 10% em solução tampão neutra e, em seguida, os mesmos órgãos do procedimento anterior foram removidos, imersos em líquido de Bouin e fixados “*in totum*” durante 48 horas, à temperatura ambiente. As lâminas histológicas foram processadas convencionalmente para inclusão em parafina de acordo com Lison¹⁴, coradas em hematoxilina/eosina e montadas em Entellan.

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida por Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5%.

RESULTADOS

Atividade Cicatrizante

A Figura 1 mostra que o SAN a 4% produziu diminuição estatisticamente significativa da área da ferida aberta ($4\text{cm}^2 = 100\%$), do 6º ao 16º dia de aferição, quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença significativa quando o resultado obtido pelo SAN foi comparado ao grupo tratado com a fibrinase® (controle positivo).

Ganho de massa corporal

No tratamento subcrônico, o ganho de massa corporal das ratas dos grupos tratados e controle é mostrado na Figura 2. A administração do SAN reduziu o ganho de massa corporal, como também o consumo de ração (dados não apresentados), nas ratas tratadas com a maior dose de SAN (1,675g/kg). Esta diminuição foi estatisticamente significativa apenas na 1^a semana de tratamento. Nenhum outro sinal clínico de toxicidade foi observado e não foram registradas mortes.

Análises Hematológica e Bioquímica

O tratamento oral subcrônico com SAN nas ratas, produziu modificações significativas pontuais nos parâmetros hematológico e bioquímico (Tabelas 1 e 2). Contudo, essas alterações permaneceram dentro das faixas de referência para espécie¹⁵.

Avaliação morfológica

A análise macroscópica externa dos órgãos não revelou qualquer alteração. A massa relativa dos tecidos (Tabela 3) também não foi alterada pela administração do SAN, com exceção de um aumento nas massas do estômago e ovário nos animais tratados com a dose de 1,675g/kg. A análise microscópica não evidenciou alterações histológicas nos órgãos avaliados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No ensaio da cicatrização os resultados revelaram que o SAN a 4% possui uma atividade significativa na promoção da cura de lesões cutâneas no modelo de ferida aberta. Isto foi

evidenciado pela melhor cicatrização observada entre o 6º e o 16º dia, quando, praticamente, observou-se à completa re-epitelialização da área lesionada. A cicatrização é um processo biológico natural, através do qual tecidos danificados tentam restabelecer sua integridade. Entretanto, fatores de risco como infecções ou reações inflamatórias excessivas podem comprometer o processo de reparo¹⁶. Esse efeito apresentado pelo SAN possivelmente ocorreu devido à ação de taninos, presentes em altas concentrações nas espécies vegetais que fazem parte da sua composição, particularmente o angico e a aroeira, que possuem cerca de 7 e 14% de taninos em suas entrecascas, respectivamente^{16,17}. Resultados semelhantes têm sido relatados em trabalhos anteriores com a utilização de extratos de plantas ricas em taninos em processos de cicatrização^{16,18,19}. Os taninos são compostos fenólicos do metabolismo secundário vegetal, sendo amplamente empregados na medicina tradicional no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações²⁰. O poder anti-séptico dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas dos tecidos, formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, impedindo, assim o desenvolvimento de microrganismos²¹. Com relação aos efeitos tóxicos, observou-se, através do teste subcrônico, uma redução no ganho de massa corporal nas ratas que foram tratadas com a maior dose (1,675g/kg) do SAN. Este efeito foi estatisticamente significativo na 1ª semana de tratamento. A presença de taninos na dieta de animais experimentais tem sido descrita na literatura como causadora de redução do consumo de alimento, da taxa de crescimento, da eficiência nutricional e da digestão de proteínas^{22,23}. Em estudo realizado por Vallet e colaboradores²⁴, ratos alimentados com dieta rica em taninos de sementes de uva apresentaram redução no ganho de massa corporal, bem como na digestão de proteínas e de matéria seca. Resultado semelhante foi obtido por Ortiz e

colaboradores²⁵ utilizando ratos e galinhas alimentados com dietas contendo extrato tanínico seco de feijões da *Vicia Faba* L. Al-Mamary e colaboradores²⁶ também observaram esse efeito em coelhos submetidos a dieta contendo grãos de sorgo ricos em taninos. É possível que o menor ganho de massa corporal observado no presente trabalho esteja relacionado com a alta concentração de taninos na composição do SAN. Em relação à avaliação dos órgãos, verificou-se um aumento nas massas do estômago e do ovário, na dose de 1,675 g/kg. Este dado, entretanto, não está correlacionado com nenhuma alteração histopatológica. Quanto aos resultados das variáveis sanguíneas, foram observadas alterações estatisticamente significativas em ratas tratadas com as doses de 0,335 e 1675g/kg do SAN, quando comparados com as ratas controle. Contudo, as flutuações encontradas não apresentaram uma correlação dose-resposta e estão dentro dos valores de referência para a espécie^{15,27}, sugerindo não estarem associadas ao tratamento com SAN. Com base nos resultados apresentados e dentro da concepção técnica dos estudos toxicológicos pré-clínicos, conclui-se que o produto fitoterápico Sanativo® apresenta uma significativa propriedade cicatrizante em tecidos epiteliais lesionados e um baixo grau de toxicidade pré-clínica.

Agradecimentos

Ao Laboratório Laperli-PE e ao apoio técnico de Rejane de Souza Silva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corrêa, M.P. (1926/78) “Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas”, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, págs. 490-2.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

2. Monteiro, J.M., U.P. Albuquerque, E.M.F. Lins-Neto, E.L. Araújo & E.L.C. Amorim (2005) J. Ethnopharmacology, article in press.
3. Jain M.K., B.Z. Yu, J.M. Rogers, A.E. Smith, E.T.A. Boger, R.L. Ostrander & A.L. Rheingold (1995) Phytochemistry 39:537-547.
4. Martinez, M.J., J. Betancourt, N. Alonso-González & A. Jauregui (1996) J. Ethnopharmacology 52:171-4.
5. Abreu Matos, F.J. (2002) Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades, 4ª ed., Fortaleza, Editora UFC, págs. 86-8.
6. Queires, L.C.S. & L.E.A. Rodrigues (1998) Brazilian Archives of Biology and Technology 41 (2): 247-253.
7. Amorim, M.M.R. & L.C. Santos (2003) REGO 25 (2):95-102.
8. Tomassini, T.C.B., N.S. Barbi, I.M. Ribeiro & D.C.D. Xavier (2000) Quim. Nova 23 (1): 47-57.
9. Bastos, G.N.T., A.R.S. Santos, W.M.M. Ferreira, A.M.R. Costa, C.I. Bispo, A.J.A. Silveira & J.L.M. Do Nascimento (2005) J. Ethnopharmacology, article in press.
10. Hunt, T.R., H.P. Ehelich, J.A. Garcia & J.E. Dumphy (1969) Ann. Surg. 170:63-41.
11. Da Silva, L.B.L. (1999) “Preparação e avaliação biofarmacêuticas de formas semi-sólidas da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*, Raddi)”. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, págs. 46-47.
12. Waynforth, B.H. (1980) “Injection techniques”, en “experimental and Surgical Techniques in the Rat”, Londres: Academic Press, págs. 3-6.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

13. Silva, E.J.R., F.J.S. Aguiar, E.S. Gonçalves, I.M.V. Sousa, G.S. Dimech, M.C.C.A. Fraga, M.C.O.C. Coelho & A.G. Wanderley (2005) *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15 (2): 88-93.
14. Lison, L.A. (1960) "Histochemie et cytochemie animals", Paris, Gauthiers-Villars, pág. 842.
15. Harkness, S.E. & J.E. Wagner (1993) "Biologia e clínica de coelhos roedores", 3^a ed., São Paulo, Livraria Roca, págs. 48-55.
16. Lopes, G.C., A.C.C. Sanches, C.V. Nakamura, B.P.D. Filho, L. Hernandez & J.C.P. Mello (2005) *J. Ethnopharmacology* 99: 265-272.
17. Borio, E.B.L., C. Cecy & Y. Yasumoto (1973) *Cienc. Cult.* 25 (7): 631-4.
18. Rane, M.M. & S.A. Mengi (2003) *Fitoterapia* 74: 553-8.
19. Fernandez, O., J.Z. Capdevila, G. Dalla & G. Melchor (2002) *Fitoterapia* 73: 564-8.
20. Bruneton, J. (1991) "Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia", Espanha, Ed. Acribia, págs. 176-184.
21. Haslam, E. (1996) *J. Nat. Prod.* 59: 205-215.
22. Butler, L.G. (1992) *Basic Life Sci* 59: 693-8.
23. Chung, K.T., T.Y. Wong, C.I. Wei, Y.W. Huang & Y. Lin (1998) *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 38: 421-64.
24. Vallet, J., J.M. Rouanet & P. Besancon (1994) *Ann Nutr Metab* 38: 75-84.
25. Ortiz, L.T., C. Alzuet, J. Trevino & M. Castanho (1994) *Br Poult Sci* 35 (5): 743-54.
26. Al-Mamary, M., M. Al-Habori, A. Al-Aghbari & A. Al-Obeidi (2001) *Nutrition research* (21):1393-1401.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

27. Kaneko, J.J., J.W. Harvey & M.L. Brus (1997) “Clinical biochemistry of domestic animais”. 5^a ed., San Diego, Academic Press, pág .932.

Tabela 1. Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas, tratadas por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	SAN 0,067g/kg	SAN 0,335g/kg	SAN 1,675g/kg
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	7,1 ± 0,2	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,2*	8,4 ± 0,3*
Hemoglobina (g/dL)	14,1 ± 0,4	15,2 ± 0,4	15,1 ± 0,4	15,2 ± 0,1
Hematócrito (%)	41,3 ± 1,0	43,0 ± 1,0	45,2 ± 1,2	46,8 ± 2,0*
VCM (fL)	58,7 ± 0,9	56,6 ± 0,4	56,7 ± 0,6	55,1 ± 0,4*
HCM (pg)	19,9 ± 0,3	20,0 ± 0,2	18,6 ± 0,7	18,3 ± 0,6
CHCM (g/dL)	34,1 ± 0,3	35,4 ± 0,4	29,7 ± 1,9*	32,9 ± 1,2
Plaquetas (10 ³ /μL)	1028,3 ± 41,6	927,0 ± 33,3	804,0 ± 80,3*	1047,0 ± 61,3
Leucócitos (10 ³ /μL)	8,5 ± 0,9	8,0 ± 0,6	11,4 ± 0,5*	7,9 ± 0,6
Bastonetes (%)	0	0	0	0
Neutrófilos (%)	28,1 ± 1,1	26,8 ± 1,8	36,4 ± 2,6*	23,9 ± 1,5
Eosinófilos (%)	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,2
Basófilos (%)	0	0	0	0
Linfócitos típicos (%)	67,0 ± 1,0	68,6 ± 1,7	57,0 ± 2,9*	71,3 ± 1,7
Linfócitos atípicos (%)	0	0	0	0
Monócitos (%)	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3	4,8 ± 0,4*	3,6 ± 0,2

Os valores representam a média ± E.P.M. de 10 animais obtidos em aparelho Coulter, modelo STKS.

VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p< 0,05).

Tabela 2. Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas, tratadas por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	SAN 0,067g/kg	SAN 0,335g/kg	SAN 1,675g/kg
Glicose (mg/dL)	92,9 ± 2,8	98,4 ± 2,8	90,4 ± 3,6	87,7 ± 3,6
Uréia (mg/dL)	34,2 ± 3,0	32,1 ± 3,6	30,0 ± 2,9	36,7 ± 4,7
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,03	0,7 ± 0,02	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,05
Ácido úrico (mg/dL)	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1 *	2,8 ± 0,1 *
Sódio (mEq/L)	139,2 ± 0,4	138,0 ± 0,4	136,9 ± 0,2 *	138,1 ± 0,6
Potássio (mEq/L)	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,8 ± 0,1 *	4,8 ± 0,1 *
Cloreto (mEq/L)	102,6 ± 0,4	101,1 ± 0,4	102,8 ± 0,8	102,1 ± 0,7
AST (U/L)	204,2 ± 10,6	217,8 ± 17	217,9 ± 16,9	177,6 ± 10,8
ALT (U/L)	48,3 ± 4,7	51,4 ± 4,1	55,3 ± 6,9	47,6 ± 7,1
GGT (U/L)	5,4 ± 0,2	5,7 ± 0,1	6,0 ± 0,1 *	5,9 ± 0,1 *
Colesterol total (mg/dL)	71,9 ± 3,1	82,6 ± 5,9	67,5 ± 4,7	62,7 ± 3,3
HDL	20,6 ± 0,8	20,0 ± 1,7	18,3 ± 1,18	16,3 ± 1,0
Triglicerídeos (mg/dL)	112,2 ± 6,2	111,0 ± 7,3	105,9 ± 5,5	118,7 ± 4,6
Fosfatase alcalina (U/L)	291,7 ± 16,9	390,1 ± 36,4	397,1 ± 47,2	423,8 ± 49,7
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,23 ± 0,07	0,20 ± 0,03
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Proteínas totais (g/dL)	7,1 ± 0,4	7,4 ± 0,9	7,5 ± 0,2	7,3 ± 0,3
Albumina (g/dL)	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,7 ± 0,1	5,6 ± 0,2

Os valores representam a média ± E.P.M. de 10 dosagens obtidas em aparelho automático Cobas Miras (Roche) com sistemas comerciais da Labtest®.

* Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05)

Tabela 3: Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), administrados por via oral a ratas Wistar adultas sobre a massa dos órgãos (g/100g), tratadas por 30 dias consecutivos.

Órgãos	Controle	SAN 0,067g/kg	SAN 0,335g/kg	SAN 1,675g/kg
Fígado	3,21 ± 0,13	3,20 ± 0,13	3,34 ± 0,11	3,40 ± 0,21
Rim	0,33 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Pulmão	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,59 ± 0,05
Coração	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Esôfago	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Estômago	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,60 ± 0,03*
Intestinos	2,66 ± 0,12	2,55 ± 0,19	2,80 ± 0,17	2,90 ± 0,21
Ovários	0,014 ± 0,001	0,012 ± 0,003	0,013 ± 0,001	0,020 ± 0,002*
Útero	0,22 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,03
Baço	0,24 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,01
Adrenal	0,012 ± 0,003	0,014 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,001

Os valores estão expressos em termos de massa relativa g/100g e representam a média ± E.P.M. de 6 animais. As vísceras foram cuidadosamente removidas após a eutanásia por aprofundamento de anestesia etérea. Em seguida, dissecadas e determinada suas massas úmidas em balança analítica, Gehaka modelo BG 440.

* Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$)

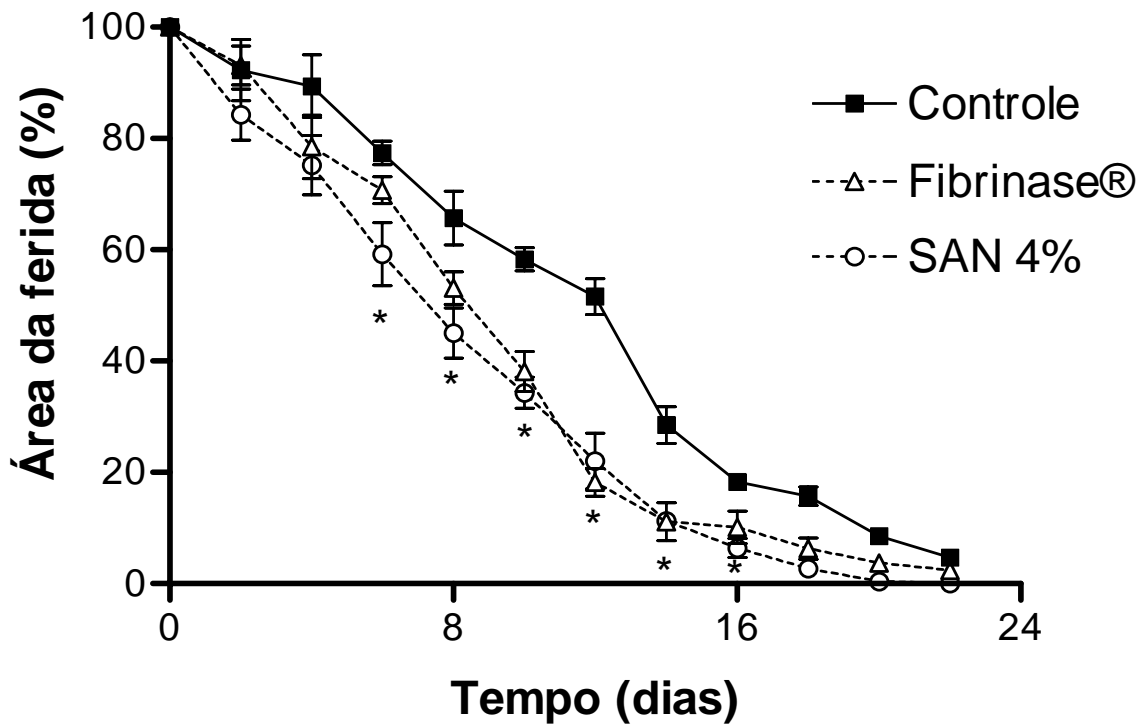


Figura 1: Efeito tópico do Sanativo® (SAN) a 4% na cicatrização de ferida aberta (área de lesão 4cm²) induzida cirurgicamente no dorso de ratos Wistar. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=8/grupo).

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p<0,05).

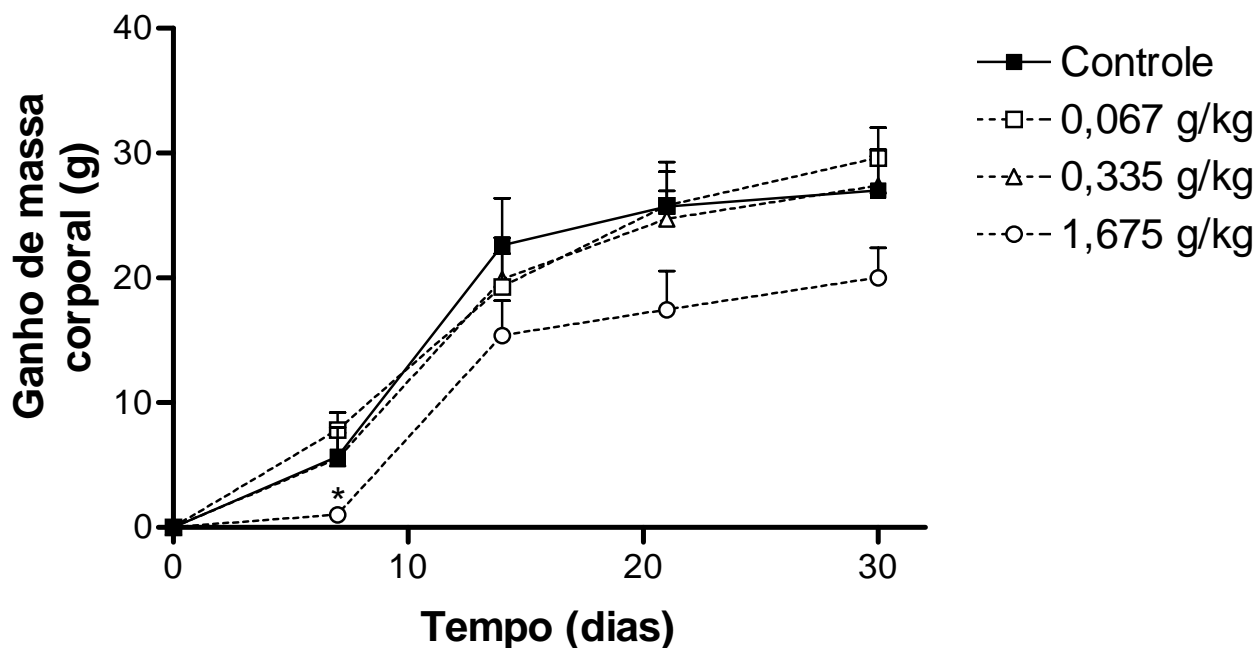


Figura 2. Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675g/kg), sobre o ganho de massa corporal administrado por via oral a ratas Wistar adultas, por 30 dias consecutivos. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n=10/grupo).

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5. Artigo II

Artigo submetido à *Revista Brasileira de Farmacognosia*

Avaliação Toxicológica Pré-clínica do Fitoterápico Sanativo® em Ratos Wistar

C. R. de Lima¹, J.H. da Costa-Silva¹, M.M.A. Lyra¹, L. Baratella-Evêncio², M.C.C.A. Fraga³, S.S.L. Lafayette³, A.G. Wanderley^{1,3}*

¹*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.*

²*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.*

³*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.*

RESUMO: Nos testes de toxicidade aguda, a administração do fitoterápico Sanativo® (SAN) por via oral não provocou morte nos animais que receberam doses de até 5 g/kg. O tratamento com SAN por 30 dias consecutivos produziu uma redução no ganho de massa corporal dos animais nas doses de 0,335 e 1,675 g/kg. As análises bioquímica e hematológica demonstraram variações pontuais estatisticamente significativas, porém todas permaneceram dentro da faixa de referência para a espécie. Não se observou diferença nas massas relativas e morfologia externa dos órgãos. A análise histológica dos diferentes órgãos não revelou qualquer alteração. Desta forma conclui-se que o Sanativo® possui baixa toxicidade.

Unitermos: Sanativo®, Hematologia, Bioquímica, Toxicidade aguda e subcrônica.

ABSTRACT: “Pre-Clinical Toxicological Evaluation of Phytotherapeutic Sanativo® in Wistar Rats”. In acute toxicity test, the Sanativo® (SAN) phytotherapeutic administration by oral route failed to cause death in the animals in doses of up to 5,0 g/kg. The treatment with SAN for 30 consecutive days produced a decrease in the animals body mass gain, at the doses of 0,335 and 1,675 g/kg. The biochemical and hematological analysis showed statistically significant punctual variations, but all of them remained on the reference rate to the species. There were no alterations in the relative weight and organs external morphology. The histological analysis of the various organs did not show any alteration. It is demonstrated that the product Sanativo® present low toxicity.

Keywords: Sanativo®, Acute and Subchronic toxicity, Hematology, Biochemistry.

INTRODUÇÃO

O Sanativo® (SAN) é um fitoterápico constituído a partir da associação dos extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais nativas da região Nordeste do Brasil. Na sua composição estão presentes 20% de angico (*Piptadenia colubrina*, Benth), 20% de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), 1,7% de camapu (*Physalis angulata*, Linné) e 1,7% de mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller). Este produto, apresentado na forma extrato fluido, é produzido pela empresa Laperli (Laboratório Pernambucano Ltda), tem seu efeito terapêutico relacionado às propriedades farmacológicas apresentadas pelas espécies vegetais que compõem sua fórmula. Ao angico é atribuída uma propriedade adstringente (Monteiro et al., 2005a). A ação da aroeira é direcionada a processos inflamatórios e infecções bacterianas (Jain et al., 1995; Martinez et al., 1996). O extrato hidroalcoólico da entrecasca da aroeira tem sido empregado no tratamento de feridas da pele, gastrites, úlceras gastroduodenais e infecções urogenitais (Queires; Rodrigues, 1998; Amorim; Santos, 2003). Com o camapu busca-se sua atividade balsâmica e analgésica. Ao infuso, preparado com as partes aéreas da planta, têm sido atribuídas propriedades sedativa, depurativa, antiinflamatória e antireumática (Tomassini et al., 2000; Bastos et al., 2005). E o mandacaru está presente devido sua propriedade anti-séptica, que é necessária em regiões lesionadas. No conjunto obtém-se um produto indicado no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações de garganta e de tecidos epiteliais lesionados. Apesar da sua ampla comercialização desde 1888, inexistem estudos sistemáticos que descrevam a segurança do uso da associação destas espécies vegetais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração aguda e subcrônica do Sanativo® em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Utilizou-se as cascas do caule da *Piptadenia colubrina* Benth (n°38.384) e da *Schinus terebinthifolius* Raddi (n° 8758), a planta inteira da *Physalis angulata* Linné (n° 18.109) e o caule da *Cereus peruvianus* Miller (n° 23.763). Todas as espécies foram identificadas no Herbário Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, onde se encontram depositadas amostras com seus respectivos n° de registro.

Preparação do Produto Fitoterápico

Os extratos hidroalcoólicos (angico a 50%, aroeira a 50%, camapu a 20% e mandacaru a 20%) foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório Pernambucano Ltda., Brasil. Em nosso laboratório, os extratos foram concentrados em rota evaporador, sob pressão reduzida, e em seguida liofilizados. O material obtido foi estocado a -20°C. No momento da utilização foram suspensos em água destilada e associados na mesma proporção do produto acabado: 20% de angico, 20% de aroeira, 1,7% de camapu e 1,7% de mandacaru.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. *albinus* entre 3-5 e 2-4 meses de idade respectivamente para machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos em condições controle de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2°C). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, processo n° 23076.005975/2005-69.

Toxicidade Aguda

Cinco grupos de ratos (n=8/grupo), de ambos os sexos, foram privados de ração por 14h, em seguida receberam em dose única, por gavagem, SAN nas doses de 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 g/kg ou água destilada no maior volume (grupo controle) para determinação da dose letal 50% (DL₅₀) de acordo com o método descrito por Litchfield e Wilcoxon (1945). Os animais foram observados diariamente quanto a alterações gerais de comportamento, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade durante um período de 14 dias.

Toxicidade Subcrônica

Quatro grupos de ratos (n=10 / grupo) foram tratados durante 30 dias consecutivos com SAN por via oral nas doses de 0,067; 0,335; 1,675g/kg e água destilada (controle, C). Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e os grupos avaliados diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade: consumo de água, ração e atividade comportamental (agressividade, passividade, movimentos estereotipados, piloreção). Ao final do tratamento os animais foram submetidos a um jejum de 14h e sob anestesia etérea procedeu-se a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital (Waynforth, 1980). O sangue foi coletado em dois tipos de tubo: um com o anticoagulante ácido etileno diamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e outro sem anticoagulante para os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros Hematológicos

Na avaliação hematológica os parâmetros: eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Coulter STKS. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram contadas (Silva et al., 2005).

Parâmetros Bioquímicos

Para determinação bioquímica, o sangue coletado foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, em seguida, determinados os níveis de: glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, cloreto, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamiltanspeptidase (GGT), colesterol total, HDL, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta, proteínas totais e albumina (Silva et al., 2005) através do analisador automático Cobas Miras (Roche) com sistemas comerciais da Labtest®.

Análise morfológica macro e microscópica

Após a coleta do sangue, procedeu-se à eutanásia por aprofundamento da anestesia etérea e necropsia para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos. O fígado, rins, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestinos, testículos, epidídimo, vesícula seminal, ducto deferente e glândulas adrenais foram cuidadosamente removidos, dissecados e tiveram suas massas úmidas determinadas em balança analítica (Gehaka modelo BG 440) a qual foi expressa em termos de massa relativa g/100g (Silva et al., 2005). A análise histopatológica foi realizada em 4 animais selecionados aleatoriamente do grupo tratado com SAN 1,675g/kg e do grupo controle. Os ratos foram perfundidos via transcardíaca com formaldeído 10% em solução tampão neutra e em seguida os órgãos foram retirados e

imersos em líquido de Bouin e fixados “*in totum*” durante 48 horas, à temperatura ambiente. As lâminas histológicas foram processadas convencionalmente para inclusão em parafina de acordo com Lison (1960), coradas em hematoxilina/eosina e montadas em Entellan.

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida por Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5%.

RESULTADOS

Toxicidade Aguda

O SAN em doses de até 5,0 g/kg, administradas por via oral a ratos de ambos os sexos não produziu morte durante um período de 14 dias de observação, impossibilitando o cálculo da dose letal média (DL₅₀). Os animais não mostraram sinais clínicos de toxicidade ou qualquer alteração comportamental, durante o período de observação. Não houve diferenças entre os grupos controle e tratado no consumo de água e ração.

Massa corporal

No tratamento subcrônico, o ganho de massa corporal dos animais é mostrado na Figura 1. A administração do SAN reduziu significativamente o ganho de massa corporal dos animais tratados com as doses de 0,335 e 1,675 g/kg em respectivamente, 28 e 55% quando comparado ao grupo controle, após 30 dias de tratamento. Foi observada uma redução no

consumo de ração dos ratos tratados com SAN nas doses de 0,335 e 1,675 g/kg (dados não apresentados). Nenhum outro sinal clínico visível de toxicidade foi registrado.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

O tratamento subcrônico com SAN não induziu modificações no perfil hematológico dos ratos, exceto por um aumento estatisticamente significativo verificado no valor de VCM nos animais tratados com a dose de 0,335 g/kg (Tabela 1). Observou-se também que o tratamento oral dos animais com SAN não alterou o perfil bioquímico (Tabela 2), exceto por um aumento estatisticamente significativo nos valores de uréia e albumina; e uma redução estatisticamente significativa para os valores de potássio e fosfatase alcalina, nas doses de 0,335 e 1,675 g/kg. Contudo, cabe salientar que todos os valores encontrados nos perfís hematológico e bioquímico permaneceram dentro da faixa de referência para a espécie (Harkness; Wagner, 1993).

Análise morfológica

A análise macroscópica externa dos órgãos não revelou qualquer modificação. A massa relativa dos tecidos (Tabela 3) também não foi alterada pela administração do SAN. Assim como, a análise microscópica não evidenciou alterações histológicas nos órgãos avaliados (dado não apresentado).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No ensaio de toxicidade aguda por via oral, o SAN demonstrou-se seguro, não revelando qualquer sinal de toxicidade no período avaliado. De acordo com Lorke (1983), substâncias com valores estimados de DL₅₀ superiores a 5,0 g/kg podem ser consideradas atóxicas e os

cálculos decorrentes aos resultados obtidos acima deste valor, imprecisos. O acompanhamento da massa corporal do animal, assim como a aferição da massa relativa dos órgãos são importantes indicadores para avaliação da toxicidade de uma substância (Jahn; Gunzel, 1997). No teste subcrônico, verificou-se que o SAN induziu redução no ganho de massa corporal nos ratos tratados com as doses de 0,335 e 1,675 g/kg. Relacionou-se inicialmente essa redução, há presença de altas concentrações de taninos no angico e na aroeira. A *Piptadenia colubrina* (Benth) e a *Schinus terebinthifolius* (Raddi) são descritas na literatura como sendo ricas em taninos, com o teor presente nas suas entrecascas estimados em 7 e 14%, respectivamente (Bório; Cecy; Yasumoto, 1973; Monteiro et al, 2005a). Vários estudos (Butler, 1992; Chung et al., 1998; Santos-Belga; Scalbert, 2000) têm demonstrado que animais monogástricos, tais como ratos e coelhos, quando submetidos a um regime nutricional rico em taninos podem vir a sofrerem redução: no ganho de massa corporal, do consumo de alimento, da eficiência nutricional e da digestão de proteínas. O efeito antinutricional dos taninos tem sido atribuído principalmente a sua capacidade de interagirem com proteínas, formando complexos insolúveis, e com metais, dando origem a quelatos (Santos-Belga; Scalbert, 2000). A presença de níveis elevados de taninos na dieta animal tem sido considerada indesejável, já que estes precipitam substratos protéicos ingeridos, inibem enzimas digestivas e afetam a utilização de vitaminas e minerais (Monteiro et al., 2005b). Os animais tratados com SAN possivelmente tiveram sua capacidade digestiva diminuída, conseqüentemente um menor aproveitamento de nutrientes, o que ocasionou uma redução no seu desenvolvimento normal. A ingestão de alimento também foi afetada. É possível que os animais tratados com SAN 1,675 g/kg, passaram a apresentar uma sensação de preenchimento estomacal, o que seria responsável por essa redução no consumo. Em estudo realizado por Vallet et al.

(1994), ratos alimentados com dieta rica em taninos de sementes de uva apresentaram redução no ganho de massa corporal, bem como na digestão de proteínas e de matéria seca. No mesmo ano, resultado semelhante foi obtido por Ortiz et al. (1994) com ratos e galinhas alimentados com dietas contendo extrato tanínico seco de feijões da *Vicia Faba* L. Em pesquisa desenvolvida por Al-Mamary et al. (2001) também foi observado redução no ganho de massa corporal, porém, desta vez em coelhos submetidos a dietas contendo grãos de sorgo ricos em taninos. A massa relativa, a macroscopia e microscopia dos órgãos analisados não apresentaram qualquer alteração tecidual ou indícios de processos inflamatórios. As flutuações encontradas na hematologia e bioquímica não apresentaram uma correlação dose-resposta e estão dentro dos limites de referência estabelecidos para a espécie (Harkness; Wagner, 1993; Kaneko; Harvey; Brus, 1997), o que sugere que estas variações não estão associadas ao tratamento com SAN. Baseados nos resultados obtidos, conclui-se que a administração subcrônica do SAN não altera a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados em ratos Wistar adultos, caracterizando o SAN como um fitoterápico seguro com baixo grau de toxicidade pré-clínica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Laperli-PE e a Rejane de Souza Silva e Maria de Fatima Nascimento Monteiro pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim MMR, Santos, LC 2003. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *REGO* 25 (2): 95-102.

Al-Mamary M, Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Obeidi A 2001. In vivo effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. *Nutrition research* (21):1393-1401.

Bastos GNT, Santos, ARS, Ferreira WMM, Costa AMR, Bispo CI, Silveira AJA, Do Nascimento JLM 2005. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. *J.Ethnopharmacology*, article in press.

Borio EBL, Cecy C, Yasumoto Y 1973. Pharmacognostic study of the bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Cienc Cult* 25 (7): 631-4.

Butler LG 1992. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. *Basic Life Sci* 59: 693-8.

Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y 1998. Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38: 421-64.

Harkness SE, Wagner JE 1993. *Biologia e clínica de coelhos roedores*. São Paulo, Livraria Roca.

Jain MK, Yu BZ, Rogers JM, Smith AE, Boger ETA, Ostrander RL, Rheingold AL 1995. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 39:537-547.

Jahn AI, Gunzel PKH 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol* 11 (2/3): 171-8.

Kaneko JJ, Harvey JW, Brus ML 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego, Academic Press.

Litchfield JT, Wilcoxon F 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Therap* 96: 99-113.

- Lison LA 1960. *Histochemie et cytochimie animals*. Paris, Gauthiers-Villars.
- Lorke D 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol* 54: 275-87.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins-Neto EMF, Araújo EL, Amorim ELC 2005a. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J.Ethnopharmacology*, article in press.
- Martinez MJ, Betancourt J, Alonso-González N, Jauregui A 1996. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J.Ethnopharmacology* 52:171-4.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC 2005b. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím. Nova* 28 (5): 892-6.
- Ortiz LT, Alzuate C, Trevino J, Castanho M 1994. Effects of Faba beans tannins on the growth and histological structure of the intestinal tract and liver of chicks and rats. *Br. Poult. Sci.* 35 (5): 743-54.
- Queires LCS, Rodrigues LEA 1998. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da Aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 41 (2): 247-253.
- Silva EJR, Aguiar FJS, Gonçalves ES, Sousa IMV, Dimech GS, Fraga MCCA, Coelho MCOC, Wanderley AG 2005. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15 (2): 88-93.
- Santos-Buelga C, Scalbert A 2000. Review – Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci Food Agric* 80: 1094-1117.
- Tomassini TCB, Barbi NS, Ribeiro IM, Xavier DCD 2000. Gênero *Physalis* – uma revisão sobre vitaesteróides. *Quim. Nova* 23 (1): 47-57.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

Vallet J, Rouanet JM, Besancon P 1994. Dietary grape seed tannins: effects of nutritional balance and on some enzymic activities along the crypt-villus axis of rat small intestine. *Ann Nutr Metab* 38: 75-84.

Waynforth BH 1980. Injection techniques. In: *experimental and Surgical Techniques in the Rat*. Londres: Academic Press.

Tabela 1. Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos, tratados por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	SAN 0,067 g/kg	SAN 0,335 g/kg	SAN 1,675 g/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,9 ± 0,1	8,9 ± 0,3	7,9 ± 0,3	8,4 ± 0,3
Hemoglobina (g/dL)	16,5 ± 0,4	17,1 ± 0,3	15,4 ± 0,5	15,2 ± 0,5
Hematócrito (%)	49,9 ± 0,8	51,8 ± 1,1	47,2 ± 1,4	46,8 ± 1,4
VCM (fL)	57,1 ± 1,0	56,5 ± 0,6	60,1 ± 1,6*	56,0 ± 0,6
HCM (pg)	18,5 ± 0,4	18,6 ± 0,2	19,2 ± 0,5	17,4 ± 0,6
CHCM (g/dL)	33,0 ± 0,5	32,9 ± 0,1	32,7 ± 0,1	31,0 ± 1,0
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	840,3 ± 59,0	889,2 ± 35,9	929,7 ± 36,2	883,3 ± 56,2
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	11,0 ± 0,8	10,5 ± 0,8	10,6 ± 0,9	10,0 ± 0,9
Bastonetes (%)	0	0	0	0
Neutrófilos (%)	23,3 ± 1,2	26,8 ± 1,9	22,4 ± 1,4	22,8 ± 2,8
Eosinófilos (%)	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Basófilos (%)	0	0	0	0
Linfócitos típicos (%)	71,3 ± 1,0	67,0 ± 2,3	72,4 ± 1,4	72,1 ± 2,7
Linfócitos atípicos (%)	0	0,1 ± 0,1	0	0
Monócitos (%)	4,1 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,3

Os valores representam a média ± E.P.M. (N=10 animais/grupo). VCM: Volume Corpuscular Médio,

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 2. Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos, tratados por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	SAN 0,067 g/kg	SAN 0,335 g/kg	SAN 1,675 g/kg
Glicose (mg/dL)	80,6 ± 6,0	79,7 ± 6,7	75,3 ± 8,0	88,0 ± 8,6
Uréia (mg/dL)	30,4 ± 2,3	33,0 ± 2,1	36,4 ± 1,3	38,4 ± 1,8*
Creatinina (mg/dL)	0,49 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,49 ± 0,04	0,57 ± 0,1
Ácido úrico (mg/dL)	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2
Sódio (mEq/L)	138,9 ± 0,6	139,4 ± 0,7	140,5 ± 0,9	135,6 ± 1,8
Potássio (mEq/L)	4,7 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,0 ± 0,1 *	4,7 ± 0,1
Cloreto (mEq/L)	102,8 ± 0,6	101,1 ± 0,6	103,6 ± 0,4	102,3 ± 0,4
AST (U/L)	160,1 ± 17,5	186,4 ± 19,3	145,7 ± 10,7	133,8 ± 11,2
ALT (U/L)	28,8 ± 3,0	33,0 ± 3,2	34,1 ± 4,7	33,1 ± 4,1
GGT (U/L)	48,7 ± 1,4	45,5 ± 1,3	47,3 ± 1,7	46,6 ± 4,0
Colesterol total (mg/dL)	45,9 ± 4,1	45,9 ± 5,5	41,8 ± 4,2	45,4 ± 5,1
HDL	16,0 ± 1,8	15,7 ± 1,7	12,0 ± 0,8	14,6 ± 1,6
Triglicerídeos (mg/dL)	88,6 ± 10,6	77,5 ± 7,7	64,5 ± 4,8	105,6 ± 9,0
Fosfatase alcalina (U/L)	82,2 ± 3,1	71,7 ± 2,6	65,5 ± 2,1*	63,4 ± 7,4*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2	0,2	0,2	0,2
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,1	0,1	0,1	0,1
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,1	0,1	0,1	0,1
Proteínas totais (g/dL)	6,7 ± 0,1	6,9 ± 0,1	6,8 ± 0,02	6,5 ± 0,1
Albumina (g/dL)	5,0 ± 0,09	5,2 ± 0,05	5,1 ± 0,05	5,4 ± 0,1*

Os valores representam a média ± E.P.M. (N=10 animais/grupo).

* Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p< 0,05)

Tabela 3: Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), administrados por via oral a ratos Wistar adultos sobre a massa dos órgãos (g/100g), tratados por 30 dias consecutivos.

Órgãos	Controle	SAN 0,067 g/kg	SAN 0,335 g/kg	SAN 1,675 g/kg
Fígado	3,16 ± 0,12	3,42 ± 0,15	3,29 ± 0,12	3,35 ± 0,24
Rim	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,03
Pulmão	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,04
Coração	0,34 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Esôfago	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Estômago	0,39 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,03
Intestinos	1,62 ± 0,15	2,00 ± 0,10	1,88 ± 0,10	2,01 ± 0,21
Testículo	0,39 ± 0,06	0,43 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,44 ± 0,01
Epidídimo	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Vesícula seminal	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,005	0,09 ± 0,006	0,09 ± 0,002
Ducto deferente	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,001
Baço	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,01
Adrenal	0,007 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,007 ± 0,001

Os valores estão expressos em termos de massa relativa g/100 g e representam a média ± E.P.M. de 6 animais.

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

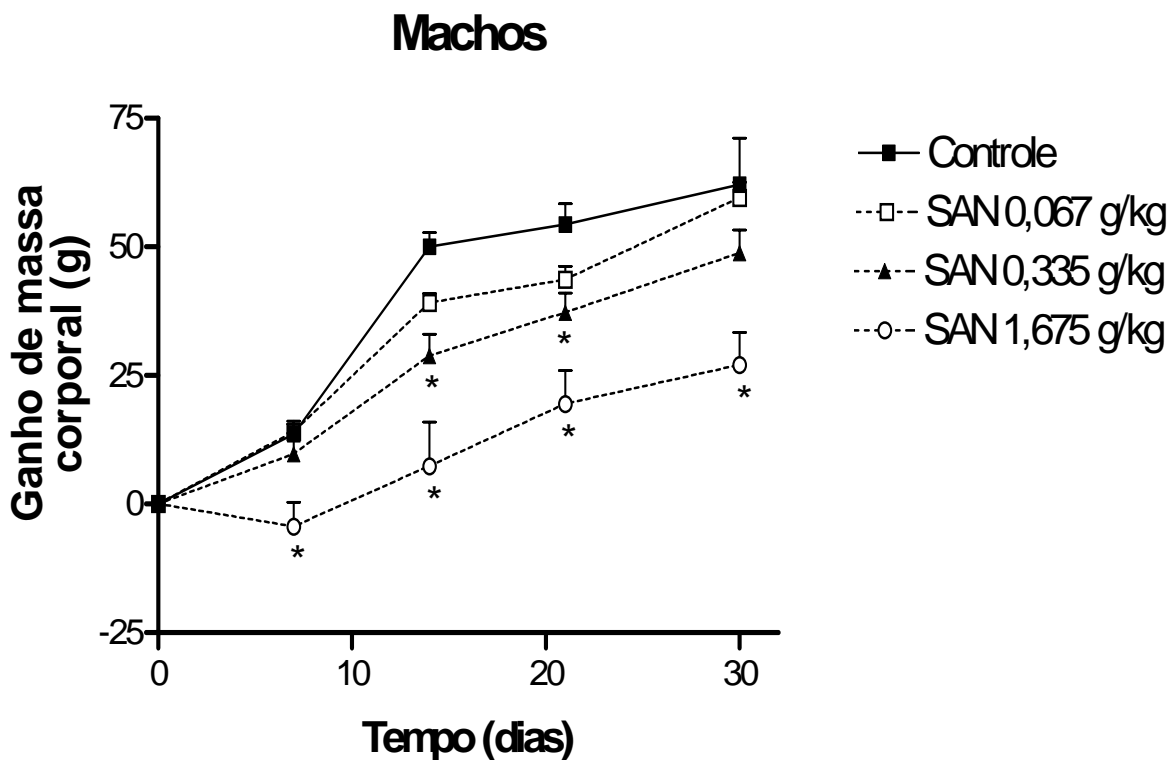


Figura 1. Efeito do Sanativo® (SAN 0,067; 0,335 e 1,675 g/kg), sobre o ganho de massa corporal administrado por via oral a ratos Wistar adultos, por 30 dias consecutivos. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n=10/grupo).

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Em vista de tais resultados e dentro da concepção técnica dos estudos pré-clínicos, conclui-se que o produto fitoterápico Sanativo® apresenta uma significativa atividade cicatrizante no modelo de ferida aberta em dorso de rato. Isto foi evidenciado pela diminuição significativa no tempo requerido para a completa re-epitelialização da área lesionada.

Em relação à avaliação toxicológica, os resultados obtidos demonstram que o Sanativo® apresenta baixo grau de toxicidade por via oral. De maneira geral, a sua administração não produziu efeitos tóxicos sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos em ratos de ambos os sexos.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, M.M.R.; SANTOS, L.C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *REGO*, v.25 (2), p.95-102, 2003.
- AKARELE, O. summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram*, v.28, p.13-19, 1993.
- AKERELE, O. WHO chronicles. *Soc. Sci. Med.*, v.38, p.76, 1984.
- ARAÚJO, E.L. Aroeira da praia – Estudo farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius*, Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado do Departamento de Ciências Farmacêuticas / UFPE, Recife, 2002.
- BARNES, D.G.; DOURSON, M. Reference dose (RfD); description and use in health risk assessments. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* v.8, p.471-486, 1988.
- BASEY, K.; MCGAW, B.A.; WOOLLEY, J.G. Phygrine, an alkaloid from physalis species. *Phytochemistry*, v.31 (12), p.4173-6, 1992.
- BASTOS, G.N.T.; SANTOS, A.R.S.; FERREIRA, V.M.M.; COSTA, A.M.R.; BISPO, C.I.; SILVEIRA, A.J.A.; Nascimento, J.L.M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L.on mice. *Journal of Ethnopharmacology*, article in press, 2005.
- BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. *The Journal of Toxicological Sciences*, v.28 (3), p.109-121, 2003.
- BORIO, E.B.L.; CECY, C.; YASUMOTO, Y. Pharmacognostic study of the bark of *Schinus terebinthifolius*, Raddi. *Ciencia e Cultura*, v.25 (7), p.631-4, 1973.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

BOTHAM, P.A. Acute systemic toxicity – prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in vitro*, v.18, p.227-230, 2003.

CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E, COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v.48, p.85-88, 1995.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos - Biodiversidade. *Ciência e Cultura*, v.55, n.3, p.37-9, 2003.

CAMPELLO, J.P.; MARSAIOLI, A.J. Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v.13 (3), p.659-60, 1974.

CAMPELLO, J.P.; MARSAIOLI, A.J. Terebenthifolic acid and bauerenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v.14 (10), p.2300-2, 1975.

CASTRO, J.A. Toxicologia básica mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta Bioq. Clin. Latinoamericana*, v.2, p.197-206, 1993.

CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.125-6, 1978a.

CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.170-1, 1978b.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.408-9, 1978c.

CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.70-1, 1978d.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p.171-5, 2003.

COULOMBE, P.A. Towards a molecular definition of keratinocyte activation after acute injury to stratified epithelia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.236, p.231-238, 1997.

DA SILVA, L.B.L. "Preparação e avaliação biofarmacêuticas de formas semi-sólidas da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*, Raddi)". Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

DELGOBO, C.L.; GORIN, P.A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*, v.47 (7), p.1207-1214, 1998.

DELGOBO, C.L.; GORIN, P.A.J.; TISCHER, C.A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolisaccharide. *Carbohydrate Research*, v.320, p.167-175, 1999.

DEMBITSKY, V.M.; REZANKA, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. *Phytochemistry*, v.42 (4), p.1075-1080, 1995.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

DE OLIVEIRA, A.J.B.; DA SILVA, M.M.F.P. Alkaloid production by callous tissue culture of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.104 (2), p.149-55, 2003.

DRUMMOND, D.; SILVA, M.T.G.; MARQUES, G.H.; TOMASSINI, T.C.B. Estudo da atividade antimicrobiana de *Physalis angulata* L. – extratos e frações dos frutos e raízes. XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, fm 247, 2000.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia - Biodiversidade. *Ciência e Cultura*, v.55, n.3, p.35-6, 2003.

FAUSTMAN, E.M.; ALLEN, B.C.; KAVLOCK, R.J.; KIMEL, C.A. Dose-response assessment for developmental toxicity: I Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v.23, p.478-486, 1994.

FERNADEZ, O.; CAPDEVILA, J.Z.; DALLA, G.; MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*, v.73, p.564-8, 2002.

FOWLER, J.S.L.N.; RUTTY, D.A. Methodological aspects of acute toxicity testing particular LD₅₀ determinations present use in development of new drugs. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, v.52, p.20-30, 1983.

FREIBURGHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M.H.; BRUM, R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.55, p.1-11, 1996.

GOMES, L.J.; GOMES, M.A.O. Extrativismo e Biodiversidade: o caso da fava d'anta. *Ciência Hoje*, n 161, p.66-69, 2000.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

GUTIERREZ-LUGO, M.T.; DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B.N. Lipoxygenase inhibition by Anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerials parts of *Anadenanthera colubrine*. *Planta Med.*, v.70, p.263-265, 2004.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. v.59, p.205-215, 1996.

HILL, E.F. Acute and subacute toxicology in evaluation of pesticide hazard to avain wildlife. *Up-and-Down Procedure Peer Panel Report*, appendix 3, p.45-67, 1993.

HUGHES, J.; RAMOS, G.; MOYNA, P. Main components in *Cereus peruvianus* epicuticular wax. *Journal of Natural Products*, v.43 (5), p.564-6, 1980.

HWANG, J.K.; SHIM, J.S.; CHUNG, J.Y. Anticariogenic activity of some tropical medicinal plants against *Streptococcus mutans*. *Fitoterapia*, v.75, p.596-598, 2004.

ISMAIL, N.; ALAM, M. Anovel flavanoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia*, v.72, p.676-679, 2001.

JAIN, M.K.; YU, B.Z.; ROGERS, J.M.; SMITH, A.E; BOGER, E.T.A.; OSTRANDER, R.L.; RHEINGOLD, A.L. *Phytochemistry*, v.39, p.537-547, 1995.

KAISTA, K.K; KIER, L.B. Strutral studies of terebinthone from *Schinus terebinthifolius*. *J. Pharm. Sci.*, v.51, p.245-8, 1962a.

KAISTA, K.K; KIER, L.B. Strutral studies on the triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *J. Pharm. Sci.*, v.51, p.1136-8, 1962b.

KLAASSEN, C.D. Princípios de Toxicologia. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 6^a ed., v.2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

KRINGSTAD, R. Cerheptaric acid, a new lactone-forming acid isolated from *Cereus peruvianus* (L.) Mill. *Carbohydrate Research*, v.80 (2), p.285-289, 1980.

KRINGSTAD, R.; SINGSAAS, A.O.; RUSTEN, G.; BAEKKEMOEN, G.; PAULSEN, B.S.; NORDAL, A. 2-C-Methylaldotetronic acid, a new lactone-forming acid present in plants. *Phytochemistry*, v.19 (4), p.543-545, 1980.

LAWRENCE, B.M. A discussion of *S. molle* and *S. terebinthifolius*. *Perfum. Flavor.*, v.9 (5), p.65-9, 1984.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MÁRQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, article in press, 2005.

LLOYD, H.A.; JAOUNI, T.M.; EVANS, S.L.; MORTON, J.F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, v. 16 (8), p.1301-2, 1977.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D., HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. On the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.265-272, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 2ª ed., v.1, Nova Odessa, SP: editora Platarum, p.172, 1998a.

LORENZI, H. Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 2ª ed., v.1, Nova Odessa, SP: editora Platarum, p.8, 1998b.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

LORKE, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Tóxicol.*, v.54, p.275-87, 1983.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, C.A.; VEIGA, V.F.J.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25 (3), p.429-438, 2002.

MAKINO, B.; KAWAI, M.; OGURA, T.; NAKANISHI, M.; YAMAMURA, H.; BUTSUGAN, Y. Structural revision of physalin H isolated from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, v.58 (11), p.1668-1674, 1995.

MARTINEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.52, p.171-4, 1996.

MARTINEZ, M.J.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extrato fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Rev. Cubana Plant. Med.*, v.5 (1), p.23-5, 2000.

MELLO, A.C.; AFIATPOUR, P. Presence of acetylcholine in the fruit of *Physalis angulata* (Solanaceae). *Ciência e Cultura*, v.37 (5), p.799-804, 1985.

MONTANDON, D.; D'ANDIRAS, G.; GABBIANI, G. The mechanism of wound contraction and epithelialization. *Clinics in Plastic Surgery*, v.4, p.325-346, 1977.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. *Química Nova*, v.24 (1), p.105-111, 2001.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of na acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

Anadenanthera colubrina (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, v.89, p.175-185, 2003.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunology Letters*, v. 93, p.189-197, 2004.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; LINS-NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *Journal of Ethnopharmacology*, article in press, 2005.

MORTON, D.M. Importance of species selection in drug toxicity testing. *Toxicology Letters*, v.102-103, p. 545-50, 1998.

MOURELLE, J.A.F.; CAO, M.C.F.L.; RODRÍGUEZ, F.M.; GUTIÉRREZ, Z.P. Actividad antiinflamatoria del *Schinus terebinthifolius*, (copal) en ratas. *Rev. Cubana Farm.*, v. 27 (2), p.139-144, 1993.

NINIO, R.; LEWINSOHN, E.; MIZRAHI, Y.; SITRIT, Y. Quality attributes of store koubo (*Cereus peruvianus* (L.) Miller) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v.30, p.273-280, 2003.

NORDAL, A.; KROGH, A.; OGNER, G. The occurrence of phorbic acid in plants. *Acta Chemica Scandinavica*, v.19 (7), p.1705-8, 1965.

PACHTER, I.J.; ZACHARIAS, D.E.; RIBEIRO, O. Índole alkaloids of *Acer saccharinum* (the Siver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

Mimosa hostilis. Contribution from the Research and Development Division, Smith kline and French laboratories. p.1285-7, 1959.

PIACENTI, S.; BALDERRAMA, L.; DE FOMMASI, N.; MORALIS, L.; VARGAS, L.; PIZZA, C. Anadanthoside: a flavanol-3-0-β-d-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. *Phytochemistry*, v.51, p.709-711, 1999.

PIERIBATTEST, J.C.; CONAN, J.Y.; GRODIN, J.; VICENT, E.J.; GUERERE, M. Contribution a l'étude chimique des baies roses de bourbon. *Annales des falsifications de L'expertise et Toxicologique*, v.74, p.11-16, 1981.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25 (1), p.45-61, 2002.

PIRES, O.C.; TAQUEMASA, A.V.C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C.E.P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). *Acta Farm. Bonaerense*, v.23 (2), p.176-82, 2004.

QUEIRES, L.C.S.; RODRIGUES, L.E.A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da Aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.41 (2), p.247-253, 1998.

RANE, M.M.; MENGI, S.A. Comparative effect of oral administration and topical application of alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark on incision and excision wounds in rats. *Fitoterapia*, v.74, p.553-8, 2003.

REZANKA, T.; DEMBITSKY, V.M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. *Phytochemistry*, v.47 (6), p.1145-1148, 1997.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

RUIZ, A.R.; DE LA TORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.52, p.123-7, 1996.

SANCHES, E.G.; SILVA, M.T.G.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.B. Evaluation of the antibacterial activity of *Physalis angulata* L. extracts. *Boll. Chim. Farm.*, v.2, p.136, 1997.

SANTOS, J.A.A.; TOMASSINI, T.C.B.; XAVIER, D.C.D.; RIBEIRO, I.M.; SILVA, M.T.G.; MORAES-FILHO, Z.B. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro*. v.98 (3), p.425-8, 2003.

SANTOS, W.O.; REBOUÇAS, L.M.C.; SIQUEIRA, M.M.A.; CARVALHO, D.; ALENCAR, J.W. Estudo químico de *Schinus terebinthifolius*, Raddi. *Ciência e Cultura*, v.38 (7), p.602, 1986.

SARSUR NETO, J.M.; LISBOA, S.M.; BRANDÃO, M.G.L.; COELHO, M.M. Avaliação farmacológica preliminar do extrato liofilizado de angico (*Piptadenia colubrina* Bth). *Revista de Farmácia e Bioquímica da UFMG*, v.10, p.31-42, 1989.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.96, p.563-8, 2005.

SCHUZ, V.; HANSEL, R. TYLER, V.E. Fitoterapia Racional – Um guia de fitoterapia para ciências da saúde, 4^a ed. Malone, São Paulo, 2002.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

SEPLANTEC Inventário de plantas medicinais do estado da Bahia. Subsecretaria de Ciência e Tecnologia, v.II, p.675-7, Salvador-BA, 1979.

SHINGU, K.; YAHARA, S.; NOHARA, T.; OKABE, H. constituents of solanaceos plants. 21. Three new withanolides, physagulins A, B and D from *Physalis angulata* L. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.40(8), p.2088-91, 1992.

SILVA, M.T.G.; MARQUES, G.H.; RIBEIRO, I.M.; SANCHES, E.G.; TOMASSINI, T.C.B. Evaluation of the bacteria inhibitory profile between native Belém do Pará and Rio de Janeiro cultivated *P. angulata* L. species against *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*. *Boll. Chim. Farm.*, v.2, p.138, 1999.

SILVA, M.T.G.; SIMAS, S.M.; BATISTA, T.G.F.M.; CARDARELLI, P.; TOMASSINI, T.C.B. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro*, v.100 (7), p.779-782, 2005.

SITRIT, Y.; NINIO, R.; BAR E.; GOLAN, E.; LARKOV, O.; RAVID, U.; LEWINSOHN, E. S-Linalool synthase activity in developing fruit of the columnar cactus koubo [*Cereus peruvianus* (L.) Miller]. *Plant Science*, v. 167, p.1257-1262, 2004.

SOARES, M.B.P.; BELLINTANI, M.C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.B.; SANTOS, R.R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, v.459, p.107-112, 2003.

STHAL, E. Pink pepper, a dangerous exotic spice? *Dtsch. Apoth. Ztg.*, v.122 (7), p.337-40, 1982.

Lima, C.R.; Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico Sanativo®.

STHAL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol an cutaneous irritant of *Schinus terebinthifolius*, Raddi. *Planta Médica*, v.48, p.5-9, 1983.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Lecta*, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

TOMASSINI, T.C.B.; BARBI, N.S.; RIBEIRO, I.M.; XAVIER, D.C.D. Gênero *Physalis* – uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova*, v.23 (1), p.47-57, 2000.

VASINA, O.E.; MASLENNIKOVA, V.A.; ABUBAKIROV, N.K. *Physalis* Withasteroids. *Khim Priord Soed*, v.3, p.243-255, 1986.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v.28 (3), p.519-528, 2005.

WHO – Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Parte I, EHC 6, 1978.

WU, S.J.; NG, L.T.; CHEN, C.H.; LIN, D.L.; WANG, S.S.; LIN, C.C. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* L. and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sciences*, v.74, p.2061-2073, 2004.