

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**JORDANA LUIZI DOS PRAZERES**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Athenaea velutina* (SENDTN.) D'ARCY (SOLANACEAE) EM RATOS WISTAR**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2020**

**JORDANA LUIZI DOS PRAZERES**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Athenaea velutina* (SENDTN.) D'ARCY (SOLANACEAE) EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: João Paulo Viana Leite

Coorientadora: Mariana Machado Neves

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P921a Prazeres, Jordana Luizi dos, 1988-  
2020 Avaliação da toxicidade do extrato etanólico das folhas de  
*Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy (Solanaceae) em ratos  
Wistar / Jordana Luizi dos Prazeres. – Viçosa, MG, 2020.  
129 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndice.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Athenaea velutina* . 2. Solanaceae. 3. Toxicidade.  
4. Matéria médica vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 571.95

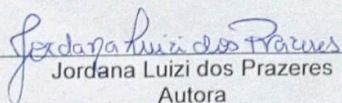
JORDANA LUIZI DOS PRAZERES

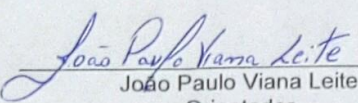
**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE *Athenaea velutina* (SENDTN.) D'ARCY (SOLANACEAE)  
EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2020.

Assentimento:

  
Jordana Luizi dos Prazeres  
Autora

  
João Paulo Viana Leite  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir viver esta experiência e por me sustentar a cada dificuldade.

Aos meus pais, minha irmã e meu sobrinho pelo apoio.

Aos meus tios e padrinhos Mariinha e Tatá pelo incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de fazer o curso.

Ao meu orientador, professor João Paulo Viana Leite, por me aceitar no Programa, pela orientação e pela confiança.

À minha coorientadora, professora Mariana Machado Neves, pela coorientação, pelo apoio e pela realização das análises histopatológicas.

Ao professor Paulo Roberto Cecon do Departamento de Estatística pela receptividade e pelo auxílio nas análises estatísticas.

À técnica Lilian Fialho do Laboratório de Análises Bioquímicas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por me ensinar a utilizar o moinho de facas.

Ao técnico Monteiro do Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, e à técnica Talita Silva do Laboratório de Operações e Processos/Estudos de Materiais Alimentares, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, por realizarem a liofilização do extrato.

À Letícia Monteiro Farias pelo curso de cromatografia, pela realização das análises por *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector* (HPLC-DAD) e pelo carinho.

Ao Markus Kohlhoff do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, do Centro de Pesquisas René Rachou, pela realização das análises por *Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry* (LC-HRMS).

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira, responsável pelo Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, do Departamento de Biologia Geral, por permitir a utilização da autoclave e da centrífuga.

Aos técnicos Aécio Oliveira e Cíntia Fidelis do Laboratório Clínico, do Departamento de Veterinária, por realizarem as análises hematológicas e de sódio e potássio.

À técnica Solange Bigonha do Laboratório de Análises Clínicas, do Departamento de Nutrição e Saúde, por realizar as análises bioquímicas, pelo carinho e incentivo.

Ao técnico Jean Rezende do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo auxílio na determinação de lipídeos do extrato.

Ao técnico farmacêutico Adriano Castro do Departamento de Medicina e Enfermagem (DEM), pelo auxílio na interpretação da hematologia.

Aos técnicos-administrativos Eduardo, Marco, Túlio e Nathalie do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e Gustavo e Leonardo do Departamento de Biologia Geral, pelo suporte.

À Izabella Martins da Costa Rodrigues, taxonomista colaboradora da Flora do Brasil 2020, pelas informações, pela disponibilidade e pelo carinho.

Ao Doutor Gustavo Roberto Villas Boas, professor da Universidade do Oeste da Bahia, pela disponibilidade e pelo auxílio.

À Doutora Giseli Karenina Traesel por, gentilmente, responder os meus questionamentos.

À Nívea Maria Pacheco, minha professora na graduação, que se tornou colega de pós-graduação. Pessoa responsável por me apresentar o curso de Mestrado em Bioquímica Aplicada da UFV. Agradeço por ter aberto as portas do mundo acadêmico para mim, pelo incentivo e apoio durante estes dois anos.

Ao Alisson, colega do Laboratório de Biodiversidade, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por todas as informações a respeito da planta, pelo auxílio nas coletas, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Luciano Pedrosa, funcionário da Universidade Federal de Ouro Preto, pelas coletas.

Aos colegas do Laboratório de Biodiversidade: Isabella, Laís, Iorrana, Sabrina, Ana Paula, Camila, Jana, Jéssica, Antônio, Luana, Geana, Bianca, Geovana, Luiza e Nicole, pelo apoio e auxílio.

Às colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada: Gislaine, Fernanda Sales e Fernanda Araújo, pelo auxílio; Roberta e Juliana Leopoldo, pela amizade.

À Juliana Regina, colega do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, que se tornou amiga, por toda força e apoio. E aos pais da Ju, pelo carinho.

Ao querido amigo John do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural, do Departamento de Biologia Geral, pelo companheirismo.

Ao amigo Luiz Ladeira do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural, pela disponibilidade, pela paciência, por todos os ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos do Departamento de Biologia Geral: Renner, pelo apoio; Luiz Otávio, pelo apoio e pelas risadas; Ana Cláudia, Felipe, Grazi, Arabela, Iara, Franciane e Daniel, pelo auxílio; Janaína, Talita, Beth, Amanda Lozi e Diane, pelo conhecimento compartilhado.

Ao Luiz Pedro, parceiro de pesquisa.

À minha querida amiga Greyce, minha maior incentivadora!

Às minhas amigas Sangeorana, Gabrielle e família e Aline pelo incentivo.

Às minhas amigas de Viçosa: Amanda Dias, por compartilharmos momentos de tristezas e alegrias; Jaíne, por toda força e pelo carinho.

Às minhas amigas nutricionistas Mariana Macedo e Andressa Manzur, pelo incentivo.

À Bioclin por, gentilmente, fornecer os kits bioquímicos usados neste estudo.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro da pesquisa (Edital Universal).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para o alcance desta conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## BIOGRAFIA

JORDANA LUIZI DOS PRAZERES, filha de Fátima Aparecida Teixeira e José Aparecido dos Prazeres, nasceu em Sabará - Minas Gerais (MG), em 13 de maio de 1988.

Em junho de 2011, graduou-se em Nutrição, pelo Centro Universitário Newton Paiva, em Belo Horizonte - MG, sendo bolsista integral do Programa Universidade para Todos (ProUni).

Durante a graduação, atuou como monitora de Bioquímica por três períodos e participou de dois Projetos de Iniciação Científica, na antiga Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC, atual Centro de Inovação e Tecnologia CIT SENAI FIEMG. De 2011 a 2018, trabalhou em Unidades Produtoras de Refeições, no Banco de Alimentos da Prefeitura Municipal de Sabará, em Clínicas e foi Nutricionista concursada da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Sabará.

Em 2017, concluiu a pós-graduação *lato sensu* em Nutrição Clínica Funcional, no Centro de Nutrição Funcional VP, onde pôde aprofundar seus conhecimentos sobre os compostos bioativos dos alimentos e sobre alguns fitoterápicos.

Em março de 2018, ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Bioquímica Aplicada, da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, realizando pesquisa em toxicologia de plantas. Em fevereiro de 2020, se submeteu à defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

*“O impossível é só questão de opinião”.*  
(Alexandre Magno Abrão / Thiago Raphael Castanho)

## RESUMO

PRAZERES, Jordana Luizi dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Avaliação da toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) em ratos Wistar.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadora: Mariana Machado Neves.

*Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) conhecida como jurubeba-de-morcego, é endêmica do Brasil. É uma espécie não utilizada na medicina popular. Pesquisadores do grupo Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade (BIOPROS) identificaram compostos vitanolídeos presentes no extrato orgânico dessa espécie como responsáveis pelas atividades citotóxica e antitumoral. Como a *A. velutina* tem composição química bastante similar (vitanolídeos) e forte relação filogenética com a *Withania somnifera* (Solanaceae), a *A. velutina* apresenta potencial para ser usada como insumo farmacêutico ativo vegetal para a produção de fitoterápicos. Este estudo teve como objetivos: avaliar a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina* (EEFoAv) e identificar os compostos vitanolídeos presentes no EEFoAv. Para o teste de toxicidade aguda, as ratas (n = 5) receberam uma dose oral única de 1000 mg/kg de peso corporal (pc) do EEFoAv e foram observadas por 14 dias. No teste de toxicidade de doses repetidas, ratos machos e fêmeas (n = 10) receberam doses orais de 250, 500 ou 1000 mg/kg de pc do EEFoAv, sendo tratados e observados por 28 dias. Após o período de tratamento, o grupo controle *recovery* e o grupo *recovery* permaneceram em observação por mais 14 dias. Foram identificados quatro compostos vitanolídeos majoritários no EEFoAv, utilizando a técnica *Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry* (UHPLC-HRMS), sendo o Aurelianólido B em maior concentração. O EEFoAv não apresentou toxicidade oral aguda e nem de doses repetidas em ratos Wistar. O EEFoAv não causou mortalidade. Não houve parâmetros bioquímicos que indicassem toxicidade hepática ou renal. Não houve sintomatologia clínica, perda de peso corporal, alteração no consumo de água e ração, alteração do peso absoluto dos órgãos, alterações anatômicas dos órgãos e histopatológicas hepáticas. No estudo de toxicidade aguda, não houve alteração no peso relativo dos órgãos, nem

alterações na hematologia. Porém, houve redução estatisticamente significativa nas concentrações de bilirrubina e de alanina aminotransferase (ALT) ( $p < 0,05$ ). Os animais tratados durante o período de 28 dias apresentaram alterações nas concentrações de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos, como hemácias, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), colesterol total, colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase isoenzima MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), ferro, sódio e potássio ( $p < 0,05$ ). Houve redução significativa apenas do peso relativo do fígado das fêmeas do grupo *recovery* ( $p < 0,05$ ). Todas as alterações bioquímicas foram revertidas, após a interrupção da administração do extrato, exceto a redução na concentração de sódio. Alterações nas concentrações de hemácias, hemoglobina, índice de amplitude de distribuição de hemácias (RDW) e ácido úrico ( $p < 0,05$ ) ocorreram no grupo *recovery*. As alterações ocorreram em machos ou em fêmeas ou em ambos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam ausência de toxicidade do EEFoAv, e serão utilizados para estabelecer as doses dos demais estudos não clínicos e clínicos, para posteriormente viabilizar o desenvolvimento e o registro de um medicamento fitoterápico a partir da espécie *Athenaea velutina*.

Palavras-chave: *Athenaea velutina*. Solanaceae. Toxicidade. Matéria médica vegetal.

## ABSTRACT

PRAZERES, Jordana Luizi dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Toxicity evaluation of the ethanolic extract of *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) leaves in Wistar rats.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-adviser: Mariana Machado Neves.

*Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) is known as jurubeba-de-morcego and is endemic to Brazil. This plant species is not used in folk medicine. However, researchers from the group Molecular Bioprospecting in the Sustainable Use of Biodiversity (BIOPROS) identified withanolides in the organic extract of *A. velutina*, as responsible for its cytotoxic activities. These compounds are also found in *Withania somnifera*, which reinforces the phylogenetic relationship between these two species, and points to the potential use of *A. velutina* as a pharmaceutical plant material for the production of herbal medicines. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity and phytochemical composition of the ethanolic extract of *A. velutina* leaves (EEFoAv). In the acute toxicity test, female rats (n = 5) received an oral single dose of 1000 mg/kg body weight (bw) of EEFoAv. After that, the animals were observed for 14 days. In the repeated dose toxicity test, male and female rats (n = 10) received oral doses of 250, 500, and 1000 mg/kg bw, and were observed for 28 days. After the treatment, the both control *recovery* and *recovery* groups remained under observation for more 14 days. As main results, four vitanolide compounds were identified in EEFoAv using Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry, with Aurelianolide B being the major compound. EEFoAv did not present oral acute toxicity in repeated dose toxicity. Also, EEFoAv did not alter biochemical parameters that indicated hepatic or renal toxicity. Clinical symptoms, such as loss of body weight, changes in the consumption of water and feed, changes in the absolute weight of the organs, anatomical changes in the organs, and liver histopathology were not observed. In the acute toxicity study, there was no change in the relative weight of the organs, or changes in hematology. However, there was a statistically significant reduction in the concentrations of bilirubin and alanine aminotransferase ( $p < 0.05$ ). The animals treated during the 28 days showed changes in the concentrations of some hematological and biochemical

parameters, such as red blood cells, mean corpuscular hemoglobin concentration, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, aspartate aminotransferase, creatine kinase isoenzyme MB, lactate dehydrogenase, iron, sodium, and potassium ( $p < 0.05$ ). In the *recovery* group, there was a significant reduction in the relative liver weight of the females ( $p < 0.05$ ). All biochemical changes were reversed after stopping the administration of the extract, except the sodium concentration. Reductions in red blood cell concentrations, hemoglobin, red cell distribution amplitude index, and uric acid ( $p < 0.05$ ) were observed in both sexes. These results indicate the absence of high toxicity of the EEFoAv. In conclusion, this work will support others non-clinical and clinical studies with *A. velutina*, in order to contribute to the development and registration of phytotherapeutic for this plant.

Keywords: *Athenaea velutina*. Solanaceae. Toxicity. Vegetable medical matter.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Athenaea velutina</i> na Mata do Paraíso, Viçosa - MG (A), <i>Athenaea velutina</i> no Parque Estadual do Itacolomi, Ouro Preto - MG (B), folhas (C), flores (D), frutos (E) e sementes (F) de <i>Athenaea velutina</i> e frutos de <i>Solanum paniculatum</i> L. (jurubeba) (G).....	28
Figura 2	Ocorrência geográfica de <i>Athenaea velutina</i> , baseada nas informações retiradas do banco de dados do herbário virtual <a href="http://inct.splink.org.br">inct.splink.org.br</a> , no ano de 2019.....	30
Figura 3	Estrutura dos vitanolídeos.....	31
Figura 4	Vitanolídeos de <i>Athenaea fasciculata</i> (Vell): Aurelianolídeo A (1) e Aurelianolídeo B (2).....	32
Figura 5	Vitanolídeos identificados em <i>Athenaea velutina</i> .....	33
Figura 6	Filogenia de Solanaceae.....	35
Figura 7	Estudo de toxicidade para fitoterápicos.....	46
Figura 8	Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD, detectado na região de 254 nm de dois extratos etanólicos de folhas de <i>Athenaea velutina</i> : A) extrato oriundo de folhas acessadas no município de Viçosa; B) extrato oriundo de folhas acessadas no município de Ouro Preto.....	55
Figura 9	Cromatograma de íons extraídos obtido por UHPLC-HRMS (modo positivo) para <i>m/z</i> 513, 531, 471, 573, 529, 545, 559, 511, 571, 555, 479.....	56
Figura 10	Vitanolídeos identificados no extrato etanólico de <i>Athenaea velutina</i> .....	58

Figura 11	Estrutura do vitanolídeo Nic-2 isolado de <i>Nicandra physaloides</i> .....	85
Figura 12	Estruturas do sitoindosídeo IX (1) e do sitoindosídeo X (2).....	91
Figura 13	Estruturas do sitoindosídeo VII (1) e do sitoindosídeo VIII (2).....	96
Figura 14	Vitaferina A.....	100
Figura 15	Composto isolado de <i>Withania aristata</i> , vitaristatina.....	104
Quadro 1	Teste de toxicologia não clínica de fitoterápicos.....	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Gradiente de eluição empregado na técnica de HPLC-DAD para os extratos de <i>Athenaea velutina</i> .....	42
Tabela 2	Gradiente de eluição empregado na técnica de UHPLC-HRMS para o extrato de <i>Athenaea velutina</i> .....	43
Tabela 3	Rendimento do extrato etanólico das folhas de <i>Athenaea velutina</i> .....	56
Tabela 4	Identificação proposta dos vitanolídeos majoritários no EEFoAv por análise de UHPLC-HRMS.....	57
Tabela 5	Análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do extrato etanólico das folhas de <i>Athenaea velutina</i> .....	59
Tabela 6	Parâmetros fisiológicos das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda.....	60
Tabela 7	Peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda.....	60
Tabela 8	Parâmetros hematológicos das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda.....	61
Tabela 9	Parâmetros bioquímicos das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda.....	62
Tabela 10	Parâmetros fisiológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	63

Tabela 11	Parâmetros fisiológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	64
Tabela 12	Peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	65
Tabela 13	Peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	66
Tabela 14	Peso do fígado relativo para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	66
Tabela 15	Parâmetros hematológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	67
Tabela 16	CHCM para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 1 a 4) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	68
Tabela 17	Parâmetros hematológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	69
Tabela 18	Neutrófilos (%) e linfócitos (%) para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	70

Tabela 19	Hemácias, hemoglobina e hematócrito para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	71
Tabela 20	Parâmetros bioquímicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	73
Tabela 21	AST e CK-MB para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 1 a 4) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	75
Tabela 22	LDH e ferro para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 1 a 4) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	75
Tabela 23	Parâmetros bioquímicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	77
Tabela 24	Glicemia de jejum, ácido úrico e creatinina para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexo do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	79
Tabela 25	Valores de referência para os parâmetros hematológicos que sofreram alterações estatisticamente significativas, no estudo de toxicidade de doses repetidas.....	89
Tabela 26	Quantidade de ferro em diferentes partes do material vegetal seco de <i>Withania somnifera</i> de duas localidades da Índia.....	102

Tabela 1 A	Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros fisiológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	121
Tabela 2 A	Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros fisiológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	121
Tabela 3 A	Resumo da análise de variância das variáveis peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	122
Tabela 4 A	Resumo da análise de variância das variáveis peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	122
Tabela 5 A	Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros hematológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	123
Tabela 6 A	Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros hematológicos para sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	124
Tabela 7 A	Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros bioquímicos para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	125
Tabela 8 A	Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros bioquímicos para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	alanina aminotransferase
APAP	Acetaminofeno
AST	aspartato aminotransferase
bar	unidade de pressão
BIOPROS	Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade
CA	Califórnia
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CK-MB	creatina quinase isoenzima MB
cm	centímetros
d	dia(s)
Da	Dalton
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (detector por arranjo de diodos)
dag	decagrama
dl	decilitro
DL50	dose que mata 50% dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
EEFoAv	Extrato etanólico das folhas de <i>Athenaea velutina</i>
EPTEA	Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por electrospray)
EUA	Estados Unidos da América
ev	elétrons-volt
E. S.	Extrato seco
FAv_5	fração enriquecida em esteroides vitanolídeos, oriunda das folhas de <i>Athenaea velutina</i>
fl	fentolitro
FRV	fração rica em vitanolídeos
g	grama(s)
G	Grupo
gama GT	gama glutamiltransferase

h	horas
HCM	hemoglobina corpuscular média
HDL	lipoproteína de alta densidade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas de Alta Resolução)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
IFAV	insumo farmacêutico ativo vegetal
Inc.	Incorporação
kg	quilograma
L	Litro
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida)
LDH	lactato desidrogenase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LTDA	Limitada
m	metros
mcg	microgramas
MeOH	metanol
mEq	miliequivalentes
Mesh	número de abertura por polegada
MF	Medicamentos fitoterápicos
mg	miligrama(s)
MG	Minas Gerais
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
MS <sup>n</sup>	<i>Multiple-stage Mass Spectrometry</i>
m/m	massa por massa
<i>m/z</i>	massa/carga
n	número
nº	número
nm	nanômetros

OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para Cooperação e Desenvolvimento da Economia)
OUPR	Ouro Preto
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
pc	peso corporal
pg	picogramas
PTF	Produtos tradicionais fitoterápicos
P. A.	para análise
R	Rendimento
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RDW	índice de amplitude de distribuição de hemácias
U	Unidades
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência)
UV	Ultra-violeta
µL	microlitros
µm	micrômetros
V	Volt
VCM	volume corpuscular médio
VIC	Viçosa
x g	Força gravitacional

## LISTA DE SÍMBOLOS

- ♀ Fêmeas
- °C Grau Celsius
- ♂ Machos
- ± Mais ou menos
- ® Marca registrada
- % Porcentagem

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1	Fitoterápicos.....	26
2.2	<i>Athenaea velutina</i> (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae).....	26
2.3	Conhecimento fitoquímico sobre <i>Athenaea velutina</i> .....	30
2.4	Relação filogenética entre <i>Athenaea velutina</i> e <i>Withania somnifera</i> .....	34
2.5	Estudos de toxicidade para fitoterápicos.....	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Estudos fitoquímicos.....	39
4.1.1	Coleta do material vegetal.....	39
4.1.2	Preparação das folhas.....	40
4.1.2.1	Limpeza e secagem.....	40
4.1.2.2	Pulverização.....	40
4.1.3	Produção do extrato vegetal.....	40
4.1.4	Análise comparativa dos extratos por HPLC-DAD.....	41
4.1.5	Análise do EEFoAv por UHPLC-HRMS.....	42
4.1.6	Análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do EEFoAv.....	43
4.1.7	Determinação de lipídeos do EEFoAv pelo método de Soxhlet.....	44
4.2	Ensaio <i>in vivo</i> .....	44
4.2.1	Animais.....	44
4.2.2	Delineamento experimental.....	45
4.2.2.1	Estudo de toxicidade para fitoterápicos.....	45
4.2.2.1.1	Estudo de toxicidade aguda.....	47
4.2.2.1.2	Estudo de toxicidade de doses repetidas.....	48
4.2.3	Ressuspensão do EEFoAv.....	49
4.2.4	Eutanásia e coleta de material.....	50

4.2.5	Análises hematológicas e bioquímicas.....	50
4.2.6	Processamento histológico.....	52
4.2.7	Análises estatísticas.....	52
5	RESULTADOS.....	54
5.1	Estudos fitoquímicos.....	54
5.1.1	Análise comparativa dos extratos por HPLC-DAD.....	54
5.1.2	Rendimento do EEFoAv.....	55
5.1.3	Análise do EEFoAv por UHPLC-HRMS.....	56
5.1.4	Análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do EEFoAv.....	58
5.1.5	Determinação de lipídeos do EEFoAv pelo método de Soxhlet.....	59
5.2	Ensaio <i>in vivo</i> .....	59
5.2.1	Estudo de toxicidade aguda.....	59
5.2.2	Estudo de toxicidade de doses repetidas.....	63
5.2.3	Análises histopatológicas.....	80
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÕES.....	108
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110
	REFERÊNCIAS.....	111
	APÊNDICE A - Tabelas dos resumos das análises de variância de todas as variáveis do estudo de toxicidade de doses repetidas.....	121
	ANEXO A - Autorização do acesso ao patrimônio genético no Parque do Itacolomi, concedida pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais – IEF-MG.....	127
	ANEXO B - Aprovação dos procedimentos que foram realizados com os animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA/UFV.....	129

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior número de espécies vegetais do planeta (BRASIL, 2019b). Visando o aproveitamento sustentável desses recursos vegetais, tem-se utilizado como importante estratégia a busca por compostos ativos para obtenção de novos fármacos, cosméticos, alimentos e/ou agroquímicos (SKIRYCZ *et al.*, 2016).

Sabe-se que o bioma Mata Atlântica possui cerca de 20000 espécies vegetais, incluindo diversas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. Muitas delas ainda são desconhecidas pela ciência (BRASIL, 2019c). Nesse contexto, em 2013, pesquisadores do grupo Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade (BIOPROS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) iniciaram o projeto de localização, identificação e coleta de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica. Esse projeto visa à construção de uma coleção de extratos (ALMEIDA, 2015).

Desde então, esses extratos tem sido alvo de estudos de bioprospecção farmacêutica de interesse para as áreas de saúde humana e agricultura. Até o momento, cerca de 250 extratos já foram testados quanto às atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, nematicida e inibidora de enzimas de interesse bioquímico, como acetilcolinesterase. E vários compostos químicos bioativos já foram identificados, em alguns casos, trata-se do primeiro relato de informações químico-farmacológicas para a espécie (RODRIGUES, 2017; ALVES, 2019).

Uma das espécies que se mostrou promissora na busca de novas substâncias com propriedades citotóxicas e antitumorais, foi a *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae) (ALMEIDA, 2015). Pesquisadores do BIOPROS já identificaram compostos vitanolídeos no extrato diclorometânico dessa planta como responsáveis pela atividade antitumoral, sendo esse o primeiro estudo químico-farmacológico da espécie (ALMEIDA, 2019).

Como a *A. velutina* tem composição química bastante similar (vitanolídeos) (ALMEIDA, 2019) e forte relação filogenética com a espécie *Withania somnifera* (Solanaceae), conhecida como ginseng indiano e amplamente usada como fitoterápico na medicina Ayurvédica (MUSHARRAF *et al.*, 2011; PRABU; PANCHAPAKESAN; RAJ, 2012), a *A. velutina* apresenta potencial para ser usada como insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) para a produção de fitoterápicos.

Para iniciar uma pesquisa para o desenvolvimento de medicamento fitoterápico a partir de uma espécie não utilizada na medicina popular, como é o caso da *A. velutina*, se faz necessária a realização de ensaios não clínicos que comprovem a sua segurança (BRASIL, 2014). Portanto, o presente trabalho propõe a avaliação da toxicidade aguda e de doses repetidas do extrato etanólico das folhas de *A. velutina* em ratos Wistar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fitoterápicos

Atualmente, a utilização de fitoterápicos é uma prática mundialmente disseminada, sendo encorajada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), especialmente em países em desenvolvimento (MATTOS *et al.*, 2018).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26/2014 define fitoterápico como o produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2014).

Os efeitos biológicos do fitoterápico se devem ao fitocomplexo, que é o conjunto de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário ou secundário da planta (BRASIL, 2014).

O fitocomplexo pode ser o marcador do fitoterápico. O marcador é a substância ou classe de substâncias (exemplo: alcaloides, flavonoides) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014).

A RDC nº 26/2014 determinou a divisão dos fitoterápicos em dois grupos: medicamentos fitoterápicos (MF) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTF). A segurança e eficácia dos MF devem ser comprovadas por meio de estudos não clínicos e clínicos ou por registro simplificado. Para os PTF, a segurança e efetividade devem ser comprovadas por meio da comprovação de uso seguro e efetivo para um período mínimo de 30 anos ou por registro simplificado (BRASIL, 2014).

### 2.2 *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae)

*Athenaea velutina* pertence à família Solanaceae (MISSOURI..., 2018). As solanáceas compreendem 3000 a 4000 espécies, classificadas em aproximadamente 100 gêneros. É uma família economicamente importante, com distribuição mundial (OLMSTEAD, 2013; GEBHARDT, 2016). Contém culturas

alimentares de importância global, como a batata (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*S. lycopersicum* L.), a berinjela (*S. melongena* L.) e a pimenta (*Capsicum* spp.). Além de importantes espécies para a indústria farmacêutica, como o tabaco (*Nicotiana* spp.) e a atropina (*Atropa belladonna* L.) (VORONTSOVA; KNAPP, 2012; GEBHARDT, 2016). Muitos gêneros são ornamentais, tais como: *Brunfelsia* (dama-da-noite) e *Petunia* (petúncias) (JUDD *et al.*, 2009).

*Athenaea* Sendtn. é restabelecido como o nome correto para o táxon anteriormente referido como *Aureliana* Sendtn. (RODRIGUES; KNAPP; STEHMANN, 2019).

O gênero *Athenaea* compreende outras 11 espécies, são elas: *A. angustifolia*, *A. anonacea*, *A. brasiliensis*, *A. cuspidata*, *A. fasciculata*, *A. martiana*, *A. picta*, *A. pogogenia*, *A. sellowiana*, *A. tomentosa* e *A. wettsteiniana* (RODRIGUES; KNAPP; STEHMANN, 2019). Todas são endêmicas do Brasil, exceto *A. fasciculata* que extrapola os limites do país, alcançando também a Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (RODRIGUES, 2013).

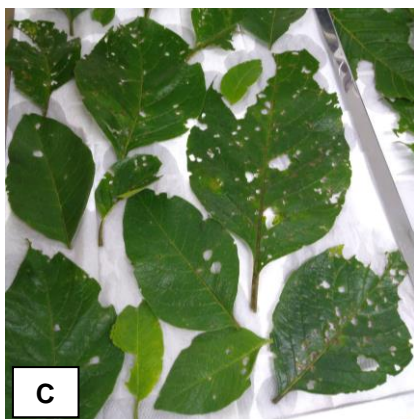
São sinônimas de *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy: *Aureliana velutina* (Sendtn.), *Bassovia velutina* (Sendtn.) Dunal e *Capsicum velutinum* (Sendtn.) Kuntze (RODRIGUES; KNAPP; STEHMANN, 2019). *Athenaea velutina* tem como nomes populares: jurubeba-de-morcego, fruta-de-morcego (KUHLMANN, 2018) e jurubeba-branca (RODRIGUES, 2013).

A planta recebeu esses nomes populares porque seus frutos são semelhantes à jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) (FIGURAS 1 E e G), que também pertence à família das solanáceas e por atraírem morcegos (KUHLMANN, 2018).

Os frutos amargos da jurubeba são amplamente utilizados na culinária regional, na forma de conservas ou receitas. Também são usados tradicionalmente curtidos na cachaça (KUHLMANN, 2018). Essa planta é utilizada na medicina popular para tratar distúrbios gástricos e hepáticos, apresenta propriedades antioxidantes e atenuantes do efeito citotóxico de certas substâncias (VIEIRA *et al.*, 2013). No entanto, não foram encontrados registros de usos alimentícios nem medicinais da *A. velutina* (KUHLMANN, 2018).

Os morcegos atraídos pelos frutos de *A. velutina* são principalmente frugívoros (Phyllostomidae) como *Sturnira liliium*, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, entre outros. As flores da *A. velutina* atraem abelhas (KUHLMANN, 2018).

Figura 1 - *Athenaea velutina* na Mata do Paraíso, Viçosa - MG (A), *Athenaea velutina* no Parque Estadual do Itacolomi, Ouro Preto - MG (B), folhas (C), flores (D), frutos (E) e sementes (F) de *Athenaea velutina* e frutos de *Solanum paniculatum* L. (jurubeba) (G)



Fonte: A autora, 2018 (A, C); Leite, J. P. V., 2018 (B); Kuhlmann, 2018 (D, E, F e G).

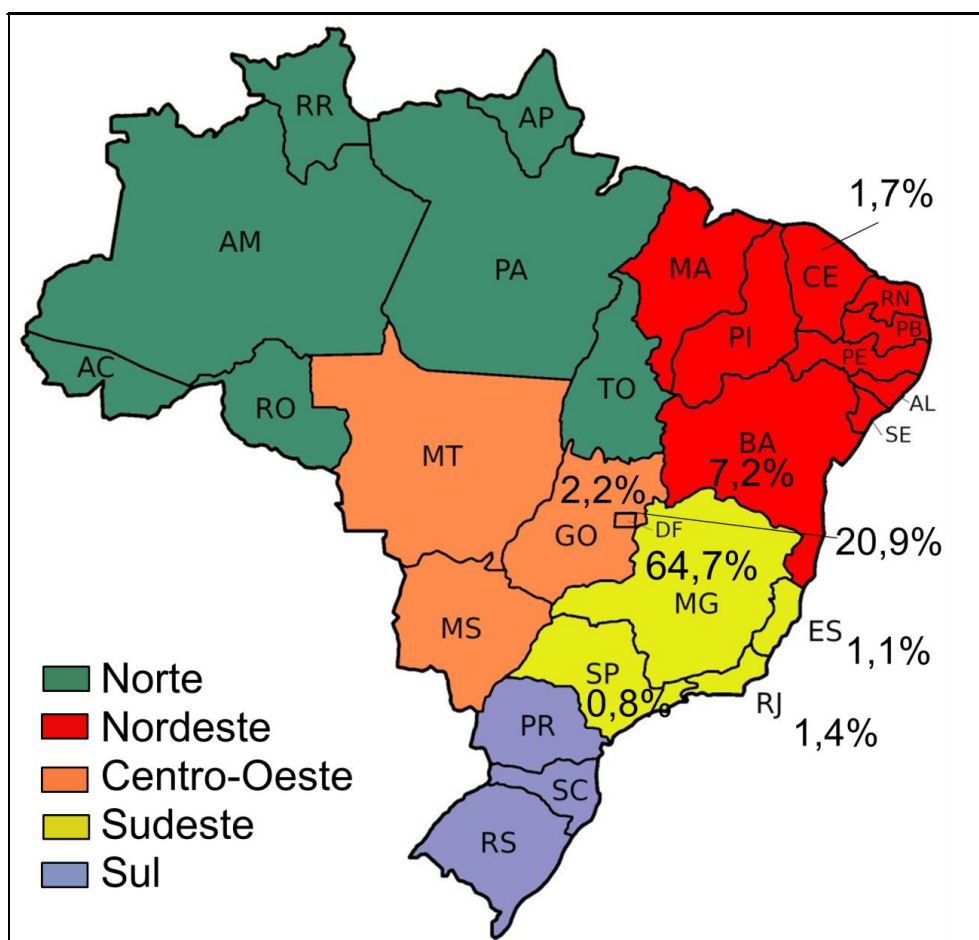
*A. velutina* se apresenta como arbustos ou pequenas árvores de até 3,5 m de altura (KUHLMANN, 2018), densamente aveludados (BARBOZA; CHIARINI; STEHMANN, 2010). O epíteto específico *velutina* vem do latim, devido ao fato da planta apresentar esse revestimento aveludado de delicados e macios pelos (RIZZINI, 1955). O ápice das folhas de *A. velutina* é acuminado, suas flores possuem pétalas verdes com bordas brancas e os frutos são globosos e carnudos, com até 1,5 cm de diâmetro, verdes quando imaturos, amarelo-esverdeados e amolecidos quando maduros. As sementes têm até 3 mm de comprimento, são achatadas, irregulares, tem a superfície enrugada e são douradas; mais de 50 por fruto (FIGURAS 1A a F) (HUNZIKER; BARBOZA, 1990; CARVALHO; COSTA; DUARTE, 2001; GALASSI; MELLO-SILVA; SILVA, 2006; RODRIGUES, 2013; KUHLMANN, 2018).

O habitat da *A. velutina* é em locais altos, acima de 700 m, frequentemente entre 1200 e 1600 m, beiras de estradas, clareiras, mas também em Matas de Galeria. A floração e a frutificação dessa espécie são concentradas entre os meses de outubro e abril (RODRIGUES, 2013).

*A. velutina* tem como domínios fitogeográficos o Cerrado e a Mata Atlântica (AURELIANA..., 2018).

Com base em um levantamento realizado em 2019, pesquisando o banco de dados do herbário virtual [inct.splink.org.br](http://inct.splink.org.br) (INCT, 2019), há ocorrência de *Athenaea velutina* nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. Do total das 363 ocorrências relatadas de *A. velutina*, a maioria está concentrada em Minas Gerais (64,7%). O segundo estado com maior número de registros é o Distrito Federal (20,9%), seguido da Bahia (7,2%) e de Goiás (2,2%). Também há ocorrência de *A. velutina* no Ceará (1,7%), no Rio de Janeiro (1,4%), no Espírito Santo (1,1%) e em São Paulo (0,8%) (FIGURA 2).

Figura 2 - Ocorrência geográfica de *Athenaea velutina*, baseada nas informações retiradas do banco de dados do herbário virtual inct.splink.org.br, no ano de 2019



Fonte: A autora, 2019. BA: Bahia, CE: Ceará, DF: Distrito Federal, ES: Espírito Santo, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo.

### 2.3 Conhecimento fitoquímico sobre *Athenaea velutina*

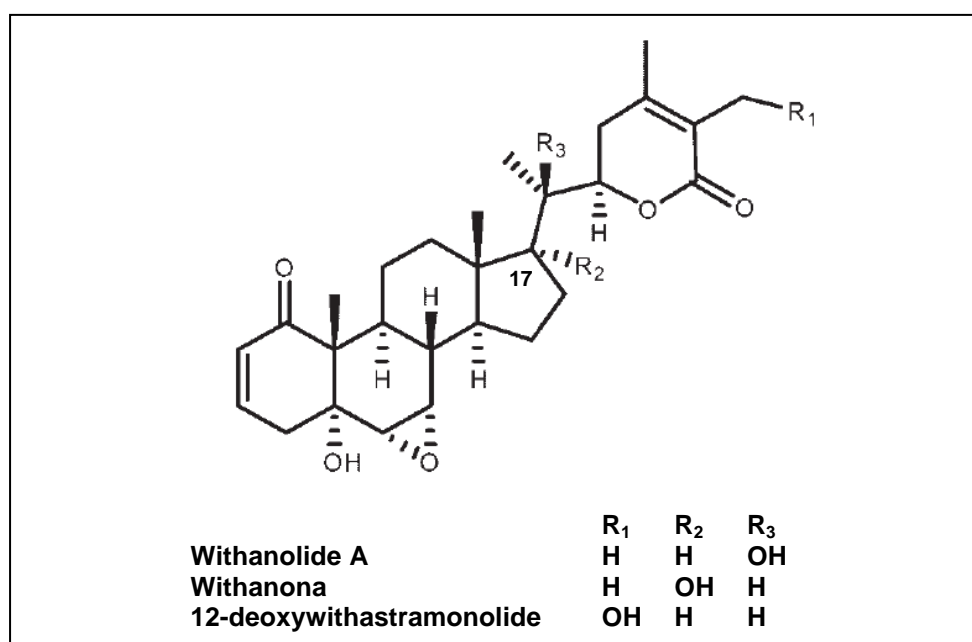
Os vitanolídeos estão bem estabelecidos como marcadores quimiotaxonômicos nas solanáceas (PIGATTO; MENTZ; SOARES, 2014).

Esses metabólitos secundários são esteroides contendo uma lactona com uma cadeia lateral de nove carbonos, geralmente ligados ao carbono 17 (C-17). Uma grande variação da fração lactona é encontrada em várias classes de vitanolídeos (FIGURA 3) (ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 1998; MUSHARRAF *et al.*, 2011).

O isolamento e a síntese de vitanolídeos têm atraído grande interesse devido às suas diversas atividades biológicas, tais como: antitumoral,

antimicrobiana, antiestresse, anti-inflamatória, antiúlcera e hepatoprotetora, imunomoduladora e imunossupressora, citotóxica, inseticida, antiparasitária, diurética, antioxidante, neuroprotetora, inibidora de angiogênese, hipoglicêmica, anticolinesterase e antiartrítica (BENJUMEA *et al.*, 2009; ALMEIDA-LATEFÁ *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; MUSHARRAF *et al.*, 2011).

Figura 3 - Estrutura dos vitanolídeos



Fonte: Adaptado de Musharraf e colaboradores, 2011.

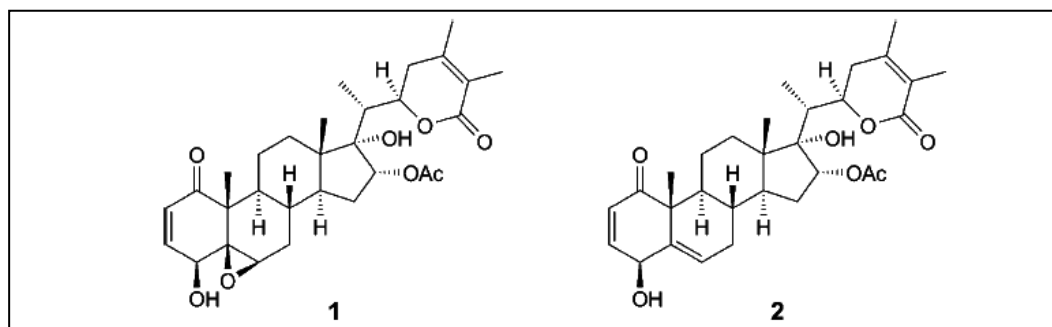
Um grande número de vitanolídeos foi isolado da subfamília Solanoideae (Solanaceae). Esses compostos foram encontrados em mais de 20 gêneros da família Solanaceae (PIGATTO; MENTZ; SOARES, 2014; ALMEIDA-LATEFÁ *et al.*, 2010).

Os vitanolídeos já identificados em *Withania somnifera* são: vitanolídeos A (FIGURA 3), B-O, Q, R, T, U, WS-1, Y, Z; di-hidroxivitanolídeo; hidroxivitanolídeo D; vitanosídeos I-XI; vitaferina A; 6 $\alpha$ -cloro-5 $\beta$ ,17 $\alpha$ -di-hidroxivitaferina A; 6 $\alpha$ -cloro-5 $\beta$ -hidroxivitaferina A; (22R)-5 $\beta$ -formil-6 $\beta$ ,27-di-hidroxi-1-oxo-4-norvit-24-enolídeo; 2,3-di-hidrovitaferina A; 3-metoxi-2,3-di-hidrovitaferina A; 2,3-dide-hidrosomnifericina; vitanona (FIGURA 3); 5-hidroxivitanolídeo R; vitasomidienona; vitaferinilo; vitanina; dienolídeos; trienolídeos; fisagulina D; coagulina Q; vitassomniferina A; vitassomniferóis A-C; sominona; sominolídeo; ashwagandhanolídeo (derivado dimérico tiovitanolídeo); sitoindosídeos VII e VIII

(acilesteril-glicosídeos); sitoindosídeos IX e X (C-27-glicovitanolídeos) (MARQUES, 2014) e 27-deoxivitaferina A (WORLD..., 2009).

*Athenaea* é um gênero taxonomicamente ainda pouco conhecido. Apenas recentemente a sua fitoquímica começou a ser revelada (RODRIGUES, 2013). Almeida-Lafetá e colaboradores (2010) isolaram vitanolídeos (Aurelianolídeo A e B) do extrato metanólico de *Athenaea fasciculata* (Vell) e utilizaram técnicas espectroscópicas para caracterizar os compostos (FIGURA 4). Esses vitanolídeos apresentaram atividade leishmanicida (LIMA *et al.*, 2018).

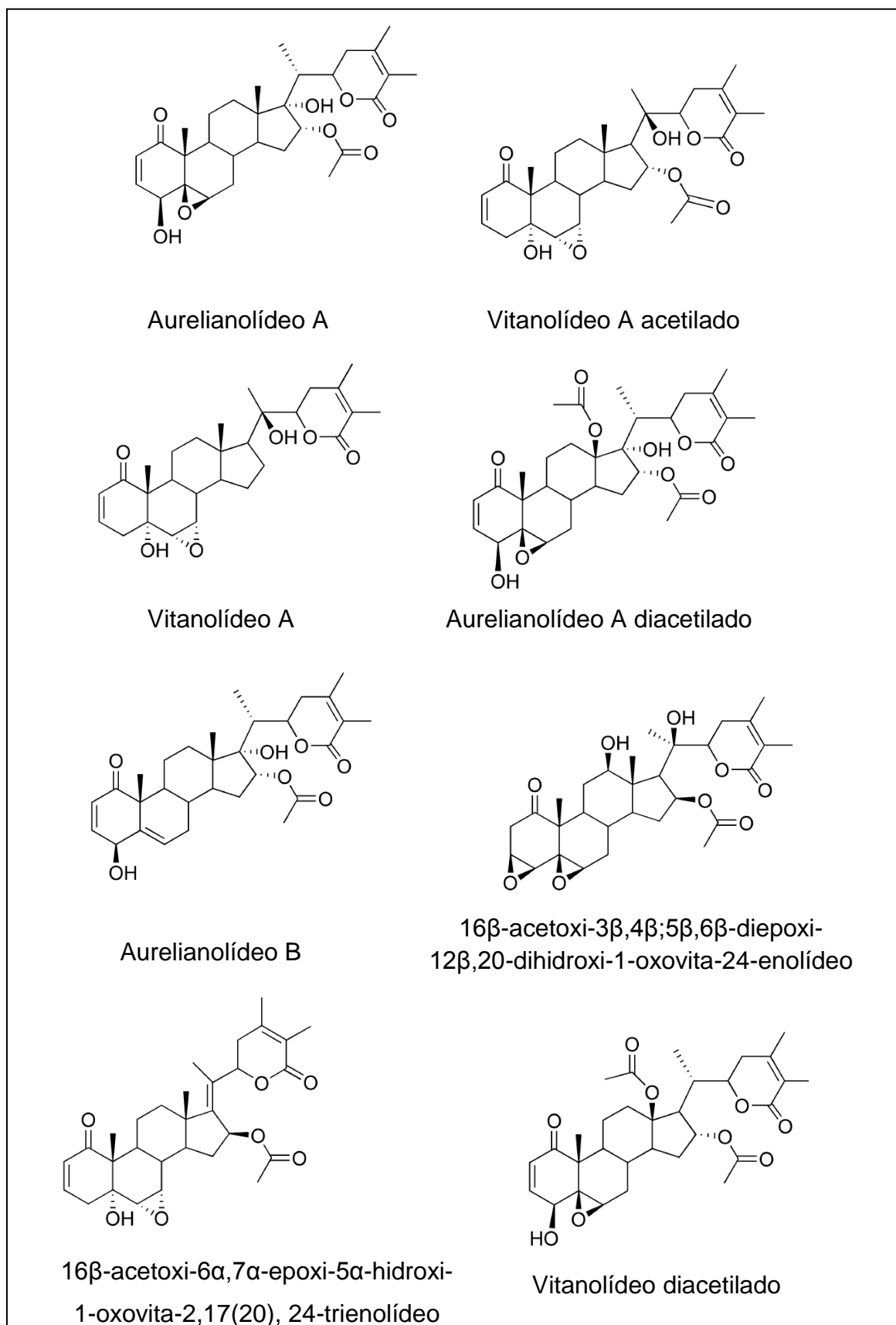
Figura 4 - Vitanolídeos de *Athenaea fasciculata* (Vell): Aurelianolídeo A (1) e Aurelianolídeo B (2)



Fonte: Almeida-Latefá e colaboradores, 2010.

Empregando análises espectrométricas por *Liquid Chromatography – Electrospray Ionization - Multiple-stage Mass Spectrometry* (LC–ESI–MS<sup>n</sup>) Almeida (2019) também identificou 11 vitanolídeos inéditos em *A. velutina*, são eles: 16 $\alpha$ -acetoxi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-4 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxi-1-oxovita-2,24-dienolídeo (Aurelianolídeo A); 16 $\alpha$ -acetoxi-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihidroxi-1-oxovita-2,24-dienolídeo (Vitanolídeo A acetilado); 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihidroxi-1-oxovita-2,24-dienolídeo (Vitanolídeo A); 16 $\alpha$ ,18-diacetoxi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-4 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxi-1-oxovita-2,24-dienolídeo (Aurelianolídeo A diacetilado); 16 $\alpha$ -acetoxi-4 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-1-oxovita-2,5,24-trienolídeo (Aurelianolídeo B); 16 $\beta$ -acetoxi-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ;5 $\beta$ ,6 $\beta$ -diepoxi-12 $\beta$ ,20-dihidroxi-1-oxovita-24-enolídeo; 16 $\beta$ -acetoxi-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ -hidroxi-1-oxovita-2,17(20),24-trienolídeo; 16 $\alpha$ ,18-diacetoxi-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-4 $\beta$ -hidroxi-1-oxovita-2,24-dienolídeo (Vitanolídeo diacetilado) (FIGURA 5) e 3 derivados vitanolídeos.

Figura 5 - Vitanolídeos identificados em *Athenaea velutina*



Fonte: Adaptado de Almeida, 2019.

No entanto, a ocorrência dos vitanolídeos não é completamente restrita à Solanaceae. Também foram isolados de Taccaceae (*Tacca plantaginea* e *T. chantrieri*), Leguminosae (*Cassia siamea*), e de alguns organismos marinhos, como *Minabea* sp. (PIGATTO; MENTZ; SOARES, 2014; ALMEIDA-LATEFÁ *et al.*, 2010).

Além dos vitanolídeos, na *Withania somnifera* já foram identificados ácidos fenólicos (ácidos gálico, siríngico, benzoico, clorogênico, p-coumárico e vanílico) e flavonoides (catequina, kaempferol e naringenina) (ALAM *et al.*, 2011). E no gênero *Athenaea*, já foram identificados os ácidos fenólicos: ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido vanílico e ácido ferúlico (SILVA *et al.*, 2018).

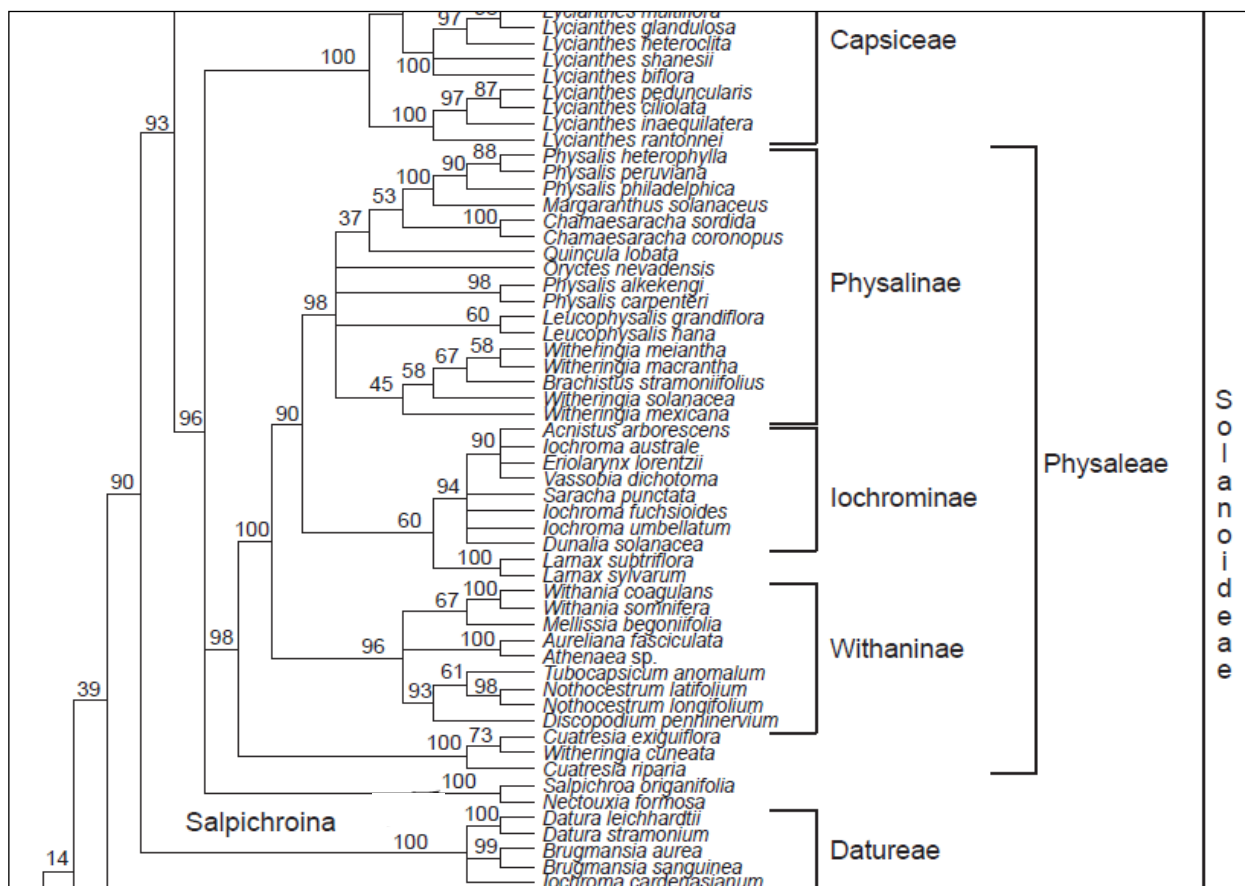
Em estudo realizado por Almeida (2019), foram identificados em extrato de *A. velutina* seis compostos fenólicos: quatro fenólicos simples (ácido quinínico, derivados de ácido cafeico - ácido cafeoilquínico e ácido dicafeoilquínico - e derivado do ácido ferúlico) e dois flavonoides (kaempferol-O-rutinosídeo e quercetina-3-O-rutinosídeo). Nesse trabalho foi empregada a técnica de injeção direto de fluxo em espectrômetro de massa (*Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Multiple-stage Mass Spectrometry - FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>*).

#### **2.4 Relação filogenética entre *Athenaea velutina* e *Withania somnifera***

Com base nos trabalhos realizados por Almeida (2019) e por Almeida-Latefá e colaboradores (2010) foi observado que ambas as espécies, *A. velutina* e *A. fasciculata*, produzem esteroides vitanolídeos similares aos encontrados em *Withania somnifera*. Na última classificação proposta por Olmstead e colaboradores (2008), baseada em análises filogenéticas, *Athenaea* e *Withania* são da mesma família (Solanaceae), subfamília (Solanoideae), tribo (Physaleae) e subtribo (Withaninae) (FIGURA 6).

O gênero *Withania* está entre as mais ricas fontes de lactonas esteroidais na natureza. *W. somnifera*, comumente conhecido como ginseng indiano ou Ashwagandha, é amplamente utilizada nas medicinas tradicional Indiana e Ayurvédica (MUSHARRAF *et al.*, 2011; PRABU; PANCHAPAKESAN; RAJ, 2012). É um fitoterápico mundialmente prescrito como um tônico para a saúde geral, e para várias outras indicações, tais como: antiestresse, anti-inflamatória, anti-isquêmica, antioxidante, quimiopreventiva, efeitos na memória e cognição, neuroprotetora e estimulante imunológica (WORLD..., 2009).

Figura 6 - Filogenia de Solanaceae



Fonte: Adaptado de Olmstead e colaboradores, 2008.

Os extratos metanólicos de diferentes partes de *W. somnifera* exibem potencial terapêutico contra problemas cardiovasculares, e também são eficazes contra hiperlipidemia, obesidade e envelhecimento. A maioria das atividades biológicas associadas a essa planta é amplamente atribuída à presença de vitanolídeo A e seus congêneres (FIGURA 3) (MUSHARRAF *et al.*, 2011).

As constatações expostas acima levam a seguinte hipótese: seria a espécie *Athenaea velutina* sucedânea de *W. somnifera*?

## 2.5 Estudos de toxicidade para fitoterápicos

Apesar da grande biodiversidade brasileira, o número de produtos fitoterápicos industrializados derivados de plantas medicinais nativas brasileiras ainda é muito baixo (TABACH; DUARTE-ALMEIDA; CARLINI, 2017). A avaliação da segurança de plantas usadas na medicina popular no Brasil também não é muito

recorrente (TABACH; DUARTE-ALMEIDA; CARLINI, 2017), apesar de ter aumentado nos últimos anos após a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). A segurança e eficácia desses produtos vegetais nativos precisam ser testadas de acordo com as diretrizes regulatórias nacionais e internacionais, para que os medicamentos fitoterápicos possam ser mais amplamente disponíveis para a população (TABACH; DUARTE-ALMEIDA; CARLINI, 2017).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pelo registro de medicamentos e pela fiscalização das empresas que os produzem. Essa agência realiza o controle sanitário dos produtos e normatiza a sua produção, distribuição, publicidade, consumo e descarte (CARVALHO *et al.*, 2011).

Os estudos de toxicologia não clínicos são realizados com células ou com animais, os estudos clínicos são feitos com seres humanos (BRAGA; RATES; SIMÕES, 2017).

Atualmente, seguindo a legislação nacional, os ensaios não clínicos de segurança e eficácia dos MF devem seguir como parâmetro mínimo, a última versão publicada pela ANVISA do Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, no que for aplicável a medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2014).

Esse Guia é uma orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. A sua elaboração foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos (*Food and Drug Administration - FDA, European Medicines Agency - EMA*), e de instituições de interesse na área (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH, Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD, National Cancer Institute – NCI e World Health Organization - WHO*), visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional (ANVISA, 2013).

Para avaliação da toxicidade dos MF, A ANVISA permite utilizar os guias da OECD. A OECD, com sede em Paris, França, é uma organização internacional composta por 36 países membros. Essa organização estabelece normas internacionais em uma ampla gama de temas, desde agricultura e impostos até a segurança de produtos químicos (BRASIL, 2019a; ORGANISATION..., 2019).

Dentre os estudos não clínicos de segurança propostos no Guia da ANVISA, estão os estudos de toxicidade de dose única (aguda) e os estudos de toxicidade de doses repetidas. Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando essa é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por pelo menos 14 dias após a administração (ANVISA, 2013).

Os estudos de toxicidade de doses repetidas permitem caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida diariamente. A partir deles é possível obter informações sobre os efeitos tóxicos e identificação de órgãos alvos, informações sobre os efeitos fisiológicos, hematológicos, bioquímicos, anátomo e histopatológicos, além de informações sobre a indicação do nível de dose sem observação de efeito (*No Observed Effect Level* - NOEL) e o nível de dose sem observação de efeito adverso (*No Observed Adverse Effect Level* - NOAEL) (ANVISA, 2013).

Espera-se que esses estudos possam fornecer informações para dar subsídios às futuras pesquisas clínicas com o extrato etanólico de *A. velutina* (ANVISA, 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Analisar quimicamente o extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy (Solanaceae)
- Avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas do extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina* em ratos Wistar.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Produzir o extrato etanólico das folhas de *A. velutina*;
- Comparar o perfil fitoquímico, por *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector* (HPLC-DAD), de extratos produzidos com folhas de duas diferentes localidades de acesso;
- Identificar os compostos vitanolídeos presentes no extrato, utilizando *Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry* (UHPLC-HRMS);
- Analisar o conteúdo mineral do material vegetal e do extrato;
- Determinar o teor de lipídeos do extrato;
- Avaliar a toxicidade aguda e de doses repetidas do extrato, por administração via oral, em ratos Wistar, tendo como parâmetros: mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais), variações no peso corporal, no peso dos órgãos e no consumo de água e ração, patologia clínica (hematologia e bioquímica), duração e reversibilidade da toxicidade e anátomo e histopatologia.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Estudos fitoquímicos

#### 4.1.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Athenaea velutina* foram acessadas no fragmento de Mata Atlântica de duas localidades:

- 1) Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA) Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, que pertence à Universidade Federal de Viçosa (UFV) (FIGURA 1A), em junho e outubro de 2018. Exsicata depositada no Herbário VIC da UFV, sob o registro VIC 047742;
- 2) Parque Estadual do Itacolomi, em Ouro Preto/Mariana, Minas Gerais, Brasil (FIGURA 1B), em dezembro de 2018 e fevereiro de 2019. Exsicata depositada no Herbário “Professor José Badini”, da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o registro OUPR 32617.

Foi necessário acessar folhas de *A. velutina* de duas localidades, porque a quantidade de folhas do município de Viçosa era insuficiente para produzir a quantidade de extrato necessária para a realização do presente estudo.

As folhas e o extrato oriundos do EPTEA serão referidos aqui como folhas/extrato de Viçosa, e as folhas e o extrato oriundos do Parque Estadual do Itacolomi serão referidos como folhas/extrato de Ouro Preto.

O cadastro do acesso ao patrimônio genético foi obtido pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN (nº AD6E1F9). A autorização do acesso ao patrimônio genético no Parque do Itacolomi foi concedida pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais – IEF-MG (nº 011/2019) (ANEXO A).

Para coletar as amostras utilizou-se de tesoura e podão.

## 4.1.2 Preparação das folhas

### 4.1.2.1 Limpeza e secagem

As folhas frescas foram destacadas dos galhos, lavadas e pesadas (balança: C15, C&F<sup>®</sup>). A secagem foi realizada em uma estufa de secagem (PEG100, Pardal<sup>®</sup>) com ventilação circular a 40 °C, durante 48 horas.

### 4.1.2.2 Pulverização

O material vegetal seco foi pulverizado em um moinho de facas (MA680, Marconi<sup>®</sup>), com peneira de 20 mesh (0,85 mm), e posteriormente, foi pesado (balança: C15, C&F<sup>®</sup>).

## 4.1.3 Produção do extrato vegetal

O processo de extração empregado foi o de percolação exaustiva.

Inicialmente, o material vegetal pulverizado foi submetido a uma maceração com etanol 99,5% (Êxodo Científica<sup>®</sup>, Tec-lab<sup>®</sup> e Dinâmica<sup>®</sup>), na proporção de 1:5 (200 g de material vegetal para 1 L de etanol), em um béquer, por 2 horas. Posteriormente, o material vegetal embebido no solvente foi adicionado ao percolador. O extrato líquido foi drenado e concentrado em evaporador rotatório (R-200 e R-3, Büchi<sup>®</sup>), temperatura do banho 50 °C, acoplado à bomba de vácuo (pressão reduzida). O processo foi realizado de forma exaustiva diversas vezes até que não se observou mais extração significativa.

Após concentrados, os extratos foram liofilizados (liofilizadores: L101, Liotop<sup>®</sup>; LP 510, Liotop<sup>®</sup>; LS3000, Terroni<sup>®</sup>). O total de extrato proveniente das folhas de *A. velutina* de Viçosa e de Ouro Preto foi pesado separadamente em balança analítica (AY220, Marte<sup>®</sup>). Esses valores foram utilizados para o cálculo do rendimento dos extratos.

O rendimento (R) dos extratos foi calculado a partir da relação entre o peso seco do material vegetal pulverizado e o peso do extrato liofilizado produzido, seguindo a fórmula abaixo:

$$R(\%) = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa do material vegetal pulverizado (g)}} \times 100$$

Os extratos foram armazenados em frascos de vidro, fechados e mantidos no freezer a -20 °C, protegidos da luz.

#### 4.1.4 Análise comparativa dos extratos por HPLC-DAD

Os extratos das duas diferentes localidades (Viçosa e Ouro Preto) foram comparados para confirmar a similaridade do perfil cromatográfico, e então, serem reunidos para garantir quantidade suficiente para realização de todo o estudo.

Os perfis cromatográficos dos extratos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (*High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector - HPLC-DAD*), utilizando equipamento Shimadzu Prominence<sup>®</sup> (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions). O comprimento de onda monitorado foi de 254 nm. A coluna utilizada nas eluições (Shimpack<sup>®</sup>, 150 mm por 4,6 mm de diâmetro, com tamanho de partícula de 15 µm) foi de fase reversa (C-18) e a temperatura do forno foi ajustada em 40 °C.

O preparo das amostras foi realizado utilizando uma pequena quantidade das amostras solubilizadas em 2 µL de metanol (MeOH) grau HPLC (Dinâmica<sup>®</sup>), com auxílio de banho ultrassônico (USC1600A, UltraCleaner<sup>®</sup>), em temperatura de 30 °C, por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro *millipore* de 45 µm, acondicionadas nos *vials* e levadas ao HPLC.

O fluxo utilizado foi de 1 ml/min e o tempo de corrida foi de 60 minutos. A fase móvel consistiu de solvente A: água ultrapura e solvente B: MeOH. Foi selecionado um gradiente linear, variando de 5% a 95% de MeOH, do tempo inicial até 55 minutos de corrida. Após 60 minutos, o sistema voltou à concentração inicial de 5% de MeOH (TABELA 1).

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado na técnica de HPLC-DAD para os extratos de *Athenaea velutina*

Tempo (min)	Concentração de MeOH (%)
0	5
55	95
60	5

#### 4.1.5 Análise do EEFoAv por UHPLC-HRMS

A análise da presença de esteroides vitanolídeos em extrato etanólico de *A. velutina* (EEFoAv) foi realizada com o extrato administrado aos animais durante o teste de toxicidade, proveniente da mistura dos extratos oriundos de materiais vegetais de Viçosa e Ouro Preto.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (*Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry - UHPLC-HRMS*).

Foi utilizado o equipamento UHPLC Nexera (Shimadzu®), acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (*Electrospray Ionization - Time-of-flight, electron transfer dissociation*) ESI-QTOF maXis ETD (Bruker®), controlado pelo software Compass 1.5.

Amostras foram diluídas na concentração final de 5 mg/ml, sendo injetado 1 µL. A coluna usada foi Shimadzu® Shim-Pack XR-ODS-III (C18, 2,2 µm, 2,0 mm × 150 mm), a 40 °C, com fluxo de 400 µl/min. As fases móveis A (solução de ácido fórmico 0,1% em água deionizada) e B (acetonitrila) foram usadas em condição isocrática de 5% de B nos 5 minutos iniciais, seguido por um gradiente linear até 100% de B no tempo de 40 minutos, persistindo nessa concentração por 5 minutos (TABELA 2).

Os espectros de massas foram adquiridos em modos positivo e negativo. Parâmetros de ionização empregados foram energia de 4500 V voltagem capilar, 3,0 bar de pressão de nebulização, 8 L/min e 200 °C de fluxo de gás dessecante e temperatura, respectivamente.

Tabela 2 - Gradiente de eluição empregado na técnica de UHPLC-HRMS para o extrato de *Athenaea velutina*

Tempo (min)	Concentração de acetonitrila (%)
0	5
5	5
40	100
45	100

Para fragmentação foi empregada energia de colisão entre 15 e 60 ev, sendo a configuração dos íons otimizados para faixa de 40-1000  $m/z$ .

Para detecção dos esteroides vitanolídeos, previamente identificados por Almeida (2019), foram obtidos cromatogramas de íons extraídos (*Extracted Ions Chromatogram* - EIC) pelo registro da intensidade do sinal observado para valores de  $m/z$  referentes a esses compostos em função do tempo de retenção.

A identificação dos picos cromatográficos foi realizada pela determinação da fórmula molecular de acordo com massa exata do isótopo do íon molecular ( $MS^1$ ) e comparação dos espectros de fragmentação ( $MS^2$ ) com espectros de referência contidos nos bancos de dados *MassBank* e *Universal Natural Products Database - In-silico MS/MS DataBase* (UNPD-ISDB).

#### 4.1.6 Análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do EEFoAv

A análise de minerais do material vegetal das folhas coletadas em Ouro Preto e do EEFoAv foi realizada pelos técnicos do Departamento de Solos da UFV.

A digestão nitroperclórica foi feita para determinação dos teores de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e boro (B), em 0,5 g de cada amostra. Esses minerais foram quantificados utilizando espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy*: ICP-OES; Optima 8300 DV, PerkinElmer®) (SARRUGE; HAAG, 1974).

A determinação de nitrogênio (N) foi realizada pelo método Kjeldahl, em 0,2 g de cada amostra (SARRUGE; HAAG, 1974).

Os resultados obtidos foram expressos em decagrama por quilograma de amostra (dag/kg) para P, K, Ca, Mg, S e N e miligramas por quilograma de amostra (mg/kg) para Cu, Fe, Zn, Mn e B.

#### **4.1.7 Determinação de lipídeos do EEFoAv pelo método de Soxhlet**

O teor de lipídeos do EEFoAv foi determinado pelo método de Soxhlet, descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Três gramas do extrato foram pesadas em papel de filtro, que foi arramado com fio de lã previamente desengordurado. O papel de filtro foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet. O extrator foi acoplado ao balão de fundo chato previamente tarado a 105 °C. Éter etílico P. A. (Isofar<sup>®</sup>) foi adicionado em quantidade suficiente para um Soxhlet meio. A extração contínua foi mantida por 6 horas (quatro a cinco gotas por segundo), sob aquecimento em chapa elétrica.

Após as 6 horas, o papel de filtro foi retirado, o éter foi destilado e o balão com o resíduo extraído foi transferido para uma estufa a 105 °C, sendo mantido nela por uma hora. O balão foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente.

Para encontrar a porcentagem de lipídeos na amostra foi utilizado o cálculo abaixo:

$$\frac{100 \times \text{Lip}}{A} = \text{lipídeos ou extrato etéreo por cento m/m}$$

Onde Lip é igual ao número de gramas de lipídeos e A é igual número de gramas da amostra.

A determinação foi realizada em triplicata.

## **4.2 Ensaio *in vivo***

### **4.2.1 Animais**

Foram utilizados 70 animais adultos (aproximadamente 250,00 g), com 8 semanas de idade, sendo 30 ratos Wistar machos e 40 ratas Wistar fêmeas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da

UFV. Os animais foram separados em 14 gaiolas (50 x 60 x 22 cm), contendo 05 animais em cada e foram transportados em condição adequada e controlada, do Biotério Central até o Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural, do Departamento de Biologia Geral.

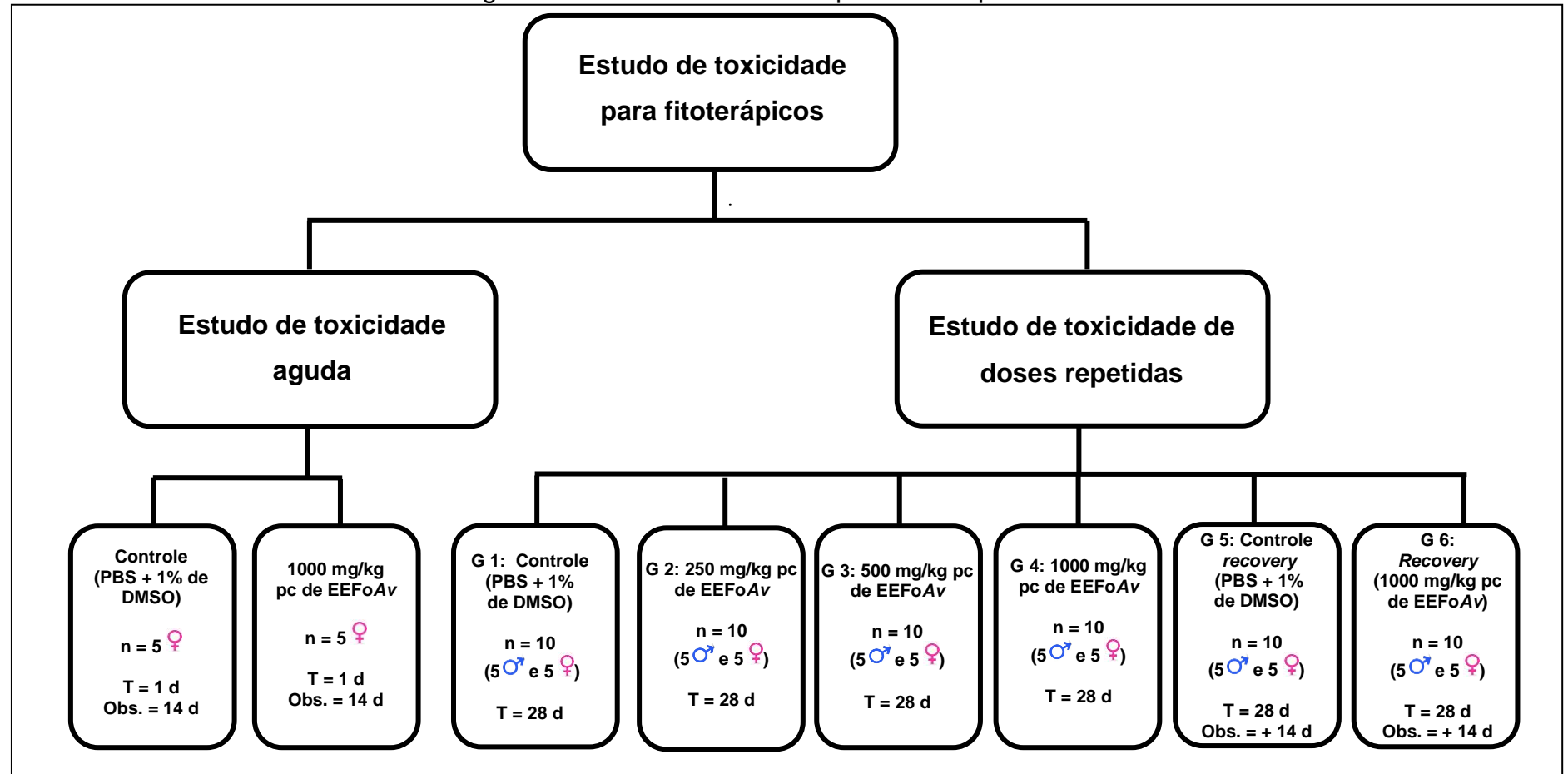
Em seguida, os animais foram alocados em gaiolas individuais com maravalha autoclavada, sob temperatura (21 °C) e fotoperíodo (12 h claro/escuro) controlados. Aos animais, foram ofertadas água *ad libitum* e ração comercial. Todos os procedimentos que foram realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa - CEUA/UFV, sob o número de protocolo 82/2018 (ANEXO B).

## **4.2.2 Delineamento experimental**

### **4.2.2.1 Estudo de toxicidade para fitoterápicos**

O delineamento do estudo de toxicidade para fitoterápicos (estudo de toxicidade aguda e estudo de toxicidade de doses repetidas) está representado na Figura 7.

Figura 7 - Estudo de toxicidade para fitoterápicos



Fonte: A autora.

Legenda: d: dia(s), DMSO: dimetilsulfóxido, EEFoAv: Extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina*, ♀: fêmeas, G: grupo, ♂: machos, n: número, Obs.: Observação, PBS: *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino), T: tratamento.

#### 4.2.2.1.1 Estudo de toxicidade aguda

A sequência de procedimentos foi adotada para atender às recomendações contidas no Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (ANVISA, 2013) e às diretrizes da OECD (OECD, 2001b, 2001c e 2008a).

Após um mês de aclimação, 10 ratas foram divididas, em dois grupos experimentais (n = 5 animais por grupo), de acordo com o peso, de forma que nos dois grupos houvesse ratas mais pesadas e menos pesadas. No início do estudo, a variação de peso das ratas utilizadas não excedeu  $\pm 20\%$  do peso médio de cada grupo. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais até o final do experimento.

Um grupo foi tratado, via gavagem, com uma dose única de 1000 mg/kg de peso corporal (pc) do EEFoAv, dissolvidos em tampão fosfato salino (PBS) acrescido de 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). O grupo controle negativo recebeu, via gavagem, PBS acrescido de 1% de DMSO (que constituem o veículo para ressuspensão do extrato), no mesmo volume usado para o primeiro grupo.

No dia da administração, os animais foram observados duas vezes (logo após a administração e 4 horas depois). Nos 14 dias seguintes, os animais foram observados uma vez ao dia. Foi observada diariamente a possível ocorrência de mortalidade e os seguintes sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais): alterações na pele, pelo, olhos, mucosas, ocorrência de secreções, lacrimação, piloereção, padrão respiratório incomum, alterações na marcha, postura e resposta ao manuseio, presença de movimentos involuntários, *grooming* (limpeza) excessivo, andar em círculos repetitivos, caminhar para trás e automutilação.

As ratas foram pesadas a cada 3 dias (balança: AS500C, Marte<sup>®</sup>), para avaliar variações no peso corporal. O consumo de água e ração foi quantificado diariamente, a fim de avaliar variações no consumo. Para isso, a água e a ração ofertadas aos animais foram pesadas diariamente, os dados da diferença entre a água e a ração ofertadas e o restante não consumido foram utilizados para o cálculo do consumo diário.

#### 4.2.2.1.2 Estudo de toxicidade de doses repetidas

A sequência de procedimentos foi adotada para atender às recomendações contidas no Guia da ANVISA (ANVISA, 2013) e à diretriz 407 da OECD: Estudo de Toxicidade Oral de Doses Repetidas de 28 dias em roedores (OECD, 2008b).

Os animais foram divididos nos grupos de acordo com o peso, de forma que em todos os grupos houvesse animais mais pesados e menos pesados. No início do estudo, a variação do peso dos animais utilizados não excedeu  $\pm 20\%$  do peso médio de cada sexo, por grupo.

Os grupos experimentais foram delineados da seguinte forma:

- Grupo 1 (n = 5 machos; 5 fêmeas): controle negativo, recebendo PBS acrescido de 1% de DMSO, por gavagem, durante 28 dias;
- Grupo 2 (n = 5 machos; 5 fêmeas): tratamento com o extrato etanólico das folhas de *A. velutina* na dosagem de 250 mg/kg pc, ressuspendido em PBS acrescido de 1% de DMSO, via gavagem, por 28 dias;
- Grupo 3 (n = 5 machos; 5 fêmeas): tratamento com o EEFoAv na dosagem de 500 mg/kg pc, ressuspendido em PBS acrescido de 1% de DMSO, via gavagem, por 28 dias;
- Grupo 4 (n = 5 machos; 5 fêmeas): tratamento com o EEFoAv na dosagem de 1000 mg/kg pc, ressuspendido em PBS acrescido de 1% de DMSO, via gavagem, por 28 dias;
- Grupo 5 (n = 5 machos; 5 fêmeas): controle *recovery*, os animais receberam PBS acrescido de 1% de DMSO, via gavagem por 28 dias, e manutenção sem tratamento por mais 14 dias;
- Grupo 6 (n = 5 machos; 5 fêmeas): *recovery*, os animais receberam tratamento com o EEFoAv na dosagem de 1000 mg/kg pc, ressuspendido em PBS acrescido de 1% de DMSO, via gavagem, por 28 dias, e manutenção sem tratamento por mais 14 dias.

Durante os 28 dias de tratamento e os 14 dias sem tratamento, foi observada diariamente a possível ocorrência de mortalidade e os seguintes sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais): alterações na pele, pelo, olhos, mucosas, ocorrência de secreções, lacrimação, piloereção, padrão respiratório incomum, alterações na marcha, postura e resposta ao manuseio, presença de movimentos

involuntários, *grooming* (limpeza) excessivo, andar em círculos repetitivos, caminhar para trás e automutilação.

Os animais foram pesados a cada 3 dias (balança: AS500C, Marte<sup>®</sup>), para avaliar variações no peso corporal. O consumo de água e ração foi quantificado diariamente, a fim de avaliar variações no consumo. Para isso, a água e a ração ofertadas aos animais foram pesadas diariamente, os dados da diferença entre a água e a ração ofertadas e o restante não consumido foram utilizados para o cálculo do consumo diário.

Durante os 14 dias sem tratamento também foram monitorados: a reversibilidade, a persistência e o atraso na ocorrência de efeitos tóxicos.

#### 4.2.3 Ressuspensão do EEFoAv

Cada dose do extrato (1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc) foi ressuspensa em uma mistura contendo 594 µl de solução tampão fosfato salino (PBS) 1X e 6 µl de DMSO. O DMSO correspondeu a 1% da solução total de 600 µl.

A solução de PBS 1X foi previamente preparada, para isso foram necessários:

- 8 g de cloreto de sódio (NaCl);
- 0,2 g de cloreto de potássio (KCl);
- 1,4 g de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>);
- 0,2 g de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>);
- 1000 ml de água deionizada;
- ajuste do pH da solução para 7,2;
- autoclavar (autoclave: AV-50, Phoenix Luferco<sup>®</sup>);
- armazenar em pote de vidro, no refrigerador.

O valor em miligramas do extrato que foi administrado nos animais foi obtido após a pesagem dos animais e a realização do cálculo da média do peso por sexo, por grupo. O extrato foi pesado (balança: AY220, Marte<sup>®</sup>) em tubo falcon e a ele foi adicionado o veículo para ressuspensão.

A suspensão do extrato foi submetida ao banho ultrassônico (USC1600A, UltraCleaner<sup>®</sup>), por 30 minutos, com aquecimento (40 °C), para solubilização. Posteriormente, foi agitada (agitador tipo vórtex: VX-38, Warmnest<sup>®</sup>) e mantida em banho-maria (200Ø, WEA<sup>®</sup>) a 40 °C até o momento da administração.

#### 4.2.4 Eutanásia e coleta de material

Todos os animais ficaram em jejum, no período noturno, por aproximadamente 12 horas antes da eutanásia. Os animais tiveram seus pesos aferidos (balança: AS500C, Marte<sup>®</sup>), sendo em seguida, sedados com xilazina (10 mg/kg pc, intraperitoneal) e anestesiados com cloridrato de quetamina (150 mg/kg pc, intraperitoneal).

O sangue foi coletado por punção cardíaca, durante o período de anestesia do animal. Uma gota de sangue de cada animal foi utilizada para a dosagem de glicemia de jejum. Uma alíquota de 1ml do sangue de cada animal foi armazenada em tubos heparinizados, ao abrigo da luz. Esse material foi utilizado para as dosagens hematológicas. O restante do sangue de cada animal foi armazenado em tubos falcon sem anticoagulante, sendo imediatamente centrifugado (centrífuga: 208 n, Excelsa Baby II<sup>®</sup>) por 15 minutos a 4.119 x g, para obtenção do soro. O soro foi enviado para as análises bioquímicas.

Os órgãos dos animais (fígado, rins, coração e baço) foram removidos, dissecados, pesados (balança: 210A, BEL Engineering<sup>®</sup>) e analisados anatomicamente. O fígado foi separado para análises histopatológicas.

O peso relativo de cada órgão foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Peso Relativo} = \frac{\text{Peso do órgão (g)}}{\text{Peso corporal no dia da eutanásia (g)}} \times 100$$

#### 4.2.5 Análises hematológicas e bioquímicas

Para determinar as concentrações de glicose no sangue dos animais foram utilizadas tiras para teste de glicose e um glicosímetro (On Call<sup>®</sup> Plus; Laboratórios Acon, Inc., San Diego, CA, EUA).

O sangue coletado em tubo heparinizado foi utilizado para a dosagem do hemograma completo dos ratos: contagem total de leucócitos, contagem diferencial (relativa e absoluta) de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos), contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (volume corpuscular médio – VCM, hemoglobina corpuscular média – HCM,

concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM e índice de amplitude de distribuição de hemácias - RDW) e contagem de plaquetas.

As análises hematológicas foram realizadas no analisador hematológico automático Humancountplus® (Human do Brasil LTDA).

O soro foi utilizado para dosagem dos seguintes parâmetros bioquímicos: colesterol total (método enzimático-colorimétrico), colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) (método enzimático-colorimétrico), triglicerídeos (método enzimático-colorimétrico), bilirrubina total (método colorimétrico), alanina aminotransferase/transaminase glutâmico-pirúvica (ALT/TGP) (método cinético), aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico-oxálica (AST/TGO) (método cinético), gama glutamiltransferase (gama GT) (método cinético), fosfatase alcalina (método cinético), ácido úrico (método enzimático-colorimétrico), ureia (método cinético), creatinina (método cinético-colorimétrico), creatina quinase isoenzima MB (CK-MB) (método cinético), lactato desidrogenase (LDH) (método cinético), proteínas séricas (método colorimétrico), albumina (método colorimétrico), ferro (método colorimétrico), ferritina (método imunológico-turbidimétrico), capacidade ligadora de ferro (método colorimétrico), cálcio (método colorimétrico), fósforo (método UV de ponto final), sódio e potássio.

As análises bioquímicas foram realizadas no analisador bioquímico automático BS-200 (Mindray®, China), previamente calibrado com padrões para os diferentes parâmetros bioquímicos quantificados. Os kits comerciais de análise bioquímica foram gentilmente doados pela Bioclin® (Brasil). As amostras de soro foram processadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante dos kits diagnósticos.

As concentrações de colesterol LDL foram calculadas de acordo com a equação de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972), descrita abaixo:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - (\text{Triglicerídeos}/5).$$

Sódio e potássio foram dosados no fotômetro de chama B462 (Micronal SA®, Brasil).

#### 4.2.6 Processamento histológico

Para as análises histopatológicas, fragmentos do fígado dos animais foram fixados em solução Karnovsky, por 24 horas. Posteriormente, fragmentos desse órgão foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto), com trocas a cada 30 minutos e diafinizados com xilol. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina, para confecção dos blocos. Cortes de 3  $\mu$ m foram obtidos em micrótomo rotativo (EP-31-20091, EasyPath<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Esses cortes foram colocados em lâminas histológicas, num total de três cortes por lâmina, por animal. Para evitar a análise da mesma área histológica, as seções foram avaliadas em semi-série, utilizando 1 a cada 10 cortes. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina/eosina (HE). Posteriormente, foram desidratados, diafinizados, montados com Entellan<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>, Frankfurt, Alemanha) e analisados em microscópio de luz (BX41TF, Olympus<sup>®</sup>, Tóquio, Japão).

#### 4.2.7 Análises Estatísticas

No estudo de toxicidade aguda, o experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com duas doses de extratos e cinco repetições. As médias foram comparadas utilizando-se o teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Este estudo foi realizado apenas com as fêmeas.

Para os grupos 1, 2, 3 e 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas, o experimento foi conduzido seguindo um esquema fatorial 4x2, tendo quatro doses de extratos e dois sexos, no delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram analisados por meio de análise de variância. Para comparar as médias dos tratamentos com a do controle, utilizou-se o teste de Dunnett, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

Para os grupos 5 e 6 (grupo controle *recovery* e grupo *recovery*) do estudo de toxicidade de doses repetidas, o experimento foi conduzido seguindo um esquema fatorial 2x2, tendo duas doses de extratos e dois sexos, no delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram analisados por meio de análise de variância. As médias foram comparadas utilizando-se o teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP). Todas as análises foram realizadas no programa Sistema para Análises Estatísticas – SAEG 9.1 (SAEG, 2007).

## 5. RESULTADOS

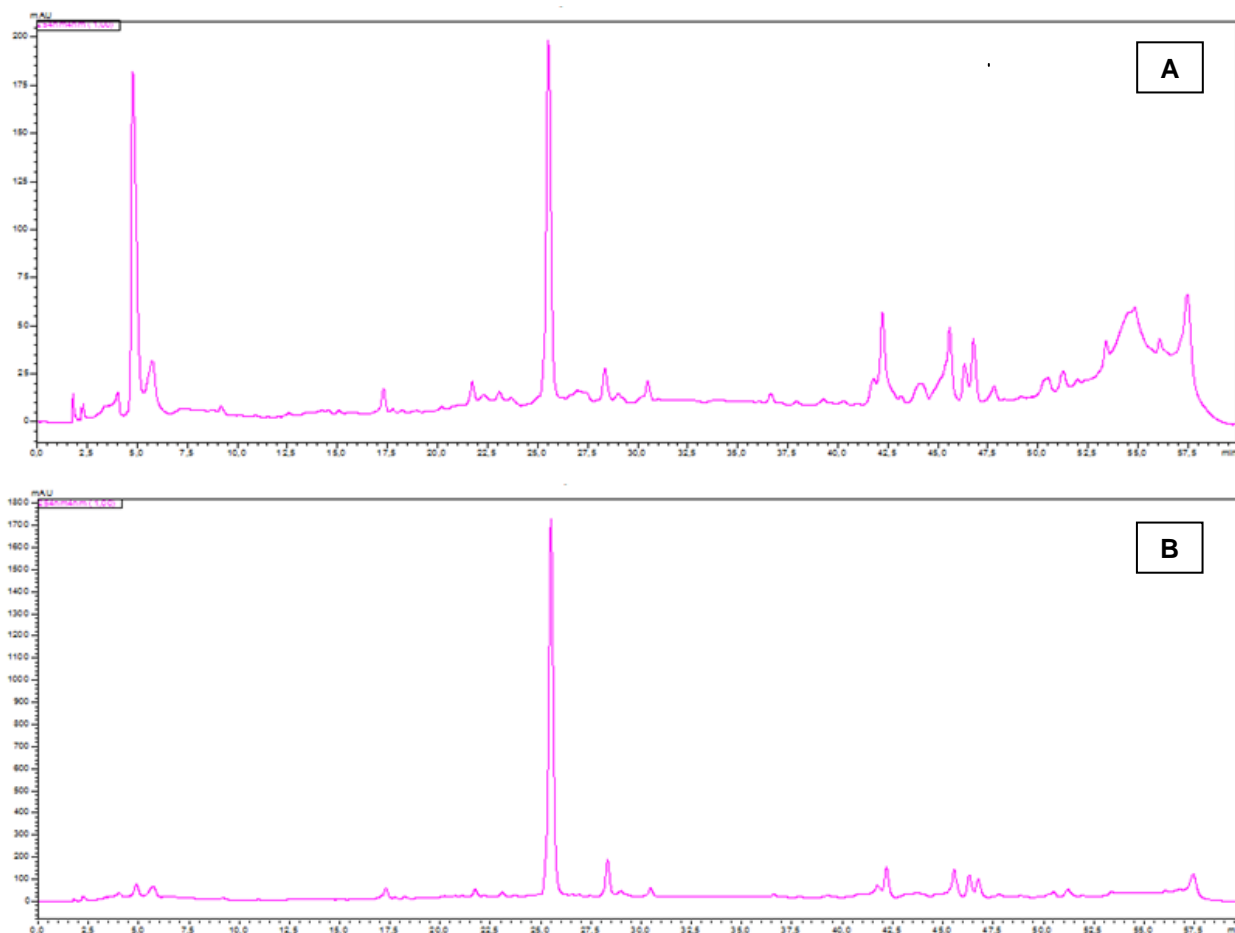
### 5.1 Estudos fitoquímicos

#### 5.1.1 Análise comparativa dos extratos por HPLC-DAD

Pela análise comparativa do perfil cromatográfico por HPLC-DAD, foi observado que os extratos produzidos de amostras de *A. velutina* acessadas nos municípios de Viçosa e Ouro Preto apresentam similaridade qualitativa em suas composições químicas (FIGURAS 8A e B), pois os tempos de retenção dos picos majoritários não alteraram. Porém, pode-se observar que existe variação quantitativa entre os componentes desses dois extratos, pois as intensidades dos sinais são diferentes.

Para a realização das demais análises e do estudo de toxicidade, os extratos foram reunidos e homogeneizados, utilizando-se cadinho e pistilo de porcelana, obtendo-se um único extrato.

Figura 8 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD, detectado na região de 254 nm de dois extratos etanólicos de folhas de *Athenaea velutina*: A) extrato oriundo de folhas acessadas no município de Viçosa; B) extrato oriundo de folhas acessadas no município de Ouro Preto



Fonte: Software LabSolutions.

### 5.1.2 Rendimento do EEFoAv

Foram obtidos 95,68 g de extrato seco (E. S.) das folhas provenientes de Viçosa e 252,33 g de E. S. das folhas de Ouro Preto. O rendimento do E. S. de Ouro Preto foi 1,41 vezes maior que o rendimento do E. S. de Viçosa.

Após a confirmação por HPLC-DAD de que os extratos das diferentes localidades apresentam similaridade qualitativa em suas composições químicas, os extratos foram reunidos e homogeneizados, obtendo-se um total 348,01 g.

Essa quantidade total foi obtida a partir de 13034 g de folhas de *Athenaea velutina*. O peso total do material vegetal seco pulverizado foi de 2970 g, o que corresponde a 22,79% do peso fresco. A perda de água foi de 77,21%. E o rendimento do extrato foi de 11,72%. Todos esses dados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento do extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina*

Localidades	PF (g)	MVSP (g)	E. S. (g)	R (MVSP /PF) (%)	Um. (%)	R (E. S./ MVSP) (%)
Viçosa	5145,00	1035,00	95,68	20,12	79,88	9,24
Ouro Preto	7889,00	1935,00	252,33	24,53	75,47	13,04
<b>Total</b>	<b>13034,00</b>	<b>2970,00</b>	<b>348,01</b>	<b>22,79</b>	<b>77,21</b>	<b>11,72</b>

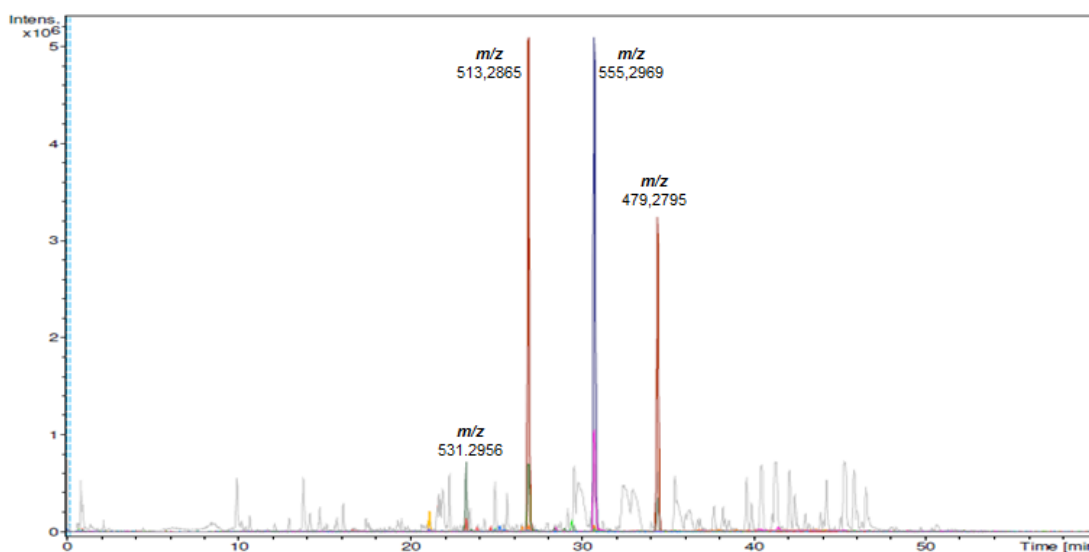
PF: planta fresca; MVSP: material vegetal seco pulverizado; E. S.: extrato seco; R: rendimento; Um.: umidade

Para realização de todas as análises abaixo e do estudo de toxicidade de *A. velutina*, foi empregada a mistura resultante dos dois extratos.

### 5.1.3 Análise do EEFoAv por UHPLC-HRMS

O extrato EEFoAv foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução para investigação da presença dos 11 esteroides vitanolídeos já identificados anteriormente em *A. velutina* (ALMEIDA, 2019). O cromatograma de íons extraídos referentes a esses 11 compostos é mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma de íons extraídos obtido por UHPLC-HRMS (modo positivo) para  $m/z$  513, 531, 471, 573, 529, 545, 559, 511, 571, 555, 479



Fonte: Compass 1.5.

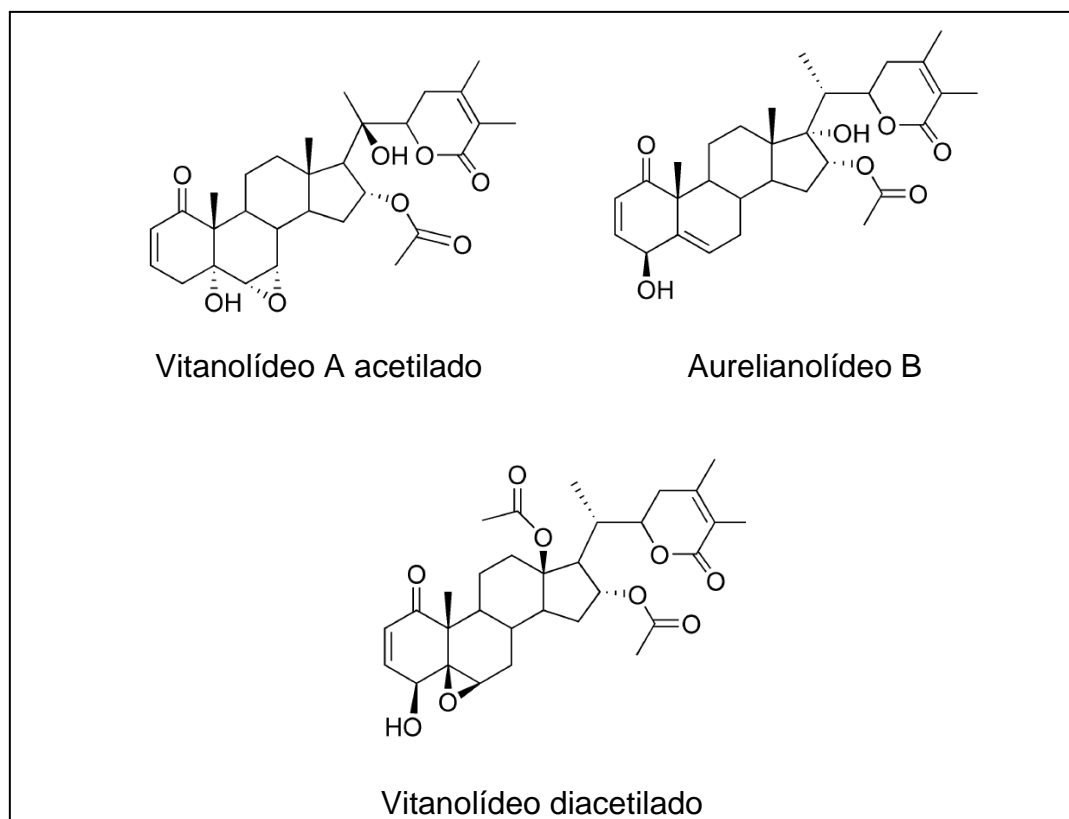
Os compostos vitanolídeos encontrados em EEFoAv, de forma majoritária, estão indicados na Tabela 4 e suas estruturas estão na Figura 10.

Tabela 4 - Identificação proposta dos vitanolídeos majoritários no EEFoAv por análise de UHPLC-HRMS

$t_R$ (min)	$[M+H]^+$ ( $m/z$ )	Fragmentações $MS^2$		Identificação proposta	
23,3	531,2956	471,2757	$[M+H-CH_3CO_2H]^+$ ; $[M+H-CH_3CO_2H-H_2O]^+$ ; $CH_3CO_2H-2H_2O]^+$ ; $CH_3CO_2H-3H_2O]^+$ ; $CH_3CO_2H-4H_2O]^+$	453,2630 435,2562 417,2436 399,2315	Vitanolídeo A acetilado [M+H- [M+H- [M+H- [M+H-
26,9	513,2865	453,2652	$[M+H-CH_3CO_2H]^+$ ; $[M+H-CH_3CO_2H-H_2O]^+$ ; $CH_3CO_2H-2H_2O]^+$ ; $CH_3CO_2H-3H_2O]^+$	435,2534 417,2428 399,2314	Aurelianolídeo B [M+H- [M+H- [M+H-
30,7	555,2969	495,2739	$[M+H-CH_3CO_2H]^+$ ; $[M+H-2CH_3CO_2H]^+$ ; $2CH_3CO_2H-H_2O]^+$ ; $2CH_3CO_2H-2H_2O]^+$	435,2529 417,2422 399,2318	Vitanolídeo diacetilado [M+H- [M+H-
34,4	479,2795	419,2582	$[M+H-CH_3CO_2H]^+$ ; $[M+H-CH_3CO_2H-H_2O]^+$ ;	401,2478 291,1746	Derivado vitanolídeo

Legenda:  $t_R$ : tempo de retenção;  $[M+H]^+$ : moléculas protonadas;  $MS^2$ : fragmentações de segunda ordem;

$CH_3CO_2H$ : acetato de etila;  $H_2O$ : água.

Figura 10 - Vitanolídeos identificados no extrato etanólico de *Athenaea velutina*

Fonte: Adaptado de Almeida, 2019.

#### 5.1.4 Análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do EEFoAv

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do EEFoAv.

Tabela 5 - Análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto e do extrato etanólico das folhas de *Athenaea velutina*

Classificação dos minerais	Minerais	Teor	
		Material vegetal de Ouro Preto	EEFoAv (Viçosa e Ouro Preto)
<b>Macrominerais</b>	P (dag/kg)	0,17	0,04
	K (dag/kg)	2,05	1,80
	Ca (dag/kg)	1,12	0,01
	Mg (dag/kg)	0,66	0,11
	S (dag/kg)	0,64	0,58
	N (dag/kg)	1,31	4,47
<b>Microminerais</b>	Cu (mg/kg)	39,89	20,08
	Fe (mg/kg)	683,75	12,95
	Zn (mg/kg)	25,92	18,89
	Mn (mg/kg)	179,57	3,94
	B (mg/kg)	47,45	6,68

### 5.1.5 Determinação de lipídeos do EEFoAv pelo método de Soxhlet

O teor de lipídeos totais encontrado no EEFoAv foi de  $31,05 \pm 3,09\%$ .

## 5.2 Ensaio *in vivo*

### 5.2.1 Estudo de toxicidade aguda

No presente estudo de toxicidade aguda utilizaram-se 10 fêmeas, os resultados revelaram que a dose de 1000 mg/kg de peso corporal do EEFoAv não causou morte e nem sinais clínicos evidentes de toxicidade (incluindo parâmetros comportamentais) nas 5 fêmeas tratadas. Durante o período de observação, as ratas expostas não apresentaram alterações nos parâmetros fisiológicos (variação de peso corporal e consumo de água e ração), quando comparadas ao grupo que recebeu PBS acrescido de 1% de DMSO (controle) (TABELA 6).

Tabela 6 - Parâmetros fisiológicos das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda

<b>Parâmetros fisiológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Peso inicial (g)</b>	236,40 ± 18,96 a	238,80 ± 13,68 a
<b>Peso final (g)</b>	247,40 ± 26,75 a	253,40 ± 12,58 a
<b>Variação de peso (g)</b>	11,00 ± 7,97 a	14,60 ± 5,13 a
<b>Consumo de água (ml/dia)</b>	36,41 ± 2,85 a	39,02 ± 12,59 a
<b>Consumo de ração (g/dia)</b>	20,22 ± 2,13 a	18,87 ± 1,67 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Além disso, nenhuma anormalidade foi encontrada nos órgãos após a necropsia, não havendo diferenças significativas em relação ao peso absoluto e ao peso relativo dos órgãos (TABELA 7).

Tabela 7 - Peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda

<b>Órgãos</b>	<b>Controle</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Fígado (g)</b>	8,23 ± 0,89 a	8,28 ± 0,55 a
<b>Fígado (g/100 g)</b>	3,33 ± 0,08 a	3,27 ± 0,14 a
<b>Rim direito (g)</b>	1,01 ± 0,16 a	0,99 ± 0,06 a
<b>Rim direito (g/100 g)</b>	0,41 ± 0,03 a	0,39 ± 0,04 a
<b>Baço (g)</b>	0,70 ± 0,05 a	0,68 ± 0,06 a
<b>Baço (g/100 g)</b>	0,28 ± 0,01 a	0,27 ± 0,02 a
<b>Coração (g)</b>	0,86 ± 0,10 a	0,83 ± 0,03 a
<b>Coração (g/100 g)</b>	0,35 ± 0,02 a	0,33 ± 0,02 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os protocolos (ANVISA, 2013; OECD, 2001b, 2001c e 2008a) não fazem recomendações de análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas nos animais do estudo de toxicidade aguda. Porém, optou-se por realizar essas análises, a fim de

obter mais informações do efeito do EEFoAv, quando administrado em dose única. Não houve nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos (TABELA 8).

Tabela 8 - Parâmetros hematológicos das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Leucócitos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	5,98 ± 2,47 a	5,18 ± 0,95 a
<b>Neutrófilos (%)</b>	27,60 ± 3,65 a	26,00 ± 6,86 a
<b>Neutrófilos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	1,69 ± 0,83 a	1,37 ± 0,45 a
<b>Linfócitos (%)</b>	69,00 ± 3,54 a	71,20 ± 6,42 a
<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	4,08 ± 1,49 a	3,67 ± 0,66 a
<b>Monócitos (%)</b>	2,60 ± 1,34 a	1,80 ± 0,45 a
<b>Monócitos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	0,17 ± 0,14 a	0,09 ± 0,03 a
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,40 ± 0,55 a	1,00 ± 0,71 a
<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	0,02 ± 0,03 a	0,05 ± 0,04 a
<b>Basófilos (%)</b>	0,40 ± 0,55 a	0,00 ± 0,00 a
<b>Basófilos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	0,03 ± 0,05 a	0,00 ± 0,00 a
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/μl)</b>	7,60 ± 0,20 a	7,33 ± 0,44 a
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	13,24 ± 0,45 a	12,86 ± 0,64 a
<b>Hematócrito (%)</b>	39,44 ± 0,94 a	37,80 ± 2,17 a
<b>VCM (fl)</b>	52,00 ± 1,41 a	51,60 ± 1,52 a
<b>HCM (pg)</b>	17,46 ± 0,77 a	17,56 ± 0,48 a
<b>CHCM (g/dl)</b>	33,58 ± 0,67 a	34,00 ± 0,25 a
<b>RDW (%)</b>	14,22 ± 0,26 a	14,32 ± 0,28 a
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	846,6 ± 85,97 a	871,20 ± 55,40 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, a administração oral aguda do EEFoAv não causou alterações significativas na maioria dos parâmetros, são eles: glicemia de jejum, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (gama GT), fosfatase alcalina, ácido úrico, ureia, creatinina, creatina quinase isoenzima MB (CK-MB), lactato desidrogenase

(LDH), proteínas séricas, albumina, ferro, ferritina, capacidade ligadora de ferro, fósforo, sódio e potássio. Houve redução estatisticamente significativa apenas nas concentrações de bilirrubina e de ALT e aumento significativo na concentração de cálcio (TABELA 9).

Tabela 9 - Parâmetros bioquímicos das ratas para os respectivos tratamentos do estudo de toxicidade aguda

<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>Controle</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Glicemia de jejum (mg/dl)</b>	172,00 ± 40,07 a	171,00 ± 19,42 a
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	67,60 ± 10,09 a	74,60 ± 10,31 a
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b>	23,12 ± 11,38 a	29,44 ± 7,46 a
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	26,40 ± 2,41 a	26,80 ± 1,64 a
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	90,40 ± 38,92 a	91,80 ± 23,83 a
<b>Bilirrubina total (mg/dl)</b>	0,18 ± 0,04 a	0,10 ± 0,00 b
<b>ALT (U/L)</b>	83,20 ± 15,19 a	63,80 ± 4,02 b
<b>AST (U/L)</b>	144,00 ± 25,36 a	129,20 ± 26,53 a
<b>Gama GT (U/L)</b>	12,80 ± 0,84 a	12,80 ± 1,64 a
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	87,40 ± 27,13 a	102,20 ± 29,64 a
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	1,34 ± 0,17 a	1,48 ± 0,36 a
<b>Ureia (mg/dl)</b>	48,20 ± 4,66 a	43,40 ± 4,72 a
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,46 ± 0,04 a	0,43 ± 0,03 a
<b>CK-MB (U/L)</b>	390,80 ± 87,06 a	307,20 ± 121,32 a
<b>LDH (U/L)</b>	810,80 ± 274,3 a	564,80 ± 303,25 a
<b>Proteínas Séricas (g/dl)</b>	5,86 ± 0,21 a	6,00 ± 0,21 a
<b>Albumina (g/dl)</b>	2,94 ± 0,09 a	2,98 ± 0,04 a
<b>Ferro (mg/dl)</b>	242,90 ± 20,30 a	275,3 ± 48,90 a
<b>Ferritina (mcg/dl)</b>	111,56 ± 64,24 a	124,26 ± 33,11 a
<b>Capacidade ligadora de ferro (mcg/ml)</b>	280,40 ± 38,26 a	258,40 ± 54,34 a
<b>Cálcio (mg/dl)</b>	10,34 ± 0,49 b	11,26 ± 0,57 a
<b>Fósforo (mg/dl)</b>	7,60 ± 0,35 a	8,32 ± 0,72 a
<b>Sódio (mEq/L)</b>	153,00 ± 2,74 a	152,20 ± 4,09 a
<b>Potássio (mEq/L)</b>	5,30 ± 0,48 a	5,78 ± 0,50 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

## 5.2.2 Estudo de toxicidade de doses repetidas

No estudo de toxicidade de doses repetidas utilizaram-se 10 animais por grupo, sendo 5 de cada sexo. Os resultados revelaram que nenhuma das 3 doses testadas (1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc do EEFoAv) causou morte e nem sinais clínicos evidentes de toxicidade (incluindo parâmetros comportamentais) nos animais tratados.

Não foram verificadas alterações nos parâmetros fisiológicos (variação de peso corporal e consumo de água e ração) dos animais que receberam o EEFoAv, no período de administração (28 dias) (TABELA 10).

Tabela 10 - Parâmetros fisiológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas

<b>Parâmetros fisiológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>250 mg/kg pc</b>	<b>500 mg/kg pc</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Peso inicial (g)</b>	253,80 ± 47,9 a	254,20 ± 45,20 a	255,60 ± 53,98 a	249,70 ± 46,42 a
<b>Peso final (g)</b>	286,80 ± 67,39 a	289,30 ± 55,23 a	280,30 ± 56,79 a	281,10 ± 60,92 a
<b>Variação de peso (g)</b>	33,0 ± 29,82 a	35,10 ± 16,13 a	24,70 ± 10,13 a	31,40 ± 17,26 a
<b>Consumo de água (ml/dia)</b>	37,69 ± 4,68 a	37,37 ± 7,07 a	37,52 ± 4,68 a	36,78 ± 5,75 a
<b>Consumo de ração (g/dia)</b>	21,26 ± 2,94 a	20,33 ± 2,79 a	20,30 ± 2,30 a	19,94 ± 3,86 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra do controle não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Também não foram observadas alterações durante o período de observação (14 dias) do grupo 6 (*recovery*: 1000 mg/kg pc do EEFoAv), quando comparado ao grupo 5 (controle *recovery*: PBS acrescido de 1% de DMSO) (TABELA 11).

Tabela 11 - Parâmetros fisiológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas

Parâmetros fisiológicos	Tratamento por 28 dias		Observação por 14 dias	
	Controle	1000 mg/kg pc	Controle	1000 mg/kg pc
<b>Peso inicial (g)</b>	254,80 ± 52,11 a	259,90 ± 53,15 a	282,70 ± 60,05 a	285,60 ± 59,37 a
<b>Peso final (g)</b>	285,10 ± 60,94 a	280,80 ± 56,89 a	296,80 ± 62,20 a	302,00 ± 64,83 a
<b>Varição de peso (g)</b>	30,30 ± 17,04 a	20,90 ± 9,86 a	14,10 ± 18,23 a	16,40 ± 6,24 a
<b>Consumo de água (ml/dia)</b>	38,91 ± 7,80 a	38,16 ± 5,94 a	35,12 ± 5,95 a	36,29 ± 5,37 a
<b>Consumo de ração (g/dia)</b>	21,20 ± 3,86 a	19,99 ± 3,08 a	21,65 ± 3,66 a	22,29 ± 3,72 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Nenhuma anormalidade foi encontrada nos órgãos dos animais tratados com as 3 doses (1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc) do EEFoAv após a necropsia. Não houve diferenças significativas em relação ao peso absoluto e ao peso relativo dos órgãos dos animais dos 3 grupos tratados, quando comparados ao grupo controle (TABELA 12).

Tabela 12 - Peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas

Órgãos	Controle	250 mg/kg pc	500 mg/kg pc	1000 mg/kg pc
<b>Fígado (g)</b>	9,14 ± 1,97 a	8,90 ± 1,39 a	9,65 ± 1,66 a	9,83 ± 1,67 a
<b>Fígado (g/100 g)</b>	3,22 ± 0,39 a	3,10 ± 0,21 a	3,48 ± 0,39 a	3,58 ± 0,67 a
<b>Rim direito (g)</b>	1,26 ± 0,28 a	1,15 ± 0,16 a	1,28 ± 0,22 a	1,22 ± 0,27 a
<b>Rim direito (g/100 g)</b>	0,44 ± 0,08 a	0,40 ± 0,03 a	0,46 ± 0,05 a	0,43 ± 0,03 a
<b>Baço (g)</b>	0,79 ± 0,21 a	0,71 ± 0,07 a	0,75 ± 0,12 a	0,75 ± 0,14 a
<b>Baço (g/100 g)</b>	0,28 ± 0,06 a	0,25 ± 0,04 a	0,27 ± 0,03 a	0,27 ± 0,03 a
<b>Coração (g)</b>	1,05 ± 0,22 a	1,03 ± 0,17 a	1,01 ± 0,17 a	1,00 ± 0,23 a
<b>Coração (g/100 g)</b>	0,37 ± 0,07 a	0,36 ± 0,03 a	0,37 ± 0,05 a	0,36 ± 0,03 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra do controle não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Também não houve diferenças significativas em relação ao peso relativo dos órgãos dos animais do grupo *recovery*, quando comparado ao grupo controle *recovery*, exceto para o peso relativo do fígado das fêmeas. A interação entre doses e sexos foi significativa para a variável peso relativo do fígado. Após o desdobramento da interação, verificou-se redução do peso relativo do fígado das fêmeas do grupo *recovery*, quando comparado ao grupo controle *recovery* (TABELAS 13 E 14).

Tabela 13 - Peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas

Órgãos	Controle	1000 mg/kg pc
<b>Fígado (g)</b>	9,44 ± 1,51 a	9,21 ± 1,95 a
<b>Fígado (g/100 g)</b>	-	-
<b>Rim direito (g)</b>	1,12 ± 0,28 a	1,14 ± 0,21 a
<b>Rim direito (g/100 g)</b>	0,38 ± 0,04 a	0,38 ± 0,02 a
<b>Baço (g)</b>	0,74 ± 0,14 a	0,73 ± 0,12 a
<b>Baço (g/100 g)</b>	0,25 ± 0,04 a	0,25 ± 0,03 a
<b>Coração (g)</b>	1,03 ± 0,18 a	1,02 ± 0,21 a
<b>Coração (g/100 g)</b>	0,35 ± 0,03 a	0,34 ± 0,03 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

-: interação entre doses e sexos.

Tabela 14 - Peso do fígado relativo para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	Fígado (g/100 g)	
	Macho	Fêmea
<b>0</b>	2,99 ± 0,15 A b	3,45 ± 0,39 A a
<b>1000</b>	3,06 ± 0,10 A a	3,05 ± 0,09 B a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para tratamento e sexo, respectivamente.

A administração oral do EEFoAv, durante 28 dias, não causou alterações significativas na maioria dos parâmetros hematológicos, são eles: contagem total de leucócitos, contagem diferencial (relativa e absoluta) de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos), contagem de hemácias, hematócrito, índices hematimétricos (volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média - HCM e índice de amplitude de distribuição de hemácias - RDW) e contagem de

plaquetas. No entanto, a dose de 250 mg/kg pc reduziu significativamente a concentração de hemoglobina dos animais, quando comparada ao grupo controle (TABELA 15).

Tabela 15 - Parâmetros hematológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>250 mg/kg pc</b>	<b>500 mg/kg pc</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Leucócitos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	6,04 ± 2,18 a	6,51 ± 1,84 a	5,90 ± 1,35 a	6,09 ± 1,35 a
<b>Neutrófilos (%)</b>	28,20 ± 4,98 a	23,80 ± 6,48 a	21,90 ± 4,36 a	28,00 ± 10,11 a
<b>Neutrófilos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	1,68 ± 0,62 a	1,58 ± 0,66 a	1,30 ± 0,40 a	1,66 ± 0,67 a
<b>Linfócitos (%)</b>	68,50 ± 5,93 a	73,50 ± 7,74 a	75,70 ± 4,50 a	68,70 ± 10,41 a
<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	4,16 ± 1,53 a	4,75 ± 1,27 a	4,46 ± 1,08 a	4,23 ± 1,37 a
<b>Monócitos (%)</b>	2,40 ± 1,35 a	2,00 ± 1,89 a	1,40 ± 0,52 a	2,60 ± 1,96 a
<b>Monócitos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	0,14 ± 0,11 a	0,14 ± 0,16 a	0,08 ± 0,02 a	0,15 ± 0,11 a
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,80 ± 1,23 a	0,40 ± 0,52 a	0,80 ± 0,92 a	0,60 ± 0,97 a
<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	0,05 ± 0,09 a	0,03 ± 0,04 a	0,05 ± 0,06 a	0,04 ± 0,07 a
<b>Basófilos (%)</b>	0,10 ± 0,32 a	0,30 ± 0,48 a	0,20 ± 0,42 a	0,10 ± 0,32 a
<b>Basófilos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	0,01 ± 0,02 a	0,02 ± 0,03 a	0,01 ± 0,02 a	0,01 ± 0,02 a
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/µl)</b>	7,86 ± 0,78 a	7,74 ± 0,58 a	8,03 ± 0,67 a	8,08 ± 0,46 a
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	14,15 ± 1,24 a	13,41 ± 0,64 b	14,03 ± 0,83 a	14,40 ± 0,73 a
<b>Hematócrito (%)</b>	40,24 ± 3,91 a	39,57 ± 2,57 a	40,75 ± 3,37 a	41,33 ± 2,69 a
<b>VCM (fl)</b>	51,40 ± 1,07 a	51,20 ± 1,48 a	50,90 ± 1,20 a	46,60 ± 14,75 a
<b>HCM (pg)</b>	18,01 ± 0,71 a	17,36 ± 0,74 a	17,52 ± 0,81 a	17,87 ± 0,69 a
<b>CHCM (g/dl)</b>	-	-	-	-
<b>RDW (%)</b>	14,49 ± 0,42 a	14,50 ± 0,48 a	14,85 ± 0,64 a	14,54 ± 0,61 a
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	957,20 ± 206,03 a	915,10 ± 110,30 a	932,40 ± 170,50 a	929,20 ± 193,05 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra do controle não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

-: interação entre doses e sexos.

A interação entre doses e sexos foi significativa para a variável concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Após o desdobramento da interação,

verificou-se redução na CHCM no grupo de machos tratados com a dose de 250 mg/kg pc, quando comparada ao grupo controle (TABELAS 15 e 16).

Tabela 16 - CHCM para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 1 a 4) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	CHCM (g/dl)	
	Macho	Fêmea
<b>0</b>	34,74 ± 0,87 A a	35,52 ± 1,06 A a
<b>250</b>	33,42 ± 0,66 B a	34,36 ± 0,40 A a
<b>500</b>	33,58 ± 1,00 A b	35,30 ± 0,62 A a
<b>1000</b>	35,08 ± 0,66 A a	34,64 ± 1,02 A a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra maiúscula do controle na coluna não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett, para tratamento.

As médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para sexo.

Os seguintes parâmetros hematológicos não sofreram alterações estatisticamente significativas durante o período de observação dos animais do grupo *recovery* (14 dias), quando comparado ao grupo controle *recovery*: contagem total de leucócitos, contagem diferencial relativa de leucócitos (monócitos, eosinófilos, basófilos), contagem diferencial absoluta de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos), hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) e contagem de plaquetas (TABELAS 17 e 19).

Porém, houve aumento estatisticamente significativo no índice de amplitude de distribuição de hemácias (RDW) dos animais do grupo *recovery*, quando comparado ao grupo controle *recovery* (TABELA 17).

Tabela 17 - Parâmetros hematológicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Leucócitos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	5,57 ± 1,27 a	5,14 ± 1,67 a
<b>Neutrófilos (%)</b>	-	-
<b>Neutrófilos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	1,39 ± 0,44 a	1,13 ± 0,46 a
<b>Linfócitos (%)</b>	-	-
<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	4,01 ± 0,97 a	3,86 ± 1,37 a
<b>Monócitos (%)</b>	2,10 ± 1,52 a	2,20 ± 1,81 a
<b>Monócitos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	0,11 ± 0,07 a	0,11 ± 0,10 a
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,90 ± 0,99 a	0,80 ± 1,23 a
<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	0,05 ± 0,06 a	0,03 ± 0,05 a
<b>Basófilos (%)</b>	0,20 ± 0,42 a	0,10 ± 0,32 a
<b>Basófilos (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	0,01 ± 0,02 a	0,00 ± 0,01 a
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/µl)</b>	-	-
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	-	-
<b>Hematócrito (%)</b>	-	-
<b>VCM (fl)</b>	51,50 ± 2,12 a	49,90 ± 2,02 a
<b>HCM (pg)</b>	16,57 ± 0,55 a	16,34 ± 0,53 a
<b>CHCM (g/dl)</b>	32,26 ± 0,81 a	32,73 ± 0,60 a
<b>RDW (%)</b>	14,71 ± 0,50 b	15,15 ± 0,62 a
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	1037,60 ± 208,81 a	969,00 ± 121,58 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

-: interação entre doses e sexos.

A interação entre doses e sexos foi significativa para as variáveis neutrófilos (%), linfócitos (%), hemácias, hemoglobina e hematócrito. Após o desdobramento da interação, verificou-se redução significativa da porcentagem de neutrófilos e aumento significativo da porcentagem de linfócitos nas fêmeas, aumento significativo nas concentrações de hemácias e hemoglobina dos machos e redução significativa na concentração de hemoglobina das fêmeas, quando comparado ao grupo controle.

Quanto à porcentagem de hematócrito, após o desdobramento da interação, verificou-se que não houve efeito do tratamento (TABELAS 17, 18 e 19).

Tabela 18 - Neutrófilos (%) e linfócitos (%) para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	Neutrófilos (%)		Linfócitos (%)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>0</b>	23,00 ± 2,92 A a	27,00 ± 7,58 A a	73,60 ± 2,51 A a	70,00 ± 6,82 B a
<b>1000</b>	26,20 ± 2,17 A a	18,00 ± 4,74 B b	70,80 ± 3,27 A b	78,80 ± 6,91 A a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para tratamento e sexo, respectivamente.

Tabela 19 - Hemácias, hemoglobina e hematócrito para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )		Hemoglobina (g/dl)		Hematócrito (%)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>0</b>	7,91 $\pm$ 0,33 B a	8,04 $\pm$ 0,22 A a	12,94 $\pm$ 0,19 B b	13,48 $\pm$ 0,60 A a	40,00 $\pm$ 0,85 A a	41,82 $\pm$ 2,78 A a
<b>1000</b>	8,40 $\pm$ 0,46 A a	7,83 $\pm$ 0,32 A b	13,58 $\pm$ 0,44 A a	12,92 $\pm$ 0,18 B b	41,06 $\pm$ 1,45 A a	39,66 $\pm$ 0,32 A a

Valores expressos como média  $\pm$  DP.

As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para tratamento e sexo, respectivamente.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, durante todo o período de 28 dias de tratamento, a administração oral do EEFoAv não causou alterações significativas nas concentrações de triglicerídeos, bilirrubina total, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (gama GT), fosfatase alcalina, ácido úrico, ureia, creatinina, proteínas séricas, albumina, ferritina, capacidade ligadora de ferro, cálcio e fósforo (TABELA 20).

Porém, houve aumento estatisticamente significativo nas concentrações de glicemia de jejum dos animais, quando administrada a dose de 500 mg/kg pc; de colesterol total nos animais que receberam as 3 doses testadas; de colesterol LDL nos animais dos grupos que receberam 250 e 1000 mg/kg pc; de colesterol HDL nos animais que receberam 500 e 1000 mg/kg pc; e de sódio nos animais do grupo que recebeu 250 mg/kg pc. A dose de 500 mg/kg pc reduziu significativamente as concentrações de sódio e potássio nos animais, quando comparada ao grupo controle (TABELA 20).

Tabela 20 - Parâmetros bioquímicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 1 a 4) do estudo de toxicidade de doses repetidas

Parâmetros bioquímicos	Controle	250 mg/kg pc	500 mg/kg pc	1000 mg/kg pc
Glicemia de jejum (mg/dl)	186,10 ± 49,95 b	191,50 ± 28,94 b	241,20 ± 49,27 a	173,60 ± 53,84 b
Colesterol total (mg/dl)	69,70 ± 17,58 b	86,00 ± 10,53 a	89,10 ± 14,79 a	95,80 ± 16,47 a
Colesterol LDL (mg/dl)	27,82 ± 19,44 b	42,70 ± 9,95 a	41,76 ± 14,68 b	48,52 ± 13,13 a
Colesterol HDL (mg/dl)	26,70 ± 2,67 b	28,80 ± 2,10 b	32,10 ± 3,45 a	33,30 ± 4,83 a
Triglicerídeos (mg/dl)	75,90 ± 31,99 a	72,50 ± 26,98 a	76,20 ± 51,70 a	69,90 ± 44,32 a
Bilirrubina total (mg/dl)	0,14 ± 0,05 a	0,17 ± 0,05 a	0,13 ± 0,05 a	0,13 ± 0,05 a
ALT (U/L)	73,70 ± 15,80 a	60,90 ± 15,00 a	61,70 ± 8,07 a	59,40 ± 12,35 a
AST (U/L)	-	-	-	-
Gama GT (U/L)	9,20 ± 4,47 a	10,30 ± 2,98 a	10,10 ± 2,81 a	7,60 ± 3,10 a
Fosfatase alcalina (U/L)	118,10 ± 49,73 a	142,30 ± 50,79 a	150,20 ± 46,63 a	144,10 ± 46,46 a
Ácido úrico (mg/dl)	1,59 ± 0,36 a	1,31 ± 0,40 a	1,50 ± 0,47 a	1,77 ± 1,92 a
Ureia (mg/dl)	54,50 ± 9,65 a	46,50 ± 3,69 a	47,60 ± 6,93 a	51,10 ± 7,53 a
Creatinina (mg/dl)	0,51 ± 0,08 a	0,46 ± 0,05 a	0,45 ± 0,03 a	0,49 ± 0,15 a
CK-MB (U/L)	-	-	-	-
LDH (U/L)	-	-	-	-
Proteínas Séricas (g/dl)	6,34 ± 0,37 a	6,15 ± 0,26 a	6,25 ± 0,30 a	6,24 ± 0,20 a
Albumina (g/dl)	2,95 ± 0,24 a	2,93 ± 0,13 a	2,95 ± 0,13 a	2,95 ± 0,12 a
Ferro (mg/dl)	-	-	-	-
Ferritina (mcg/dl)	94,22 ± 62,25 a	76,46 ± 42,84 a	74,35 ± 52,71 a	52,37 ± 31,85 a
Capacidade ligadora de				
Ferro (mcg/ml)	297,48 ± 65,43 a	278,00 ± 54,81 a	281,50 ± 43,53 a	289,20 ± 68,69 a
Cálcio (mg/dl)	10,35 ± 0,59 a	10,26 ± 0,34 a	10,68 ± 0,45 a	10,59 ± 0,62 a
Fósforo (mg/dl)	8,85 ± 1,33 a	7,72 ± 0,69 a	7,99 ± 1,02 a	8,94 ± 1,89 a
Sódio (mEq/L)	144,88 ± 3,35 b	169,60 ± 5,32 a	139,70 ± 4,40 c	148,60 ± 2,63 b
Potássio (mEq/L)	6,58 ± 0,92 a	6,91 ± 0,75 a	5,54 ± 0,72 b	6,46 ± 0,33 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra do controle não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett, para tratamento.

-: interação entre doses e sexos.

A interação entre doses e sexos foi significativa para as variáveis AST, CK-MB, LDH e ferro. Após o desdobramento da interação, verificou-se redução significativa nas

concentrações das enzimas AST, CK-MB e LDH nas fêmeas em todas as doses testadas e aumento significativo na concentração de ferro nos machos tratados com a dose de 500 mg/kg pc, quando comparados ao grupo controle (TABELAS 20, 21 e 22).

Tabela 21 - AST e CK-MB para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 1 a 4) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	AST (U/L)		CK-MB (U/L)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>0</b>	151,20 ± 18,43 A b	188,80 ± 18,10 A a	385,60 ± 113,61 A b	527,80 ± 176,56 A a
<b>250</b>	138,60 ± 5,94 A a	107,80 ± 14,02 B b	360,20 ± 110,81 A a	212,80 ± 97,27 B b
<b>500</b>	145,80 ± 17,18 A a	142,20 ± 28,07 B a	420,00 ± 15,25 A a	297,20 ± 55,75 B a
<b>1000</b>	144,80 ± 20,38 A a	153,80 ± 15,27 B a	459,20 ± 132,92 A a	246,00 ± 98,56 B b

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra maiúscula do controle na coluna não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett, para tratamento.

As médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para sexo.

Tabela 22 - LDH e ferro para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 1 a 4) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	LDH (U/L)		FERRO (mg/dl)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>0</b>	808,60 ± 319,35 A b	1370,60 ± 596,50 A a	157,52 ± 27,81 B b	291,06 ± 49,56 A a
<b>250</b>	798,40 ± 317,56 A a	429,00 ± 223,60 B a	161,78 ± 10,26 B b	241,50 ± 30,54 A a
<b>500</b>	897,20 ± 72,33 A a	502,60 ± 129,50 B a	224,54 ± 46,07 A a	254,76 ± 53,17 A a
<b>1000</b>	796,40 ± 366,53 A a	520,00 ± 164,87 B a	169,78 ± 24,65 B b	266,14 ± 36,57 A a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas da mesma letra maiúscula do controle na coluna não diferem dele ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett, para tratamento.

As médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para sexo.

Durante o período de observação dos animais do grupo *recovery* (14 dias), a grande maioria dos parâmetros hematológicos não sofreu alterações estatisticamente significativas, quando comparado ao grupo controle *recovery*, são eles: colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, bilirrubina total, ALT, AST, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, creatina quinase isoenzima MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), proteínas séricas, albumina, ferro, ferritina, capacidade ligadora de ferro, cálcio, fósforo e potássio (TABELAS 23 e 24).

No entanto, houve redução estatisticamente significativa na concentração de sódio do grupo *recovery*, quando comparado ao grupo controle *recovery* (TABELA 23).

Tabela 23 - Parâmetros bioquímicos dos ratos para os respectivos tratamentos (grupos 5 e 6) do estudo de toxicidade de doses repetidas

<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>Controle</b>	<b>1000 mg/kg pc</b>
<b>Glicemia de jejum (mg/dl)</b>	-	-
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	91,40 ± 10,41 a	91,98 ± 16,18 a
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b>	43,20 ± 8,97 a	40,34 ± 17,12 a
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	32,00 ± 4,69 a	34,90 ± 6,90 a
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	81,00 ± 20,85 a	92,30 ± 30,47 a
<b>Bilirrubina total (mg/dl)</b>	0,09 ± 0,06 a	0,10 ± 0,00 a
<b>ALT (U/L)</b>	66,90 ± 11,52 a	72,10 ± 17,11 a
<b>AST (U/L)</b>	148,50 ± 45,01 a	161,30 ± 55,55 a
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	96,00 ± 31,72 a	91,90 ± 34,91 a
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	-	-
<b>Ureia (mg/dl)</b>	61,50 ± 5,76 a	66,75 ± 9,40 a
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	-	-
<b>CK-MB (U/L)</b>	368,50 ± 135,46 a	437,95 ± 201,01 a
<b>LDH (U/L)</b>	730,70 ± 335,22 a	951,30 ± 591,38 a
<b>Proteínas Séricas (g/dl)</b>	6,15 ± 0,27 a	6,46 ± 0,53 a
<b>Albumina (g/dl)</b>	2,81 ± 0,14 a	2,81 ± 0,20 a
<b>Ferro (mg/dl)</b>	195,93 ± 73,52 a	180,63 ± 57,28 a
<b>Ferritina (mcg/dl)</b>	98,90 ± 85,07 a	120,29 ± 65,83 a
<b>Capacidade ligadora de Ferro (mcg/ml)</b>	269,60 ± 79,72 a	295,00 ± 64,87 a
<b>Cálcio (mg/dl)</b>	10,16 ± 0,54 a	10,42 ± 0,68 a
<b>Fósforo (mg/dl)</b>	7,86 ± 1,21 a	8,75 ± 1,61 a
<b>Sódio (mEq/L)</b>	152,30 ± 5,48 a	146,30 ± 3,53 b
<b>Potássio (mEq/L)</b>	6,91 ± 1,92 a	6,43 ± 1,11 a

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

-: interação entre doses e sexos.

A interação entre doses e sexos foi significativa para as variáveis glicemia de jejum, ácido úrico e creatinina. Após o desdobramento da interação, verificou-se que houve aumento significativo nas concentrações de glicemia de jejum e ácido úrico dos machos do grupo *recovery*, quando comparado ao grupo controle *recovery*. Quanto à creatinina, o desdobramento revelou que não houve efeito do tratamento (TABELAS 23 e 24).

As tabelas dos resumos das análises de variância de todas as variáveis do estudo de toxicidade de doses repetidas estão expostas no Apêndice A.

Tabela 24 - Glicemia de jejum, ácido úrico e creatinina para as respectivas combinações de tratamentos (grupos 5 e 6) e sexos do estudo de toxicidade de doses repetidas

Doses	Glicemia de jejum (mg/dl)		Ácido úrico (mg/dl)		Creatinina (mg/dl)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>0</b>	178,80 ± 27,96 B a	173,80 ± 58,14 A a	0,42 ± 0,04 B a	1,18 ± 1,20 A a	0,80 ± 0,06 A a	0,82 ± 0,05 A a
<b>1000</b>	238,80 ± 33,25 A a	148,20 ± 19,79 A b	1,52 ± 1,07 A a	0,66 ± 0,21 A a	0,85 ± 0,04 A a	0,76 ± 0,05 A b

Valores expressos como média ± DP.

As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para tratamento e sexo, respectivamente.

### **5.2.3 Análises histopatológicas**

O fígado dos animais controle e dos animais tratados com diferentes doses do EEFoAv, tanto de forma aguda quanto crônica, apresentou arquitetura tecidual normal, composta por cordões de hepatócitos divididos em lóbulos e entremeados por capilares sinusoides, com a veia centro lobular preservada. Os hepatócitos apresentaram citoplasma acidófilo e núcleo basofílico, podendo esse tipo celular apresentar um ou dois núcleos. Os animais que foram mantidos vivos por 14 dias após o tratamento com o extrato, também apresentaram histologia hepática semelhante ao do fígado dos animais do seu respectivo grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

As folhas frescas das plantas apresentam teor de umidade entre 60 a 98% (SOARES; FARIAS, 2017). No presente trabalho, após a secagem das folhas frescas de *A. velutina* verificou-se perda de 77,21% de umidade (TABELA 3).

O teor de umidade é um parâmetro importante para a manutenção da qualidade do IFAV, pois o excesso de água favorece o crescimento microbiano, o aparecimento de fungos ou insetos e proporciona a deterioração do material seguida por hidrólise. A secagem e estabilização apropriadas do IFAV são fundamentais para que a umidade residual não comprometa suas propriedades químicas e/ou físico-químicas (SOARES; FARIAS, 2017).

A similaridade qualitativa nas composições químicas dos extratos produzidos de amostras de *A. velutina* acessadas em Viçosa e Ouro Preto foi confirmada pela análise por HPLC-DAD (FIGURAS 8A e B). Porém, foi observado que existe variação quantitativa entre os componentes desses dois extratos.

Goobo-Neto e Lopes (2007) afirmam que a composição química de uma mesma espécie vegetal é passível de importantes variações qualitativas e quantitativas, resultantes tanto de fatores endógenos, como o estágio de desenvolvimento, quanto de fatores exógenos, como interferências edafoclimáticas, sazonalidade e pragas.

Almeida (2019) analisou a fração enriquecida em esteroides vitanolídeos, oriunda das folhas de *A. velutina* da Mata do Paraíso, Viçosa-MG, nomeada FAv\_5, empregando técnica de LC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. Foram identificados 11 compostos vitanolídeos, no EEFoAv avaliado no presente trabalho, 4 desses compostos (TABELA 4) mostraram-se majoritários, havendo uma maior concentração de Aurelianólídeo B.

O cromatograma obtido por UHPLC-HRMS (FIGURA 9) em modo positivo (íon extraído) de EEFoAv indicou a presença dos 11 esteroides vitanolídeos pesquisados, porém 4 desses ( $m/z$  531,2956;  $m/z$  513,2865;  $m/z$  555,2969;  $m/z$  479,2795) apresentaram-se de forma majoritária, nos tempos de retenção de 23,3 min; 26,9 min; 30,7 min; 34,4 min; respectivamente. Os demais vitanolídeos, anteriormente identificados por Almeida (2019) para a FAv\_5, no extrato EEFoAv foram identificados em pequenas quantidades. O padrão de fragmentação de vitanolídeos é estabelecido por sucessivas perdas de moléculas de água e

subsequente clivagem do grupo lactona. Já a perda de um fragmento de 60 Da refere-se ao grupo acetato de etila ( $[M+H-C_2H_4O_2]^+$ ) (MUSHARRAF *et al.*, 2010).

Os estudos de toxicidade realizados para o extrato de *A. velutina* seguiram as recomendações para registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil (ANVISA, 2013), uma vez que o mesmo apresenta potencial terapêutico.

De acordo com a ANVISA (2013), estudos para a determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) para registro de fitoterápicos não são necessários. Dessa forma, métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais podem ser utilizados, tais como os preconizados nos guias da OECD.

Os guias da OECD 420, 423 e 425 (OECD, 2001c, 2001b e 2008a) preconizam a realização da avaliação de toxicidade aguda empregando animal de um único sexo, a fim de reduzir a variabilidade e como um meio de minimizar o número de animais utilizados. Normalmente, as fêmeas são usadas (OECD, 2001a). Isso ocorre porque pesquisas na literatura sobre testes de DL50 convencionais mostram que, geralmente, há pouca diferença na sensibilidade entre os sexos, mas, nos casos em que foram observadas diferenças, as fêmeas mostraram maior sensibilidade. As fêmeas têm uma capacidade de desintoxicação menor do que os machos, conforme medido pela atividade específica das enzimas das fases I e II. (LIPNICK *et al.*, 1995).

Atualmente, o uso de machos em testes experimentais em animais excede claramente o de fêmeas e, portanto, a preferência por fêmeas nos testes de toxicidade aguda pode resultar em um melhor equilíbrio geral do uso de ambos os sexos (OECD, 2001a).

Ocasionalmente, os resultados dos testes subsequentes, por exemplo, um teste subcrônico, podem levantar preocupações de que o sexo mais sensível não tenha sido usado. Nesses casos, e somente quando houver suspeita de diferenças consideráveis entre os sexos, pode ser necessário realizar outro estudo completo de toxicidade oral aguda no segundo sexo (OECD, 2001a).

A toxicidade sistêmica pode ser identificada através da diminuição do peso corporal dos animais, por redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, como apatia e a presença de pelos eriçados. Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos e alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (CUNHA *et al.*, 2009).

No presente estudo de toxicidade aguda, os resultados revelaram que a dose de 1000 mg/kg de peso corporal do EEFoAv não causou: morte, sinais clínicos evidentes de toxicidade (incluindo parâmetros comportamentais), nem alterações nos parâmetros fisiológicos (variação de peso corporal e consumo de água e ração) durante o período de observação (TABELA 6). Anormalidade nos órgãos, diferenças significativas em relação ao peso absoluto e ao peso relativo dos órgãos e alterações significativas nos parâmetros hematológicos nas fêmeas tratadas (TABELAS 7 e 8), também não foram observados, evidenciando assim, a não toxicidade do EEFoAv para ratos Wistar.

Para uma avaliação toxicológica minuciosa de xenobióticos, dados de bioquímica clínica são essenciais, pois permitem determinar a ocorrência de efeitos tóxicos em diferentes tecidos (OECD, 2008b).

Neste estudo de toxicidade aguda, a administração oral do EEFoAv não causou alterações significativas na maioria dos parâmetros bioquímicos, são eles: glicemia de jejum, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (gama GT), fosfatase alcalina, ácido úrico, ureia, creatinina, creatina quinase isoenzima MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), proteínas séricas, albumina, ferro, ferritina, capacidade ligadora de ferro, fósforo, sódio e potássio (TABELA 9).

No entanto, houve redução significativa nas concentrações séricas de bilirrubina e alanina aminotransferase (ALT), quando comparadas ao grupo controle (TABELA 9).

As aminotransferases (ALT e AST), a gama GT, a fosfatase alcalina e a bilirrubina (direta, indireta e total) representam o hepatograma simples, para pacientes sem histórico de doenças hepáticas. São exames de rastreio para se identificar alguma doença oculta do fígado e/ou das vias biliares e, no caso dos ensaios de toxicidade, são utilizados para acompanhar as funções hepáticas a fim de se detectar alterações hepatológicas que podem significar hepatotoxicidade. ALT e AST são enzimas presentes, principalmente nos hepatócitos, sendo responsáveis pela metabolização das proteínas, tanto na síntese como na degradação de aminoácidos (NELSON; COX, 2006). A ALT é encontrada em maior quantidade no fígado, sendo considerada específica para esse órgão, enquanto a AST é encontrada no fígado, coração e músculo esquelético (OZER *et al.*, 2008).

Elevadas quantidades das enzimas ALT, AST, gama GT, fosfatase alcalina e da bilirrubina no soro são indicativos de lesões nas membranas celulares dos hepatócitos e dessa forma, também são utilizados como marcadores de estresse oxidativo (KHATRI; GARG; AGRAWAL, 2009). A bilirrubina total funciona como um bom marcador de lesão hepatobiliar aguda, principalmente quando associada à ALT (DUFOUR *et al.*, 2000).

No grupo tratado do presente estudo de toxicidade aguda, houve redução de 44,4% na concentração de bilirrubina, quando comparado ao grupo controle. As concentrações aferidas, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle (TABELA 9), encontravam-se dentro dos valores de referência proposto por Lima e colaboradores (2014): 0,10 - 0,89 mg/dl.

A concentração de ALT no grupo controle foi de 83,20 U/L (TABELA 9). Esse valor é superior aos valores de referência propostos por Lima e colaboradores (2014): 32 - 63 U/L. O EEFoAv foi capaz de reduzir a ALT para um valor próximo dos valores considerados normais (63,80 U/L) (TABELA 9).

É fundamental determinar os valores de referência hematológicos e bioquímicos para animais de diferentes biotérios de acordo com a espécie, a dieta, a linhagem, o sexo e a idade (MELO *et al.*, 2012). Porém na ausência desses valores, os dados de outros biotérios podem ser considerados, assim procederam Villas Boas e colaboradores (2018), Carraschi e colaboradores (2003) e Moreira e colaboradores (2017).

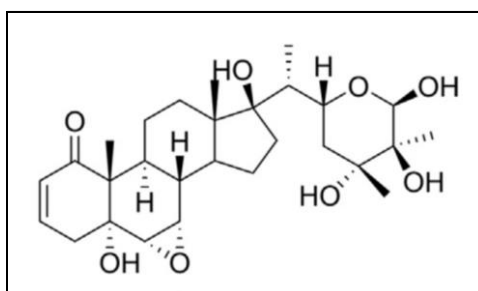
Embora a ALT seja um dos principais marcadores de toxicidade hepática, apenas o seu aumento é indicativo de tal disfunção. A detecção de uma menor expressão dessa enzima não se torna preocupante como sinal de dano hepático (SOUZA, 2017).

Essa redução nas concentrações séricas de bilirrubina e de ALT, provavelmente, pode ser devida ao efeito hepatoprotetor dos vitanolídeos.

Wang e colaboradores (2018) isolaram 11 vitanolídeos de *Nicandra physaloides* (Solanaceae). Dentre eles, o vitanolídeo 11 (Nic-2 - 17 $\beta$ -hidroxiesteroide) (FIGURA 11) mostrou proteção mais potente contra o dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células hepáticas LO2. Nic-2 é um vitanolídeo já conhecido, teve sua estrutura analisada por Bates e Morehead (1974).

Nic-2 melhorou a sobrevivência celular, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e melhorou as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona reduzida (GSH), o que poderia inibir o dano oxidativo das células LO2, induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (WANG *et al.*, 2018). Os pesquisadores desse trabalho concluíram que o Nic-2 pode ser usado como composto principal para o desenvolvimento de um medicamento para doença hepática devido aos seus efeitos antioxidantes e hepatoprotetores.

Figura 11 - Estrutura do vitanolídeo Nic-2 isolado de *Nicandra physaloides*



Fonte: Wang e colaboradores, 2018.

Outro parâmetro que sofreu alteração na avaliação bioquímica dos animais que receberam o EEFoAv, no estudo de toxicidade aguda, foi o cálcio (TABELA 9). O aumento na concentração sérica (11,26 mg/dl) foi ligeiramente superior aos valores de referência propostos por Lima e colaboradores (2014), que variam de 6,7 mg/dl a 11,00 mg/dl.

Frequentemente, concentrações séricas elevadas de cálcio podem levar à calcificação dos tecidos moles em animais. É uma condição encontrada nos exames *post mortem* de animais e é caracterizada pela deposição de cálcio em órgãos como fígado, coração, pulmões e rins (PEREIRA, 2002). Nenhuma evidência de calcificação foi encontrada na análise histopatológica do fígado das fêmeas tratadas, sugerindo que esse aumento na concentração de cálcio não está correlacionado com efeito tóxico do EEFoAv.

Em relação às análises histopatológicas, também não houve outras alterações significativas nos fígados das ratas do grupo tratado, quando comparado com o grupo controle.

As finalidades das análises histopatológicas são: observação da integridade dos tecidos e investigação de lesões como degeneração, necrose, apoptose e infiltração leucocitária, que podem evidenciar toxicidade (VILLAS BOAS *et al.*, 2018).

Para a maioria dos estudos de avaliação toxicológica, a investigação de dados histopatológicos permite uma melhor compreensão e integração dos demais resultados obtidos (EVERDS, 2015).

Neste estudo de toxicidade aguda, não houve aumento nas concentrações de ALT e AST (TABELA 9), o que sugere que a administração aguda do EEFoAv não alterou a função e o metabolismo dos hepatócitos. Igualmente, também não houve aumento na concentração de creatinina. A creatinina é conhecida como um indicador eficaz da função renal, qualquer aumento na sua concentração é observado se houver um dano acentuado aos néfrons funcionais (LAMEIRE; BIESEN; VANHOLDER, 2005). Assim, os resultados registrados neste estudo sugerem que o extrato EEFoAv não afetou a função renal das ratas. Claramente, isso serve apenas como teste preliminar, para uma melhor estimativa da função renal, é necessário o teste de depuração da creatinina (LI *et al.*, 2010).

A partir desses resultados, entende-se que a administração oral aguda de 1000 mg/kg pc do EEFoAv não causou toxicidade às ratas Wistar.

Como a dose de 1000 mg/kg pc do EEFoAv foi bem tolerada pelas ratas no estudo de toxicidade aguda, essa dose foi empregada como a dose mais alta para o estudo de toxicidade de doses repetidas. Nesse tipo de estudo, a dose mais alta é escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg pc por dia em roedores e não-roedores. As demais doses foram estabelecidas em sequência descendente, em intervalos de 2 e 4 vezes. Ou seja, foram feitas duas reduções da dose mais alta para chegar à dose intermediária de 500 mg/kg pc e à dose mais baixa do estudo, 250 mg/kg pc (ANVISA, 2013).

Os resultados do estudo de toxicidade de doses repetidas revelaram que nenhuma das três doses testadas causou: morte, sinais clínicos evidentes de toxicidade (incluindo parâmetros comportamentais), nem alterações nos parâmetros fisiológicos (variação de peso corporal e consumo de água e ração) nos animais tratados (5 machos e 5 fêmeas por grupo), durante o período de administração do extrato (28 dias) e durante o período de observação (14 dias, no caso do grupo *recovery*) (TABELAS 10 E 11).

Anormalidades nos órgãos e diferenças significativas em relação ao peso absoluto dos órgãos também não foram observadas em nenhum grupo do estudo de toxicidade de doses repetidas (TABELAS 12 e 13).

A ausência de qualquer sinal de toxicidade no grupo *recovery* no final dos 14 dias de observação, indica que o EEFoAv não apresentou efeitos tóxicos tardios nos animais testados.

Também não houve alterações significativas nos pesos relativos dos órgãos dos animais tratados com as doses 1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc do EEFoAv (TABELA 12). Houve apenas redução do peso relativo do fígado das fêmeas do grupo *recovery* (TABELA 14). No entanto, não foram observadas alterações clínicas, macroscópicas, nem histológicas nos fígados dessas fêmeas, não sendo atribuída significância biológica a essa redução do peso relativo do fígado, o que sugere que essa alteração não está relacionada à toxicidade do EEFoAv.

O fígado é o principal órgão de eliminação de drogas do organismo (MOURA *et al.*, 2016). Em relação às análises histopatológicas, também não houve outras alterações significativas na histologia hepática dos animais dos grupos tratados, quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis às substâncias químicas tóxicas e um importante indicador do estado fisiopatológico em humanos e animais (LI *et al.*, 2010).

O hemograma é um exame de grande importância tanto na área veterinária quanto para os humanos. Constitui um dos mais explorados recursos primários para apontamento de desequilíbrio orgânico que pode nortear uma investigação mais assertiva. A ingestão de substâncias tóxicas, inclusive plantas e outros produtos naturais, pode alterar as concentrações das células sanguíneas (BARROS; DAVINO, 2014; MELO *et al.*, 2012).

Os resultados do estudo de toxicidade de doses repetidas indicaram que os seguintes parâmetros hematológicos não sofreram alterações estatisticamente significativas durante todo o período de 28 dias de tratamento: contagem total de leucócitos, contagem diferencial (relativa e absoluta) de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos), contagem de hemácias, hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM e RDW) e contagem de plaquetas (TABELA 15).

Porém, houve redução estatisticamente significativa na concentração de hemoglobina do grupo que recebeu 250 mg/kg pc do EEFoAv e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos machos do mesmo grupo (TABELAS 15 e 16).

A hemoglobina é a proteína que dá a cor às hemácias e ao sangue. Participa do transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. Está diminuída nas anemias (FERREIRA NETO; VIANA; MAGALHÃES, 1977). A redução de 5,23% encontrada na concentração de hemoglobina do grupo que recebeu 250 mg/kg pc do EEFoAv, quando comparado ao grupo controle (TABELA 15), não caracteriza anemia, já que o valor sérico de 13,41 g/dl de hemoglobina não é inferior aos valores de referência para a espécie, mostrados na Tabela 25.

Os índices hematimétricos são valores que ajudam a caracterizar o quadro anêmico. A CHCM é um índice de cor e reflete a concentração de hemoglobina presente nas hemácias. Esse índice permite a avaliação do grau de saturação de hemoglobina na hemácia. A saturação de hemoglobina normal indica a presença de hemácias ditas normocrômicas. Quando diminuídas, as hemácias são denominadas hipocrômicas e, quando aumentadas, hiperocrômicas. A partir desse índice pode-se classificar as anemias em hipocrômicas, normocrômicas e hiperocrômicas. (FERREIRA NETO; VIANA; MAGALHÃES, 1977). No âmbito veterinário, especificamente para animais de laboratório, esse parâmetro somente seria preocupante se o animal estivesse em quadro de anemia intensa com decréscimo dos valores de hemácias (EVANS, 2009). E ainda, o valor de 33,42 g/dl de CHCM, que corresponde a uma redução de 3,80%, quando comparada ao grupo controle (TABELA 16), está dentro dos valores de referência para a espécie (TABELA 25).

Além disso, não foram observados achados associados a essas alterações nos exames histopatológicos. Portanto, considera-se que as alterações observadas nesses parâmetros hematológicos não são efeitos tóxicos induzidos pelo EEFoAv.

Villas Boas e colaboradores (2018) também encontraram alterações estatisticamente significativas nos parâmetros hematológicos dos ratos tratados na avaliação da segurança pré-clínica do extrato etanólico de *Campomanesia pubescens*, porém não atribuíram toxicidade ao extrato, já que os valores encontrados estavam dentro da faixa de referência para a espécie.

Tabela 25 - Valores de referência para os parâmetros hematológicos que sofreram alterações estatisticamente significativas, no estudo de toxicidade de doses repetidas

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Sexo</b>	<b>Valor de referência</b>	<b>Referência</b>
Hemácias	Machos	4,72 - 10,25 x10 <sup>6</sup> /µl	Lima <i>et al.</i> , 2014
Hemoglobina	Machos	10,20 - 17,80 g/dl	Lima <i>et al.</i> , 2014
Hemoglobina	Fêmeas	11,10 - 17,10 g/dl	Lima <i>et al.</i> , 2014
CHCM	Machos	31,60 - 37,80 g/dl	Lima <i>et al.</i> , 2014
RDW	Machos	13,00 - 18,40 %	Melo <i>et al.</i> , 2012
RDW	Fêmeas	12,70 - 18,20 %	Melo <i>et al.</i> , 2012

Durante o período de observação dos animais do grupo *recovery* (14 dias), os seguintes parâmetros hematológicos não sofreram alterações estatisticamente significativas, quando comparados ao grupo controle *recovery*: contagem total de leucócitos, contagem diferencial relativa de leucócitos (monócitos, eosinófilos, basófilos), contagem diferencial absoluta de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos), hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) e contagem de plaquetas (TABELAS 17 e 19).

No entanto, houve redução estatisticamente significativa da porcentagem de neutrófilos e aumento estatisticamente significativo da porcentagem de linfócitos nas fêmeas do grupo *recovery* (TABELA 18). Sabe-se que a contagem relativa dos leucócitos deve ser comprovada pela contagem absoluta, a qual considera o número global dos leucócitos. Uma interpretação baseada apenas na contagem relativa não reflete as verdadeiras alterações na distribuição celular (COLES, 1984). Como não houve alterações singificativas na contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos, essas alterações na contagem relativa dos leucócitos foram consideradas irrelevantes.

Também houve aumento estatisticamente significativo nas concentrações de hemácias e hemoglobina dos machos do grupo *recovery* (TABELA 19), quando comparado ao grupo controle *recovery*.

A diferença na concentração de hemácias entre os sexos é de causa hormonal. Os andrógenos aumentam a sensibilidade do tecido eritoblástico à

eritropoetina; a castração masculina causa anemia. Os estrógenos desestimulam a eritropoese; após a menopausa, há elevação da contagem a concentrações masculinas (FAILACE, 2003).

Patel, Nirav e Lal (2016) encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo, ao avaliarem a segurança do extrato de *Withania somnifera* padronizado em 4,5% de vitaferina A. Houve aumento estatisticamente significativo de hemoglobina nas fêmeas dos grupos tratados com 500 e 2000 mg/kg/dia e aumento significativo na hemoglobina dos machos no grupo tratado com 2000 mg/kg/dia. Eles concluíram que não foi observado efeito adverso relacionado ao tratamento com o extrato em parâmetros hematológicos. O aumento de hemoglobina estava dentro da faixa normal de laboratório, portanto não foi considerado toxicologicamente relevante.

No presente estudo de toxicidade de doses repetidas, o aumento nas concentrações de hemácias e hemoglobina dos machos do grupo *recovery*, foi de 6,19% e 4,95%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle *recovery*. As concentrações séricas encontradas de hemácias e de hemoglobina também estavam dentro dos valores de referência para a espécie (TABELA 25), não sendo consideradas toxicologicamente relevantes.

Pelo contrário, esse aumento pode estar relacionado aos efeitos benéficos de vitanolídeos imunoestimuladores que aumentam a atividade da medula óssea (ZIAUDDIN *et al.*, 1996).

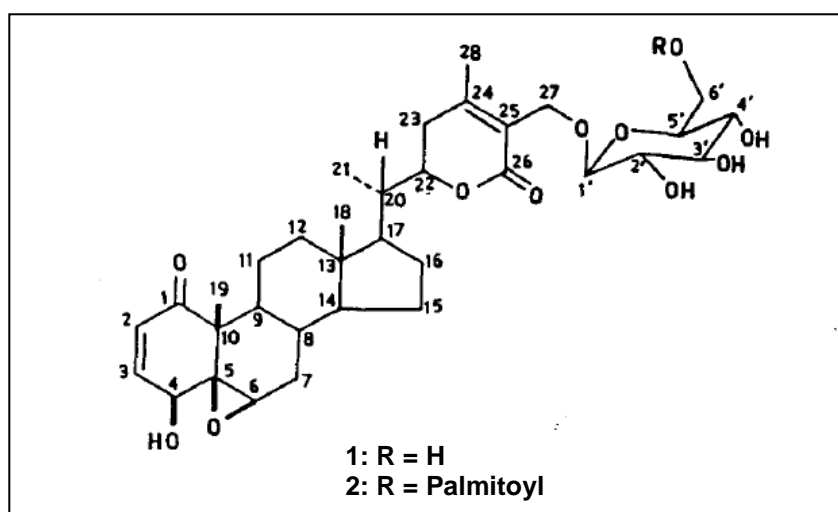
Os efeitos da raiz de *W. somnifera* foram investigados em camundongos com mielossupressão induzida por ciclofosfamida, azatioprina ou prednisolona. A administração da raiz (100 mg/kg pc) impediu a mielossupressão nos camundongos tratados com os três medicamentos imunossupressores. Um aumento significativo nas concentrações de hemoglobina ( $p < 0,01$ ), hemácias ( $p < 0,01$ ), contagem de glóbulos brancos ( $p < 0,05$ ), contagem de plaquetas ( $p < 0,01$ ) e peso corporal ( $p < 0,05$ ) foi observado em camundongos tratados em comparação com camundongos não tratados (controle) (ZIAUDDIN *et al.*, 1996).

Os pesquisadores desse trabalho ainda concluíram que os resultados de animais saudáveis tratados com *W. somnifera* (aumento de hemoglobina, hemácias e contagem de plaquetas) são favoráveis ao seu uso tradicional como tônico para a saúde, melhorando a atividade da medula óssea. Futuramente, pode ser possível o uso de *W. somnifera* como imunomodulador para combater efeitos indesejáveis dos

medicamentos mielossupressores e também para desenvolver e melhorar a imunidade protetora mesmo em indivíduos normais (ZIAUDDIN *et al.*, 1996).

De acordo com Ghosal e colaboradores (1989), os glicovitanolídeos sitoindosídeos IX (vitaferina-A-C27-O- $\beta$ -D-glicosídeo) e X (6'-O-palmitoil-vitaferina-A-C27-O- $\beta$ -D-glicosídeo) (FIGURA 12), isolados de *Withania somnifera*, exercem efeitos imunoestimulantes.

Figura 12 - Estruturas do sitoindosídeo IX (1) e do sitoindosídeo X (2)



Fonte: Ghosal e colaboradores, 1989.

Ao comparar os animais que receberam a administração do extrato por 28 dias e foram eutanasiados ao final da administração com os animais que foram mantidos vivos em observação por mais 14 dias, após a administração, observou-se que houve persistência da redução na concentração de hemoglobina, que ocorreu nos animais que receberam 250 mg/kg pc do EEFoAv (TABELA 15), nas fêmeas do grupo *recovery* (TABELA 19). A redução da CHCM (TABELA 16) que ocorreu nos machos que receberam 250 mg/kg pc do EEFoAv, não persistiu nos animais do grupo *recovery* (TABELA 17).

A redução na concentração de hemoglobina nas fêmeas do grupo *recovery*, quando comparada ao seu respectivo grupo controle, foi de 4,15% (TABELA 19). O valor encontrado também estava dentro da faixa de referência para a espécie (TABELA 25).

Também houve aumento significativo na porcentagem do RDW dos animais do grupo *recovery* (TABELAS 17). Esse aumento foi de 2,99%, quando comparado ao grupo controle *recovery*.

O RDW corresponde à amplitude de distribuição do tamanho das hemácias. Indica o quanto a população de hemácias se desvia do tamanho médio. Valores mais altos de RDW indicam heterogeneidade volumétrica excessiva da população de hemácias; são a expressão numérica do que os hematologistas chamam anisocitose. Nota-se pela variação do diâmetro das hemácias (FAILACE, 2003).

O valor encontrado neste estudo de toxicidade de doses repetidas para o RDW, também se encontrava dentro do valor de referência para a espécie.

Não foram observados achados associados às alterações hematológicas do grupo *recovery* na análise histopatológica. Portanto, considera-se que essas alterações não são efeitos tóxicos induzidos pelo EEFoAv.

Durante todo o período de 28 dias de tratamento do estudo de toxicidade de doses repetidas, a administração oral do EEFoAv não causou alterações significativas na maioria dos parâmetros bioquímicos, são eles: triglicerídeos, bilirrubina total, (alanina aminotransferase) ALT, gama glutamiltransferase (gama GT), fosfatase alcalina, ácido úrico, ureia, creatinina, proteínas séricas, albumina, ferritina, capacidade ligadora de ferro, cálcio e fósforo (TABELA 20).

Durante o período de observação dos animais do grupo *recovery* (14 dias), a grande maioria dos parâmetros hematológicos não sofreu alterações estatisticamente significativas, são eles: colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, bilirrubina total, ALT, (aspartato aminotransferase) AST, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, creatina quinase isoenzima MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), proteínas séricas, albumina, ferro, ferritina, capacidade ligadora de ferro, cálcio, fósforo e potássio (TABELAS 23 e 24).

Porém, a concentração de glicemia de jejum nos animais do grupo 500 mg/kg pc estava aumentada (TABELA 20). Isso também ocorreu nos machos do grupo *recovery*, quando comparado ao seu respectivo grupo controle (TABELA 23).

Durante uma situação de estresse, como procedimentos cirúrgicos (onde exala o odor do sangue), eutanásia, entre outros, além da estimulação do sistema nervoso autônomo simpático, também é observado o aumento do cortisol sérico e da glicemia plasmática. Embora a hiperglicemia induzida por exposição prolongada ao estresse seja reversível, ela persiste por um período prolongado, mesmo após o

término da exposição ao estresse, antes de atingir as concentrações de normalidade (NIRUPAMA; DEVAKI; YAJURVEDI, 2012).

Isso sugere que as alterações glicêmicas encontradas no presente estudo não estão relacionadas ao tratamento com o EEFoAv, uma vez que o grupo controle e o grupo controle *recovery* também mostraram alterações da glicemia de jejum em relação aos valores de referência estabelecidos por Lapchik e colaboradores (2009), que variam de 85 mg/dl a 132 mg/dl. No entanto, é necessário um estudo detalhado para investigar se o EEFoAv pode afetar a glicemia de jejum durante e após o consumo.

Houve também aumento estatisticamente significativo na concentração de colesterol total no grupo de animais que recebeu as 3 doses testadas (250 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 1000 mg/kg pc) do EEFoAv, no estudo de toxicidade de doses repetidas, quando comparado ao grupo controle. Esse aumento foi acompanhado do aumento estatisticamente significativo na concentração de colesterol LDL no grupo de animais que receberam 250 e 1000 mg/kg pc do EEFoAv e do aumento estatisticamente significativo na concentração de colesterol HDL do grupo de animais que receberam 500 e 1000 mg/kg pc do EEFoAv (TABELA 20).

O aumento na concentração de colesterol total no grupo que recebeu 1000 mg/kg pc do EEFoAv foi um pouco maior (95,80 mg/dl) que o valor de referência (46 mg/dl - 92 mg/dl) estabelecido por Lapchik e colaboradores (2009).

Porém, Dantas e colaboradores (2006) estabeleceram como valor de referência para os ratos machos não tratados do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, 68,9 mg/dl a 105,1 mg/dl de colesterol total. E Melo e colaboradores (2012) determinaram como valor de referência para ratas não tratadas do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe, 46 mg/dl a 101 mg/dl de colesterol total.

Já que esses dois últimos valores de referência de outros biotérios são maiores que os valores encontrados de colesterol total para os grupos que tiveram aumento significativo em relação ao grupo controle, entende-se que o aumento ocorreu dentro da faixa de normalidade, não sendo patológico, porém esse aumento está próximo aos limites superiores.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos podem variar entre linhagens e cepas diferentes de uma dada espécie e também em função do método de coleta de sangue. Dessa forma, é fundamental determinar os valores de referência para

animais de diferentes biotérios (MELO *et al.*, 2012). Porém na falta dessa determinação para o biotério utilizado no presente trabalho, utilizou-se os valores de referência de outros biotérios.

Para o colesterol LDL não foram encontrados valores de referência.

O único valor de referência para colesterol HDL encontrado foi o estabelecido por Dantas e colaboradores (2006), para ratos machos não tratados: 36,6 mg/dl - 59,4 mg/dl. O valor de colesterol HDL no presente estudo para os animais do grupo controle, estava abaixo dessa faixa (26,70 mg/dl), e os valores de colesterol HDL para os grupos que receberam 500 e 1000 mg/kg pc do EEFoAv estavam próximos ao limite inferior, 32,10 e 33,30 mg/dl, respectivamente (TABELA 20). Esses dados sugerem que a administração do EEFoAv por 28 dias, foi capaz de aumentar o colesterol HDL para concentrações normais.

Observou-se que no grupo de animais que receberam 250 mg/kg pc do EEFoAv parece que o responsável por aumentar o colesterol total foi o colesterol LDL, já que não houve aumento significativo do colesterol HDL nessa dose.

Por outro lado, no grupo que recebeu 500 mg/kg pc do EEFoAv, parece que o responsável pelo aumento do colesterol total foi o colesterol HDL, já que não houve aumento significativo do colesterol LDL nessa dose.

No entanto, no grupo de animais que recebeu 1000 mg/kg pc do EEFoAv, tanto o colesterol HDL quanto o colesterol LDL parecem ser os responsáveis pelo aumento do colesterol total, já que essas frações aumentaram significativamente.

Há uma relação direta entre a incidência de doenças do coração e as concentrações plasmáticas de colesterol (SANT'ANA, 2012). A LDL, uma vez oxidada, participa do desenvolvimento da aterosclerose (HORST; LAJOLO, 2012). Estudos epidemiológicos mostraram que altas concentrações de colesterol HDL poderiam contribuir potencialmente para a prevenção da aterogênese, inibição da oxidação de LDL e proteger células endoteliais dos efeitos citotóxicos da LDL oxidada (RIGOTTI; MIETTINEN; KRIEGER, 2003; ASSMANN; NOFER, 2003).

O aumento nas concentrações de colesterol total, colesterol LDL e colesterol HDL não persistiu nos animais do grupo *recovery* (TABELA 23). Indicando que se a administração do EEFoAv for interrompida, o perfil lipídico volta ao normal.

Na avaliação da segurança da ingestão oral do extrato aquoso de *Stigma maydis* (milho da seda), utilizado na medicina popular, Ikpeazu e colaboradores (2018) encontraram um aumento significativo na concentração de colesterol LDL do

grupo de ratos machos tratados. Esse resultado indicou que o extrato aquoso de *Stigma maydis* não pode servir como um agente hipolipidêmico nas doses testadas (500 mg/kg pc, 1000 mg/kg pc e 2000 mg/kg pc).

É possível que em humanos saudáveis, esse aumento do colesterol total, e do colesterol LDL não seja maléfico, e portanto, o uso do EEFoAv deva ser evitado apenas em pacientes que apresentam dislipidemias.

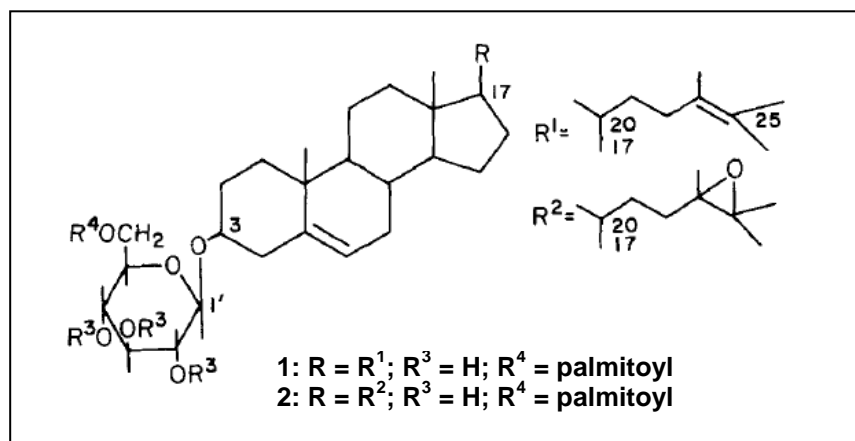
Os resultados do efeito do EEFoAv no perfil lipídico dos animais do presente estudo de toxicidade de doses repetidas contrasta com a propriedade hipolipidêmica atribuída à *W. somnifera*.

Em animais submetidos a dietas hiperlipemiantes, a adição da raiz pulverizada de *W. somnifera* demonstrou reduzir de forma significativa as concentrações de colesterol total e dos triglicerídeos no sangue, aumentando a concentração de colesterol HDL, ativando sistemas antioxidantes e interferindo na atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), a qual participa da síntese de colesterol (VISAVADIYA; NARASIMHACHARYA, 2007).

De acordo com Visavadiya e Narasimhacharya (2007), o efeito de redução do colesterol pode ser devido ao aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares, através da excreção fecal de esteróis. E esse aumento da excreção fecal de esteróis poderia ser atribuído ao maior conteúdo de fibra na raiz de *W. somnifera* (178,66 mg/g). O aumento da atividade antioxidante hepática dos animais indica que fibras, fitoesteróis, glicovitanolídeos (sitoindosídeos VII-X e vitaferina A) (FIGURAS 12, 13 e 14), polifenóis, flavonoides e vitamina C presentes na raiz *W. somnifera* poderiam contribuir para a melhoria da hiperlipidemia. Os pesquisadores desse trabalho ainda suspeitam que a raiz pulverizada de *W. somnifera* também é eficaz em indivíduos normais para a diminuição do perfil lipídico.

O teor de lipídeos totais encontrado no EEFoAv foi de 31,05 ( $\pm$  3,09)%, o que pode ser a causa do aumento do colesterol total e do colesterol LDL nos animais tratados no estudo de toxicidade de doses repetidas.

Figura 13 - Estruturas do sitoindosídeo VII (1) e do sitoindosídeo VIII (2)



Fonte: Bhattacharya e colaboradores, 1987.

A determinação de lipídeos é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes lipofílicos, por exemplo, éter. Quase sempre se torna mais simples fazer uma extração contínua em aparelho tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídeos, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Esses conjuntos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, lecitinas, ceras, carotenoides, clorofila e outros pigmentos, além de esteróis, fosfatídeos, vitamina A e D, óleos essenciais etc., mas em quantidades relativamente pequenas, que não chegam a representar uma diferença significativa na determinação. Nos produtos em que essas concentrações se tornam maiores, a determinação terá a denominação mais adequada de extrato etéreo (INSTITUTO..., 2008).

Em 1965, identificou-se a relação entre alguns ácidos graxos saturados com a elevação do colesterol sérico. Entre os ácidos graxos saturados que elevam o colesterol plasmático e são considerados aterogênicos estão o ácido láurico (C12:0), o ácido mirístico (C14:0) e o ácido palmítico (C16:0) (COSTA; SILVA, 2003). Os ácidos graxos em plantas, normalmente, são ácidos carboxílicos de cadeia linear com um número par de átomos de carbono. As cadeias de carbono podem ser curtas (12 unidades) ou longas (30 ou mais), porém mais comumente têm 16 ou 18 carbonos de extensão. As proporções de ácidos graxos nos lipídeos vegetais variam com as espécies vegetais (FISIOLOGIA..., 2017).

A análise por *Gas Chromatography - Mass Spectrometry* (GC-MS) deve ser realizada para avaliar a composição e quantificar os lipídeos do EEFoAv, a fim de esclarecer se os ácidos graxos contidos no EEFoAv podem elevar o colesterol.

Existe a possibilidade de haver metabólitos no EEFoAv responsáveis pelas alterações encontradas no perfil lipídico dos animais. Esse dado deve ser investigado.

No estudo de toxicidade de doses repetidas, a administração do EEFoAv reduziu significativamente as concentrações de AST nas fêmeas em todas as doses testadas (1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc) do EEFoAv (TABELA 21).

Os valores de AST encontrados tanto para as fêmeas do grupo controle quanto para as fêmeas dos grupos tratados estavam dentro do valor de referência para espécie, proposto por Lima e colaboradores (2014): 51 - 211 U/L, o que evidencia a não toxicidade do extrato.

Almeida (2019) também encontrou redução significativa na concentração de AST (268,3 U/L) no grupo de camundongos fêmeas C57BL/6 portadoras de melanoma B16F10 tratadas, por 21 dias, com 100 mg/kg pc do extrato diclorometânico de *Athenaea velutina* (mesma espécie utilizada no presente estudo), administrados por via intraperitoneal, quando comparado ao grupo controle (431,4 U/L) ( $p < 0,05$ ). A redução foi de 37,8%. No presente trabalho, a menor dose (250 mg/kg pc do EEFoAv) reduziu a AST em 42,9%.

A concentração de creatinina mensurada no trabalho de Almeida (2019) permaneceu constante e a concentração de ureia do grupo de camundongos fêmeas tratadas diminuiu para um valor considerado normal, para animais saudáveis, após o tratamento com o extrato diclorometânico de *A. velutina*.

Além disso, ao realizar a análise histopatológica do tecido hepático desses camundongos fêmeas, Almeida (2019) concluiu que o grupo controle exibiu um número maior de gotículas lipídicas (13,16%), dentro do citoplasma dos hepatócitos, do que o grupo tratado (5,31%). O fígado dos animais não apresentou sinais histológicos de lesão hepática, como fibrose ou necrose.

Devkar e colaboradores (2016) também observaram redução nas alterações gordurosas macrovesiculares no fígado de animais tratados com uma fração rica em vitanolídeos (FRV), isolada de um extrato metanólico das raízes de *Withania somnifera*. Essa redução, encontrada no trabalho de Devkar e colaboradores (2016),

correlaciona-se com os achados bioquímicos, nos quais se observou redução significativa nas concentrações de colesterol e de triglicérides.

Diante dos resultados dos principais marcadores bioquímicos relacionados à função hepática e renal e da melhora das condições histológicas do fígado dos animais, Almeida (2019) concluiu que o extrato diclorometânico de *A. velutina* não causou danos a esses órgãos e que esse extrato pode exercer atividade protetora do fígado de camundongos fêmeas C57BL/6 portadoras de melanoma.

Como já citado anteriormente, Wang e colaboradores (2018) concluíram que o vitanolídeo Nic-2 (FIGURA 11) isolado de *Nicandra physaloides* tem efeito hepatoprotetor.

Além disso, no trabalho de Devkar e colaboradores (2016) foi avaliado o possível mecanismo da atividade hepatoprotetora da FRV, isolada de *W. somnifera*. A hepatotoxicidade foi induzida pela administração oral de acetaminofeno (APAP), também conhecido como paracetamol, 750 mg/kg pc por 14 dias. A superdosagem de APAP é comum em seres humanos e é frequentemente associada com danos hepáticos. Os animais tratados com APAP receberam silimarina (25 mg/kg) ou doses graduadas da FRV (50, 100 e 200 mg/kg) 2 h antes da administração de APAP.

No grupo tratado com a FRV, no trabalho de Devkar e colaboradores (2016), houve redução significativa e dose-dependente ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) nas concentrações de bilirrubina, fosfatase alcalina, ALT, AST e LDH e aumento significativo e dose-dependente ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) da superóxido desmutase (SOD) hepática, glutatona reduzida (GSH) e capacidade antioxidante total, quando comparado ao grupo controle. As concentrações de malondialdeído e óxido nítrico também diminuíram significativamente ( $p < 0,01$ ) pelo tratamento com a FRV. As alterações histológicas induzidas por APAP no fígado foram restauradas à quase normalidade pelo pré-tratamento com a FRV.

O conteúdo de vitanosídeo V; vitaferina A; 1,2 desoxivitastramonolídeo; vitanona (FIGURA 3); vitanolídeo A (FIGURA 3) e vitanolídeo B presentes na FRV foi de 0,86; 12,9; 1,92; 1,52; 5,24 e 4,52 mg/g, respectivamente. A análise por TLC-DPPH mostrou que o vitanosídeo V; a vitaferina A; o 1, 2 desoxivitastramonolídeo; a vitanona e o vitanolídeo A tiveram atividade antioxidante. Os pesquisadores desse estudo concluíram que a FRV pode exercer sua ação hepatoprotetora por diminuir a inflamação e o estresse óxido-nitrosativo por inibição do fator de necrose tumoral- $\alpha$

(TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ciclo-oxigenase-2 (COX-II) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (DEVKAR *et al.*, 2016).

Diante de tudo isso pode-se concluir que o EEFoAv pode apresentar atividade hepatoprotetora.

No estudo de toxicidade de doses repetidas, também houve redução estatisticamente significativa nas concentrações de creatina quinase isoenzima - MB (CK-MB) nas fêmeas em todas as doses testadas (1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc) do EEFoAv (TABELA 21).

Após um infarto, várias enzimas são liberadas das células cardíacas lesionadas para a corrente sanguínea. Medidas das atividades séricas da CK-MB e das transaminases (ALT e AST) podem fornecer informações sobre a gravidade da lesão. A CK-MB é a primeira enzima cardíaca a aparecer no sangue após um infarto. A AST é a próxima a surgir e a ALT aumenta posteriormente. A lactato-desidrogenase (LDH) também pode ser liberada do músculo cardíaco lesionado (NELSON, 2014).

A isoenzima MB é a única isoenzima da creatina quinase presente no músculo cardíaco (NELSON, 2014).

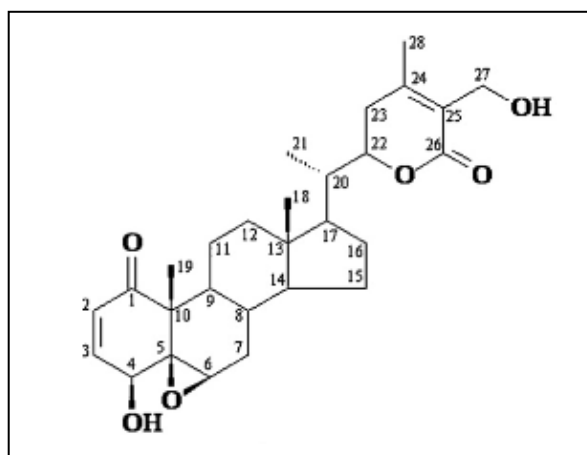
A concentração sanguínea de CK-MB começa a subir dentro de 2 horas após o infarto, alcança um pico entre 12 e 36 horas e retorna às concentrações normais entre 3 e 5 dias após o ataque. Portanto, a medida da CK-MB no sangue confirma o diagnóstico de um ataque cardíaco e indica aproximadamente quando ele ocorreu (NELSON, 2014).

Não foram encontrados valores de referência para CK-MB em ratos Wistar. Porém, acredita-se que não se pode atribuir toxicidade ao EEFoAv devido a essa redução nas concentrações da CK-MB, obtida no presente trabalho. Pelo contrário, essa redução pode até mesmo indicar um efeito cardioprotetor do EEFoAv.

O extrato hidroalcolólico de raiz de *W. somnifera* (MOHANTY *et al.*, 2004; MOHANTY *et al.*, 2008) e a vitaferina A (FIGURA 14) (YAN *et al.*, 2018) mostraram efeitos cardioprotetores devido ao efeito antioxidante.

Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de avaliar o efeito cardioprotetor do EEFoAv.

Figura 14 - Vitaferina A



Fonte: Benjumea e colaboradores, 2009.

Também houve redução estatisticamente significativa nas concentrações de lactato desidrogenase (LDH) nas fêmeas em todas as doses testadas (1000 mg/kg pc, 500 mg/kg pc e 250 mg/kg pc) do EEFoAv (TABELA 22), no estudo de toxicidade de doses repetidas.

A LDH pode auxiliar no diagnóstico de um ataque cardíaco e indicar aproximadamente quando ele ocorreu. A relação [LDH isoenzima 1]/[LDH isoenzima 2] aumentada, combinada com o aumento na concentração sanguínea da CK-MB, é evidência muito forte de um infarto do miocárdio recente (NELSON, 2014).

A LDH também está presente nos eritrócitos, no cérebro, nos rins, no fígado e no músculo esquelético (NELSON, 2014).

A LDH juntamente com a creatina quinase, fragmentos da cadeia pesada de miosina, troponina-I e mioglobina podem ser utilizadas como marcadores indiretos de dano muscular. Os métodos indiretos adotados para análise do dano muscular são os mais utilizados nos estudos em função da facilidade de coleta e, sobretudo, pelo baixo custo quando comparados aos métodos diretos (análises de amostras do músculo ou de imagens por técnica de ressonância magnética) (FOSCHINI; PRESTES; CHARRO, 2007).

Substâncias citoplasmáticas que não têm a capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática, como a LDH, extravasam para o meio extracelular após o dano nas estruturas musculares, tornando o aumento na concentração sérica dessas substâncias potentes marcadores indiretos de dano muscular e de outras estruturas teciduais (FOSCHINI; PRESTES; CHARRO, 2007).

No trabalho de Devkar e colaboradores (2016) citado acima, também houve redução significativa e dose-dependente ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) na concentração de LDH do grupo de ratos tratados com a FRV (100 e 200 mg/kg) em comparação ao grupo tratado apenas com APAP, afirmando o efeito hepatoprotetor do extrato.

Não foram encontrados valores de referência para LDH em ratos Wistar. Porém, acredita-se que não se pode atribuir toxicidade ao EEFoAv devido a essa redução nas concentrações da LDH, obtida no presente trabalho. Pelo contrário, essa redução pode até mesmo indicar efeitos cardioprotetor e hepatoprotetor do EEFoAv.

A administração do EEFoAv por 28 dias, foi capaz de aumentar significativamente a concentração de ferro do grupo de machos tratados com a dose de 500 mg/kg pc (TABELA 22). Provavelmente, isso se deve ao alto teor de ferro, 12,95 mg/kg, no EEFoAv (TABELA 5).

A análise de minerais do material vegetal de Ouro Preto (TABELA 5) revelou um conteúdo de ferro de 683,75 mg/kg, sendo o ferro encontrado em maior quantidade que os outros microminerais (Mn, B, Cu e Zn).

Esse teor de ferro estava dentro do intervalo (485,00 - 740 mg/kg) encontrado por Krishnamurthy e Sarala (2010) nas folhas de *Withania somnifera* de duas localidades da Índia.

Krishnamurthy e Sarala (2010) também encontraram o ferro em maior quantidade que os outros microminerais (Zn, Mn e Cu), em diferentes partes do material vegetal seco de *W. somnifera* (TABELA 26).

O ferro estava em maior quantidade nas amostras de folhas de Karthikere e nas amostras de raízes de Sondekola (KRISHNAMURTHY; SARALA, 2010).

Dos 25 diferentes tipos de plantas secas inexploradas analisadas por Kuppusamy e colaboradores (2015), as flores de *Pinus radiata* continham a maior quantidade de ferro (514,00 mg/kg).

De acordo com Kuppusamy e colaboradores (2015) a composição elementar das flores de *P. radiata* enfatiza seu potencial de exploração como medicamento industrial para promover a saúde pública, particularmente para aliviar as deficiências de ferro. A *A. velutina* também poderia ser explorada para esse fim, já que apresenta teor de ferro maior que o das flores de *P. radiata*.

Tabela 26 - Quantidade de ferro em diferentes partes do material vegetal seco de *Withania somnifera* de duas localidades da Índia

Partes da planta	Ferro (mg/kg)	
	Karthikere, Chickmagalore district	Sondekola, Chitradurga district
<b>Raiz</b>	349,50	945,00
<b>Haste</b>	617,00	280,00
<b>Folha</b>	740,00	485,00
<b>Fruto</b>	602,00	370,00

Fonte: Adaptado de Krishnamurthy e Sarala, 2010.

O ferro normalmente é armazenado nas folhas como um complexo proteico de ferro, chamado de fitoferritina. Esse mineral é essencial, porque faz parte de certas enzimas e de proteínas que transportam elétrons durante a fotossíntese e a respiração (SALISBURY; ROSS, 1984).

Na saúde humana, o ferro é essencial para a boa saúde cardiovascular, desenvolvimento cognitivo e função imunológica (TRUMBO *et al.*, 2001).

De acordo com as informações da Infinity Pharma<sup>®</sup> (2017), pelo fato da *Withania somnifera* conter ferro, sua ingestão pode aumentar as concentrações de hemoglobina e hemácias. A Infinity Pharma<sup>®</sup> (2017) alerta que o consumo em grande quantidade de fitoterápicos a base de *W. somnifera* deve ser evitado por pacientes com hemocromatose. Essa condição patológica, geralmente hereditária, é caracterizada pela formação de depósitos de ferro, sobretudo no fígado (COZZOLINO; HENRIQUES, 2012).

A partir das informações da Infinity Pharma<sup>®</sup> (2017), entende-se que além do possível efeito imunoestimulante de extratos com composição química similar a *W. somnifera*, como o EEFoAv, o conteúdo elevado de ferro do EEFoAv também pode explicar o aumento nas concentrações de hemácias e hemoglobina dos machos do grupo *recovery*.

É possível que em humanos saudáveis, esse discreto aumento nas hemácias e na hemoglobina não traga prejuízos à saúde. E apenas, pacientes com hemocromatose devam ter cautela, assim como no uso da *W. somnifera*. Investigação mais aprofundada precisa ser realizada para avaliar esse dado.

Os animais que receberam 250 mg/kg pc do EEFoAv, por 28 dias, apresentaram aumento estatisticamente significativo na concentração de sódio e os animais que receberam 500 mg/kg pc do EEFoAv apresentaram uma redução nas concentrações de sódio e de potássio, quando comparados ao grupo controle (TABELA 20).

O aumento na concentração de sódio foi maior (169,60 mEq/L) que os valores de referência para ratos machos (142 - 151 mEq/L) e fêmeas (140 - 150 mEq/L) (GIKNIS; CLIFFORD, 2008). A redução na concentração de sódio (139,70 mEq/L) foi ligeiramente abaixo desses valores de referência. E a redução na concentração de potássio (5,54 mEq/L) estava dentro dos valores estabelecidos por Lima e colaboradores (2014), para machos (3,9 mEq/L - 7,9 mEq/L) e fêmeas (3,6 mEq/L - 6,7 mEq/L) (TABELA 20).

A essas reduções nas concentrações de sódio e potássio não foram atribuídas efeito tóxico do EEFoAv, já que a redução de sódio ocorreu próximo ao valor de referência e a redução de potássio encontrava-se dentro do valor de referência para a espécie. E ainda, essas reduções podem indicar um efeito diurético do EEFoAv.

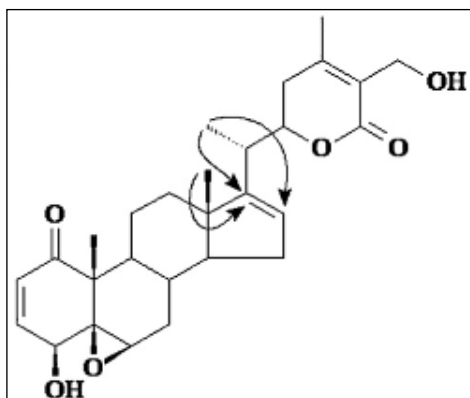
Em estudo realizado com 12 pacientes voluntários com hipercolesterolemia e diabetes tipo 2 (de grau moderado em ambos os casos), a administração oral da raiz pulverizada de *W. somnifera*, durante 1 mês, demonstrou diminuir significativamente as concentrações de colesterol total, colesterol LDL e colesterol VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), triglicerídeos e glicose no sangue. Isso ocorreu ao mesmo tempo em que se observou redução não significativa na concentração de sódio e redução significativa na concentração de potássio, aumento significativo no volume de excreção urinária e de sódio na urina. Esses dois últimos parâmetros são bons indicadores de diurese. Esses resultados indicam que *W. somnifera* é um bom diurético como relatado na literatura (ANDALLU; RADHIKA, 2000).

Além disso, quatro extratos de *Withania aristata* a 100 mg/kg foram administrados por via oral a ratos para avaliar sua atividade diurética. Da fração mais ativa, dois vitanolídeos foram isolados. Ambos, individualmente e como uma mistura a 5 e a 10 mg/kg, foram analisados quanto à atividade diurética. A taxa de excreção de água e o teor dos eletrólitos sódio e potássio foram medidos na urina dos animais. A fração aquosa de *W. aristata*, os dois vitanolídeos e a mistura desses compostos apresentaram alta atividade diurética, com uma excreção significativa de

íons sódio e potássio nos animais. A atividade foi atribuída aos vitanolídeos: vitaferina A e vitaristatina (27-hidroximetil,  $\Delta^{16,17}$  vitanolídeo) (FIGURAS 14 e 15) (BENJUMEA *et al.*, 2009).

Esses dados permitem confirmar que o efeito diurético de *W. aristata* produzido pela fração aquosa, deve-se, pelo menos principalmente, à presença desses vitanolídeos, os principais componentes ativos nessa fração polar. Os autores não excluem a possibilidade de que outros produtos contidos na planta também possam contribuir sinergicamente para essa ação. Em resumo, os compostos vitanolídeos parecem ser bons diuréticos, embora sua excreção de água e íons seja cerca de 30 a 40% menor que aquela produzida pelo diurético hidroclorotiazida (BENJUMEA *et al.*, 2009).

Figura 15 - Composto isolado de *Withania aristata*, vitaristatina



Fonte: Benjumea e colaboradores, 2009.

Nos animais do grupo *recovery*, houve redução estatisticamente significativa na concentração de sódio e redução não significativa na concentração de potássio (TABELA 23). A concentração de sódio no grupo controle *recovery* foi ligeiramente maior (152,30 mEq/L) que os valores de referência para machos (142 – 151 mEq/L) e fêmeas (140 – 150 mEq/L) (GIKNIS; CLIFFORD, 2008). O período de observação, mostrou que a interrupção da administração do EEFoAv reduziu a concentração de sódio para valores normais (146,30 mEq/L).

Essas reduções nas concentrações de sódio e potássio podem indicar que o efeito diurético persiste mesmo após a interrupção da administração do EEFoAv.

No estudo de toxicidade de doses repetidas, houve aumento estatisticamente significativo na concentração de ácido úrico nos machos do grupo *recovery* (TABELA 24).

Porém, observou-se que a concentração de ácido úrico do grupo controle, 0,42 mg/dl, estava abaixo dos valores de referência. Houve aumento significativo (1,52 mg/dl) para concentrações consideradas normais, estabelecidas por Lima e colaboradores (2014): 1,0 - 3,2 mg/dl. Como o EEFoAv alterou os valores de ácido úrico, mas esses estavam dentro da faixa de normalidade e a creatinina e a ureia não sofreram aumento significativo, pode-se sugerir o EEFoAv é desprovido de efeito adverso na função renal de ratos Wistar.

O ácido úrico é o produto final de excreção do catabolismo das purinas em primatas, aves e em alguns outros animais. O produto excretado origina-se, em parte, das purinas ingeridas e, em parte, da renovação dos nucleotídeos púricos dos ácidos nucleicos (NELSON, 2014).

O excesso de ácido úrico pode levar ao quadro patológico conhecido como gota. A gota é uma doença das articulações, causada pela concentração elevada de ácido úrico no sangue e nos tecidos. As articulações tornam-se inflamadas, doloridas e artríticas devido à deposição anormal de cristais de urato de sódio. Os rins também são afetados, pois o ácido úrico em excesso se deposita nos túbulos renais. Sua causa precisa não é conhecida, mas frequentemente envolve uma excreção reduzida de uratos (NELSON, 2014).

A gota ocorre predominantemente em pessoas do sexo masculino (NELSON, 2014). Observou-se que apesar de não haver alteração significativa na concentração de ácido úrico nas fêmeas, houve redução.

Uma explicação para essa elevação do ácido úrico nos machos pode ser o efeito colateral do possível efeito diurético do EEFoAv, citado acima, já que o aumento na concentração sérica de ácido úrico é um efeito colateral comum do tratamento com diuréticos tiazídicos. A manifestação máxima desse efeito colateral, derivado do uso diuréticos tiazídicos é a provocação de gota sintomática. O aumento do ácido úrico, devido à utilização dos diuréticos tiazídicos, pode ser causado pelo aumento da recaptação tubular de ácido úrico e pela redução da secreção de ácido úrico na urina (ALA-MUTKA *et al.*, 2018).

É possível que em humanos, esse aumento na concentração de ácido úrico não seja maléfico e, apenas aqueles pacientes que tenham predisposição para gota, tenham que utilizar o fitoterápico com cautela.

No estudo de toxicidade de doses repetidas, os exames laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) apontaram alterações, em geral, não dose-dependentes.

Apesar das variações estatísticas encontradas nos parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade de doses repetidas, os resultados não excederam aos valores de referência para a espécie.

Diante dos resultados dos principais marcadores bioquímicos (ALT, AST, ureia e creatinina) relacionados à função hepática e renal, pode-se concluir que EEFoAv não causou danos ao fígado e aos rins, não podendo ser considerado tóxico, dentro das doses avaliadas.

Além disso, o EEFoAv pode exercer atividade hepatoprotetora, imunoestimulante, cardioprotetora e diurética. Além dos vitanolídeos, esses efeitos benéficos poderiam ser explicados, pelos ácidos fenólicos e flavonoides, já identificados na *A. velutina* por Almeida (2019), agindo sinergicamente.

Em meados de 2019, a ANVISA publicou o Guia nº 22 - Estudos Não Clínicos Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos, que expressa o entendimento dessa agência sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pela legislação. Esse Guia deve ser utilizado por agentes públicos e privados como referência para cumprimento legislativo (ANVISA, 2019).

De acordo com o Guia nº 22, no caso do desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir de uma espécie vegetal não previamente estudada, ou seja, que não tenha dados prévios publicados de estudos não clínicos, clínicos, fitoquímicos e documentação de uso no ser humano, é recomendável que sejam feitos todos os testes citados no Quadro 1 (ANVISA, 2019).

De acordo com o Guia nº 22 o estudo de toxicidade aguda e de doses repetidas devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora (ANVISA, 2019). Dessa forma, estudos complementares de toxicidade devem ser realizados para o EEFoAv.

Quadro 1 - Teste de toxicologia não clínica de fitoterápicos

Tipos de produto	Testes recomendados	Testes adicionais que poderão ser recomendados de acordo como os dados da literatura*
Produto tradicional fitoterápico	Genotoxicidade e Toxicidade reprodutiva	Carcinogenicidade
Medicamento fitoterápico	Toxicidade aguda, doses repetidas, tolerância local, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva	Carcinogenicidade e segurança farmacológica (sistema cardiovascular, respiratório e nervoso central)

\* Caso existam motivos para se esperar um risco específico.

Fonte: ANVISA, 2019.

## 7 CONCLUSÕES

A análise comparativa do perfil cromatográfico por HPLC-DAD revelou que os extratos produzidos de amostras de *Athenaea velutina* acessadas nos municípios de Viçosa e Ouro Preto apresentam similaridade qualitativa em suas composições químicas. No entanto, existe variação quantitativa entre os componentes desses dois extratos.

Utilizando UHPLC-HRMS, foi possível identificar os vitanolídeos: Vitanolídeo A acetilado, Aurelianolídeo B, Vitanolídeo diacetilado e derivado de vitanolídeo no EEFoAv.

O EEFoAv não apresentou toxicidade oral aguda e nem de doses repetidas em ratos Wistar.

O EEFoAv não causou mortalidade. Não houve parâmetros bioquímicos que indicassem toxicidade, tais como: elevação nas concentrações séricas das enzimas hepáticas ALT e AST e da ureia e da creatinina. Não houve sintomatologia clínica, variação de peso corporal, alteração no consumo de água e ração, alteração do peso absoluto dos órgãos, alterações anatômicas dos órgãos e histopatológicas hepáticas.

No estudo de toxicidade aguda, não houve alteração nos pesos relativos dos órgãos, nem alterações na hematologia. Porém houve as seguintes alterações nos parâmetros bioquímicos: redução nas concentrações de bilirrubina e de ALT e aumento na concentração de cálcio.

Quanto ao estudo de toxicidade de doses repetidas, os animais eutanasiados após os 28 dias de tratamento, apresentaram alterações nos seguintes parâmetros hematológicos: redução nas concentrações de hemoglobina (250 mg/kg; machos e fêmeas) e da CHCM (250 mg/kg; machos). As alterações nos parâmetros bioquímicos desses animais, relacionadas à administração do EEFoAv, foram as seguintes: aumento nas concentrações de colesterol total (250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg; machos e fêmeas), de colesterol LDL (250 mg/kg e 1000 mg/kg; machos e fêmeas) e de colesterol HDL (500 mg/kg e 1000 mg/kg; machos e fêmeas); redução nas concentrações das enzimas AST, CK-MB e LDH (250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg; fêmeas); aumento na concentração de ferro (500 mg/kg; machos); aumento (250 mg/kg; machos e fêmeas) e redução (500 mg/kg; machos e

fêmeas) nas concentrações de sódio e redução na concentração de potássio (500 mg/kg; machos e fêmeas).

Quanto aos animais do grupo *recovery*, houve redução do peso relativo do fígado das fêmeas. Também houve persistência da redução na concentração de hemoglobina nas fêmeas, mas não da CHCM nos machos. Além disso, em relação aos parâmetros hematológicos, houve aumento nas concentrações de hemácias e de hemoglobina nos machos e aumento do RDW, em machos e fêmeas.

Apesar das variações estatísticas encontradas nos parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade de doses repetidas, os resultados não excederam aos valores de referência para a espécie.

A redução na concentração de sódio persistiu nos animais do grupo *recovery*, em machos e fêmeas. O outro parâmetro bioquímico que sofreu alteração nesse grupo foi o ácido úrico que teve sua concentração elevada no grupo de machos. Todas as outras alterações nos parâmetros bioquímicos apresentadas pelos animais eutanasiados após 28 de tratamento, foram revertidas.

As alterações que os exames laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) apontaram, em geral, não são dose-dependentes.

As alterações hematológicas e bioquímicas indicam potencial terapêutico e uma ausência de toxicidade do EEFoAv, o que permite a continuação dos estudos.

O estudo de toxicidade aguda e de doses repetidas deve ser realizado em outra espécie de mamíferos, por exemplo, cães, em ambos os sexos. Mais estudos devem ser realizados para avaliar a toxicidade a longo prazo (90 dias), para maior avaliação da segurança.

Os dados gerados neste trabalho serão utilizados para estabelecer as doses a serem utilizadas em demais estudos não clínicos e clínicos para posteriormente viabilizar o desenvolvimento e o registro de um medicamento fitoterápico a partir da espécie *Athenaea velutina*.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisar os marcadores de estresse oxidativo (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD, glutathione S-transferase - GST e malondialdeído - MDA) nos órgãos coletados (fígado, rim, baço e coração) dos animais do presente estudo.

Estudos com o extrato etanólico de *Athenaea velutina* deverão ser conduzidos, para avaliar os efeitos:

- hepatoprotetor,
- imunoestimulante,
- cardioprotetor e
- diurético.

O estudo toxicológico das outras 11 espécies do gênero *Athenaea* deve ser incentivado, já que há possibilidade dessas conterem vitanolídeos e apresentarem potencial terapêutico, assim como a *Athenaea velutina*.

## REFERÊNCIAS

- ALA-MUTKA, E. M.; RIMPELÄ, J. M.; FYHRQUIST, F.; KONTULA, K. K.; HILTUNEN, T. P. Effect of hydrochlorothiazide on serum uric acid concentration: a genome-wide association study. **Pharmacogenomics**, v.19, n. 6, p. 517-527, 2018.
- ALAM, N.; HOSSAIN, M.; IBRAHIM KHALIL, MD.; MONIRUZZAMAN, M.; SULAIMAN, S. A.; GAN; S. H. High catechin concentrations detected in *Withania somnifera* (ashwagandha) by high performance liquid chromatography analysis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 65, 2011.
- ALMEIDA, A. A. **Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. Orientador: João Paulo Viana Leite. 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2015.
- ALMEIDA, A. A. **Estudo fitoquímico e da atividade antimelanoma de *Aureliana velutina* Sendtn. (Solanaceae)**. Orientador: João Paulo Viana Leite. 2019. 114 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2019.
- ALMEIDA-LAFETÁ, R. C.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. Withanolides from *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 2478–2487, 2010.
- ALVES, J. R. **Bioprospecção de moléculas em espécies vegetais de *Ficus* spp. para o controle de fitonematoides**. Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Coorientador: João Paulo Viana Leite. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.
- ANDALLU, B.; RADHIKA, B. Hypoglycemic, diurectic and hypocholesterolemic effect of Winter cherry (*Whitania somnifera*, Dunal) root. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 607-609, 2000.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº 22 – Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos**. Versão 1, de 17 jun. 2019. Brasília, p. 1-31, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2977552/Guia+22+.pdf/8bec9e94-a3e2-4bb9-9e50-0f79cc876a8c>. Acesso em: 08 jul. 2019.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Versão 2, de 31 de jan. 2013. Brasília, p. 1-48, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7>

%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75.  
Acesso em: 08 jul. 2019.

ASSMANN, G.; NOFER, J. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annual Review of Medicine**, v. 54, p. 321–341, 2003.

ATTA-UR-RAHMAN; YOUSAF, M.; GUL, W.; QURESHI, S.; CHOUDHARY, M. I.; VOELTER, W.; HOFF, A.; JENS, F.; NAZ, A. Five new withanolides from *Withania coagulans*. **Heterocycles**, v. 48, n. 9, p.1801-1811, 1998.

*AURELIANA* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2018. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14587>. Acesso em: 02 jun. 2018.

BARBOZA, G. E.; CHIARINI, F. E.; STEHMANN, J. R. Real Identity of *Witheringia sellowiana* (Solanaceae), Typification, and Chromosome Number. **Systematic Botany**, v. 35, n. 2, p. 420-424, 2010.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. cap. 1.4, p. 30-36, 2014.

BATES, R. B.; MOREHEAD, S. R. Structure of Nic-2, a major steroidal constituent of the insect repellent plant *Nicandra physaloides*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 4, 1974.

BENJUMEA, D.; MARTÍN-HERRERA, D.; ABDALA, S.; GUTIÉRREZ-LUIS, J.; QUIÑONES, W.; CARDONA, D.; TORRES, F.; ECHEVERR, F. Withanolides from *Whitania aristata* and their diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 351-355, 2009.

BHATTACHARYA, S. K.; GOEL, R. K.; KAUR, R.; GHOSAL, S. Anti-Stress Activity of Sitoindosides VII and VIII, New Acylsterylglucosides from *Withania somnifera*. **Phytotherapy Research**, v. 1, n. 1, 1987.

BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In:\_\_\_\_\_. **FARMACOGNOSIA: do produto natural ao medicamento [recurso eletrônico]** / Organizadores, Cláudia Maria Oliveira Simões... [et al.]. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA ECONOMIA. **Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OCDE**. 2019a. Disponível em: <https://www.fazenda.gov.br/assuntos/atuacao-internacional/cooperacao-internacional/ocde#membros-da-ocde>. Acesso em: 29 jun. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. 2014.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Espécies ameaçadas**. 2019b. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-de-especies/fauna-ameacada.html>. Acesso em 17 jun. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. 2019c. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica\\_emdesenvolvimento](http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento). Acesso em 17 jun. 2019.

CARRASCHI, L.; ZAUPA, C.; TSUZUKI, J. K.; GABRIEL, M.; USHIROBIRA, T. M. A.; KANESHIMA, E. N.; SILVA, J. C.; AKIMOTO, L. S.; MARQUES, L. C. Estudo toxicológico pré-clínico do produto fitoterápico Biotoss<sup>®</sup> em roedores. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 3, p. 91-96, 2003.

CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; SILVA, L. V. C.; RAMALHO, L. S.; OLIVEIRA MARQUES, R. F.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 467–474. 2011.

CARVALHO, L. D. F.; COSTA, L. H. P.; DUARTE, A. C. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das solanáceas que ocorrem no Sudeste Brasileiro (*Acnistus*, *Athenaea*, *Aureliana*, *Brunfelsia* e *Cyphomandra*). **Rodriguésia**, v. 52, n. 8, p. 31-45, 2001.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. 566 p.

COSTA, R. P.; SILVA, C. C. Doenças cardiovasculares. *In*: CUPPARI, L. (Coord.). **Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto**. Barueri, SP: Manole, 2003. xviii, 406 p.

COZZOLINO, S. M. F.; HENRIQUES, G. S. Ferro. *In*: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4 ed., atualizada e revisada. Barueri, SP: Manole, 2012.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. S. S.; JUNIOR, R. S. L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 403-411, 2009.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério

Central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DEVKAR, S. T.; KANDHARE, A. D.; ZANWAR, A. A.; JAGTAP, S. D.; KATYARE, S. S.; BODHANKAR, S. L.; HEGDE, M. V. Hepatoprotective effect of withanolide-rich fraction in acetaminophen-intoxicated rat: decisive role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-II and iNOS. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2394-2403, 2016.

DUFOUR, D. R.; LOTT, J. A.; NOLTE, F. S.; GRETCH, D. R.; KOFF, R. S.; SEEFF, L. B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 2050-2068, 2000.

EVANS, G. O. **Animal hematotoxicology**: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. CRC Press. 2009.

EVERDS, N. E. Evaluation of clinical pathology data: correlating changes with other study data. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p. 90–97, 2015.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, 1977. 279 p.

FISIOLOGIA e desenvolvimento vegetal [recurso eletrônico] / Lincoln Taiz... [et al.]; [tradução: Alexandra Antunes Mastroberti... et al.]; revisão técnica: Paulo Luiz de Oliveira. – 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M. A. Relationship between physical exercise, muscle damage and delayed-onset muscle soreness. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2007.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972.

GALASSI, S. C.; MELLO-SILVA, R.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Solanaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 24, p. 101-105, 2006.

GEBHARDT, C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, 2016.

GHOSAL, S.; LAL, J.; SRIVASTAVA, R.; BHATTACHARYA, S. K.; UPADHYAY, S. N.; JAISWAL, A. K.; CHATTOPADHYAY, U. Immunomodulatory and CNS Effects of Sitoindosides IX and X, Two New Glycowithanolides from *Withania somnifera*. **Phytoterapy Research**, v. 3, n. 5, 1989.

GIKNIS, M. L. A.; CLIFFORD, C. B. **Clinical Laboratory Parameters for CrI:WI(Han)**. Charles River Laboratories. 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4 ed., atualizada e revisada. Barueri, SP: Manole, 2012.

HUNZIKER, A. T.; BARBOZA, G. E. Estudios sobre Solanaceae XXX. Revisión de *Aureliana*. **Darwiniana**, v. 30, n. 1-4, p. 95-113, 1990.

IKPEAZU, V. O.; UGBOGU, E. A.; EMMANUEL, O.; UCHE-IKONNE, C.; OKORO, B.; NNAEMEKA, J. Evaluation of the safety of oral intake of aqueous extract of *Stigma Maydis* (corn silk) in rats. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 17, n. 4, p. 387-397, 2018.

INCT - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. 2019. Disponível em: <http://inct.splink.org.br/>. Acesso em: 17 jun. 2019.

INFINITY PHARMA®. **Ashwagandha**: Ginseng indiano. 2017. Disponível em: <https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/a/ashwagandha-ginseng-indiano.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JUDD, W. S. *et al.* **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 632 p.

LAMEIRE, N.; BIESEN, V. W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. **Lancet**, v. 365, p. 417-430, 2005.

KHATRI, A.; GARG, A.; AGRAWAL, S. S. Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulata*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 122, p. 1-5, 2009.

KRISHNAMURTHY, S. R.; SARALA, P. Proximate Nutritive Values and Mineral Components of *Withania Somnifera* (Linn.) Dunal. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 985-996, 2010.

KUHLMANN, M. **Frutos e sementes do Cerrado**: espécies atrativas para a fauna. Brasília: M. K. Peres, 2018. 464 p. 2 v.

KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P. MEGHARAJ, M.; NIROLA, R.; LEE, Y. B.; NAIDU, R. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. **Industrial Crops and Products**, 2015.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009. 708 p.

LI, X.; LUO, Y.; WANG, L.; LI, Y.; SHI, Y.; CUI, Y.; XUE, M. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 110–115, 2010.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; ALBUQUERQUE-JR, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

LIMA, S. C. M.; PACHECO, J. S.; MARQUES, A. M.; VELTRI, E. R. P.; ALMEIDA-LAFETÁ, R. C.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C.; TORRES-SANTOS, E. C. Leishmanicidal activity of withanolides from *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*. **Molecules**, v. 23, n. 3160, p. 2-12, 2018.

LIPNICK, R. L.; COTRUVO, J. A.; HILL, R. N.; BRUCE, R. D.; STITZEL, K. A.; WALKER, A. P.; CHU, I.; GODDARD, M.; SEGAL, L.; SPRINGER, J. A.; MYERS, R. C. Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50 and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 223-231, 1995.

MARQUES, M. **Nutrição Clínica Funcional: Fitoterapia**. São Paulo: VP Editora, 2014. 272 p.

MATTOS, G.; CAMARGO, A.; SOUSA, C. A.; ZENI, A. L. B. Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735-3744, 2018.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 9, p. 1-6, 2012.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Aureliana velutina* Sendtn. 2018. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/50080687>. Acesso em: 02 jun. 2018.

MOHANTY, I. R.; ARYA, D. S.; DINDA, A.; TALWAR, K. K.; JOSHI, S.; GUPTA, S. K. Mechanisms of Cardioprotective Effect of *Withania somnifera* in Experimentally Induced Myocardial Infarction. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 94, p. 184-190, 2004.

MOHANTY, I. R.; ARYA, D. S.; GUPTA, S. K. *Withania somnifera* provides cardioprotection and attenuates ischemia-reperfusion induced apoptosis. **Clinical Nutrition**, v. 27, p. 635-642, 2008.

MOREIRA, M. E. C.; NATAL, D. I. G.; TOLEDO, R. C. L.; RAMIREZ, N. M.; RIBEIRO, S. M. R.; BENJAMIN, L. A.; OLIVEIRA, L. L.; RODRIGUES, D. A.; ANTÔNIO, J. D.; VELOSO, M. P.; SANTOS, M. H.; MARTINO, H. S. D. Bacupari

peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143–153, 2017.

MOURA, A. P. G.; BELTRÃO, D. M.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; BRITO, M. T.; SOUSA, T. K. G.; BATISTA, L. M.; CARVALHO, J. C.; RUIZ, A. L. T. G.; TORRE, A. D.; DUARTE, M. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V. Essential oil from fruit of *Xylopija langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093-3102, 2016.

MUSHARRAF, S. G.; ALI, A.; ALI, R. A.; YOUSUF, S.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, I. Analysis and development of structure-fragmentation relationships in withanolides using an electrospray ionization quadropole time-of-flight tandem mass spectrometry hybrid instrument. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 104–114, 2011.

NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico]/David L. Nelson, Michael M. Cox; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga... *et al.*]; revisão técnica: Carlos Termignoni... [*et al.*]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. C. **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2006. 1202 p.

NIRUPAMA, R.; DEVAKI, M.; YAJURVEDI, H. N. Chronic stress and carbohydrate metabolism: persistent changes and slow return to normalcy in male albino rats. **Stress**, v. 15, p. 262–271, 2012.

OECD Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Publications. **Series on Testing and Assessment N° 24**, 2001a.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (423)**, 17 Dec. 2001b.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (420)**, 17 Dec. 2001c.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP) (425)**, 3 Oct. 2008a.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (407)**, 3 Oct. 2008b.

OLMSTEAD, R. G. Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 80–102, 2013.

OLMSTEAD, R. G.; BOHS, L.; MIGID, H. A.; SANTIAGO-VALENTIN, E.; GARCIA, V. F.; COLLIER, S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, v. 57, n. 4, p. 1159–1181, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Who we are**. 2019. Disponível em: <https://www.oecd.org/about/>. Acesso em: 29 jun. 2019.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, n. 245, p. 194-205, 2008.

PATEL, S. B.; NIRAV, J. R.; LAL, L. H. Safety assessment of *Withania somnifera* extract standardized for Withaferin A: Acute and sub-acute toxicity study. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 7, p. 30-37, 2016.

PEREIRA, A. M. Principais doenças das cobaias. *In*: Andrade, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório**: criação e experimentação. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388 p.

PIGATTO, A. G. S.; MENTZ, L. A.; SOARES, G. L. G. Chemotaxonomic characterization and chemical similarity of tribes/genera of the Solanoideae subfamily (Solanaceae) based on occurrence of withanolides. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 54, p. 40–47, 2014.

PRABU, P, C.; PANCHAPAKESAN, S.; RAJ, C. D. Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Assessment of the Hydroalcoholic Extract of *Withania somnifera* Roots in Wistar Rats. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1169–1178, 2012.

RIGOTTI, A.; MIETTINEN, H. E.; KRIEGER, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 3, p. 357-387, 2003.

RIZZINI, C. T. **Latim para botânicos**. [S.l.]: Fundação Gonçalo Moniz, 1955. 226 p.

RODRIGUES, I. M. C. **Estudos taxonômicos nos gêneros *Athenaea* Sendtn e *Aureliana* Sendtn. (Solanaceae)**. Orientador: João Renato Stehmann. 2013. 295 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013.

RODRIGUES, I. M. C.; KNAPP, S.; STEHMANN, J. R. The nomenclatural re-establishment of *Athenaea* Sendtn. (Solanaceae) with a nomenclatural synopsis of the genus. **Taxon**, p. 1-8, 2019.

RODRIGUES, L. A. **Bioprospecção de produtos naturais antibacterianos de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica**. Orientador: João Paulo Viana Leite. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

SAEG: sistema para análises estatísticas. Versão 9.1. Viçosa: UFV, 2007.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W., **Plant Physiology**, 3 ed. CBS Publishers and Distributors, New Delhi, India, 1984.

SANT'ANA, L. S. Biodisponibilidade de lipídios. *In*: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4 ed., atualizada e revisada. Barueri, SP: Manole, 2012.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análise química de plantas**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p. 1974.

SILVA, E. L.; ALMEIDA-LAFETÁ, R. C.; BORGES, R. M.; STAERK, D. Athenolide A, a new steroidal lactone from the leaves of *Athenaea martiana* (Solanaceae) determined by means of HPLC-HR-MS-SPE-NMR analysis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 1, 2018.

SINGH, A.; DUGGAL, S.; SINGH, H.; SINGH, J.; KATEKHAYE, S. Withanolides: phytoconstituents with significant pharmacological activities. **International Journal of Green Pharmacy**, p. 229–237, 2010.

SKIRY CZ, A.; KIERSZIEWSKA, S.; MÉRET, M.; WILLMITZER, L.; TZOTZOS, G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A modern Eldorado? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, 2016.

SOARES, L. A. L.; FARIAS, M. R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. *In*: \_\_\_\_\_. **FARMACOGNOSIA: do produto natural ao medicamento [recurso eletrônico] / Organizadores, Cláudia Maria Oliveira Simões... [et al.]**. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUZA, V. H. S. **Avaliação da toxicidade não clínica do extrato bruto e vouacapanos obtidos dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth.** Orientadora: Mary Ann Foglio. 2017. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, São Paulo, 2017.

TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract. Part I – Preclinical Studies. **Phytotherapy Research**, 2017.

TRUMBO, P.; YATES, A. A.; SCHLICKER, S.; POOS, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 294–301, 2001.

VIEIRA, P. M.; MARINHO, L. P. M.; FERRI, S. C. S.; CHEN-CHEN, L. Protective effects of steroidal alkaloids isolated from *Solanum paniculatum* L. against mitomycin cytotoxic and genotoxic actions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 553-560, 2013.

VILLAS BOAS, G. R.; SANTOS, A. C.; SOUZA, R. I. C.; ARAÚJO, F. H. S.; TRAESEL, G. K.; MARCELINO, J. M.; SILVEIRA, A. P. S.; FARINELLI, B. C. F.; CARDOSO, C. A. L.; LACERDA, R. B.; OESTERREICH, S. A. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens*

(D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 1–12, 2018.

VISAVADIYA, N. P.; NARASIMHACHARYA, A. V. R. L. Hypocholesteremic and antioxidant effects of *Withania somnifera* (Dunal) in hypercholesteremic rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 136–142, 2007.

VORONTSOVA, M. S.; KNAPP, S. A new species of *Solanum* (Solanaceae) from South Africa related to the cultivated eggplant. **PhytoKeys**, v. 8, p. 1–11, 2012.

WANG, L.; ZHUA, L.; GAO, S.; BAO, F.; WANG, Y.; CHEN, Y.; LI, H.; CHEN, L. Withanolides isolated from *Nicandra physaloides* protect liver cells against oxidative stress-induced damage. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 93-101, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**, v. 4, 2009.

YAN, Z.; GUO, R.; GAN, LU.; LAU, W. B.; CAO, X.; ZHAO, J.; MA, X.; CHRISTOPHER, T. A.; LOPEZ, B. L.; WANG, Y. Withaferin A inhibits apoptosis via activated Akt-mediated inhibition of oxidative stress. **Life Sciences**, v. 211, p. 91-101, 2018.

ZIAUDDIN, M.; PHANSALKAR, N.; PATKI, P.; DIWANAY, S.; PATWARDHAN, P. Studies on the immunomodulatory effects of Ashwagandha. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 69–76, 1996.

## APÊNDICE A - Tabelas dos resumos das análises de variância de todas as variáveis do estudo de toxicidade de doses repetidas

Tabela 1 A - Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros fisiológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas

Fonte de Variação (FV)		SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
Grau de Liberdade (GL)		1	3	3	32	-
Quadrados médios	Peso inicial (g)	66341,03 **	64,36 ns	108,09 ns	562,26	9,36
	Peso final (g)	98505,62 **	191,56 ns	123,03 ns	996,31	11,10
	Varição de peso (g)	3168,40 **	202,17 ns	101,00 ns	327,38	58,27
	Consumo de água (ml/dia)	88,41 ns	1,57 ns	46,22 ns	28,56	14,31
	Consumo de ração (g/dia)	226,39 **	3,20 ns	2,40 ns	3,01	8,47

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

Tabela 2 A - Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros fisiológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas

Fonte de Variação (FV)		SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
Grau de Liberdade (GL)		1	1	1	16	-
Quadrados médios	Peso inicial (g) 28 d	37932,05 **	130,05 ns	36,45 ns	743,25	10,59
	Peso final (g) 28 d	57702,45 **	92,45 ns	6,05 ns	740,50	9,62
	Varição de peso (g) 28 d	924,80 *	441,80 ns	72,20 ns	155,75	48,75
	Consumo de água (ml/dia) 28 d	142,56 ns	2,81 ns	9,94 ns	44,51	17,31
	Consumo de ração (g/dia) 28 d	174,27**	7,36 ns	1,03 ns	2,76	8,06
	Peso inicial (g) 14 d	52122,05 **	42,05 ns	26,45 ns	751,75	9,65
	Peso final (g) 14 d	61605,00 **	135,20 ns	45,00 ns	687,60	8,76
	Varição de peso (g) 14 d	396,05 ns	26,45 ns	2,45 ns	183,93	88,93
	Consumo de água (ml/dia) 14 d	117,30 ns	6,87 ns	3,28 ns	28,61	14,98
	Consumo de ração (g/dia) 14 d	203,61 **	2,05 ns	0,15 ns	2,57	7,30

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

d : dias.

Tabela 3 A - Resumo da análise de variância das variáveis peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas

	Fonte de Variação (FV)	SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
	Grau de Liberdade (GL)	1	3	3	32	-
Quadrados médios	Fígado (g)	65,96 **	1,88 ns	0,85 ns	1,05	10,90
	Fígado (g/100 g)	0,6397 ns	0,4982 *	0,3585 ns	0,1679	12,26
	Rim direito (g)	1,4238 **	0,0322 ns	0,0265 ns	0,0165	10,49
	Rim direito (g/100 g)	0,0021 ns	0,0062 ns	0,0038 ns	0,0027	11,99
	Baço (g)	0,3301 **	0,0121 ns	0,0208 ns	0,0116	14,40
	Baço (g/100 g)	0,0074 *	0,0016 ns	0,0029 ns	0,1312	13,57
	Coração (g)	1,0304 **	0,0053 ns	0,0063 ns	0,0122	10,82
	Coração (g/100 g)	0,0009 ns	0,0006 ns	0,0020 ns	0,0023	13,16

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

Tabela 4 A - Resumo da análise de variância das variáveis peso dos órgãos (g) e peso relativo dos órgãos (g/100 g de peso corporal) para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas

	Fonte de Variação (FV)	SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
	Grau de Liberdade (GL)	1	1	1	16	-
Quadrados médios	Fígado (g)	39,9001 **	0,2524 ns	2,3194 ns	0,7555	9,45
	Fígado (g/100 g)	0,2566 *	0,1442 ns	0,2760 *	0,4823	7,00
	Rim direito (g)	0,7124 **	0,0032 ns	0,0021 ns	0,0243	13,82
	Rim direito (g/100 g)	0,0013 ns	0,0002 ns	0,0005 ns	0,0009	8,02
	Baço (g)	0,09158 *	0,00129 ns	0,00004 ns	0,01357	15,81
	Baço (g/100 g)	0,011351 **	0,000448 ns	0,000009 ns	0,000786	11,21
	Coração (g)	0,4864 **	0,0003 ns	0,0014 ns	0,0141	11,63
	Coração (g/100 g)	0,00306 *	0,00048 ns	0,00006 ns	0,00065	7,42

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

Tabela 5 A - Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros hematológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas

Fonte de Variação (FV)	SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
Grau de Liberdade (GL)	1	3	3	32	-
<b>Leucócitos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	37,2490 **	0,6897 ns	4,4043 ns	1,7388	21,49
<b>Neutrófilos (%)</b>	140,6250 ns	97,9583 ns	23,6917 ns	46,2625	26,70
<b>Neutrófilos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	5,5138 **	0,3213 ns	0,1280 ns	0,2162	29,89
<b>Linfócitos (%)</b>	280,9000 *	128,1333 ns	48,9000 ns	49,5500	9,83
<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	10,7257 **	0,7096 ns	3,5497 ns	1,3049	25,97
<b>Monócitos (%)</b>	12,1000 *	2,8000 ns	3,5667 ns	1,9500	66,50
<b>Monócitos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	0,1087 **	0,0108 ns	0,0124 ns	0,0092	73,79
<b>Eosinófilos (%)</b>	1,6000 ns	0,3667 ns	0,2667 ns	0,9250	147,96
<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	0,0174 ns	0,0011 ns	0,0001 ns	0,0046	165,49
<b>Basófilos (%)</b>	0,0250 ns	0,0917 ns	0,0917 ns	0,1625	230,35
<b>Basófilos (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	0,0002 ns	0,0003 ns	0,0003 ns	0,0006	233,79
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/μl)</b>	6,4240 **	0,2393 ns	0,3821 ns	0,2176	5,88
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	9,9003 **	1,7716 *	0,3929 ns	0,5474	5,29
<b>Hematócrito (%)</b>	142,6750 **	5,6285 ns	11,6132 ns	5,8502	5,98
<b>VCM (fl)</b>	81,2250 ns	52,5583 ns	56,9583 ns	54,6625	14,78
<b>HCM (pg)</b>	2,7040 *	0,9087 ns	0,3620 ns	0,4938	3,972
<b>CHCM (g/dl)</b>	5,6250 **	2,9220 *	1,9950 *	0,6659	2,36
<b>RDW (%)</b>	0,3240 ns	0,2937 ns	0,1780 ns	0,3081	3,8
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	18792,23 ns	3066,49 ns	33787,96 ns	30262,39	18,64

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

Quadrados médios

Tabela 6 A - Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros hematológicos para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas

Fonte de Variação (FV)	SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
Grau de Liberdade (GL)	1	1	1	16	-
<b>Leucócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	7,0686 ns	0,9288 ns	1,5180 ns	1,9505	26,08
<b>Neutrófilos (%)</b>	22,05 ns	42,05 ns	186,05 *	23,30	20,50
<b>Neutrófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,7481 ns	0,3256 ns	0,1408 ns	0,1699	32,65
<b>Linfócitos (%)</b>	24,20 ns	45,00 ns	162,20 *	27,8	7,19
<b>Linfócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	2,8764 ns	0,1117 ns	2,2881 ns	1,2560	28,51
<b>Monócitos (%)</b>	1,25 ns	0,05 ns	0,45 ns	3,05	81,23
<b>Monócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,00011 ns	0,00002 ns	0,00381 ns	0,00806	79,74
<b>Eosinófilos (%)</b>	2,45 ns	0,05 ns	0,05 ns	1,25	131,53
<b>Eosinófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,0089 ns	0,0014 ns	0,0005 ns	0,0026	117,60
<b>Basófilos (%)</b>	0,05 ns	0,05 ns	0,05 ns	0,15	258,20
<b>Basófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,00002 ns	0,00019 ns	0,00008 ns	0,00027	263,27
<b>Hemácias (<math>\times 10^6/\mu\text{l}</math>)</b>	0,2398 ns	0,0994 ns	0,6160 *	0,1165	4,24
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	0,0180 ns	0,0080 ns	1,8000 **	0,1548	2,97
<b>Hematócrito (%)</b>	0,2205 ns	1,5125 ns	12,9605 *	2,6570	4,01
<b>VCM (fl)</b>	16,20 ns	12,80 ns	0,00 ns	3,83	3,86
<b>HCM (pg)</b>	0,6125 ns	0,2645 ns	0,0005 ns	0,2883	3,26
<b>CHCM (g/dl)</b>	0,4205 ns	1,1045 ns	0,1445 ns	0,5375	2,26
<b>RDW (%)</b>	1,8000 *	0,9680 *	0,4500 ns	0,2128	3,09
<b>Plaquetas (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	1155,20 ns	23529,80 ns	10396,80 ns	32117,78	17,86

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

Tabela 7 A - Resumo da análise de variância das variáveis referentes aos parâmetros bioquímicos para os sexos (S) e os grupos (G) 1 a 4 do estudo de toxicidade de doses repetidas

Fonte de Variação (FV)	SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
Grau de Liberdade (GL)	1	3	3	32	-
<b>Glicemia de jejum (mg/dl)</b>	14440,00 **	8818,07 **	1677,27 ns	1812,68	21,49
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	115,6000 ns	1228,1670 **	292,4667 ns	224,9250	17,61
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b>	5,4760 ns	770,5680 *	171,3453 ns	226,9970	37,48
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	0,0250 ns	91,4250 **	5,0250 ns	12,6750	11,78
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	1703,0250 ns	89,8250 ns	421,0917 ns	1704,112	56,07
<b>Bilirrubina total (mg/dl)</b>	0,0023 ns	0,0036 ns	0,0003 ns	0,0026	35,95
<b>ALT (U/L)</b>	265,2250 ns	433,7583 ns	187,2917 ns	168,8250	20,32
<b>AST (U/L)</b>	93,0250 ns	3697,2250 **	2015,9580 **	328,8375	12,37
<b>Gama GT (U/L)</b>	44,1000 *	15,1333 ns	21,2333 ns	9,6625	33,42
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	50055,6200 **	1995,7580 ns	200,4917 ns	1056,6380	23,44
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	1,0563 ns	0,3663 ns	0,4809 ns	1,1043	68,13
<b>Ureia (mg/dl)</b>	13,2250 ns	131,4917 ns	53,8250 ns	54,0500	14,73
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,0001 ns	0,0086 ns	0,0063 ns	0,0086	19,46
<b>CK-MB (U/L)</b>	72760,90 *	49193,40 *	61147,77 **	12067,66	30,21
<b>LDH (U/L)</b>	143041,60 ns	479668,70 **	522658,20 **	99020,90	41,12
<b>Proteínas Séricas (g/dl)</b>	0,0010 ns	0,0603 ns	0,0963 ns	0,0859	4,69
<b>Albumina (g/dl)</b>	0,0040 ns	0,0010 ns	0,0019 ns	0,0268	5,55
<b>Ferro (mg/dl)</b>	72182,02 **	2475,48 ns	4594,92 *	1395,21	16,91
<b>Ferritina (mcg/dl)</b>	4812,32 ns	2941,94 ns	2340,52 ns	2303,27	64,55
<b>Capacidade ligadora de</b>					
<b>Ferro (mcg/ml)</b>	60543,9600 **	750,3077 ns	4100,5740 ns	1632,5230	14,10
<b>Cálcio (mg/dl)</b>	0,1210 ns	0,3900 ns	0,2110 ns	0,2694	4,96
<b>Fósforo (mg/dl)</b>	0,3610 ns	3,7403 ns	1,9897 ns	1,7295	15,70
<b>Sódio (mEq/L)</b>	44,5210 ns	1721,6410 **	14,0410 ns	15,7860	2,64
<b>Potássio (mEq/L)</b>	1,1222 ns	3,4423 **	0,8023 ns	0,4626	10,67

\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

Quadrados médios

Tabela 8 A - Resumo da análise de variância das variáveis referentes os parâmetros bioquímicos para os sexos (S) e os grupos (G) 5 e 6 do estudo de toxicidade de doses repetidas

Fonte de Variação (FV)	SEXO (S)	GRUPO (G)	S X G	RESÍDUO	CV(%)
Grau de Liberdade (GL)	1	1	1	16	-
<b>Glicemia de jejum (mg/dl)</b>	11424,20 *	1479,20 ns	9159,20 *	1414,70	20,34
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	444,1531 ns	1,6531 ns	126,2531 ns	172,4719	14,32
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b>	1068,7220 *	40,8980 ns	208,6580 ns	130,3290	27,33
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	6,05 ns	42,05 ns	11,25 ns	38,10	18,45
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	4234,05 **	638,45 ns	344,45 ns	480,85	25,31
<b>Bilirrubina total (mg/dl)</b>	0,0005 ns	0,0005 ns	0,0005 ns	0,0018	44,04
<b>ALT (U/L)</b>	80,00 ns	135,20 ns	605,00 ns	196,55	20,17
<b>AST (U/L)</b>	605,00 ns	819,20 ns	2976,80 ns	2651,30	33,24
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	16188,05 **	84,05 ns	8,45 ns	239,15	16,46
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	0,0125 ns	0,4205 ns	3,2805 *	0,6573	85,79
<b>Ureia (mg/dl)</b>	82,0125 ns	137,8125 ns	10,5125 ns	62,5375	12,33
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,00481 ns	0,00005 ns	0,01513 *	0,00233	5,97
<b>CK-MB (U/L)</b>	154264,60 *	24116,51 ns	9439,51 ns	22818,66	37,46
<b>LDH (U/L)</b>	1160656,0 *	243321,8 ns	105415,2 ns	180806,3	50,56
<b>Proteínas Séricas (g/dl)</b>	0,1445 ns	0,4805 ns	0,1125 ns	0,1820	6,77
<b>Albumina (g/dl)</b>	0,0980 ns	0,0000 ns	0,0000 ns	0,0288	6,03
<b>Ferro (mg/dl)</b>	45907,360 **	1170,450 ns	1404,488 ns	1929,164	23,33
<b>Ferritina (mcg/dl)</b>	7647,569 ns	2287,447 ns	1203,886 ns	5954,935	70,41
<b>Capacidade ligadora de</b>					
<b>Ferro (mcg/ml)</b>	51612,800 **	3225,800 ns	3,200 ns	2716,150	18,46
<b>Cálcio (mg/dl)</b>	0,0031 ns	0,3251 ns	0,4351 ns	0,3954	6,11
<b>Fósforo (mg/dl)</b>	2,3805 ns	3,9605 ns	2,3805 ns	1,9818	16,95
<b>Sódio (mEq/L)</b>	5,0000 ns	180,0000 **	51,2000 ns	20,3750	3,02
<b>Potássio (mEq/L)</b>	0,2000 ns	1,1520 ns	3,6980 ns	2,5170	23,79





\*\* : F significativo a 1% de probabilidade.

\* : F significativo a 5% de probabilidade.

ns : F não significativo a 5% de probabilidade.

CV : coeficiente de variação.

**ANEXO A - Autorização do acesso ao patrimônio genético no Parque do Itacolomi, concedida pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais – IEF-MG**

		<b>GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS</b> SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS ASSESSORIA DE PROGRAMAS E PROJETOS ESPECIAIS			
<b>AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA NO ESTADO DE MINAS GERAIS</b>					
Número da Autorização		Data da Emissão		Prazo de Validade	
011/2019		07/03/2019		07/03/2020	
<b>INFORMAÇÕES DO RESPONSÁVEL E DO PROJETO</b>					
Título do Projeto: "Análise química e avaliação de atividades biológicas da flora do Parque do Itacolomi"					
Instituição: Universidade Federal de Viçosa					
Responsável: João Paulo Vieira Leite					
Logradouro: Rua A				CPF: 80507697654	
N.º/KM: 95		Complemento: Condomínio Octávio Pacheco		Bairro/Localidade: Jardim dos Vales	
Município: Viçosa		UF: MG		CEP: 36570-880	
Telefone: (31) 3859-3044		Celular: (31) 99611-0066		Cx. Postal:	
E-mail: jvleite@ufv.br					
<b>INTEGRANTES DA EQUIPE</b>					
Nome		Instituição		CPF/RG	
Alisson Andrade Almeida		UFV		086.167.316-60	
Jordana Lutz dos Prazeres		UFV		088.998.376-35	
Leorana Vieira salustiano		UFV		112.155.216-18	
Função					
Pesquisador					
Pesquisador					
Pesquisador					
<b>INFORMAÇÕES DAS ATIVIDADES</b>					
TIPO DE ATIVIDADE:		<input type="checkbox"/> Captura		<input checked="" type="checkbox"/> Coleta	
		<input type="checkbox"/> Abiótica		<input type="checkbox"/> Microorganismos	
		<input type="checkbox"/> Anfíbios		<input type="checkbox"/> Répteis	
		<input type="checkbox"/> Fungo		<input checked="" type="checkbox"/> Botânica	
		<input type="checkbox"/> Aves		<input type="checkbox"/> Mamíferos	
		<input type="checkbox"/> Sem Coleta/Captura		<input type="checkbox"/> Invertebrados	
				<input type="checkbox"/> Ictiofauna	
OBSERVAÇÕES		<p>Esta autorização permite coleta/transporte de material botânico (folhas e ramos) de acordo com a tabela de estimativa de coleta que segue em anexo.</p> <p>Esta autorização não permite coleta/transporte de espécies da flora ameaçadas de extinção que constam na Portaria MMA nº443/2014.</p> <p>As campanhas devem ser agendadas com o responsável pela UC, com antecedência mínima de 10 dias das atividades de campo.</p>			
<b>LOCAL DA ATIVIDADE - EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL</b>					
Unidade de Conservação		Responsável pela UC		Assinatura do Responsável pela UC	
Parque Estadual do Itacolomi		Marta Lucia Coimbra Cristo			
		Contato (Telefone e e-mail)		Endereço da UC	
		(31) 3551-6293 marta.cristo@semambiente.mg.gov.br postacolomi@semambiente.mg.gov.br		Rodovia BR 356, Km 98 - Ouro Preto CEP: 35.400-000	
Esta autorização será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação.					
<b>LOCAL DA ATIVIDADE - FORA DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL (apenas para material botânico)</b>					
Município(s)		Não se aplica			
<b>TRANSPORTE - DESTINO DO MATERIAL COLETADO</b>					
Instituição(ões)		Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa-MG			
Endereço(s)		Avenida Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa - MG, 36570-900			
Outras Observações e Ressalvas:					
Assinatura do responsável pela Autorização			Número do Processo SIGEDNSIPRO - IEE/ASPROP		
 <b>Antônio Augusto Melo Molard</b> Diretor Geral do IEF MG 21.175-174-9			00000118 2101 2019 		
<small>           Célula Adm/Pesquisa-Terc. 9000 - Avenida Itaipava - Assessoria de Projetos/IEF e Projetos Especiais - 1º andar            Rodovia João Paulo S. 4143, Serra Santa Verônica - CEP 31020-900            Telefone: (31) 3815-1200 E-mail: 2019.00000118@semambiente.mg.gov.br         </small>					
Página 1 de 2					



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTAVEL  
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS  
ASSESSORIA DE PROGRAMAS E PROJETOS ESPECIAIS


1. Esta autorização não isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da terra indígena, da unidade de conservação federal, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação estadual cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso;
2. O pesquisador titular deverá confirmar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade de conservação, quando for o caso;
3. O Instituto Estadual de Florestas não se responsabiliza por qualquer dano a equipamentos, acidentes ou lesões físicas ou psíquicas, estando ainda, o pesquisador responsável e sua equipe ciente da vulnerabilidade da área de realização da pesquisa;
4. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior;
5. O titular da autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos e em proporções de coleta ou captura que não comprometam a viabilidade da população do grupo taxonômico de interesse em condições *in situ*, quando for o caso;
6. Esta autorização não permite captura/coleta/transporte:
  - para fins comerciais, industriais ou esportivos;
  - para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos, conforme resolução do CONAMA de nº 237 de 19/12/97, salvo quando especificado;
  - de espécies ameaçadas de extinção em lista oficial federal, salvo quando constante de projeto específico autorizado pelo SISBC;
  - de espécies ameaçadas de extinção em lista oficial estadual, salvo quando constante de projeto específico autorizado pelo IEF;
  - de fauna e flora em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso ou tácito do proprietário nos termos do Código Civil;
7. Esta autorização não permite transporte interestadual e internacional de material biológico;
8. Esta autorização não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Veja maiores informações em [www.mma.gov.br](http://www.mma.gov.br);
9. O titular desta autorização, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando da transgressão, omissão ou falsa declaração de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização suspensa ou revogada pelo IEF e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação em vigor;
10. O responsável poderá, durante a validade desta autorização e conforme Termo de Compromisso firmado, solicitar à Assessoria de Programas e Projetos Especiais do IEF Renovação, Cancelamento ou Conclusão, conforme instruções no site do IEF (<http://www.ief.mg.gov.br/biodiversidade/pesquisa-cientifica/>);
11. Esta autorização é válida somente sem armadas ou marmas e exclusivamente no estado de Minas Gerais;
12. O pesquisador deverá estar sempre acompanhado desta autorização para apresentá-la às autoridades, quando solicitada.

#### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Portaria 130/2017, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização deverá ser anotada *in loco*, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada ao IEF e ao responsável da UC, em até 30 dias após a atividade de campo, por meio do envio da cópia do registro de coleta imprevista de material biológico. O transporte de material biológico ou de substrato deverá ser acompanhado da autorização e devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica.

Unidade de Conservação	Taxa*	Qtde.	Tipo de amostra	QMc.	Data	Justificativa

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

<p>Assinatura do responsável pela Autorização</p>  <p><b>Arilson Augusto Melo Maland</b> Diretor Geral do IEF MAGP 1.176/91-8</p>	<p>Número do Processo SIGED/SIPRO - IEF/ASPROP</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------

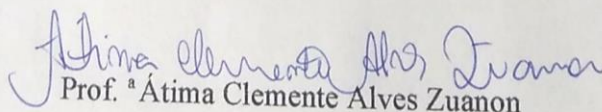
**ANEXO B - Aprovação dos procedimentos que foram realizados com os animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA/UFV**

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 82/2018, intitulado “**Estudo toxicológico do extrato etanólico das folhas de aureliana velutina sendtner (solanaceae) em ratos wistar**”, coordenado pela professora Mariana Machado Neves do Departamento de de Biologia Geral, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 21/03/2019, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 82/2018, named “**Toxicological study of the ethanolic extract of leaves of aureliana velutina sendtner (solanaceae) in wistar rats**”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 21, 2019 valid for 12 months.

  
Prof.ª Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV