

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**CAROLINE GOMES**

**TOXICIDADE SUBCRÔNICA (28 DIAS) DE *Tropaeolum majus* L. EM RATOS**

CURITIBA - PR  
2012

**CAROLINE GOMES**

**TOXICIDADE SUBCRÔNICA (28 DIAS) DE *Tropaeolum majus* L. EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Paulo Roberto Dalsenter

Co-Orientador: Prof. Emerson Luiz Botelho Lourenço

CURITIBA - PR  
2012




Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



## PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “TOXICIDADE SUBCRÔNICA DE *Tropaeolum majus* L. EM RATOS WISTAR”, de autoria da pós-graduanda **CAROLINE GOMES**, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter e composta pelos professores: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (UNIPAR) e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Menezes Zanoveli (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 24 de fevereiro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Orientador - UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (UNIPAR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Menezes Zanoveli (UFPR)

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Rosa, pela força, incentivo e pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Por ser mãe, “pai” e amiga nestes últimos anos. Teu apoio foi essencial para a conclusão desta etapa.

Ao meu pai, Anísio (*in memoriam*) por me mostrar a importância dos estudos, incentivando para que eu me dedicasse cada vez mais. Pelo amor, carinho e pelas boas recordações que ficaram gravadas em minha memória.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e saúde, por iluminar o meu caminho e colocar nele pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, Anísio (*in memoriam*) e Rosa, pelo amor incondicional, pelos valores que me ensinaram e por sempre incentivarem meus estudos e apoiarem meus projetos. À minha mãe ainda, por toda força e carinho que me transmitiu especialmente neste período, mesmo distante fisicamente.

Aos meus irmãos, Robson e Dyego, pelo carinho, apoio e incentivo que sempre me deram para que concluísse cada etapa e buscasse sempre ir mais longe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter, por me guiar no desenvolvimento do projeto, na redação do artigo e da dissertação, pelos ensinamentos e principalmente por acreditar na minha capacidade de concluir este projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Msc. Emerson L. B. Lourenço, pelo incentivo para que eu fizesse o mestrado, por propiciar a realização deste projeto, pelo auxílio em cada dificuldade, pelas orientações, pela sinceridade e amizade.

Aos professores Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, Tatiane Camacho Mendes e Karla M. R. Guedes, pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e pelo aprendizado que me proporcionaram.

Aos alunos de iniciação científica Samila, Camila, Érica, Mariana, Vancley, Thiago, em especial a Aline Duque; e também ao mestrando Douglas Rossi que foram parte essencial para execução deste projeto em Umuarama.

A Ana Carolina e Fabíola, pela amizade e companheirismo em todos os momentos, e por colaborarem direta e indiretamente neste projeto.

Às minhas companheiras Ana Cláudia, Juliane, Inês, Samanta e Leone, pelo aprendizado me proporcionaram no laboratório, pela ajuda, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela amizade que construímos neste período.

Aos funcionários do biotério, do departamento de farmacologia e do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e aos funcionários da Universidade paranaense (UNIPAR) de Umuarama que contribuíram para o desenvolvimento dos experimentos.

Aos colegas e professores do departamento de farmacologia, pelas contribuições e colaborações. Pelo convívio agradável e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os meus amigos e familiares, que compreenderam a minha ausência em alguns momentos, por terem me dado muita força e pelos bons momentos juntos.

As agências CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

## EPÍGRAFE

“Os seus desapontamentos não fazem o trabalho que só o  
tempo conseguirá realizar.  
O seu mau humor não modifica a vida.  
A sua dor não impedirá que o sol brilhe amanhã sobre os  
bons e os maus.  
A sua tristeza não iluminará os caminhos.  
O seu desânimo não edificará a ninguém.  
As suas lágrimas não substituem o suor que você deve  
verter em benefício da sua própria felicidade...”

(Chico Xavier)

## RESUMO

O uso popular de plantas medicinais é amplamente difundido no mundo, onde várias plantas são utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças, como câncer, asma, diabetes, distúrbios gastrointestinais, desordens cardiovasculares, entre outras. A espécie *Tropaeolum majus* L. é uma importante planta medicinal, nativa dos Andes da América do Sul, distribuída mundialmente, sendo conhecida popularmente no Brasil como chaguinha, capuchina e nastúrcio. As folhas desta planta são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de desordens cardiovasculares, infecções do trato urinário, asma e constipação. Suas folhas e flores também são consumidas pela população na forma de saladas, apresentando um sabor picante semelhante ao do agrião. Estudos com o extrato hidroetanólico das folhas de *T. majus* demonstraram atividade diurética, anti-inflamatória e anti-hipertensiva, evidenciando seu potencial terapêutico e apoiando alguns de seus usos populares. Porém, não há estudos toxicológicos sobre o seu uso prolongado. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade oral pré-clínica após doses repetidas do extrato bruto hidroetanólico liofilizado obtido das folhas de *T. majus* em ratos Wistar. Para isso três doses do extrato hidroetanólico de *T. majus* (75, 375 e 750 mg/kg) ou veículo (água destilada) foram administrados durante 28 dias por via oral, em ratos Wistar machos e fêmeas. Os animais foram pesados diariamente e sinais clínicos de toxicidade sistêmica foram avaliados durante os experimentos. Um dia após o último tratamento os animais foram eutanasiados. Foi procedida a coleta de sangue para análises hematológicas e bioquímicas, e posteriormente, foram removidos os órgãos para determinação do peso relativo e análise histopatológica. Não foram observados sinais clínicos de toxicidade ou morte relacionada com os tratamentos. Não foram observadas alterações significativas no ganho de peso corporal, parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos séricos, peso relativo e análise histopatológica de fígado, rins e baço. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram ausência de toxicidade oral após doses repetidas durante 28 dias do extrato hidroetanólico de *T. majus* em ratos Wistar nas doses utilizadas. Entretanto, outros estudos são necessários para uma completa avaliação da segurança desta planta, como estudos de toxicidade oral após doses repetidas por 90 dias, estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade.

**Palavras-chave:** *Tropaeolum majus* L.; toxicidade pré-clínica; parâmetros bioquímicos; parâmetros hematológicos; análises histopatológicas.

## ABSTRACT

The popular use of medicinal plants is widely known around the world, and several plants are used for the treatment of diseases as cancer, asthma, diabetes, gastrointestinal and cardiovascular disorders, among others. The species *Tropaeolum majus* L. is an important medicinal plant, native from the Andes in South America, worldly distributed, popularly known in Brazil as chaguinha, capuchinha and nastúrcio. The leaves are mainly used in traditional medicine for the treatment of heart disorders, urinary tract infections, asthma and constipation. Its leaves and flowers are also used by the population as salads, presenting a bitter flavor, similar to cress. Studies with the hydroethanolic extract of the leaves of *T. majus* showed diuretic, anti-inflammatory and anti-hypertensive activities, demonstrating its therapeutic potential and supporting some of its popular uses. However there are no toxicological studies about its chronic use. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the pre-clinical oral toxicity after repeated doses of the lyophilized hydroethanolic extract obtained from the leaves of *T. majus* in Wistar rats. Three doses of the hydroethanolic extract of *T. majus* (75, 375 and 750 mg/kg) or vehicle (distillate water) were orally administered to male and female Wistar rats for 28 days. The animals were weighted daily and clinical signs of systemic toxicity were evaluated during the experiments. One day after the last treatment the animals were killed, blood was collected for the hematological and biochemical analysis, and later, organs were removed to determinate the relative weight and histopathological analysis. No signs of toxicity or death related to the treatment were observed. There were also no significant changes in body weight gain, hematological or biochemical parameters, relative organ weight and histopathological analysis of the liver, kidneys and spleen. The results gathered in this study show the absence of oral toxicity after repeated doses during 28 days of the hydroethanolic extract of *T. majus* in Wistar rats in the doses used. However, other studies are necessary for a complete evaluation of the safety of this plant, as oral toxicity studies after repeated doses during 90 days, and genotoxicity and carcinogenicity studies.

**Key words:** *Tropaeolum majus* L.; pre-clinical toxicity; biochemical parameters; hematological parameters; histopathological analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Foto da espécie <i>T. majus</i> cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.....	25
<b>Figura 2</b>	Foto da entrada do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com exemplares de <i>T. majus</i> utilizadas na composição do jardim.....	28
<b>Figura 3</b>	Estruturas químicas da isoquercitrina e da quercetina.....	29
<b>Figura 4</b>	Foto ilustrativa de uma folha de <i>T. majus</i> logo após a coleta, e da mesma folha após a secagem.....	35
<b>Figura 5</b>	Fotos ilustrativas dos processos de trituração, maceração e filtração durante a preparação dos extratos vegetais no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama..	36
<b>Figura 6</b>	Foto do rotaevaporador, aparelho utilizado para evaporação do solvente sob pressão reduzida. Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.....	36
<b>Figura 7</b>	Foto do aparelho utilizado para liofilizar o extrato. Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.....	37
<b>Figura 8</b>	Foto do analisador hematológico automatizado (Abbott Cell Dyn 3500), aparelho utilizado para a realização das análises hematológicas. Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.....	39
<b>Figura 9</b>	Foto do analisador bioquímico automatizado (Selectra E), aparelho utilizado para a realização das análises bioquímicas. Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama..	40
<b>Figura 10</b>	Foto do sistema semi-automatizado (MH-Lab Ise – Íon Seletivo), que foi utilizado para determinação dos íons sódio e potássio. Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama..	41
<b>Figura 11</b>	Fotomicrografias de lâminas histopatológicas de baço, fígado e rim de ratos Wistar .....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Ganho de peso corporal (%) em ratos Wistar machos durante o tratamento por via oral com o EHTM ou veículo por 28 dias.....	43
<b>Gráfico 2</b>	Ganho de peso corporal (%) em ratas Wistar durante o tratamento por via oral com o EHTM ou veículo por 28 dias.....	43

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre o peso relativo dos órgãos de ratos Wistar.....	44
<b>Tabela 2</b>	Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros hematológicos de ratos Wistar.....	45
<b>Tabela 3</b>	Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros hematológicos de ratas Wistar.....	46
<b>Tabela 4</b>	Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros bioquímicos séricos de ratos Wistar.....	47
<b>Tabela 5</b>	Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros bioquímicos séricos de ratas Wistar.....	48

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	v
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS .....	16
2.1.1 Riscos do uso de plantas medicinais.....	18
2.1.2 Regulamentação .....	21
2.1.3 Testes toxicológicos para validação de plantas medicinais.....	22
2.2 <i>T. majus</i> .....	25
2.2.1 Usos populares .....	26
2.2.2 Principais constituintes químicos .....	28
2.2.3 Estudos farmacológicos e toxicológicos .....	31
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	34
4.1 OBJETIVO GERAL.....	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	35
5.1 MATERIAL VEGETAL .....	35
5.2 PREPARAÇÃO DO EHTM.....	35
5.3 ANIMAIS.....	37
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL APÓS DOSES REPETIDAS.....	37

5.4.1	Peso relativo dos órgãos.....	38
5.4.2	Análises hematológicas.....	39
5.4.3	Análises bioquímicas.....	40
5.4.4	Histopatologia.....	41
5.4.5	Análises estatísticas.....	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
6.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL APÓS DOSES REPETIDAS.....	43
6.1.1	Peso relativo dos órgãos.....	44
6.1.2	Análises hematológicas.....	45
6.1.3	Análises bioquímicas.....	46
6.1.4	Histopatologia.....	49
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>71</b>
	ANEXO 1 – Protocolo para confecção das lâminas histológicas	71

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional para cuidar da saúde. Além disso, as plantas medicinais constituem o tipo de medicina tradicional mais popular (WHO, 2008), pois inúmeras plantas são utilizadas pela população para o tratamento de muitas doenças, tais como asma, diabetes, desordens cardiovasculares, câncer, distúrbios gastrointestinais, entre outras (KIM *et al.*, 2007; GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA, 2008).

Vários tipos de terapias empregando plantas medicinais têm sido registrados apesar do intenso desenvolvimento e comercialização de medicamentos convencionais. O acesso facilitado às plantas medicinais, seu baixo custo e a tradição do seu uso contribuem para o crescimento deste tipo de terapia alternativa (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças geralmente é acompanhado pela crença de que elas apresentam baixa toxicidade devido a sua origem natural. No entanto, o tratamento com plantas medicinais, de maneira semelhante ao uso de medicamentos convencionais, pode causar efeitos adversos, interações medicamentosas e intoxicações (GADANO; GURNI; CARBALLO, 2006; SEEF, 2007; SINITOX, 2011).

A preocupação com a segurança do uso de plantas medicinais e suas preparações tem aumentado, visto a ampla utilização destes recursos pela população. Deste modo, a avaliação toxicológica destes recursos terapêuticos com base em protocolos padronizados por agências regulamentadoras é de extrema importância.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que regulamenta os medicamentos e alimentos no Brasil, em uma de suas resoluções dispõe especificamente sobre estudos de toxicidade pré-clínica de medicamentos fitoterápicos, onde são recomendados estudos de toxicidade após doses repetidas para fitoterápicos utilizados por longos períodos (ANVISA, 2004b).

Uma importante planta medicinal nativa dos Andes da América do sul é a espécie *Tropaeolum majus* L. (Tropaelaceae). Esta espécie é amplamente distribuída no mundo, sendo conhecida popularmente como chaguinha,

capuchinha e nastúrcio (CORRÊA, 1978; LORENZI; MATOS, 2002). Suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, incluindo desordens cardiovasculares, infecções do trato urinário, asma e constipação (CORRÊA, 1978; LORENZI; MATOS, 2002; FERREIRA; VIEIRA; ZÁRETE, 2004; FERRO, 2006).

Esta planta também é uma hortaliça, principalmente as suas folhas e flores são consumidas na alimentação, na forma de saladas, consideradas como uma boa fonte nutricional (PANIZZA, 1997; NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005; MLCEK; ROP, 2011). A Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) em um informativo incentiva o plantio desta planta, orientando quanto ao seu cultivo, a fim de oferecê-la para o consumo alimentar e medicinal (VAZ; JORGE, 2006).

Estudos em farmacologia experimental realizados com *T. majus* demonstraram atividades farmacológicas que apoiam cientificamente alguns dos seus usos populares e evidenciam o seu potencial terapêutico (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2009, 2011A, 2011B; LOURENÇO *et al.*, 2011). Entretanto, quanto a estudos toxicológicos, existem poucos trabalhos que avaliaram a toxicidade desta planta (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2009; ZANETTI *et al.*, 2003).

Dentro deste contexto, percebemos que é imprescindível a realização de estudos mais abrangentes sobre estes recursos naturais, proporcionando o uso racional e terapêuticamente correto destes agentes. Assim, com base no potencial terapêutico de *T. majus* e na ausência de estudos de toxicidade após o seu uso prolongado, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade oral pré-clínica após doses repetidas do extrato bruto hidroetanólico obtido das folhas de *T. majus* (EHTM) em ratos Wistar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais pela população surgiu através da transmissão dos conhecimentos adquiridos empiricamente pelas gerações anteriores, fazendo parte da cultura popular (PANIZZA, 1997). Desde os primórdios o homem aprendeu a buscar na natureza alimento, e a utilizar-se dela também para aliviar as dores e curar os males. Em suas observações também encontrou na natureza plantas que lhes faziam mal (LORENZI; MATOS, 2002).

Este tipo de medicina tradicional é amplamente difundido no mundo, na Austrália, por exemplo, é usada no tratamento das enfermidades por 50% da população (LING *et al.*, 2008). No Brasil, aproximadamente 20% da população faz uso dos medicamentos disponíveis, enquanto o restante procura tratamentos alternativos, onde estão incluídas as plantas medicinais (REIS; MARIOT, 2001). Uma pesquisa demonstrou que cerca de 37% da população adulta dos Estados Unidos da América (EUA) utiliza preparações à base de plantas medicinais terapêuticamente (BREVOORT, 1998). Outro estudo, no Canadá, relatou que 9% dos pacientes que chegam as clínicas médicas afirmam já ter utilizado algum tipo de terapia com plantas medicinais (XU; LEVINE, 2008).

O baixo custo e a facilidade de obtenção das plantas medicinais contribuem para o aumento do uso terapêutico destes agentes. As plantas podem ser cultivadas pelos próprios usuários ou adquiridas facilmente em ervanários. Devido à ausência de alternativas economicamente viáveis, muitas vezes as plantas são utilizadas como uma opção terapêutica primária (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Na África, cerca de 80% da população faz uso deste tipo de medicina popular, principalmente frente ao alto custo dos medicamentos sintéticos (WHO, 2008).

A importância das plantas medicinais também é observada na produção de medicamentos. Diversos princípios ativos foram isolados de plantas medicinais e representaram a maior parte dos medicamentos

disponíveis até 1950. No entanto, a produção sintética de fármacos e as dificuldades técnico-científicas na preparação de extratos vegetais contribuíram para uma redução na quantidade de medicamentos de origem vegetal (LAPA *et al.*, 2004).

A partir da década de 80, com o avanço tecnológico e o desenvolvimento de técnicas de isolamento de substâncias, a identificação de compostos em amostras complexas, como são os extratos vegetais, tornou-se mais efetiva (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Devido a isso, constantemente novas moléculas isoladas de plantas são testadas para o tratamento de várias patologias, como exemplos podemos citar a Artemisinina, encontrada na *Artemisia annua*, que apresenta potente atividade antimalárica; e o anticancerígeno Taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*.

Deste modo, após um período de declínio do interesse da indústria farmacêutica por substâncias de origem vegetal, devido a dificuldades técnicas e científicas, tem sido notável uma revalorização dos medicamentos fitoterápicos. Vários grupos farmacêuticos têm se dedicado no sentido de promover o aprimoramento e a produção em escala industrial dos mesmos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Tem sido observada uma ampla comercialização de produtos naturais. O comércio de plantas medicinais apresentou um crescimento de 20% nos últimos anos, em relação aos medicamentos convencionais (HOWELL *et al.*, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde na Europa Ocidental o faturamento anual com produtos naturais foi de 5 bilhões de dólares no período de 2003 a 2004. Apenas na China, as vendas destes produtos atingiram 14 bilhões de dólares em 2005 e no Brasil chegaram a 160 milhões de dólares em 2007 (WHO, 2008). Nos EUA representa aproximadamente 5 bilhões de dólares por ano, sendo o setor de maior crescimento no mercado farmacêutico da América do Norte (ASCHWANDEN, 2001).

Além disso, muitas pesquisas com plantas medicinais estão sendo conduzidas proporcionando o desenvolvimento de novos fármacos, quer sejam resultados de substâncias isoladas ou produtos análogos aos derivados de plantas (LORENZI; MATOS, 2002). Não faltam exemplos desta contribuição nos medicamentos atualmente disponíveis no mercado, das 520 novas drogas

aprovadas entre 1983 e 1994, aproximadamente 39% foram produtos naturais ou derivados de fontes naturais (FRANCISCHI, 2005). Neste sentido, a busca por substâncias ativas a partir de plantas medicinais também é demonstrada em estudos químicos e farmacológicos, expressa pelo aumento do número de trabalhos científicos publicados nesta área, assim como, pelo surgimento de periódicos específicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Na medicina tradicional mais de 20.000 espécies de plantas, que estão sendo estudadas, podem levar a descoberta de novos fármacos (GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA, 2008). Um levantamento dos registros de medicamentos fitoterápicos no Brasil encontrou 512 medicamentos com registro válido na ANVISA até 30 de março de 2008, os quais derivam de 162 espécies vegetais. Destas espécies, apenas cerca de 25% são nativas da América do Sul. Isto demonstra a necessidade de investimentos em pesquisa acerca da eficácia e segurança de plantas medicinais brasileiras e sul-americanas, assim como no desenvolvimento de medicamentos a partir das mesmas (CARVALHO *et al.*, 2008).

Por outro lado, a ampla utilização de plantas pela população mundial também oferece riscos a saúde da população. O desconhecimento do seu emprego correto por parte dos usuários e a ideia de que elas apresentam baixa toxicidade devido a sua origem natural, evidenciam a necessidade da realização de estudos científicos sobre a segurança do uso de plantas medicinais.

### 2.1.1 Riscos do uso de plantas medicinais

A crença da população de que por sua origem natural o uso de plantas medicinais não causa efeitos tóxicos é contraposta por vários estudos. De modo que mesmo plantas utilizadas popularmente com finalidade terapêutica apresentam riscos à saúde humana.

Estão descritas na literatura complicações cardíacas, hepáticas, renais, hematológicas, intestinais, entre outras, decorrentes da utilização de fitoterápicos (RIES; SAHUD, 1975; CHAN *et al.*, 1977; WOOLF *et al.*, 1994;

ABT *et al.*, 1995; KO, 1998; LAI; CHAN, 1999; SOSSAI; NASONE; CANTAMALESSA, 2007).

Alguns compostos encontrados em espécies vegetais são potencialmente tóxicos. Os alcaloides pirrolizidínicos, que estão presentes em várias plantas, são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (HIRONO; MORI; HAGA, 1978; YEONG *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 2001). O confrei (*Symphytum officinale*) empregado na medicina tradicional como cicatrizante, apresenta estes compostos tóxicos, conseqüentemente, sua utilização em preparações para uso interno está proibida pela ANVISA desde 1992 (ANVISA, 1992).

Recentemente, têm sido reportados na literatura casos de indução de hepatite tóxica pelo uso da espécie *Aloe vera* (KANAT; OZET; ATAERGIN, 2006; BOTTENBERG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010). Esta espécie é conhecida como babosa e muito utilizada popularmente como anti-inflamatória e cicatrizante, entre outras aplicações. A ANVISA suspendeu a produção de alimentos e bebidas contendo *Aloe vera* em novembro de 2011 devido à insuficiência de estudos que comprovem a segurança do seu uso oral, existindo somente registros de medicamentos fitoterápicos de uso tópico obtidos a partir da mesma (CARVALHO *et al.*, 2008; ANVISA, 2011).

Outro exemplo de substâncias tóxicas encontradas em plantas são aquelas que causam nefrotoxicidade, como o ácido aristolóquico. Este ácido está presente em espécies do gênero *Aristolochia*, no qual estão incluídas plantas utilizadas popularmente para o tratamento de gota, artrite, reumatismo e doenças inflamatórias crônicas da pele, como o cipó-mil-homens (VANHERWEGHEM *et al.*, 1993; DEBELLE *et al.*, 2002; LAPA *et al.*, 2004).

Encontram-se descritas na literatura muitas reações adversas, como alergias, distúrbios gastrointestinais, náuseas e outras, decorrentes da utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Outro ponto a ser considerado é o fato de que tais produtos naturais também podem interagir com outros medicamentos e entre si quando administrados concomitantemente (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Diversos estudos apontam para o risco de interações medicamentosas pelo uso concomitante da erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*) com outros

fármacos (HENNEY, 2000; MOORE *et al.*, 2000; DI CARLO *et al.*, 2001). Esta planta é conhecida e amplamente utilizada por sua ação antidepressiva e por isso pode interferir com outras substâncias que apresentam o mesmo efeito farmacológico.

Um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro analisou formulários sobre o uso de plantas medicinais preenchidos pela população usuária do sistema de saúde local e profissionais da área de saúde. Foi observado que as plantas são utilizadas na forma de automedicação, concomitantemente com o medicamento sintético e em muitos casos substituindo-o sem o conhecimento médico, o que aumenta o risco de interações medicamentosas (VEIGA JUNIOR, 2008).

O uso indiscriminado de plantas coloca em risco a saúde da população. Em 2009 o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX) registrou 1289 casos de intoxicação humana por plantas no Brasil, que correspondem a aproximadamente 1% do total de intoxicações. Deste percentual, dois casos evoluíram a óbito. A maioria das intoxicações foi classificada em acidentes individuais, mas existiram consequências de uso indevido, abuso, uso terapêutico, prescrição inadequada, tentativa de aborto ou suicídio, entre outras circunstâncias (SINITOX, 2011).

A prevalência de intoxicação por estes agentes é relativamente baixa quando comparada aos demais, como os medicamentos, todavia, não pode ser ignorada. Cabe ressaltar ainda, que não existe uma cultura popular em denunciar este tipo de acontecimento, resultando em subnotificação, além da dificuldade dos órgãos competentes em captar e monitorar estas informações (SINITOX, 2011; LANINI *et al.*, 2009).

É importante salientar, que o uso terapêutico de plantas pode estar relacionado a um amplo espectro de efeitos tóxicos, incluindo distúrbios metabólicos, alterações do sistema imune e endócrino, hepatotoxicidade e distúrbios comportamentais (BUTTAR; JONES, 2003; JURGENS, 2003).

Assim, os riscos e os benefícios inerentes à utilização de plantas medicinais devem ser avaliados. É de extrema importância a condução de estudos toxicológicos com estes recursos naturais, os quais devem ser baseados nos protocolos elaborados pelas agências regulamentadoras.

### 2.1.2 Regulamentação

A regulamentação de medicamentos à base de plantas é importante para garantir sua eficácia, segurança e qualidade. Ainda não estão bem estabelecidos padrões pelas autoridades reguladoras no que diz respeito ao controle de qualidade do uso popular de plantas medicinais.

Com o crescimento do uso de plantas medicinais pela população, se expandiram também as discussões sobre a segurança do seu uso. Em alguns países, como nos Estados Unidos da América (EUA), os produtos naturais são considerados como suplementos alimentares. As indústrias fabricantes destes produtos também são responsáveis pela segurança dos mesmos. Porém, quando estes produtos são utilizados como medicamentos a regulamentação é feita pela Food and Drug Administration - FDA (WU; GHANTOUS; BIRNKRANT, 2008; JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010).

Na União Europeia quando os produtos à base de plantas são utilizados com finalidade terapêutica, estas plantas são classificadas como medicamentos regulares. A comprovação da qualidade, eficácia e segurança destes produtos é exigida pela European Medicines Agency - EMEA (JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010).

No Brasil os derivados de plantas medicinais com indicação terapêutica (extratos, tinturas, óleos e outros) são classificados como medicamentos e denominados de "medicamentos fitoterápicos" (ANVISA, 2000). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pela regulamentação dos fitoterápicos e possui legislações específicas para o registro dos mesmos. Estas normas são baseadas em protocolos de agências regulamentadoras internacionais, como Organization for Economic Co-operation Development – OECD, FDA, EMEA e WHO (ANVISA, 2000, 2010a).

A função destas agências regulamentadoras na elaboração de normas para produção, comercialização de medicamentos e na fiscalização do cumprimento das mesmas é muito importante. Do mesmo modo, há necessidade de atualização constante das normas e protocolos propostos para avaliação destes produtos, conforme a evolução das técnicas científicas e o surgimento de novos estudos. A padronização dos protocolos de avaliação da

eficácia e toxicidade de plantas medicinais pelas agências regulamentadoras é extremamente necessária, especialmente para que seja garantida a segurança da população usuária destes recursos terapêuticos.

### 2.1.3 Testes toxicológicos para validação de plantas medicinais

De acordo com a ANVISA, os medicamentos fitoterápicos são aqueles “*obtidos com o emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas*” (ANVISA, 2010b).

Atualmente, o registro destes medicamentos no Brasil deve seguir a Lei nº 6.360/76, regulamentada pelos Decretos nº 79.094/77 e nº 3.091/2001, que dispõem sobre a vigilância sanitária de medicamentos, insumos farmacêuticos e outros (BRASIL, 1976, 1977, 2001). Regulamentações específicas foram elaboradas para regulamentar o registro de fitoterápicos, passando pelas RDC número nº 17/2000 e nº 48/2004, até a RDC nº 14/2010, que revogou a anterior e encontra-se em vigor até o momento (ANVISA, 2000, 2004a, 2010b).

Várias resoluções complementares específicas têm sido elaboradas nos últimos anos. Como a RE nº 88/2004 que estabelece a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia, e a instrução normativa IN nº 5/2008 que consiste na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. Outros exemplos são as resoluções RE nº 90/2004 e nº 91/2004, que são respectivamente, guias para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica e para a realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de medicamentos fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2007; ANVISA, 2009, 2010b). Além da elaboração de várias outras normas e orientações quanto ao controle de qualidade, estabilidade e registro dos mesmos.

Entretanto, a planta medicinal ou suas partes, na forma íntegra ou rasurada, secas, trituradas ou pulverizadas, não são registradas pela ANVISA como medicamentos fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2007, ANVISA, 2000). Segundo a Lei nº 5.591/1973, as plantas medicinais podem ser comercializadas no Brasil em farmácias e ervanárias, entretanto não podem

constar indicações de uso terapêutico em suas embalagens (CARVALHO *et al.*, 2007; ANVISA, 2009). A comercialização destes produtos pode ser registrada na ANVISA como alimentos, como por exemplo, as folhas de plantas rasuradas para preparação de chás. Para tanto deverão ser cumpridas algumas exigências, além da comprovação de que elas tenham um histórico de consumo alimentar, seguindo as resoluções RDC nº 267/2005, RDC nº 277/2005, RDC nº 278/2005 e RDC nº 219/006 (CARVALHO *et al.*, 2007).

De acordo com a RDC nº 14/2010, para o registro de um medicamento fitoterápico deve ser elaborado um relatório técnico com informações sobre a planta, forma de produção, bula, dados de controle de qualidade, eficácia e segurança do mesmo. Os estudos de eficácia e segurança podem ser comprovados através de pontuação em literatura técnico-científica; ensaios pré-clínicos e clínicos; tradicionalidade do uso ou presença na “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” (ANVISA, 2010b).

Os medicamentos fitoterápicos desenvolvidos a partir das espécies vegetais contidas na lista de fitoterápicos de registro simplificado, respeitando as condições ali impostas, não precisam apresentar comprovação de indicação terapêutica e da segurança do seu uso, pois se encontra na literatura uma grande quantidade de estudos sobre elas (ANVISA, 2008, 2009).

Na obtenção do registro utilizando a comprovação por meio de pontuação em literatura técnico-científica, são considerados os estudos farmacológicos e toxicológicos, em animais e humanos, publicados em literatura referenciada pela ANVISA para avaliação dos efeitos terapêuticos e dos riscos inerentes ao uso do referido medicamento (ANVISA, 2010b).

Para os medicamentos registrados pela tradicionalidade do uso deve ser comprovada a segurança e eficácia de utilização através de estudos etnofarmacológicos ou outras publicações, que serão avaliadas quanto a ausência de risco tóxico ao usuário e de grupos ou substâncias químicas tóxicas; a comprovação de uso seguro durante 20 anos ou mais, entre outras exigências. Os medicamentos registrados por este meio deverão inserir na bula e outros informes publicitários sobre o mesmo a seguinte frase: “Medicamento registrado com base no uso tradicional, não sendo recomendado o seu uso por período prolongado” (ANVISA, 2010b).

A comprovação da segurança dos medicamentos fitoterápicos através de ensaios pré-clínicos e clínicos deve seguir as normas vigentes específicas para cada tipo de pesquisa. Os ensaios pré-clínicos devem seguir, no mínimo, as orientações do “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” nº 90/2004, onde a ANVISA solicita que sejam realizados estudos de toxicidade aguda, após doses repetidas e de genotoxicidade (ANVISA, 2004b, 2010b).

De acordo com este guia, no teste de toxicidade aguda deve ser avaliada a exposição após dose única ou fracionada em um período de 24 horas. Recomenda-se a utilização de uma espécie de mamíferos em idade adulta, ambos os sexos, empregando doses suficientes para observação de possíveis efeitos adversos ou a dose máxima possível. Os animais deverão ser observados durante 14 dias após o tratamento quanto a sinais clínicos de toxicidade, posteriormente deverão ser eutanasiados e autopsiados. Caso sejam encontradas alterações macroscópicas nos órgãos, estes deverão ser analisados histologicamente (ANVISA, 2004b).

No teste de toxicidade após doses repetidas, orienta-se que devem ser utilizados pelo menos duas espécies de mamíferos (uma roedora e uma não-roedora), machos e fêmeas, em idade adulta jovem. Para os medicamentos fitoterápicos utilizados até 30 dias no ano o período de administração mínimo neste teste deverá ser de 4 semanas. Quando os fitoterápicos forem utilizados por mais de 30 dias no ano a duração deve ser de pelo menos 12 semanas. Deverão ser observadas alterações comportamentais, ganho de peso corporal, hemograma completo, análises bioquímicas e análises anatomohistopatológicas na avaliação de toxicidade após doses repetidas. Também é recomendado por este guia a realização de estudos de genotoxicidade, utilizando testes *in vitro* e *in vivo*, para os fitoterápicos utilizados por tempo prolongado ou continuamente (ANVISA, 2004b).

Dessa maneira, o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de derivados de plantas necessita de estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos, que forneçam informações sobre a sua eficácia e segurança para garantir a população uma opção terapêutica de qualidade e sem riscos a sua saúde humana.

## 2.2 *T. majus*

A *T. majus* (Figura 1) é uma espécie nativa dos Andes da América do Sul (México e Peru), pertencente à família Tropaeolaceae, foi levada à Europa pelos descobridores, sendo amplamente distribuída no mundo e cultivada nas regiões sul e sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002; PANIZZA, 1997).



**Figura 1** - Foto da espécie *T. majus* cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.

Esta espécie vegetal é conhecida popularmente como chaguinha, capuchinha, nastúrcio, chagas, mastruço, agrião-do-méxico, capuchinho, capuchina-grande, mastruço-do-peru, flor-de-sangue, flor-de-chagas, agrião-da-índia, cinco-chagas e capucine, e também possui como sinónimo o nome *Cardaminum majus* Moench (LORENZI; DE SOUSA, 2001; LORENZI; MATOS, 2002).

A *T. majus* é uma planta perene, que floresce permanentemente, cujo plantio por sementes pode ser feito em qualquer época do ano, possui fácil

adaptação aos solos e necessita apenas da incidência de luz solar por algumas horas do dia e solo úmido (PANIZZA, 1997; VAZ; JORGE, 2006; GOLZE; SOUZA, 2008).

Caracteriza-se como uma planta herbácea, aromática, de ramos rasteiros, caule mole e retorcido, folhas arredondadas, em forma de escudo, na tonalidade verde-claro, e flores isoladas, com coloração que varia de amarelo a vermelho escuro (LORENZI; MATOS, 2002; FERREIRA; VIEIRA; ZÁRETE, 2004; VAZ; JORGE, 2006). As antocianinas, corantes naturais, são os compostos apontados como responsáveis pela coloração das flores, sendo pigmentos que exibem atividade antioxidante e são de interesse para uso como aditivo alimentar e pigmento na indústria farmacêutica (WANG *et al.*, 1999; WANG; JIAO, 2000; GÁRZON; WROLSTAD, 2009).

### 2.2.1 Usos populares

Esta planta é considerada medicinal, ornamental, hortícola e melífera (SPARRE, 1972; ZANETTI *et al.*, 2003). Todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular há séculos. Relata-se que os indígenas das montanhas peruanas já a utilizavam. As folhas são consumidas pela população principalmente na forma de chá, para o tratamento de diversas doenças, sendo atribuídas a elas atividades antisséptica, antibiótica, expectorante, diurética, antiescorbútica, anti-inflamatória, entre outras (BOWN, 1995; PANIZZA, 1997; BOORHEM, 1999; LORENZI; MATOS, 2002; FERRO, 2006).

As folhas e flores frescas de *T. majus* também são utilizadas na alimentação, principalmente na forma de saladas, estimulando o apetite e favorecendo a digestão de seus consumidores, possuem um sabor amargo, picante, semelhante ao do agrião, que é característico da presença de glicosinolatos (compostos com enxofre) (PANIZZA, 1997; HEINZMANN, 2004; NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005; GARZÓN; WROLSTAD, 2009). As folhas e flores desta planta foram relatadas por um estudo como excelente fonte do carotenoide luteína, o qual parece reduzir o risco de desenvolver catarata e degeneração macular (NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005).

As folhas de *T. majus* também são uma boa fonte nutricional de

vitamina C e sais minerais (ZURLO; BRANDÃO, 1989; CASTELLANI, 1997; PANIZZA, 1997). Um estudo sobre a aceitabilidade da salada com folhas e flores de *T. majus*, realizado pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul na cidade de Aquidauana, através de questionários após a degustação, encontrou que 70% dos entrevistados consideraram a salada como saborosa e 30% como muito saborosa (GOLZE; SOUZA, 2008). No entanto, as flores são altamente perecíveis, limitando seu uso como flor de corte para fins ornamentais ou alimentares, mas o armazenamento em baixas temperaturas pode prolongar sua longevidade (SANGALLI; SCALON; CARVALHO, 2007).

Esta espécie vegetal está incluída no projeto de “Produção, processamento e comercialização de plantas medicinais, condimentares e aromáticas” da Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA), onde eles incentivam e orientam tecnicamente agricultores sobre o plantio e o cultivo desta planta para sua comercialização com fins alimentícios e como planta medicinal (VAZ; JORGE, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), também estimula o consumo e orienta quanto a produção de *T. majus* através de um “Manual de hortaliças não-convencionais”. Neste manual são consideradas como “hortaliças não-convencionais” as plantas que não fazem parte da cadeia produtiva, e que não são tão consumidas pela população, como as hortaliças convencionais (por exemplo batata, tomate, entre outras), mas que têm um importante valor nutricional e são consumidas por populações tradicionais (MAPA, 2010).

Pela beleza de suas folhas e flores, esta espécie também é muito utilizada com fins ornamentais (BREMNESS, 1993).



**Figura 2** - Foto da entrada do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com exemplares de *T. majus* utilizadas na composição do jardim.

### 2.2.2 Principais constituintes químicos

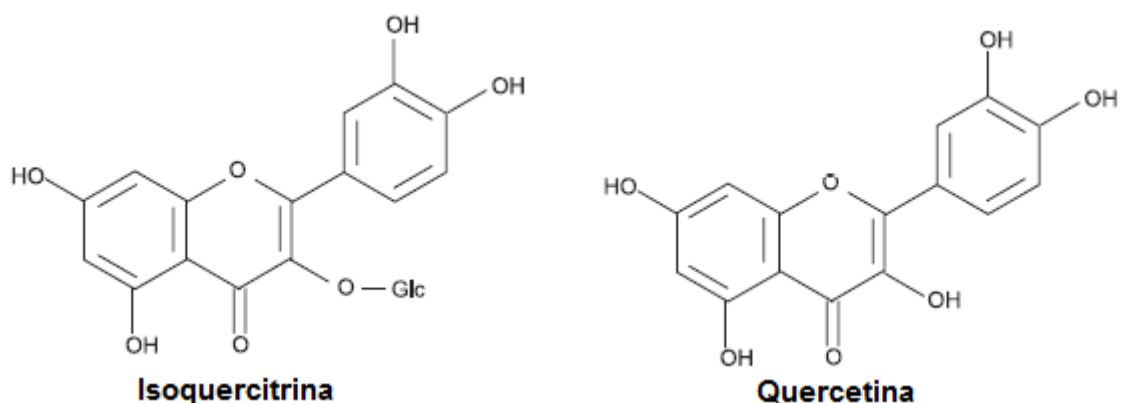
Ácidos graxos (ácido erúxico, ácido oleico e linoleico), benzil isotiocianato e flavonoides (isoquercitrina, quercetina e kaemferol) foram encontrados nas sementes e folhas de *T. majus* (DE MEDEIROS *et al.*, 2000; MIETKIEWSKA *et al.*, 2004; SANGALLI; VIEIRA; ZÁRETE, 2004; ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004). Glicosinolatos também foram previamente isolados das folhas desta planta como glucotropaeolina (benzil glicosinolato), sinalbina e triterpenos tetracíclicos (KJAER; MADSEN; MAEDA, 1978; LYKKESFELDT; MOLLER, 1993; GRIFFITHS *et al.*, 2001).

Os flavonoides estão entre os principais constituintes químicos de *T. majus*. Eles representam um grupo de compostos fenólicos complexos, com mais de 4.000 estruturas descritas, que podem ser subdivididos em flavanois, flavanonas, antocianidinas, flavonas e flavonois. Estas substâncias estão amplamente distribuídas no reino vegetal, e, com isso, presentes em várias frutas, folhas, sementes e flores que fazem parte da dieta humana (WILHELM FILHO; DA SILVA; BOVERIS, 2001; MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).

Geralmente, os flavonoides apresentam-se nos vegetais conjugados a açúcares, conhecidos como heterosídeos ou glicosídeos. A forma não-

conjugada dos flavonoides à molécula de açúcar (ou forma livre) pode ser denominada de forma aglicona ou genina e estas estruturas diferentes podem afetar a absorção, o metabolismo e a biodisponibilidade dos flavonoides (ZUANAZZI, 1999; MUSCHIETTI; MARTINO, 2009). São conhecidas numerosas atividades biológicas desta classe de substâncias: anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombica, antiviral e anticarcinogênica, através de estudos experimentais (MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; WILHELM FILHO; DA SILVA; BOVERIS, 2001; CHANG *et al.*, 2005; MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).

Como já foi descrito anteriormente, os flavonoides identificados em *T. majus* são: kaemferol ou canferol; isoquercitrosídeo, quercetina ou quercetol; e quercetol 3-O-glicosídeo ou isoquercitrina, os quais pertencem ao subgrupo dos flavonóis e estão relacionados a várias atividades farmacológicas (WILHELM FILHO; DA SILVA; BOVERIS, 2001; CHANG *et al.* 2005; MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).



**Figura 3** – Estruturas químicas da isoquercitrina e da quercetina (Adaptado de Lee *et al.*, 2008).

A quercetina é o flavonoide mais abundante na dieta por sua ampla distribuição nos vegetais, e estudos relatam atividade antioxidante (DUGAS JUNIOR *et al.*, 2000; MARTINEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002; BOADI; IYERE; ADUNYAH, 2003; TAPIA *et al.*, 2004; FIRUZI *et al.*, 2005), antiproliferativa (MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI, 1994; CHOWDHURY *et al.*, 2005), e anti-inflamatória (CHANG *et al.*, 1994; RASO *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004;

UEDA; YAMAZAKI; YAMAZAKI, 2004), em diversos modelos experimentais.

A isoquercitrina é o derivado 3-glicosilado da quercetina, que pode ser hidrolisado por bactérias intestinais formando ácidos fenólicos e a própria quercetina, que podem ser absorvidos e exercer atividades biológicas (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009; CHANG *et al.*, 2005). Atividade antioxidante, captadora de espécies reativas de oxigênio, também foi citada para a isoquercitrina por Dugas Junior *et al.* (2000), a qual foi menos ativa que sua aglicona. Atividades antioxidantes *in vitro* e anticancerígenas por diversos mecanismos de ação têm sido relatadas nos últimos anos para a isoquercitrina (YOKOHIRA *et al.*, 2008; AMADO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; AMADO *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011).

Ao Kaemferol foram atribuídas propriedades protetoras da mucosa gástrica contra uma variedade de compostos ulcerogênicos (GOEL; MAITI; TAVARES, 1996) e inibição moderada da enzima ciclooxigenase-1 (COX-1) que é uma das enzimas responsáveis pela formação de mediadores da resposta inflamatória (KIM *et al.*, 2004). Um estudo reportou que a liberação do fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  e a expressão de interleucina IL-1b pelos macrófagos, que ocorrem na inflamação, foram inibidas em baixas concentrações de kaemferol (KOWALSKI *et al.*, 2005). Estes indícios sugerem que o kaemferol, assim como outros flavonoides, apresenta um efeito anti-inflamatório com ausência dos efeitos colaterais ulcerogênicos de muitos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009; DI CARLO *et al.*, 1999).

Outro grupo importante de substâncias encontradas nesta planta são os glicosinolatos ou benzilglicosinolatos,  $\beta$  - D - S - glicosídeos aniônicos, encontrados em 16 famílias de espécies de plantas dicotiledôneas, incluindo as espécies comestíveis. Em sua forma natural, os glicosinolatos possuem baixa atividade biológica, mas devido a sua coexistência com a mironase nas folhas, em diferentes compartimentos da planta, após o dano tecidual esta enzima hidrolisa-os a compostos bioativos, isotiocianatos (HEINZMANN, 2004). Estes podem ser tóxicos contra fungos, bactérias, insetos e nematoides contidos na planta e são relacionados principalmente com atividade antimicrobiana (HEINZMANN, 2004; WIELANEK; URBANEK, 2006).

### 2.2.3 Estudos farmacológicos e toxicológicos

Diversos estudos farmacológicos experimentais foram conduzidos com *T. majus*. Binet (1964) demonstrou que o benzil isotiocianato apresenta ação antibacteriana em infecções do trato urinário. A mesma atividade foi relatada por Goos, Albrecht e Schneider (2006) com uma preparação comercial (Angocin Anti-Infekt N) que inclui *T. majus* em sua composição. A atividade antibacteriana das frações hexânica e clorofórmica do extrato etanólico das folhas de *T. majus* sobre vários microorganismos também foi reportada por Zanetti *et al.* (2003).

Foi demonstrado que o benzil glicosinolato possui atividade anticancerígena *in vitro*, contra uma variedade de linhagens de células tumorais humanas (PINTÃO *et al.*, 1995). Picciarelli *et al.* (1984) e Picciarelli e Alpi (1987) descreveram que o triterpeno curcubitacina possui atividade antineoplásica e antioxidante.

De Medeiros *et al.* (2000) avaliaram a atividade antitrombínica de vários extratos de plantas, preparados com cloreto de metileno e metanol, entre elas a *T. majus*, que foi uma das que apresentaram maior atividade. Este efeito antitrombínico da *T. majus* também foi reportado por Santo *et al.* (2007), que apontaram os flavonoides, presentes nas folhas e flores da planta, como responsáveis por esta atividade.

Recentemente, Gasparotto Junior *et al.* (2009; 2011a) confirmaram a atividade diurética aguda e prolongada (por sete dias) de *T. majus*, e sugerem que esta atividade pode envolver a ação de prostaglandinas. O EHTM apresentou atividade hipotensora, anti-hipertensiva e inibidora da ECA. Estas atividades farmacológicas foram associadas com os altos níveis de isoquercitrina (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2011b). Também foi reportada a atividade anti-inflamatória do EHTM, onde ocorreu uma inibição da migração leucocitária em ratos nas doses de 75 e 300 mg/kg (LOURENÇO *et al.*, 2011).

Na literatura encontram-se apenas dois estudos toxicológicos sobre o uso de *T. majus*, e ambos avaliaram somente a toxicidade aguda (ZANETTI *et al.*, 2003; GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2009).

Mesmo com diversos trabalhos publicados sobre atividades biológicas desta planta e de seus constituintes químicos ativos, existem poucos estudos sobre a segurança do uso de *T. majus*, e até o momento, não há dados sobre os efeitos do seu uso prolongado. Isto demonstra a necessidade da condução de mais estudos toxicológicos com esta espécie vegetal.

### 3 JUSTIFICATIVA

A espécie *T. majus* apresenta-se como uma importante planta medicinal, sendo consumida e utilizada pela população principalmente na forma de chá de suas folhas e “*in natura*” na alimentação. Além disto, seu consumo tem sido incentivado no Brasil por alguns órgãos governamentais, como o MAPA e a EMBRAPA.

Estudos farmacológicos pré-clínicos demonstraram que o EHTM apresentou atividade anti-inflamatória (LOURENÇO *et al.*, 2011), diurética (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2009; 2011a) e anti-hipertensiva em ratos (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2011b). A atividade diurética da infusão com as folhas de *T. majus* também foi avaliada. No entanto, o infuso não aumentou a excreção urinária, enquanto o EHTM aumentou o volume urinário e a excreção de sódio (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2009). Estes trabalhos confirmam algumas indicações terapêuticas populares do uso desta planta e apontam o EHTM como uma opção terapêutica eficaz. No entanto, não há dados na literatura sobre os efeitos do uso prolongado do EHTM.

Em geral, os usuários de plantas medicinais acreditam que, por serem de origem natural, as plantas não representam risco algum a saúde. No entanto, dependendo do período da vida em que o indivíduo é exposto e do tempo de exposição, podem ocorrer sérios prejuízos à saúde humana.

É importante ressaltar que o uso de plantas medicinais pode causar efeitos tóxicos, como carcinogenicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, de forma assintomática, com efeitos que se instalam em longo prazo, além de reações adversas imediatas, facilmente detectáveis e correlacionadas com seu uso, como diarreia e dermatites (LAPA *et al.*, 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Contudo, é de extrema importância que estudos sobre o uso de plantas medicinais sejam conduzidos de forma mais abrangente, a fim de contribuir cientificamente para a validação deste tipo de medicina tradicional. Tendo em vista o amplo uso desta planta medicinal, seus efeitos farmacológicos e consumo alimentar, o presente trabalho pretende avaliar e fornecer informações importantes sobre os efeitos do seu uso prolongado.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a possível toxicidade oral pré-clínica após doses repetidas durante 28 dias do EHTM.

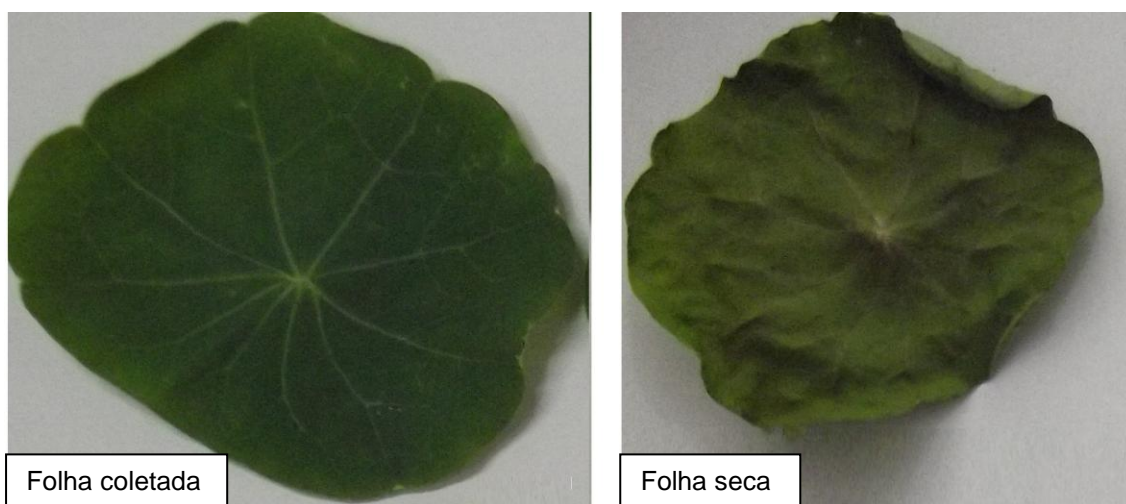
### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tratamento com doses repetidas por via oral do EHTM em ratos, machos e fêmeas, sobre o ganho de peso corporal e no peso relativo de órgãos.
- Avaliar possíveis alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos nos animais após os tratamentos.
- Avaliar possíveis alterações na histopatologia de órgãos.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *T. majus* foram coletadas no período de abril a outubro de 2010, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR), localizado na cidade de Umuarama - PR. A espécie lá cultivada foi identificada pela Dra. Mariza Barion Romagnolo (Departamento de botânica, UEM) e uma exsicata do exemplar está catalogada sob o número 2230, no herbário oficial da Universidade Paranaense (HEUP), campus de Paranavaí-PR.



**Figura 4** – Foto ilustrativa de uma folha de *T. majus* logo após a coleta, e da mesma folha após a secagem.

### 5.2 PREPARAÇÃO DO EHTM

O material coletado foi seco em estufas com circulação forçada de ar à 37°C por cinco dias. Após a secagem, o material foi triturado e armazenado em sacos de papel. Em seguida, os extratos hidroetanólicos foram preparados por maceração à temperatura ambiente por sete dias, utilizando etanol 90% como solvente. Os extratos hidroetanólicos obtidos foram filtrados e concentrados à pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura não excedendo 55°C. Posteriormente, o extrato foi liofilizado obtendo um rendimento de aproximadamente 14%. O EHTM obtido foi diluído em água destilada apenas antes do uso nos experimentos.



**Figura 5** – Fotos ilustrativas dos processos de trituração, maceração e filtração durante a preparação de extratos vegetais no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.



**Figura 6** – Foto do rotaevaporador, aparelho utilizado para evaporação do solvente sob pressão reduzida. Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.



**Figura 7** – Foto do aparelho utilizado para liofilizar o extrato. Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.

### 5.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos e fêmeas, adultos jovens ( $\pm 90$  dias) criados no biotério do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em salas de manutenção, com temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), obedecendo a uma fase claro/escuro de 12 horas e recebendo água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo número 487) da UFPR.

### 5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL APÓS DOSES REPETIDAS

No presente estudo determinamos as doses utilizadas a partir da menor dose (75 mg/kg) em que o EHTM apresentou atividade farmacológica (antiinflamatória) em ratos (LOURENÇO *et al.*, 2011). A partir desta dose calculamos a maior dose, aplicando um fator de segurança de 10 vezes a dose

terapêutica, correspondente a 750 mg/kg, e estabelecemos uma dose intermediária de 375 mg/kg.

Para determinação da toxicidade oral após doses repetidas durante 28 dias do EHTM os animais foram divididos em 4 grupos por sexo, com 8 a 10 animais cada um. Para cada grupo foram administradas por via oral (gavage), uma vez ao dia, diferentes doses de EHTM ou veículo por 28 dias, conforme descrito a seguir:

- Grupo 1: água destilada 10 mL/kg;
- Grupo 2: EHTM 75 mg/kg;
- Grupo 3: EHTM 375 mg/kg;
- Grupo 4: EHTM 750 mg/kg.

Os animais foram pesados diariamente e sinais clínicos de toxicidade (como diarreia, piloereção, tremores, salivação e convulsões) foram observados durante os experimentos. Um dia após o término dos tratamentos, os animais foram anestesiados por inalação de halotano em cubas de vidro fechadas e eutanasiados por decapitação. Aproximadamente 12 horas antes da eutanásia os animais foram deixados em jejum de ração, com livre acesso a água. Primeiramente, sob anestesia, foi coletado sangue do plexo ocular para análise dos parâmetros hematológicos. Após a decapitação foi procedida a coleta de sangue para análise dos parâmetros bioquímicos. Posteriormente, realizou-se a remoção de órgãos para determinação do peso relativo e análise histopatológica (OECD, 1995; ANVISA 2004b).

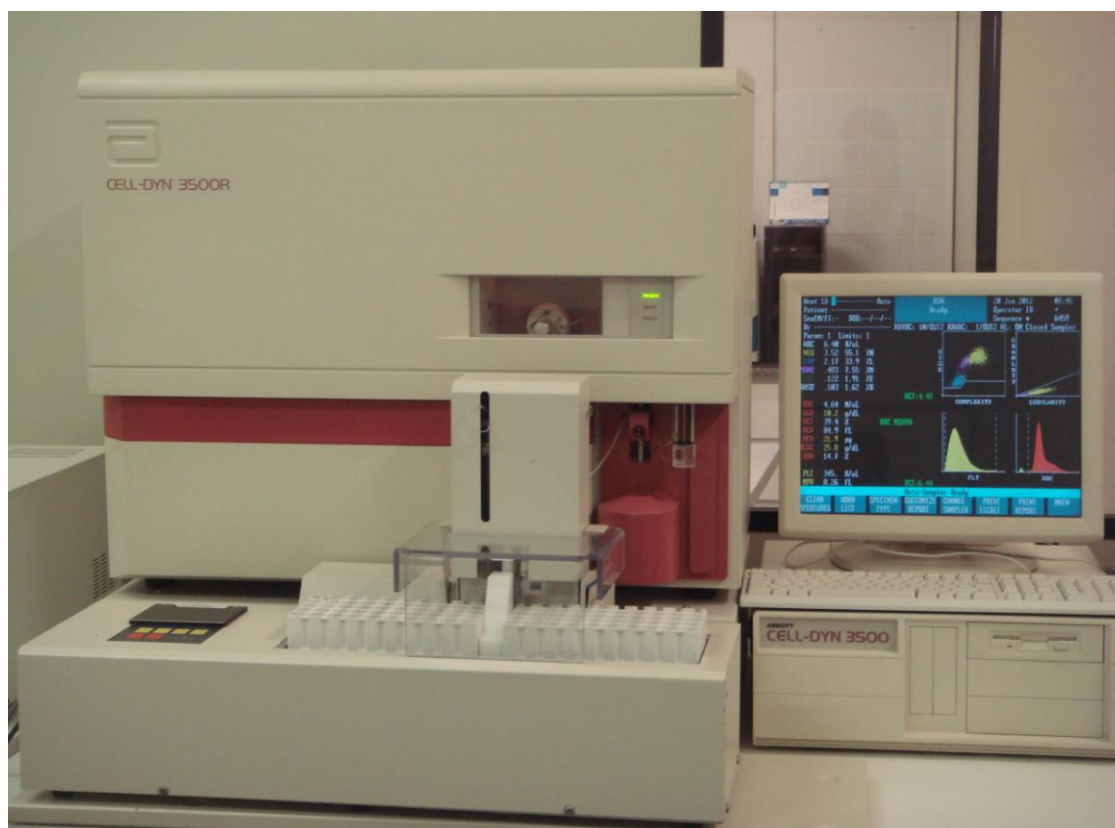
#### 5.4.1 Peso relativo dos órgãos

Após a eutanásia, fígado, rins e baço foram removidos, cuidadosamente dissecados e pesados em balança analítica. Para os rins foi utilizada a média entre o lado direito e o esquerdo. O peso de cada órgão foi multiplicado por 100 e dividido pelo peso corporal do animal antes do sacrifício para obtenção do peso relativo dos órgãos (%).

#### 5.4.2 Análises hematológicas

Uma alíquota de aproximadamente 1 mL de sangue do plexo ocular foi coletada com auxílio de capilares em tubos de ensaio com anticoagulante K2-EDTA (BD Vacutainer®). As amostras foram devidamente homogeneizadas e armazenadas em geladeira (cerca de 4°C) até o processamento.

Foram determinados em analisador hematológico automatizado (Figura 7, Abbott Cell Dyn 3500, Abbott Diagnostics, USA): o número total de eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ ), leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ ) e plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ ); contagem diferencial de leucócitos (%); a concentração de hemoglobina (g/dl); determinação do hematócrito (%), e dos índices hematimétricos, tais como: volume corpuscular médio (VCM, fl), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, %).



**Figura 8** – Foto do analisador hematológico automatizado (Abbott Cell Dyn 3500), aparelho utilizado para a realização das análises hematológicas. Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.

### 5.4.3 Análises bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas 3 a 4 mL de sangue total foram coletados em um tubo de ensaio contendo gel separador com ativador de coágulo (BD SST II® Advance® BD) e centrifugados em até 2 horas para obtenção do soro. As amostras de soro foram armazenadas em freezer (aproximadamente -20°C), descongeladas e processadas em um analisador bioquímico automatizado (Figura 8, Selectra E, Vital Scientific, Holanda).

Os parâmetros bioquímicos analisados para avaliar função renal foram a ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), sódio (mEq/L) e potássio (mEq/L). Os íons foram determinados utilizando sistema semiautomatizado (Figura 9, MH-Lab Ise – Íon Seletivo).

A fim de avaliar efeitos no fígado foram analisados: proteínas totais (g/dL), albumina (g/dL), globulinas (g/dL), colesterol total (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), fosfatase alcalina (U/L), bilirrubina total (mg/dL), bilirrubina direta (mg/dL), bilirrubina indireta (mg/dL), aspartato amino transferase (AST, U/L) e alanina amino transferase (ALT, U/L). Amilase (U/L) e glicose (mg/dL) também foram determinadas para avaliar função pancreática.



**Figura 9** – Foto do analisador bioquímico automatizado (Selectra E), aparelho utilizado para a realização das análises bioquímicas. Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.



**Figura 10** – Foto do sistema semiautomatizado (MH-Lab Ise – Íon Seletivo), que foi utilizado para determinação dos íons sódio e potássio. Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Paranaense (UNIPAR), unidade universitária de Umuarama.

#### 5.4.4 Histopatologia

Fragmentos de fígado, rins e baço dos machos foram armazenados em formol tamponado 10% para análise histopatológica. Estas amostras de tecidos foram desidratadas em etanol, clareadas em xilol e emblocadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (5  $\mu\text{m}$ ). A partir destes cortes confeccionaram-se lâminas que foram coradas com Hematoxilina e Eosina (Protocolo descrito no anexo 1).

As amostras foram analisadas por microscopia óptica quanto à estrutura geral dos órgãos, alterações degenerativas, evidências de necrose e sinais de inflamação.

#### 5.4.5 Análises estatísticas

As variáveis foram analisadas primeiramente quanto a distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias. Quando as variáveis apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes foram submetidas

a análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Bonferroni.

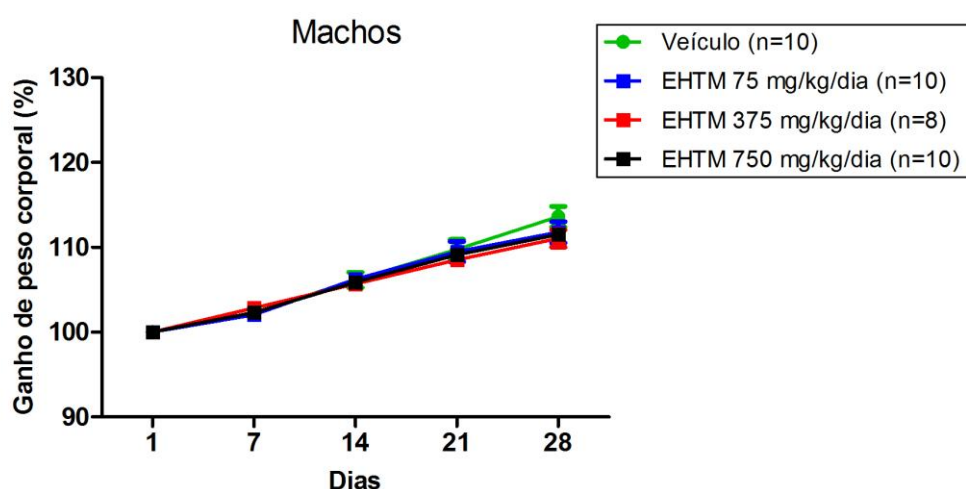
Quando as variáveis não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação entre os grupos.

Foi considerado como nível de significância estatística 5% ( $p < 0,05$ ). Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi utilizado o programa Graphpad Prism<sup>®</sup> versão 5.0. Todos os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).

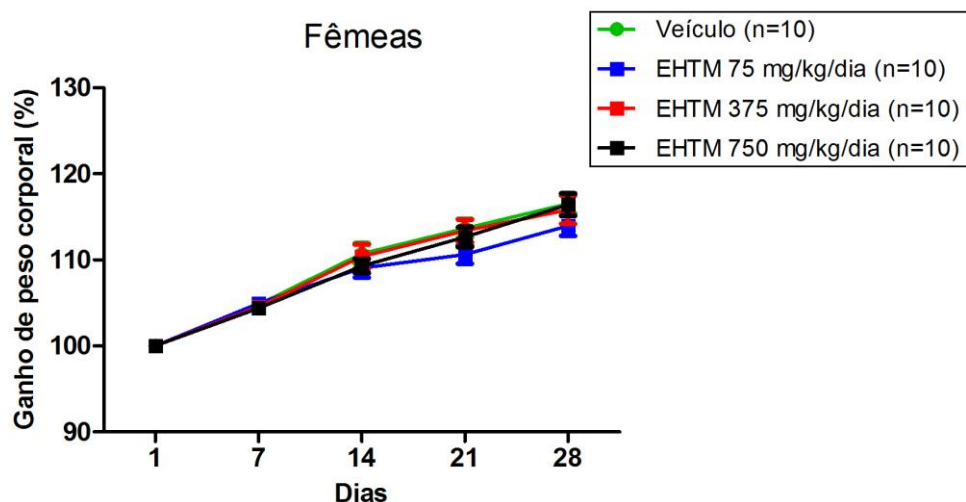
## 6 RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL APÓS DOSES REPETIDAS

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade ou morte nos animais durante os 28 dias de tratamento com o EHTM nas doses de 75, 375 ou 750 mg/kg ou veículo. O ganho de peso corporal (%) dos animais durante o período de tratamentos foi semelhante entre os animais tratados com EHTM ou veículo, representado no gráfico 1 para os machos e gráfico 2 para as fêmeas.



**Gráfico 1** - Ganho de peso corporal (%) em ratos Wistar durante o tratamento por via oral com o EHTM ou veículo por 28 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  E. P. M.



**Gráfico 2** - Ganho de peso corporal (%) em ratos Wistar durante o tratamento por via oral com o EHTM ou veículo por 28 dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  E. P. M.

### 6.1.1 Peso relativo dos órgãos

Os valores do peso relativo (%) de fígado, rins e baço dos animais estão apresentados na tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no peso relativo destes órgãos nos animais de ambos os sexos tratados com o EHTM ou veículo.

**Tabela 1** - Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre o peso relativo (%) dos órgãos de ratos Wistar.

	EHTM (mg/kg/dia)			
	Veículo	75	375	750
Machos	(n= 10)	(n= 10)	(n= 7)	(n= 10)
Peso corporal (g)*	398 ± 7,50	394 ± 9,13	393 ± 7,47	392 ± 7,38
Fígado (%)	2,88 ± 0,11	2,76 ± 0,05	2,64 ± 0,07	2,97 ± 0,07
Rins (%)	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Baço (%)	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,03
Fêmeas	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)
Peso corporal (g)*	264 ± 5,55	263 ± 6,22	267 ± 3,64	264 ± 5,55
Fígado (%)	3,42 ± 0,09	3,62 ± 0,14	3,40 ± 0,12	3,27 ± 0,10
Rins (%)	0,33 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Baço (%)	0,40 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,35 ± 0,01

Valores expressos como a média ± E.P.M. ANOVA/Bonferroni: Peso corporal, peso relativo do fígado e rins dos machos. Peso relativo dos rins das fêmeas. Kruskal-Wallis/Dunn: Peso relativo do baço dos machos. Peso corporal e peso relativo do fígado e baço das fêmeas.

\*Média do peso corporal dos animais no dia da eutanásia.

### 6.1.2 Análises hematológicas

Nas análises hematológicas avaliou-se a série eritrocitária, série leucocitária e o número de plaquetas em ratos machos e fêmeas, os resultados estão apresentados nas tabelas 2 e 3 respectivamente. Os parâmetros hematológicos analisados não foram alterados pelo tratamento com o EHTM nos animais quando comparados aos animais tratados apenas com veículo.

**Tabela 2** - Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros hematológicos de ratos Wistar.

	EHTM (mg/kg/dia)			
	Veículo (n= 7)	75 (n=7)	375 (n=6)	750 (n=8)
Hemácias ( $10^6$ /mL)	8,24 ± 0,10	8,41 ± 0,14	8,46 ± 0,13	8,48 ± 0,16
Hemoglobina (g/mL)	15,1 ± 0,23	16,1 ± 0,28	15,8 ± 0,24	15,6 ± 0,25
Hematócrito (%)	46,4 ± 1,74	49,0 ± 1,45	47,3 ± 1,13	46,3 ± 1,57
VCM (fl)	56,5 ± 2,57	58,3 ± 1,85	56,0 ± 1,65	54,6 ± 1,74
HCM (pg)	18,0 ± 0,32	19,1 ± 0,30	18,6 ± 0,06	18,4 ± 0,28
CHCM (%)	32,3 ± 1,48	33,1 ± 1,19	33,4 ± 0,88	34,0 ± 1,14
Plaquetas ( $10^3$ /mm <sup>3</sup> )	638 ± 28,5	677 ± 48,4	667 ± 39,6	758 ± 54,7
Leucócitos ( $10^3$ /mm <sup>3</sup> )	5,51 ± 0,84	4,84 ± 0,47	5,71 ± 0,76	5,30 ± 0,49
Neutrófilos (%)	23,4 ± 3,37	21,7 ± 1,36	23,5 ± 1,82	25,4 ± 2,60
Linfócitos (%)	70,6 ± 3,83	72,3 ± 1,60	68,8 ± 1,30	66,8 ± 1,95
Monócitos (%)	4,71 ± 0,99	5,00 ± 1,46	6,17 ± 0,95	6,75 ± 1,67
Eosinófilos (%)	1,29 ± 0,52	0,86 ± 0,26	1,50 ± 0,43	1,13 ± 0,30

Valores expressos como a média ± E.P.M. ANOVA/Bonferroni: hemácias, hemoglobina, HCM, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Kruskal-Wallis/Dunn: hematócrito, VCM, CHCM e linfócitos.

**Tabela 3** - Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros hematológicos de ratas Wistar.

	EHTM (mg/kg/dia)			
	Veículo (n= 10)	75 (n=10)	375 (n=10)	750 (n=10)
Hemácias ( $10^6/\text{mL}$ )	7,39 ± 0,22	7,51 ± 0,12	7,29 ± 0,09	7,55 ± 0,12
Hemoglobina (g/mL)	14,3 ± 0,34	14,3 ± 0,18	14,7 ± 0,13	14,9 ± 0,17
Hematócrito (%)	41,5 ± 0,74	40,8 ± 0,38	41,9 ± 0,56	42,7 ± 0,59
VCM (fl)	56,5 ± 1,17	54,4 ± 0,84	57,6 ± 0,98	56,7 ± 1,01
HCM (pg)	19,4 ± 0,28	19,1 ± 0,37	20,1 ± 0,28	19,7 ± 0,30
CHCM (%)	34,4 ± 0,35	35,1 ± 0,22	35,0 ± 0,19	34,8 ± 0,17
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	826 ± 36,4	872 ± 19,8	905 ± 54,8	833 ± 40,0
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	4,07 ± 0,41	4,76 ± 0,49	4,57 ± 0,75	3,94 ± 0,39
Neutrófilos (%)	25,7 ± 2,76	19,2 ± 2,19	30,0 ± 3,17	23,7 ± 1,83
Linfócitos (%)	67,8 ± 2,40	74,6 ± 1,84	64,3 ± 3,48	69,3 ± 2,33
Monócitos (%)	5,90 ± 0,96	5,50 ± 1,04	4,90 ± 0,82	6,30 ± 1,02
Eosinófilos (%)	0,60 ± 0,31	0,70 ± 0,26	0,70 ± 0,34	0,60 ± 0,27

Valores expressos como a média ± E.P.M. ANOVA/Bonferroni: hematócrito, VCM, HCM, leucócitos, neutrófilos e linfócitos. Kruskal-Wallis/Dunn: hemácias, hemoglobina, CHCM, plaquetas, monócitos e eosinófilos.

### 6.1.3 Análises bioquímicas

Os resultados das análises bioquímicas determinadas para avaliar função pancreática, renal e hepática dos animais estão apresentados nas tabelas 4 e 5, para machos e fêmeas respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa nestes parâmetros entre os animais tratados com

EHTM quando comparados aos animais do mesmo sexo que receberam apenas veículo.

**Tabela 4** - Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros bioquímicos séricos de ratos Wistar.

	EHTM (mg/kg/dia)			
	Veículo (n= 10)	75 (n=10)	375 (n=7)	750 (n=10)
Glicose (mg/dL)	114 ± 12,5	114 ± 5,0	110 ± 8,6	120 ± 13,4
Amilase (U/L)	504 ± 32,7	484 ± 24,2	461 ± 34,1	491 ± 25,6
Ureia (mg/dL)	38,2 ± 1,74	41,8 ± 2,27	40,2 ± 2,74	42,3 ± 1,80
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,02
Ácido úrico (mg/dL)	0,71 ± 0,11	0,68 ± 0,08	0,70 ± 0,17	0,62 ± 0,09
Potássio (mEq/L)	5,36 ± 0,23	5,34 ± 0,14	5,60 ± 0,46	4,80 ± 0,10
Sódio (mEq/L)	141 ± 1,17	141 ± 1,48	141 ± 1,91	141 ± 0,67
Proteínas totais (g/dL)	6,49 ± 0,17	6,63 ± 0,19	6,57 ± 0,26	6,58 ± 0,15
Albumina (g/dL)	3,55 ± 0,07	3,64 ± 0,08	3,60 ± 0,09	3,61 ± 0,06
Globulinas (g/dL)	2,94 ± 0,16	2,99 ± 0,17	2,97 ± 0,18	2,97 ± 0,15
Fosfatase alcalina (U/L)	82,9 ± 11,8	87,2 ± 6,1	82,7 ± 4,7	76,6 ± 6,1
Triglicerídeos (mg/dL)	72,3 ± 9,79	57,2 ± 3,28	67,4 ± 10,44	56,7 ± 7,87
Bilirrubina total (mg/dL)	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,29 ± 0,05	0,21 ± 0,01
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,16 ± 0,01
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
AST (U/L)	175 ± 25,4	158 ± 20,5	171 ± 28,1	135 ± 12,5
ALT (U/L)	57,9 ± 3,79	60,0 ± 4,75	60,1 ± 6,17	58,5 ± 4,04
Colesterol total (mg/dL)	72,3 ± 3,78	74,8 ± 1,42	73,7 ± 2,82	60,6 ± 2,17
Colesterol HDL (mg/dL)	47,7 ± 2,12	49,9 ± 1,13	47,9 ± 2,49	41,9 ± 1,48

Valores expressos como a média ± E.P.M. ANOVA/Bonferroni: amilase, ureia, creatinina, sódio, bilirrubina indireta, ALT e colesterol HDL. Kruskal-Wallis/Dunn: glicose, ácido úrico, potássio, proteínas totais, albumina, globulinas, fosfatase alcalina, triglicerídeos, bilirrubina total, bilirrubina direta, AST e colesterol total.

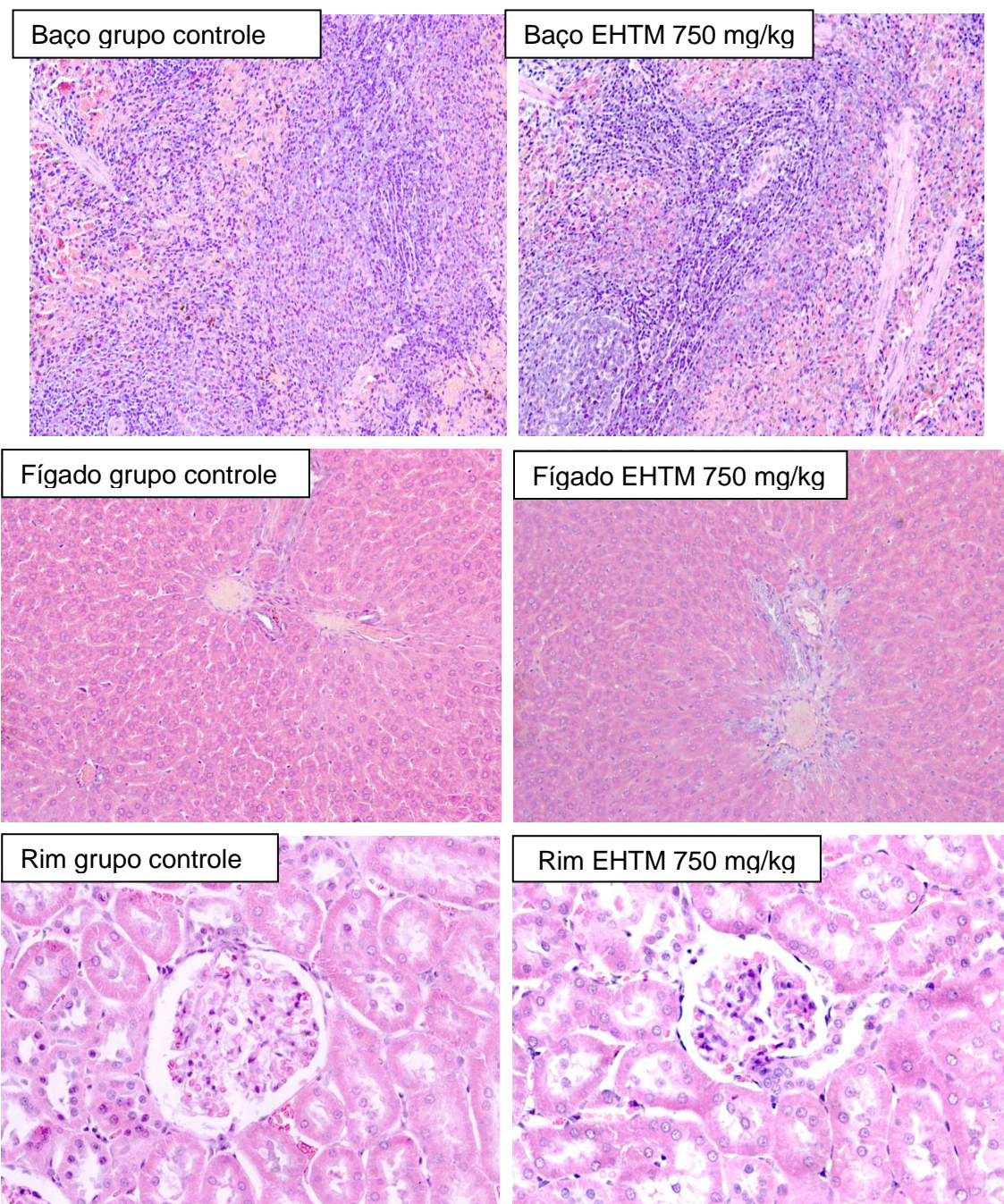
**Tabela 5** - Efeitos do tratamento após doses repetidas durante 28 dias com o EHTM sobre parâmetros bioquímicos séricos de ratas Wistar.

	EHTM (mg/kg/dia)			
	Veículo (n= 10)	75 (n=10)	375 (n=10)	750 (n=10)
Glicose (mg/dL)	111 ± 7,13	121 ± 9,34	105 ± 5,18	118 ± 7,96
Amilase (U/L)	582 ± 26,3	550 ± 19,8	538 ± 29,2	584 ± 27,3
Ureia (mg/dL)	46,5 ± 2,60	41,2 ± 2,41	45,0 ± 3,98	42,5 ± 2,71
Creatinina (mg/dL)	0,61 ± 0,06	0,56 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,63 ± 0,01
Ácido úrico (mg/dL)	1,37 ± 0,25	1,16 ± 0,11	1,32 ± 0,09	1,19 ± 0,05
Potássio (mEq/L)	5,59 ± 0,20	5,55 ± 0,25	5,25 ± 0,23	4,91 ± 0,11
Sódio (mEq/L)	147 ± 2,25	144 ± 1,16	145 ± 1,72	143 ± 1,45
Proteínas totais (g/dL)	5,86 ± 0,20	6,13 ± 0,19	6,54 ± 0,16	6,25 ± 0,14
Albumina (g/dL)	3,85 ± 0,05	3,96 ± 0,07	4,08 ± 0,06	4,05 ± 0,06
Globulinas (g/dL)	2,01 ± 0,17	2,17 ± 0,14	2,46 ± 0,13	2,20 ± 0,10
Fosfatase alcalina (U/L)	87,6 ± 11,7	97,7 ± 9,8	88,2 ± 7,9	97,0 ± 12,3
Triglicerídeos (mg/dL)	51,4 ± 4,49	51,2 ± 4,42	45,9 ± 5,56	47,9 ± 3,92
Bilirrubina total (mg/dL)	0,24 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,01
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,01
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
AST (U/L)	144 ± 20,4	138 ± 9,64	121 ± 6,53	127 ± 5,09
ALT (U/L)	46,8 ± 3,84	44,9 ± 1,51	47,2 ± 3,29	45,4 ± 2,88
Colesterol total (mg/dL)	63,8 ± 3,01	64,9 ± 4,15	66,7 ± 2,24	62,4 ± 2,36
Colesterol HDL (mg/dL)	37,0 ± 1,55	39,7 ± 2,16	42,4 ± 1,05	38,9 ± 1,41

Valores expressos como a média ± E.P.M. ANOVA/Bonferroni: glicose, amilase, ureia, potássio, proteínas totais, albumina, globulinas, fosfatase alcalina, ALT, colesterol total e colesterol HDL. Kruskal-Wallis/Dunn: creatinina, ácido úrico, sódio, triglicerídeos, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e AST.

#### 6.1.4 Histopatologia

Foram analisados fragmentos de fígado, rins e baço dos ratos machos. Não foram encontradas alterações histopatológicas relacionadas ao tratamento com EHTM em nenhum dos órgãos analisados. Os tecidos apresentaram-se morfológicamente normais e semelhantes entre os animais tratados com EHTM ou veículo (figura 11).



**Figura 11** – Fotomicrografias de lâminas histopatológicas de baço, fígado e rim de ratos Wistar representativos dos grupos tratados com veículo (grupo controle) ou com a maior dose de EHTM (750 mg/kg). Estão representados, de cima para baixo, baço (200x), fígado (200x) e rim (400x) do grupo controle (lado direito), e os mesmos órgãos do grupo EHTM 750 mg/kg (lado esquerdo). Coloração Hematoxilina e Eosina.

## 7 DISCUSSÃO

Os riscos do uso indevido de plantas medicinais tem conduzido a um aumento significativo na avaliação da segurança destes recursos terapêuticos. Desta forma pode se observar um aumento no número de trabalhos publicados na área de toxicologia avaliando plantas medicinais. Estudos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica vêm sendo realizados com diferentes produtos naturais. Neste sentido, várias pesquisas com protocolos semelhantes aos que foram utilizados neste trabalho têm sido desenvolvidos com extratos de plantas utilizadas na medicina tradicional (KONAN *et al.*, 2007; BOEIRA *et al.*, 2010; TAHRAOUI; ISRAILI; LYOUSSEI, 2010; KUNANUSORN *et al.*, 2011).

Até o momento, apenas dois estudos de toxicidade aguda foram conduzidos para avaliação da segurança do uso de *T. majus*. Em um destes estudos toxicológicos foram utilizados camundongos, que receberam por via oral doses únicas de até 5000 mg/kg de extratos aquosos ou etanólicos de *T. majus* e não apresentaram sinais de toxicidade (ZANETTI *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo, no qual não foram observados sinais de toxicidade aguda em ratos, tanto machos quanto fêmeas, após a administração do EHTM na dose de 5000 mg/kg por via oral e nas doses de 1000 e 3000 mg/kg por via intraperitoneal (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2009). A ausência de sinais de toxicidade nestes estudos sugere uma baixa toxicidade relacionada ao uso agudo de *T. majus*. Entretanto, a investigação de toxicidade subcrônica é importante para avaliar a segurança do seu uso prolongado. Além do que entre os usos terapêuticos de *T. majus* estão inclusas doenças que exigem tratamento contínuo ou por longos períodos de tempo.

No presente trabalho, após o tratamento durante 28 dias com diferentes doses do extrato hidroetanólico de *T. majus* não foram observadas alterações no ganho de peso corporal e no peso relativo do fígado, baço e rins dos animais. As análises histopatológicas destes órgãos em ratos machos também evidenciaram que eles não foram afetados pelo tratamento com o extrato. Os parâmetros bioquímicos séricos utilizados para avaliar a função hepática, renal e pancreática também não foram alterados pelo tratamento com

*T. majus*. Em conjunto, estes resultados demonstram que, nas condições experimentais e doses utilizadas, o extrato hidroetanólico de *T. majus* não induziu toxicidade nestes órgãos em ratos Wistar.

Alterações no peso relativo dos órgãos analisados são indicativos de toxicidade sistêmica. O fígado é um órgão que exerce funções de metabolização, síntese e excreção, que possui grande irrigação sanguínea. Os rins constituem os principais órgãos de depuração de substâncias, que têm um grande fluxo sanguíneo, além de possuir uma ampla superfície de contato com os compostos no interior dos túbulos renais, e o baço é um importante órgão imunológico. Devido a isso estes órgãos são sensíveis à detecção de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos de substâncias.

A ausência de efeitos tóxicos renais em ratos também foi reportada por Gasparotto Junior *et al.* (2009, 2011a) onde, através dos níveis de ureia, creatinina, sódio e potássio plasmáticos, não foram detectadas alterações pelo tratamento com o extrato hidroetanólico, com a fração semipurificada deste extrato ou com um flavonoide presente nesta planta, a isoquercitrina.

Através dos parâmetros hematológicos avaliados, eritrograma e leucograma completos, podemos observar que o tratamento com este extrato não afetou a hematopoiese e o percentual de células sanguíneas. Assim como, não foi demonstrado, pelos índices hematimétricos e dosagem de hemoglobina, a presença de anemia nos animais. As análises hematológicas são descritas na literatura por ter alta correlação em prever toxicidade humana, ou seja, alterações no sistema hematológico em animais por determinadas substâncias também são encontradas em humanos na maioria das vezes (OLSON *et al.*, 2000).

O EHTM utilizado foi previamente caracterizado, evidenciando como composto majoritário um flavonoide, da subclasse dos flavonóis, a isoquercitrina (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2011a, 2011b). Um conteúdo de aproximadamente 38 mg/g e 93 mg/g de isoquercitrina foi encontrado EHTM e na fração etanólica do mesmo, respectivamente (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2011b).

Como os flavonoides estão presentes em uma grande quantidade de vegetais e plantas, a segurança do consumo alimentar destas substâncias tem

sido avaliada. Dois estudos de toxicidade foram realizados com composto de isoquercitrina produzida enzimaticamente (EMIQ), gerado a partir do flavonoide rutina e contendo mais de 95% de isoquercitrina (HASAMURA *et al.*, 2004; TAMURA *et al.*, 2010).

Nestes estudos com a EMIQ foram relatados resultados semelhantes aos aqui apresentados, nos quais não foram observados efeitos tóxicos através de parâmetros bioquímicos, hematológicos, ganho de peso, consumo alimentar e histopatologia de cérebro, timo, coração, pulmões, fígado, baço, rins, testículos, ovários, entre outros órgãos, em ratos Wistar, após doses diárias inclusa na ração de até aproximadamente 500 mg/kg (1% do conteúdo da ração) por 13 ou 52 semanas (HASAMURA *et al.*, 2004; TAMURA *et al.*, 2010). Porém, foram encontradas algumas alterações histopatológicas renais nos machos para doses de mais de 3000 mg/kg (5%) no estudo de 52 semanas (TAMURA *et al.*, 2010).

Outro estudo com um composto de isoquercitrina enzimaticamente modificado não encontrou evidências de carcinogenicidade analisando vários órgãos, incluindo os rins. No referido estudo não foram detectados sinais de toxicidade renal na avaliação histopatológica em ratos, que receberam até 1,5% do composto de isoquercitrina na ração por 104 semanas (SALIM *et al.*, 2004).

O processo de metabolização da isoquercitrina pode formar a quercetina, outro flavonol presente na dieta e também encontrado em *T. majus* (DE MEDEIROS *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2005). Foram descritas algumas alterações histopatológicas renais em ratos após o tratamento crônico com a quercetina, as quais incluem tumores renais, lesões neoplásicas e nefropatia crônica severa (DUNNICK; HAILEY, 1992; NTP, 1992; HARWOOD *et al.*, 2007). Entretanto, uma reavaliação histopatológica renal das alterações relacionadas com o uso deste flavonoide concluiu que o aumento nos tumores renais está relacionado com a exacerbação de uma nefropatia crônica progressiva, que ocorre espontaneamente em ratos. Isto evidencia que o modo de ação da quercetina representa um mecanismo secundário no desenvolvimento de tumores renais em ratos, que não teria significado na extrapolação para humanos (HARD *et al.*, 2007). Além disso, outros estudos

não relataram evidências de carcinogenicidade relacionadas com o uso da quercetina (HIRONO *et al.*, 1981; ITO *et al.*, 1989).

No entanto, de forma geral, os estudos com estes flavonoides sugerem uma baixa toxicidade para o uso da quercetina e também para os compostos de isoquercitrina produzida enzimaticamente, que são substâncias presentes nas folhas de *T. majus*, o que corrobora com os resultados encontrados em nosso trabalho (NTP, 1992; LIMA; OLIVEIRA; NAGEM, 2003; SALIM *et al.*, 2004; HASAMURA *et al.*, 2004; HARD *et al.*, 2007; HARWOOD *et al.*, 2007; TAMURA *et al.*, 2010).

Contudo, as plantas medicinais representam uma mistura complexa de componentes químicos com atividades biológicas, que podem causar efeitos adversos, tóxicos e interagir com outros medicamentos quando empregados simultaneamente. Portanto, não podemos inferir a baixa toxicidade de uma planta com base somente em estudos toxicológicos com seus componentes isolados.

Na presente avaliação toxicológica foi utilizado o extrato hidroetanólico (90%) das folhas de *T. majus*, e os resultados aqui apresentados contribuem para avaliação da segurança desta planta. Porém, os efeitos do uso popular de *T. majus* como planta medicinal em outras preparações e a segurança do consumo alimentar da mesma permanecem obscuros. Pois, embora este extrato supostamente contenha muitos compostos presentes na folha “*in natura*”, não podemos afirmar que os resultados aqui apresentados se repetiriam em outros estudos, como por exemplo, em um modelo de consumo das folhas e flores frescas na dieta, na administração de infusões ou outros modos de preparo.

Por conseguinte, permanece uma lacuna para realização de outros testes toxicológicos, a fim de avaliar tanto preparações com finalidade terapêutica, como as infusões utilizadas popularmente, quanto às partes desta planta consumidas “*in natura*”. De modo que sejam avaliados os riscos da utilização desta espécie vegetal cronicamente na alimentação diária e no tratamento de diversas patologias.

Cabe ressaltar ainda, que de acordo com os protocolos recomendados pela ANVISA para avaliação da toxicidade de medicamentos fitoterápicos,

devem ser conduzidos mais estudos toxicológicos pré-clínicos com este extrato de *T. majus*, como estudos de toxicidade crônica e de genotoxicidade. Além disso, obviamente, deverão ser efetuados estudos clínicos para concluir a avaliação da segurança do uso de *T. majus* em humanos.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a ausência de toxicidade oral após doses repetidas durante 28 dias do extrato hidroetanólico de *T. majus*, nas doses de 75, 375 e 750 mg/kg em ratos Wistar adultos (90 dias). Não foram detectados efeitos tóxicos sistêmicos observados através do ganho de peso corporal e peso relativo dos órgãos. Nas análises hematológicas não foram detectados sinais de hematotoxicidade. Os parâmetros bioquímicos não demonstraram efeitos tóxicos renais, hepáticos e pancreáticos. Também não foram evidenciadas nas análises histopatológicas alterações no fígado, nos rins e no baço dos animais.

Entretanto, para uma completa avaliação da segurança da utilização desta planta medicinal pela população muitos estudos ainda são necessários, tanto para avaliar o seu uso com finalidade terapêutica, quanto para avaliar seu consumo alimentar. Também é importante continuar investigando os usos populares desta planta, a fim de fornecer informações científicas concisas sobre a eficácia e mecanismos de ação de seus efeitos terapêuticos, objetivando a garantia de uma alternativa terapêutica de qualidade, eficaz e segura para uso humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABT, A. B.; OH J. Y.; HUNTINGTON, R. A.; BURKHART, K. K. Chinese herbal medicine induced acute renal failure. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 2, p. 211-212, 1995.

AMADO, N. G.; CERQUEIRA, D. M.; MENEZES, F. S.; DA SILVA, J. F.; NETO, V. M.; ABREU, J. G. Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes  $\beta$ -catenin cellular localization. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 7, p. 543-552, 2009.

AMADO, N. G.; FONSECA, B. F.; CERQUEIRA, D. M.; NETO, V. M.; ABREU, J. G. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Sci**, v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Portaria SNVS nº 19 de 30 de janeiro de 1992**: proíbe o uso do confrei (*Symphythum officinale* L.) em preparações para uso interno. Brasil, 1992. Disponível em <[http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg\\_norma\\_espelho\\_consulta.cfm?id=3232655&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=27&hdTipoNorma=27&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo\\_norma=27&numero=19&data=&dataFim=&ano=1992&pag=1](http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3232655&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=27&hdTipoNorma=27&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=27&numero=19&data=&dataFim=&ano=1992&pag=1)>. Acesso em: 08/12/2011.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RDC nº 17, de 25 de fevereiro de 2000**: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil, 2000. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17\\_00rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm)>. Acesso em: 09/11/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004**: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil, 2004a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc\\_48\\_16\\_03\\_04\\_registro\\_fitoterapicos%20.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf)>. Acesso em: 10/01/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004**: determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". Brasil, 2004b. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/re\\_90\\_guia\\_tox.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/re_90_guia_tox.pdf)>. Acesso em: 10/01/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Instrução normativa IN nº 5, de 11 de dezembro de 2008**: Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. Brasil, 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/IN\\_N\\_5\\_2008\\_anvisa.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/IN_N_5_2008_anvisa.pdf)>. Acesso em: 10/01/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Consolidado de normas da Coordenação de fitoterápicos, dinamizados e notificados (COFID)**. Brasil, 2009. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/051109\\_normas.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/051109_normas.pdf)>. Acesso em: 10/01/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasil, 2010a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10/01/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil, 2010b. Disponível em: <[http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg\\_norma\\_espeho\\_consulta.cfm?id=4053023&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=&hdTipoNorma=&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo\\_norma=&numero=14&data=&dataFim=&ano=2010&pag=1](http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espeho_consulta.cfm?id=4053023&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=&hdTipoNorma=&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=&numero=14&data=&dataFim=&ano=2010&pag=1)>. Acesso em: 10/01/2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Informe Técnico nº. 47, de 16 de novembro de 2011**: esclarecimentos sobre a comercialização de *Aloe vera* (babosa) e suas avaliações de segurança realizadas na área de alimentos da ANVISA. Brasil, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/77d2e18049189cd6b929bd466b74119d/Microsoft+Word++Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+47+de+16+de+novembro+de+2011.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10/01/2012.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 79, n. 7, p. 691-692, 2001. Disponível em: <[http://www.who.int/bulletin/archives/79\(7\)691.pdf](http://www.who.int/bulletin/archives/79(7)691.pdf)>. Acesso em: 10/01/2011.

BINET, L. A biologist physician in the country. **Biol Med (Paris)**, v. 53, p. 5-28, 1964.

BOADI, W. Y.; IYERE, P. A.; ADUNYAH, S. E. Effect of quercetin and genistein on copper- and iron-induced lipid peroxidation in methyl linolenate. **J Appl Toxicol**, v. 23, n. 5, p. 363-369, 2003.

BOEIRA, J. M.; FENNER, R.; BETTI, A. H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L. A.; BARBOSA, P. R.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CORRÊA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M. P.; PEDROSO, A. P.; GOSMANN, G.; DA SILVA, J.; RATES, S. M. K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 526-532, 2010.

BOORHEM, R. L. **Reader's Digest - segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil LTDA, 1999. p. 416.

BOTTENBERG, M. M.; WALL, G. C.; HARVEY, R. L.; HABIB, S. Oral *Aloe vera*-induced hepatitis. **Ann Pharmacother**, v. 41, n. 10, p. 1740-1743, 2007.

BOWN, D. **The herb Society of América – encyclopedia of herbs & their uses**. New York: Dorling Kindersley Publishing Inc, 1995.

BRASIL. Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 1976. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei\\_6360\\_76.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_6360_76.pdf)>. Acesso em: 10/01/2012.

BRASIL. Decreto Lei nº 79.094, de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 jan. 1977. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/decreto\\_79094\\_77.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/decreto_79094_77.pdf)>. Acesso em: 10/01/2012.

BRASIL. Decreto nº 3.961, de 10 de outubro de 2001. Altera o Decreto no 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 out. 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/3961\\_01.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/3961_01.htm)>. Acesso em: 10/01/2012.

BREMNESS, L. **Manual del herborista: guía práctica para el uso y cultivo de plantas aromáticas y culinárias**. Madrid: Editorial Raices, 1993. p. 285.

BREVOORT, P. The booming US botanical market: a new overview. **Herbalgram**, v. 44, p. 33-46, 1998.

BUTTAR, H. S.; JONES, K. L. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 68, n. 6, p. 492-493, 2003.

CARVALHO A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314- 319, 2008.

CARVALHO A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **Revista T&C Amazônia**, v. 11, n. 11, p. 26-32, 2007.

CASTELLANI, D. C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúcido em *Tropaeolum majus* L.** 108 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-103, 1998.

CHAN, H.; Yeh, Y.; BILLMEIER, G. J.; EVANS, W. E.; CHAN, H. Lead-poisoning from ingestion of Chinese herbal medicine. **Clinical Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 273-281, 1977.

CHANG, H. W.; BAEK, S. H.; CHUNG, K. W.; SON, K. H.; KIM, H. P.; KANG, S. S. Inactivation of phospholipase A<sub>2</sub> by naturally occurring biflavonoid, ochonaflavone. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 205, n. 1, p. 843-849, 1994.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M. S.; HO, W. K. Difference in absorption of two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 59, n. 3, p. 549-555, 2005.

CHOWDHURY, S. A.; KISHINO, K.; SATOH, R.; HASHIMOTO, K.; KIKUCHI, H.; NISHIKAWA, H.; SHIRATAKI, Y.; SAKAGAMI, H. Tumor-specificity and Apoptosis-inducing Activity of Stilbenes and Flavonoids. **Anticancer Research**, v. 25, n. 3B, p. 2055-2063, 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. II. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978. p. 67.

DE MEDEIROS, J. M. R.; MACEDO, M.; CONTANCIA, J. P.; NGUYEN, C.; CUNNINGHAM, G.; MILES, D. H. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 157-165, 2000.

DEBELLE, F. D.; NORTIER, J. L.; DE PREZ, E. G.; GARBAR, C. H.; VIENNE, A. R.; SALMON, I. J.; DESCHODT-LANCKMAN, M. M.; VANHERWEGHEM, J. L. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. **J Am Soc Nephrol**, v.13, n. 2, p. 431–436, 2002.

DI CARLO, G.; BORRELI, F.; ERNST, E.; IZZO, A. A. St John's wort: Prozac from the plant kingdom.. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 6, p. 292-297, 2001.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DUGAS JUNIOR, A. J.; CATAÑEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G. C.; PRICE, K. L.; FISCHER, N. H.; WINSTON, G. W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **J Nat Prod**, v. 63, n. 3, p. 327-331, 2000.

DUNNICK, J. K.; HAILEY, J. R. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. **Fundam Appl Toxicol**, v. 19, p. 423–431, 1992.

FERREIRA, R. B. G.; VIEIRA, M. C.; ZÁRETE, N. A. H. Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* 'jewel' em função de espaçamentos entre plantas. **Revista Brasileira Plantas Medicas**, v. 7, n. 1, p. 57-66, 2004.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu. 2006. p. 410.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R. MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. **Biochim Biophys Acta**, v. 1721, n. 1-3, p. 174-184, 2005.

FRANCISCHI, J. N. **A farmacologia em nossa vida**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. p. 137.

GADANO, A. B.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 246-251, 2006.

GARZÓN, G. A.; WROLSTAD, R. E. Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 44-49, 2009.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; BOFFO, M. A.; LOURENÇO, E. L. B.; STEFANELLO, M. E. A.; KASSUYA, C. A. L.; MARQUES, M. C. A. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 517-522, 2009.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; GASPAROTTO, F. M.; BOFFO, M. A.; LOURENÇO, E. L.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin – An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 210-215, 2011a.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; GASPAROTTO, F. M.; LOURENÇO, E. L.; CRESTANI, S.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 363-372, 2011b.

GOEL, R. K.; MAITI, R. N.; TAVARES, I. A. Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. **Fitoterapia**, v. 67, n. 6, p. 548-552, 1996.

GOLZE, V. L. O.; SOUZA, T. A. Aceitabilidade de alimentação à base de capucinha (*Tropaeolum majus*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 3, n. 2, p. 27-30, 2008.

GOOS, K. H.; ALBRECHT, U.; SCHNEIDER, B. Efficacy and safety profile of a herbal drug containing nasturtium herb and horseradish root in acute sinusitis, acute bronchitis and acute urinary tract infection in comparison with other treatments in the daily practice/results of a prospective cohort study. **Arzneimittelforschung**, v. 56, n. 3, p. 249-257, 2006.

GRIFFITHS, D. W.; DEIGHTON, N.; BIRCH, A. N. E.; PATRIAN, B.; BAUR, R.; STÄDLER, E. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 693-700, 2001.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 361-380, 2008.

HARD, G. C.; SEELY, J. C.; BETZ, L. J.; HAYASHI, S. Re-evaluation of the kidney tumors and renal histopathology occurring in a 2-year rat carcinogenicity bioassay of quercetin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 600-608, 2007.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, 2007.

HASAMURA, M.; YASUHARA, K.; TAMURA, T.; IMAI, T.; MITSUMORI, K.; HIROSE, M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n. 3, 439-444, 2004.

HEINZMANN, B. M. Compostos com enxofre. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (orgs.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFSC/UFRS, 2004. p. 741-763.

HENNEY, J. E. Risk of drug interactions with St John's wort. **J Am Med Assoc**, v. 283, n. 13, p. 1679, 2000.

HIRONO, I.; MORI, H.; HAGA, M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. **J Natl Cancer Inst**, v. 61, n. 3, p. 865-869, 1978.

HIRONO, I.; UENO, I.; HOSAKA, S.; TAKANASHI, H.; MATSUSHIMA, T.; SUGIMURA, T.; NATORI, S. Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. **Cancer Letters**, v. 13, n. 1, p. 15-21, 1981.

HOWELL, L.; KOCHHAR, K.; SAYWELL JUNIOR, R.; ZOLLINGER, T.; KOEHLER, J.; MANDZUK, C.; SUTTON, B.; SEVILLA-MARTIR, J.; ALLEN, D. Use of Herbal Remedies by Hispanic Patients: Do They Inform Their Physician? **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 19, n. 6, p. 566-578, 2006.

ITO, N.; HAGIWARA, A.; TAMANO, S.; KAGAWA, M.; SHIBATA, M.; KURATA, Y.; FUKUSHIMA, S. Lack of carcinogenicity of quercetin in F344/DuCrj rats. **Jpn J Cancer Research**, v. 80, n. 4, p. 317–325, 1989.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 198-216, 2010.

JURGENS, T. M. Potential toxicities of herbal therapies in the developing fetus. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 68, n. 6, p. 496-498, 2003.

KANAT, O.; OZET, A.; ATAERGIN, S. Aloe vera-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man. **Eur J Intern Med**, v. 17, n. 8, p. 589, 2006.

KIM, H. G.; YOON, D. H.; LEE, W. H.; HAN, S. K.; SHRESTHA, B.; KIM, C. H.; LIM, M. H.; CHANG, H.; LIM, S.; CHOI, S.; SONG, W. O.; SUNG, J. M.; HWANG, K. C.; KIM, T. W. Phellinus linteus inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B and MAPK<sub>S</sub> activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 307-315, 2007.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KIM, H. Y.; LEE, M. J.; YOKOZAWA, T.; SAKATA, K.; LEE, S. Protective activity of flavonoid and flavonoid glycosides against glucose-mediated protein damage, **Food chemistry**, v. 126, n. 3, p. 892-895, 2011.

KJAER, A.; MADSEN, J. O.; MAEDA, Y. Seed volatiles within the family Tropaeolaceae. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1285-1287, 1978.

KO, R. J. Adulterants in Asian patent medicines. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 12, p. 847, 1998.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M.; LINCOPAN, N.; VARELA, S. D.; VARANDA, E. A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 30-38, 2007.

KOWALSKI, J.; SAMOJEDNY, A.; PAUL, M.; PIETSZ, G.; WILCZOK, T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. **Pharmacol Rep**, v. 57, n. 3 p. 390-394, 2005.

KUNANUSORN, P.; PANTHONG, A.; PITTAYANURAK, P.; WANAUPPATHAMKUL, S.; NATHASAEN, N., VICHAI, R. Acute and subchronic oral toxicity studies of *Nelumbo nucifera* stamens extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 789-795, 2011.

LAI, C.; CHAN, A. Y. Tetrahydropalmatine poisoning: diagnoses of nine adult overdoses based on toxicology screens by HPLC with diode-array detection and gas chromatography-mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 229-236, 1999.

LANINI, J.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NAPPO, S.; CARLINI, E. A. "O que vêm da terra não faz mal?" - relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 121-129, 2009.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (orgs.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFSC/UFRS, 2004, p. 247-262.

LEE, S.; PARK, H.; NOTSU, Y.; BAN, H. S.; KIM, Y. P.; ISHIHARA, K.; HIRASAWA, N.; JUNG, S. H.; LEE, Y. S.; LIM, S. S.; PARK, E.; SHIN, K. H.; SEYAMA, T.; HONG, J.; OHUCHI, K. Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 11, p. 1552-1556, 2008.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 305-314, 2003.

LING, S.; NHEU, L.; DAI, A.; GUO, Z.; KOMESAROFF, P. Effects of four medicinal herbs on human vascular endothelial cells in culture. **International Journal of Cardiology**, v. 128, n. 3, p. 350-358, 2008.

LORENZI, H.; DE SOUSA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p. 129-473.

LOURENÇO, E. L. B.; PRANDO, T. B.; MUNIZ, D.; MUNHOZ, C. J.; DALSENER, P. R.; VELASQUEZ, L. G.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Atividade de *Tropaeolum majus* L. sobre a mobilização e migração leucocitária em modelo de bolsão inflamatório. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR** v. 15, p. 15-19, 2011.

LYKKESFELDT, J.; MOLLER, B. L. Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. **Plant Physiology**, v. 102, n. 2, p. 609-613, 1993.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Manual de hortaliças não-convencionais**. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://www.abcsem.com.br/docs/manual\\_hortaliças\\_web.pdf](http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortaliças_web.pdf)>. Acesso em 08/12/2011.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBONE, J. B. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. Londres: Chapman e Hall, 1994. p. 619.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIETKIEWSKA, E.; GIBLIN, E. M.; WANG, S.; BARTON, D. L.; DIRPAUL, J.; BROST, J. M.; KATAVIC, V.; TAYLOR, D. C. Seed-Specific Heterologous Expression of a Nasturtium *FAE* Gene in Arabidopsis Results in a Dramatic Increase in the Proportion of Erucic Acid. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2665-2675, 2004.

MLCEK, J.; ROP, O. Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 10, p. 561-569, 2011.

MOORE, L. B.; GOODWIN, B.; JONES, S. A.; WISELY, G. B.; SERABJIT-SINGH, C. J.; WILLSON, T. M.; COLLINS, J. L.; KLIEWER, S. A. St. John's Wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane x receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 13, p. 7500-7502, 2000.

MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: UNIVALI, 2009. p. 185-207.

NIIZU, P. Y; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of Lutein. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 9, p. 605-609, 2005

NTP (National Toxicology Program). **Toxicology and Carcinogenesis Studies of Quercetin (CAS No. 117-39-5) in F344/N Rats (Feed Studies)**, NTP TR 409, NIH Publication No. 92-3140. National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, 1992.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **Guideline for testing of chemicals. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. Paris, adopted by the Council on 27th July 1995. Disponível em: <[http://www.oecd.org/dataoecd/50/41/37477972 .pdf](http://www.oecd.org/dataoecd/50/41/37477972.pdf)>. Acesso em: 09/11/2011.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n.1, p. 56-67, 2000.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 2. ed. São Paulo: IBRASA, 1997. p. 9-63.

PICCIARELLI, P.; ALPI, A. Embryo-suspensor of *Tropaeolum majus*: Identification of gibberellin A<sub>63</sub>. **Phytochemistry**, v. 26, n. 2, p. 329-330, 1987.

PICCIARELLI, P.; ALPI, A.; PISTELLI, L.; SCALET, M. Gibberellin-like activity in suspensors of *Tropaeolum majus* L. and *Cytisus laburnum* L. **Planta**, v. 162, n. 6, p. 566-568, 1984.

PINTÃO, A. M.; PAIS, M. S.; COLEY, H.; KELLAND, L. R.; JUDSON, I. R. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. **Planta Medicine**, v. 61, n. 3, p. 233-236, 1995.

RASO, G.M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**, v. 68, n. 8, p. 921-931, 2001.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade Natural e Aspectos Agronômicos de Plantas Mediciniais. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFSC/UFRS, 2001. p. 41-62.

RIES, C. A.; SAHUD, M. A. Agranulocytosis caused by Chinese herbal medicines -danger of medications containing aminopyrine and phenylbutazone. **Journal of the American Medical Association**, v. 231, n. 4, p. 352-355, 1975.

SALIM, E.I.; KANEKO, M.; WANIBUCHI, H.; MORIMURA, K.; FUKUSHIMA, S. Lack of carcinogenicity of enzymatically modified isoquercitrin in F344/DuCrj rats. **Food Chem. Toxicol**, v. 42, n. 2, p. 1949–1969, 2004.

SANGALLI, A.; SCALON, S. P. Q; CARVALHO, J. C. L. Perda de massa de flores de capuchinha após armazenamento. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 471-474, 2007.

SANGALLI, A.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Resíduos orgânicos e nitrogênio na produção de biomassa da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) 'jewel'. **Horticultura brasileira**, v. 28, n. 4, p. 831-839, 2004.

SANTO, A. P. E.; MARTINS, I. S. S.; TOMY, S. C.; FERRO, V. O. Efeito anticoagulante *in vitro* do extrato hidroetanólico de folhas e flores éduladas de *Tropaeolum majus* L. (Tropeolaceae) sobre o plasma humano. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 732-736, 2007.

SEEF, L. B. Herbal Hepatotoxicity. **Clinical in liver disease**, v. 11, n.3, p. 577-596, 2007.

SILVA, C. G.; RAULINO, R. J.; CERQUEIRA, D. M.; MANNARINO, S. C.; PEREIRA, M. D.; PANEK, A. D.; SILVA, J. F. M.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 761-767, 2009.

SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS). **Casos de intoxicação e/ou envenenamento no Brasil em 2009**. Brasil, 2011. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=349](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=349)>. Acesso em: 10/01/2011.

SOSSAI, P.; NASONE, C.; CANTALAMESSA, F. Are herbs always good for you? A case of paralytic ileum using a herbal tisane. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 587-588, 2007.

SPARRE, B. Tropeoláceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí:Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. cap. 26.

TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilized aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 48-55, 2010.

TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; MUTO, S.; KASAHARA, H.; KOBAYASHI, S.; OKUHARA, Y.; HAYASHI, M.; NAGASAWA, T.; ONOZATO, T.; KURODA, J. Fifty-two week chronic toxicity of enzymatically decomposed rutin in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2312-2318, 2010.

TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; LOPEZ, S.; FERESIN, G. E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 155-161, 2004.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-alpha production. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, n. 1, p. 119-125, 2004.

UTESCH, D.; FEIGE, K.; DASENBROCK, J.; BROSCARD, T. H.; HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; LINES, T. C. Evaluation of the potencial *in vivo* genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**, v. 654, n. 1, p. 38-44, 2008.

VANHERWEGHEM, J. L.; DEPIERREUX, M.; TIELEMANS, C.; ABRAMOWICZ, D.; DRATWA, M.; JADOUL, M.; RICHARD, C.; VANDERVELDE, D.; VERBEELEN, D.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. **Lancet**, v. 341, n. 8842, p. 387-391, 1993.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. Capuchinha. In: EMBRAPA (Ed.). **Plantas Medicinais Codimentares e Aromáticas**. Corumbá: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

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

WANG, H.; NAIR, M.; STRASBURG, G.; CHANG, Y.; BOOREN, A.; GRAY, J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 294-296, 1999.

WANG, S.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5677-5684, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Fact sheet n° 134: Traditional medicine**. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html>>. Acesso em: 10/11/2011.

WIELANEK, M.; URBANEK, H. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 86, n. 2, p. 177-186, 2006.

WILHELM FILHO, D. W.; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 317-334.

WOOLF, G. M.; PETROVIC, L. M.; ROJTER, S. E.; WAINWRIGHT, S.; VILLAMIL, F. G.; KATKOV, W. N.; MICHIELETTI, P.; WANLESS, I. R.; STERMITZ, F. R.; BECK, J. J.; VIERLING, J. M. Acute hepatitis associated with the Chinese herbal product Jin Bu Huan. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, n. 10, p. 729-735, 1994.

WU, K. M.; GHANTOUS, H.; BIRNKRANT, D. B. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2606-2610, 2008.

XU, S.; LEVINE, M. Medical residents' and students' attitudes towards herbal medicines: a pilot study. **Can J Clin Pharmacol**, v. 15, n. 1, p. e1-e4, 2008.

YANG, H. N.; KIM, D. J.; KIM, Y. M.; KIM, B. H.; SOHN, K. M.; CHOI, M. J.; CHOI, Y. H. Aloe-induced toxic hepatitis. **J Korean Med Sci**, v. 25, n. 3, p. 492-495, 2010.

YANG, Y. C.; YANG, J.; DOERGE, D. R.; CHAN, P. C.; FU, P. P.; CHOU, M. W. Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddeline, leading to DNA adduct formation *in vivo*. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 1, p. 101-109, 2001.

YEONG, M.L.; CLARK, S. P.; WARING, J. M.; WILSON, R. D.; WAKEFIELD, S. J. The effects of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. **Pathology**, v. 23, n. 1, p. 35-38, 1991.

YOKOHIRA, M.; YAMAKAWA, K.; SAOO, K.; MATSUDA, Y.; HOSOKAWA, K.; HASHIMOTO, N.; KUNO, T.; IMAIDA, K. Antioxidant effects of flavonoids used as food additives (purple corn color, enzymatically modified isoquercitrin, and isoquercitrin) on liver carcinogenesis in a rat medium-term bioassay. **J Food Sci**, v. 73, n. 7, p. 561-568, 2008.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **IHERINGIA**, v. 59, n. 2, p. 173-78, 2004.

ZANETTI, G. D. ; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. M.; PAGLIARIN, V. P.; MOREL, A. F. Toxicidade Aguda e Atividade Antibacteriana dos Extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farm Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 159-162, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides In : SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. ; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (orgs.) **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, 1999. p. 489.

ZURLO, C.; BRANDÃO, M. **As ervas comestíveis**. Rio de Janeiro: Globo, 1989. p. 167.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Protocolo para confecção das lâminas histológicas:

#### a) Desidratação:

- Os fragmentos dos órgãos foram colocados em cassetes histológicos, identificados, e passaram pelos seguintes banhos:
- Etanol 70% - 1 a 12 horas;
- Etanol 95% (1° banho) - 1 hora;
- Etanol 95% (2° banho) - 1 hora;
- Etanol 100% (1° banho) - 1 hora;
- Etanol 100% (2° banho) - 1 hora.

#### b) Diafanização ou clareamento:

- Xilol (1° banho) - 1 hora;
- Xilol (2° banho) - 1 hora.

#### c) Impregnação pela parafina:

- As etapas posteriores foram realizadas em estufa a 60°C;
- Xilol (50%) e Parafina (50%) - 45 minutos;
- Parafina (1° banho) - 45 minutos;
- Parafina (2° banho) - 45 minutos;
- Parafina (3° banho) - 45 minutos.

#### d) Inclusão:

- Os cassetes foram retirados da estufa um por um com as amostras, foram colocados em um molde retangular com parafina na chapa aquecedora a 60 °C;
- Os blocos foram montados e deixou-se solidificar a temperatura ambiente.

## e) Microtomia:

- Os blocos foram cortados em um micrótomo (5  $\mu\text{m}$ );
- Os cortes foram colocados em banho-maria, em seguida foram retirados um por um com uma lâmina inclinada em um ângulo de aproximadamente 90 graus;
- As lâminas foram colocadas em estufa a 60 °C por aproximadamente 7 minutos.

## f) Reidratação:

- Após retirar as lâminas da estufa foram realizados os processos a seguir:
- Xilol (1° banho) - 10 minutos;
- Xilol (2° banho) - 10 minutos;
- Etanol 100% - 5 minutos;
- Etanol 95% - 5 minutos;
- Etanol 90% - 5 minutos;
- Etanol 70% - 2 minutos.

## g) Coloração:

- Hematoxilina - aproximadamente 15 segundos;
- Lavar com água destilada;
- Eosina - 10 a 15 segundos.

## h) Desidratação:

- Etanol 90 % - Colocar e tirar;
- Etanol 100% (1° banho) - 5 minutos;
- Etanol 100% (2° banho - 5 minutos;
- Xilol (1° banho) - 10 minutos;
- Xilol (2° banho) - 10 minutos.

i) Montagem:

- Com o auxílio de um conta-gotas pingou-se uma gota de bálsamo do Canadá sobre a lamínula e a lâmina com o corte foi elevada até a lamínula, finalizando a confecção de uma lâmina histológica permanente.