UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NÁDYLA ZANON GONÇALVES

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE DIURÉTICA DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent

GOIÂNIA
2011

NÁDYLA ZANON GONÇALVES

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE DIURÉTICA DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

GOIÂNIA
2011

A Deus pela oportunidade e pela força para a realização deste trabalho.

Ao meus pais Bruna Gonçalves Zanon e Adelino Gonçalves Lemes pelo amor, compreensão e ajuda.

Ao meu namorado e amigo Paulo Rogério dos Santos Gonçalves, pelo apoio fundamental e ajuda.

À minha irmã Lydia Zanon Gonçalves pelo apoio nas horas difíceis.

# AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, meu orientador, pela oportunidade, confiança, compreensão, paciência, conhecimento repassado, sua competência e pela convivência agradável.

Ao Prof. Dr. Elson Alves Costa pela experiência antes deste trabalho como sua aluna de iniciação científica e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, e seus alunos Marcus Vinícius Mariano Nascimento, Pablinny Moreira Galdino, Fábio Borges de Souza , Iziara Ferreira Florentino e Roberta Campos Lino pela amizade, atenção e solidariedade.

Ao Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho e pela orientação, e sua técnica de laboratório Vânia Beatris Lopes Moura pela ajuda.

À Prof. Dra. Naida Cristina Borges e ao médico veterinário Wesley F. Neves do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás pela prontidão em fazer os procedimentos para a realização deste trabalho, além das orientações e sugestões.

Ao colega Marcelo Elias Pereira pela dificuldade compartilhada e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Kelly Cristina Borges Tacon Santos pela amizade, apoio e ajuda.

À funcionária Maria Alzaneide da Silva Carvalho pela ajuda prestada com responsabilidade.

Aos colegas de pós-graduação, em especial Renê Oliveira do Couto e Flávio Silva de Carvalho pela ajuda e apoio, e também à Fernanda Steger de Oliveira Costa pelo incentivo em fazer a prova para o mestrado e por termos estudado juntas para a mesma.

Aos colegas do NEPET (Núcleo de Ensino e Pesquisa Tecnológica), em especial Fernando Gomes Ferreira Oliveira, Maysa Aparecida de Oliveira e Tereza Cristina de Deus, pela convivência agradável.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFG, Fernanda Bellato, pela alegria e presteza.

À Universidade Federal de Goiás pela oportunidade.

À FAPEG (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás) e ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico) pelo apoio financeiro. E ao Biotério Central da Universidade Federal de Goiás pelo fornecimento dos animais de experimentação.

*"O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos."*

*(Oliver W. Holmes)*

*"No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz."*

*(Ayrton Senna)*

# RESUMO

A *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent é uma espécie comumente conhecida por esporão-de-galo, pertencente à família Ulmaceae e caracterizada como arbusto ou pequena árvore, com ramos compridos e muito flexíveis. É utilizada para o tratamento de infecções urinárias, rins (cálculos renais e pielonefrite) e como diurética. Relatos populares no estado de Goiás indicam o uso do esporão-de-galo na forma de chá de suas folhas. O Extrato aquoso de *C. iguananea* foi testado em ratos *Wistar* para avaliar a atividade diurética em dose única observando o efeito do mesmo sobre o volume urinário e produtos do metabolismo (ureia e creatinina) e avaliar a atividade diurética em dose múltipla observando o efeito sobre o volume urinário e na excreção urinária de eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$), e também em ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* para testar sua toxicidade oral aguda seguindo o Guia 423 (OECD), em que os animais foram observados durante 14 dias após administração única de 2000mg/kg do extrato, incluindo neste teste o estudo histopatológico do coração, pulmão, rins, fígado, baço, pâncreas e instestinos delgado e grosso. O Extrato aquoso de esporão- de- galo nas suas três doses (70, 200 e 600 mg/kg) não apresentou atividade diurética em doses múltipla e única, pois não aumentou a excreção de água, metabólitos e nem dos eletrólitos. O extrato foi enquadrado na Classe 5 (substância com DL50 superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerado de baixa toxicidade, mas achados histopatológicos sugeriram nefrotoxicidade e cardiotoxicidade do extrato no teste de toxicidade oral aguda (2000mg/kg), com aumento de peso absoluto dos rins e do coração de ratos e camundongos machos tratados com o extrato e exame microscópico de rins de ratos machos apresentando acentuada presença de cilindros hialinos no glomérulo.



**Palavras- chaves:** Plantas medicinais, *Celtis iguanaea,* atividade diurética.

# ABSTRACT

*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent is a species commonly known as cock-spur, in the Ulmaceae family and characterized as a shrub or small tree with branches long and very flexible. Is used for the treatment of urinary tract infections, kidney (kidney stones and pyelonephritis) and as a diuretic. Popular reports in the State of Goiás indicate the use of the spur cockscomb in the form of tea leaves. The aqueous extract of *Celtis iguananea* was tested in *Wistar* rats to assess single dose diuretic activity in observing the effect of same on urinary volume and products of metabolism (urea and creatinine) and assess the multiple-dose diuretic activity by observing the effect on the urinary volume and urinary excretion of electrolytes sodium (Na +) and potassium (K +), and also in *Wistar* rats and mice *Swiss* to test its acute oral toxicity following the Guide 423 (OECD), in which the animals were observed for 14 days after single administration of 2000mg/kg of extract, including this test the histopathological study of heart, lung, kidneys, liver, spleen, pancreas and intestines. The aqueous extract of cock-spur in their three doses (70, 200 and 600 mg/kg) did not submit multiple dose diuretic activity and only because it has not increased the excretion of water, electrolytes and metabolites of neither. The extract was framed in the class 5 (substance with Ld50 more than 2000 mg/kg and less than 5000 mg/kg), being considered of low toxicity, but histopathological findings cardiotoxicity and nephrotoxicity suggested does not extract any acute oral toxicity test (2000mg/kg), with an increase of absolut weight from the kidney and heart of male rats and mices treated with the extract and microscopic examination of kidney of male rats showing marked presence of cylinder hialinos no glomerulus.



**Keywords**: Medicinal plants, *Celtis iguanaea,* diuretic activity.

# LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1 Árvore de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia-GO, fevereiro de 2007. PAULA, M. A. 18

FIGURA 2 Figura 2. Folhas e frutos da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia-GO, fevereiro de 2007. PAULA, M. A. 18

FIGURA 3 Gaiola semi-metabólica pertencente ao Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico- Farmacológicas- Universidade Federal de Goiás. (a) Gaiola individual. (b) Estante com 48 gaiolas individuais. 34

FIGURA 4 Volumes de excreção urinária durante 24h (média ± EPM) de ratos *Wistar* (n=6), p.o.. (a) p=0,0011(Dunnet) e p=0,0158 (t de Student), (b) p= 0,0009 (Dunnet) e p= 0,0192 (t de Student), (c) p= 0,0005 (Dunnet) e p= 0,024 (t de Student), (d) p=0,0008 (Dunnet) e p=0,0240 (t de Student) e (e) p= 0,0007 (Dunnet) e p= 0,0326 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 38

FIGURA 5 Excreção urinária (24h) do metabólito ureia de ratos *Wistar* (média ± EPM) (n=6), p.o.. **Estatisticamente significativo em relação à salina, p < 0,0001(Dunnet) e p=0,0048 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 40

FIGURA 6 Concentração do metabólito ureia no plasma sanguíneo 24horas após dose única de EAEG (média ± EPM) de ratos *Wistar* (n=6), p.o.. *Estatisticamente significativo em relação à salina, p= 0,0065 (Dunnet) e p=0,0363 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 40

FIGURA 7 Concentração do metabólito creatinina no plasma sanguíneo sanguíneo 24horas após dose única de EAEG (média ± EPM) de ratos *Wistar* (n=6), p.o.. EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.. 41

FIGURA 8 Excreção urinária (24h) do metabólito creatinina (média ± EPM) de ratos *Wistar* (n=6), p.o.. **Estatisticamente significativo em relação à salina (p < 0,01).(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 41

FIGURA 9 Volumes de excreção urinária diária por oito dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o. (a) p= 0,0331 (Dunnet) e p= 0,0007 (t de Student), (b) p= 0,0004 (t de Student) e (c) p= 0,0586 (Dunnet) e 0,0031 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student).EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 44

FIGURA 10 Volumes de excreção urinária de 24 h somando os oito dias de ratas *Wistar* (média dos oito dias ± EPM) (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). ** p= 0,0121 (Dunnet) e 0,0055 (t de Student).EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 45

FIGURA 11 Excreção urinária do metabólito creatinina do 8° dia de experimento 45

de ratas *Wistar* (média ± EPM) (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

FIGURA 12 Concentração do metabólito creatinina no plasma sanguíneo após administração por 8 dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student ). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 46

FIGURA 13 Concentração do eletrólito potássio ($K^+$) no plasma sanguíneo após administração por 8 dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. Valores expressos em média ± EPM (n=6)(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 47

FIGURA 14 Concentração do eletrólito sódio ($Na^+$) no plasma sanguíneo após administração por 8 dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 47

FIGURA 15 Fotomicrografia de rim de ratos da linhagem *Wistar* machos submetidos ao tratamento com EAEG 2000mg/kg e solução Salina 1mL/kg. Em (A) Rim de rato controle com aspecto normal (H&E, escala = 100µm); em (B) aumento da figura anterior (H&E, escala = 20µm); em (C) Rim de rato tratado apresentando cilindros hialinos (seta) (H&E, escala = 100µm); em (D) aumento da figura anterior destacando os cilindros hialinos (seta) (H&E, escala = 20µm). 55

QUADRO 1 Classificação dos diuréticos. 21

QUADRO 2 Princípios dos 3 métodos de avaliação de toxicidade aguda oral: VALARES, 2006. 28

# LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Volumes de excreção urinária durante 24h (média ± EPM) de ratos *Wistar* (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (tratados com furosemida, 20mg/kg- controle positivo); Grupo II (tratados com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo); Grupo III (tratados com EAEG, 70mg/kg), Grupo IV (tratados com EAEG, 200mg/kg) e Grupo V (tratados com EAEG, 600mg/kg). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.(**) Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,01$). 63

TABELA 2 Excreção urinária dos metabólitos ureia e creatinina e concentração dos metabólitos ureia e creatinina no plasma sanguíneo de ratos *Wistar* após dose única de EAEG (média ± EPM) (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student).Legenda: Grupo I (tratados com furosemida, 20mg/kg- controle positivo); Grupo II (tratados com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo); Grupo III (tratados com EAEG, 70mg/kg), Grupo IV (tratados com EAEG, 200mg/kg) e Grupo V (tratados com EAEG, 600mg/kg). (**) Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,01$). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 63

TABELA 3 Volumes de excreção urinária diária por oito dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student).Legenda: Grupo I (tratadas com EAEG, 70mg/kg); Grupo II (tratadas com EAEG, 200 mg/kg); Grupo III (tratadas com EAEG, 600mg/kg), Grupo IV (tratadas com furosemida, 20mg/kg- controle positivo) e Grupo V (tratadas com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo) (*) Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,05$).EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 64

TABELA 4 Excreção urinária e concentração no plasma sanguíneo do metabólito creatinina, e concentração no plasma sanguíneo dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) de ratos *Wistar* após administração repetida de EAEG (n=6), p.o.. Valores expressos em média ± EPM (n=6). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (tratados com furosemida, 20mg/kg- controle positivo); Grupo II (tratados com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo); Grupo III (tratados com EAEG, 70mg/kg), Grupo IV (tratados com EAEG, 200mg/kg) e Grupo V (tratados com EAEG, 600mg/kg). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 65

TABELA 5 Excreção urinária diária dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) por oito dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student).Legenda: Grupo I (tratadas com EAEG, 70mg/kg); Grupo II (tratadas com EAEG, 200 mg/kg); Grupo III (tratadas com EAEG, 600mg/kg), Grupo IV (tratadas com furosemida, 20mg/kg- controle positivo) e Grupo V (tratadas com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo) (*) Estatisticamente significativo em relação à salina, p= 0,0121 (Dunnet) e p= 0,0324 (t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 48

TABELA 6 Pesos absolutos dos órgãos e evolução ponderal (média ± EPM) de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* (n=3), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (animais machos, tratados com solução salina, 1 52

mL/kg – controle); Grupo II (machos, tratados com EAEG 2000 mg/kg); Grupo III (fêmeas, tratadas com solução salina, 1 mL/kg – controle) e Grupo IV (fêmeas, tratadas com EAEG 2000 mg/kg). (a) p= 0,0053, (b) p= 0,0082, (c) p= 0,0198, (d) p= 0,049 e (e) 0,0179. (t de Student) EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

TABELA 7 Pesos relativos aos pesos corporais dos órgãos (média ± EPM) de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* (n=3), p.o..(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student) Legenda: Grupo I (animais machos, tratados com solução salina, 1 mL/kg – controle); Grupo II (machos, tratados com EAEG 2000 mg/kg); Grupo III (fêmeas, tratadas com solução salina, 1 mL/kg – controle) e Grupo IV (fêmeas, tratadas com EAEG 2000 mg/kg). (a) p= 0,0059 e (b) p= 0,0160. (t de Student) EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 53

TABELA 8 Consumo de água, ração e produção de excretas, medidos nos 7° e 14° dias do confinamento (média ± EPM) de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* (n=3), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (animais machos, tratados com EAEG 2000 mg/kg), Grupo II (animais machos, tratados com solução salina, 1 mL/kg – controle); Grupo III (fêmeas, tratadas com EAEG 2000 mg/kg) e Grupo IV(fêmeas, tratadas com solução salina, 1 mL/kg – controle).(*) Estatisticamente significativo em relação à salina (p < 0,05). ** Estatisticamente significativo em relação à salina (p< 0,01). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo. 54

TABELA 9 Valores de intensidade de lesão atribuídos aos órgãos de ratos *Wistar.* EAEG= Extrato aquoso de esporão- de- galo. 0= ausente, 1=discreto, 2=moderado e 3=intenso. 66

TABELA 10 Valores de intensidade de lesão atribuídos aos órgãos de camundongos *Swiss.* EAEG= Extrato aquoso de esporão- de- galo. 0= ausente, 1=discreto, 2=moderado e 3=intenso. 67

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....14

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, COMPROVAÇÕES CIENTÍFICAS E USO POPULAR DA ESPÉCIE EM ESTUDO .....17

1.2 ATIVIDADE DIURÉTICA.....19

1.2.1 Fármacos Diuréticos .....19

1.2.2 Diuréticos de Alça.....21

1.2.2.1 Usos Clínicos .....22

1.2.2.2 Efeitos Adversos.....23

1.2.3 Pesquisa De Atividade Diurética Em Plantas Medicinais .....23

1.3 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA.....24

1.3.1 Legislação Brasileira .....26

1.3.2 Métodos Alternativos para o teste de Toxicidade Aguda Oral.....27

1.3.2.1 Guia 423 da Oecd - Método da Toxicidade Aguda de Classe (Tac).....29

2 OBJETIVOS .....31

2.1 OBJETIVO GERAL .....31

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....31

3 MATERIAL E MÉTODOS .....32

3.1 MATERIAL BOTÂNICO .....32

3.2 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO LIOFILIZADO DE ESPORÃO-DE-GALO (EAEG) .....32

3.3 ANIMAIS.....32

3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA E DA TOXICIDADE AGUDA ORAL DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE ESPORÃO-DE-GALO – *CELTIS IGUANAEA* (JACQ.) SARGENT. .....33

3.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE ÚNICA.....34

3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE MÚLTIPLA POR OITO DIAS .....35

3.7 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA ORAL-TESTE DE DOSE ÚNICA– MÉTODO DE TOXICIDADE AGUDA DE CLASSES .....36

3.8 MÉTODO DE EUTANÁSIA .....37

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....38

4.1 TESTE DE ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE ÚNICA .....38

4.1.1 Volume de excreção urinária durante 24h .....38

4.1.2 Valores de excreção urinária e de concentração no plasma sanguíneo dos metabólitos ureia e creatinina .....39

4.2 TESTE DE ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE MÚLTIPLA POR OITO DIAS ....43

4.2.1 Volumes de excreção urinária diária oor oito dias .....43

4.2.2 Excreção urinária e valores de concentração no plasma sanguíneo do metabólito creatinina e dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) .....45

4.3 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA .....49

4.3.1 Morte e alterações comportamentais .....49

4.3.2 Análise de pesos absolutos e relativos (G/100 G de peso vivo) dos órgãos e dos parâmetros fisiológicos .....50

4.3.3 Análise Histopatológica .....54

5. CONCLUSÕES .....57

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....58

APÊNDICE .....63

# 1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento. (VEIGA et al, 2005).

Atropina, ácido salicílico, artemisinina, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, fisostigmina, pilocarpina, quinina, reserpina, taxol, tubocurarina, vincristina e vinblastina são alguns exemplos de fármacos extraídos de plantas medicinais. A maioria desses fármacos foi descoberta por meio da investigação das curas tradicionais e conhecimentos populares (GILANI & ATTA, 2005).

A venda de produtos derivados de plantas no mundo está em torno dos 100 bilhões de dólares por ano (GILANI & ATTA, 2005). A América Latina possui grande parte da biodiversidade mundial, e o Brasil sozinho possui em torno de 20-22% de todas as plantas e microrganismos conhecidos (CALIXTO, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou, em 1978, aos países-membros, o desenvolvimento de pesquisas visando à utilização das plantas medicinais com o propósito terapêutico, a elaboração de um inventário das plantas medicinais usadas em diferentes países e a padronização da nomenclatura botânica daquelas mais largamente usadas (FERRO, 2006).

São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2010).

Entre os adeptos da fitoterapia, é comum o pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas pelo seu uso prolongado na própria espécie humana. Seriam eficazes e seguras, naturalmente balanceadas, sem efeitos colaterais comuns aos medicamentos não fitoterápicos (SIMÕES et al, 2003).

A Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução de diretoria colegiada (RDC) n° 14 de 05 de abril de 2010, atualiza os procedimentos de registro desse tipo de medicamento no país, revogando a RDC n°48. Entre as exigências da RDC n° 48 estão a nece ssidade de controle de qualidade do produto acabado, com métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e resultados de prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica (BRASIL, 2004). As principais mudanças da RDC n° 14 são relacionadas a o controle de qualidade desses medicamentos. Os testes solicitados foram adequados ao avanço do conhecimento científico internacional. Com as novas exigências, as empresas deverão apresentar, no momento do registro desses produtos, testes para avaliação de aflatoxinas (uma toxina produzida por algumas espécies de fungos presentes nas plantas) e testes físico – químicos dos extratos vegetais usados nos medicamentos fitoterápicos. Os testes realizados no controle de qualidade foram organizados de forma mais racional de acordo com as várias etapas que a indústria deve seguir para obtenção dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2010a). Outras resoluções da mesma data fornecem as referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos (RDC n° 88) (BRASIL, 2004 a), que foi revogada pela Instrução Normativa (IN) n° 5 de 31 de março de 201 0 (BRASIL, 2010b), tratam dos detalhes para realização dos estudos de toxicidade por meio da criação do “Guia para a realização de Estudos de Toxicidade Pré- clínica de Fitoterápicos” (n° 90) (BRASIL, 2004c) e fornecem os requisitos necessários para o processo de pós-registro através da criação do “Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós- registro de fitoterápicos” (n° 91) (BRASIL, 2004d), além da Lista de Registro Simplificado (n° 89) (BRA SIL, 2004b), revogada pela IN n° 5 de 11 de dezembro de 2008 (BRASIL, 2008).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde no ano de 2005 e publicada por meio da portaria n°971, de 3 de ma io de 2006, propôs a inclusão de plantas medicinais e fitoterapia como opções terapêuticas no SUS. Também estabeleceu a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos (Rename- Fito), e o provimento do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS (BRASIL, 2006). O Ministério da Saúde selecionou uma relação de plantas medicinais de interesse para o SUS (Renisus), contemplando aquelas que apresentam potencial para gerar produtos de interesse para a saúde. A relação, com 71 espécies vegetais, deve orientar estudos e pesquisas nesta área (BRASIL, 2011).

Com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos através do decreto 5.813 de 22 de junho de 2006. Tem como um de seus objetivos específicos ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais (BRASIL, 2006a).

Por fatores culturais e sócio-econômicos a população de Goiás utiliza com frequência plantas medicinais como terapia alternativa. Em Goiânia e cidades vizinhas é comum a comercialização dessas plantas por pessoas denominadas de raizeiros que atuam em feiras livres, mercados municipais e bancas instaladas em vias públicas (TRESVENZOL et al, 2006). Relatos populares espontâneos no estado de Goiás indicam o uso da espécie *Celtis iguanaea* sob a forma de chá ou abafado de suas folhas para o tratamento de várias queixas tais como, dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má-digestão e como diurética (PAULA, 2009).

## 1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, COMPROVAÇÕES CIENTÍFICAS E USO POPULAR DA ESPÉCIE EM ESTUDO

*Celtis iguanaea* é uma espécie de porte arbustivo (Figura 1), comumente conhecida por esporão-de-galo, tela, taleira, sarã, gurrupiá ou gumbixava, dependendo da região do Brasil onde é encontrada (GIEHL ; JARENKOW, 1996). A espécie pertence à família Ulmaceae, é uma angiosperma e dicotiledônea classificada na sub-divisão Magnoliophyta pertencente a ordem Rosales (CORRÊA, 1969-1978). Ulmaceae é uma família de árvores e arbustos que compreende 16 gêneros e aproximadamente 2000 espécies, podendo ocorrer tanto em regiões de clima temperado quanto naquelas de clima tropical (HEYWOOD, 1993).

*Celtis iguanaea* é um arbusto trepador, tomando às vezes o porte de árvore alta até 12 metros e com caule de 25-30 cm de diâmetro; ramos compridos (7m), muito flexíveis, armados de espinhos estipulares curtos, agudos, solitários e recurvados; ramúsculos comprimidos e pubescentes; folhas curto-pecioladas (pecíolos pulverulentos), ovado oblongas ou ovadas, muito variáveis, de 5-13cm de comprimento e 3-7cm de largura, agudas ou curto-acuminadas no ápice, raramente obtusas, inteiras ou grosso-serreado-crenadas na metade superior, arredondadas ou cordiformes e freqüentemente um pouco inequiláteras na base, glabras ou quase glabras nas duas páginas, flores insignificantes, amarelo-esverdeadas ou brancacentas, dispostas em cimeiras curtas ou axilares e paniculadas; estigmas lineares e bífidos; ovário unilocular; fruto drupa ovóide-globosa, angulosa, obtusa ou tetrágona, até 12 mm de comprimento, amarela, contendo polpa adocicada e comestível (CORRÊA, 1984).

A grande variação no tamanho de suas folhas deu a espécie vasta sinonímea botânica. *Celtis aculeata* Sw., *Celtis aculeata* var. laevigata (Kunth) Planch., *Celtis alnifolia* (Wedd.) Planch., *Celtis asperula* Miq., *Celtis bonplandiana* Planch., *Celtis brevifolia* (Klotzsch) Miq., *Celtis dichotoma* (Klotzsch) Miq., *Celtis goudotii* Planch., *Celtis hilariana* Planch., *Celtis morifolia* Planch., *Celtis pavonii* Planch., *Celtis spinosa* Spreng., *Celtis spinosissima* (Wedd.) Miq., *Celtis triflora* (Ruiz ex klotzsch) Miq., dentre inúmeras outras (CORRÊA, 1969-1978).

Atualmente, segundo Souza e Lorenzi (2008), o gênero Celtis está sendo transferido para a família Cannabaceae, pertencente à Ordem Rosales, de acordo com o sistema de classificação *Angiosperm Phylogeny Group* (APGII) de 2003, baseado em estudos recentes de filogenia.

**Figura 1.** Árvore de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia-GO, fevereiro de 2007. PAULA, M. A.

**Figura 2.** Folhas e frutos da *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão-de-galo), zona rural em Goiânia-GO, fevereiro de 2007. PAULA, M. A.

Em trabalho realizado por Silva e Proença (2008) verificou-se uso popular de preparações obtidas a partir da decocção de folhas e raízes dessa espécie no tratamento de infecções urinárias. Ortêncio (1994) estudando o uso popular de plantas medicinais no estado de Goiás encontrou a indicação de esporão-de-galo para “tratamento de bexiga”, rins (cálculos renais e pielonefrite) e urina. Segundo Paula (2009), o Extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* foi capaz de proteger a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por indometacina, etanol e estresse, além de diminuir o volume e a acidez da secreção ácida gástrica em camundongos e alterar significativamente a motilidade intestinal por meio do aumento do trânsito.

A espécie em estudo apresenta atualmente pouca referência na literatura científica, o que dificultou uma discussão mais ampla a seu respeito neste trabalho.

## 1.2 ATIVIDADE DIURÉTICA

Os rins desempenham suas funções mais importantes por meio da filtração do plasma e remoção de substâncias do filtrado em graus variáveis, dependendo das necessidades do organismo. Além disso, eles depuram o filtrado (e, portanto, o corpo) de substâncias indesejáveis, excretando-as na urina, enquanto retêm substâncias necessárias, devolvendo-as ao sangue (GUYTON & HAL, 1997). Apesar de uma carga variável de ingestão de solutos e solventes, o rim é capaz de efetuar uma regulação fina do equilíbrio osmótico. Múltiplos co-transportadores, contratransportadores e canais de $Na^+$ e de $K^+$ servem para reabsorver $Na^+$ ao longo do néfron e para criar o gradiente osmótico necessário para a reabsorção de água (KESTER et al, 2008).

### 1.2.1 Fármacos diuréticos

Existe um vasto arsenal de fármacos para contornar a retenção de $Na^+$ e de água, especialmente em doenças como a insuficiência cardíaca congestiva, em que o líquido retido tem de ser eliminado. A administração desses fármacos (diuréticos) acarreta tanto diurese (perda de água) como natriurese (perda de $Na^+$). Os diuréticos

aumentam a taxa de formação de urina. Com o aumento do volume urinário há uma perda efetiva de água e de solutos associados. Contudo, a perda efetiva de eletrólitos varia entre os fármacos diuréticos, dependendo do seu local de ação (KESTER et al, 2008).

Devido ao seu papel na regulação da água e dos sais, os diuréticos são usados no tratamento de doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, edema e hipercalciúria. Muitos fármacos diuréticos (diuréticos de alça, tiazídicos, amilorida e triantereno) exercem seus efeitos sobre proteínas transportadoras específicas de membrana luminal/apical das células epiteliais dos túbulos renais. Outros exercem efeitos osmóticos que impedem a reabsorção de água (manitol), inibem enzimas (acetazolamida) ou interferem em receptores de hormônios nas células epiteliais renais (espironolactona). O Quadro 1 destacam-se os sítios onde os diuréticos exercem a sua ação primária e o sistema de transporte que é inibido pela droga (KATZUNG, 2005).

Existem dois grupos de drogas cujos efeitos natriuréticos dependem primariamente das suas ações sobre a função glomerular: as metilxantinas e a dopamina. Há evidências que a dopamina, além de favorecer um aumento da filtração glomerular, reduz o transporte de sódio em nível do túbulo proximal, devido a uma diminuição da atividade da bomba $Na^{+}$- $K^{+}$- ATPase. A teofilina (uma metilxantina) aumenta a excreção renal de sódio e de água, principalmente por causar vasodilatação da arteríola aferente e, consequentemente, aumento da taxa de filtração glomerular (LOPES E MARTINELLI, 2006).

**Quadro 1**. Classificação dos diuréticos (LOPES E MARTINELLI, 2006).

| **Diuréticos que Atuam Modificando a Hemodinâmica Renal** |
|---|
| Metilxantinas |
| Teofilina |
| Amina Simpaticomimética |
| Dopamina |
| **Diuréticos que Atuam no Túbulo Contorcido Proximal** |
| Inibidores da Anidrase Carbônica |
| Acetazolamida |
| Metazolamida |
| Diclorferinamida |
| Diuréticos Osmóticos |
| Manitol |
| **Diuréticos que Atuam na Alça de Henle** |
| Inibidores do Co-transporte $Na^+$-$K^+$-$2Cl^-$ |
| Furosemida |
| Bumetanida |
| Piretanida |
| Torasemida |
| Ácido Etacrínico |
| Diuréticos Osmóticos |
| Manitol |
| **Diuréticos que Atuam no Túbulo Contorcido Distal (Co-transporte de $Na^+$– $Cl^-$)** |
| Derivados Benzotiazídicos |
| Clorotiazida |
| Hidroclorotiazida |
| Derivados Heterocíclicos |
| Clortalidona |
| Xipamida |
| Metalazona |
| **Diuréticos que Atuam no Ducto Coletor Cortical** |
| Antagonista da Aldosterona |
| Espironolactona |
| Bloqueadores dos Canais para Sódio |
| Amilorida |
| Triantereno |

1.2.2 Diuréticos de alça

Os diuréticos de alça são os mais poderosos de todos os diuréticos e têm capacidade de provocar a excreção de 15%-25% do $Na^+$ existente no filtrado. O principal exemplo é a furosemida; outros diuréticos de alça incluem a bumetanida, a piretanida, a torasemida e o ácido etacrínico (RANG et al, 2004). Embora a

furosemida cause uma leve inibição da anidrase carbônica no túbulo contorcido proximal e o ácido etacrínico tenha algum efeito inibidor da absorção de sódio nesse segmento do néfron, o efeito diurético dessas drogas deve-se basicamente à inibição do transportador $Na^+$- $K^+$- $2Cl^-$ na porção espessa do ramo ascendente da alça de Henle ( LOPES E MARTINELLI, 2006).

A inibição do co-transportador de $Na^+$- $K^+$- $2Cl^-$ dissipa o gradiente de $Na^+$ gerado na medula renal, que impulsiona a reabsorção de água na parte descendente da alça de Henle, permeável à água. A inibição do co-transporte de $Na^+$- $K^+$- $2Cl^-$ diminui o $K^+$ intracelular, o que reduz o potencial eletrogênico positivo transepitelial, diminuindo, portanto, a reabsorção paracelular de $Ca^{2+}$ e de $Mg^{2+}$. (KESTER et al, 2008). O efeito sobre o $Ca^{2+}$ é benéfico no tratamento da hipercalcemia. A torasemida provoca menos perda de $K^+$ e $Ca^{2+}$ (RANG et al, 2004).

Os diuréticos de alça são ácidos orgânicos que se ligam facilmente às proteínas plasmáticas. O acesso dos diuréticos de alça ao local de ação principal ocorre apor meio de secreção tubular acoplada ao sistema de transporte de ácidos orgânicos no segmento S2 do túbulo proximal, o que provoca redução da excreção de ácido úrico. Aproximadamente 50% da furosemida é excretada na urina como tal; a outra metade é conjugada ao ácido glucurônico no rim, havendo aumento da meia-vida na presença de insuficiência renal. Os demais diuréticos de alça são metabolizados pelo fígado principalmente (LOPES E MARTINELLI, 2006).

### 1.2.2.1 Usos clínicos

Os diuréticos de alça são úteis para reduzir o edema associado a doenças cardíacas, hepáticas (cirrose hepática complicada por ascite) ou renais (síndrome nefrótica e insuficiência renal). Eles também são úteis no tratamento do edema pulmonar agudo e da insuficiência cardíaca congestiva. Na insuficiência renal aguda pode-se usar os diuréticos de alça numa tentativa de converter a insuficiência oligúrica (com volume urinário pequeno) numa insuficiência não-oligúrica. Os diuréticos de alça também têm sido usados no tratamento da hipercalcemia e da hipercalemia e no tratamento da hipertensão (KESTER et al, 2008).

### 1.2.2.2 Efeitos adversos

Os efeitos adversos mais frequentes associados aos diuréticos de alça estão relacionados aos efeitos renais dos fármacos: depleção de volume, alcalose metabólica hipocalêmica, hipomagnesemia e hipocalcemia. A furosemida e a bumetanida são fármacos derivados de sulfonamidas e são contra-indicadas em pacientes com hipersensiblidade às sulfas. Pode haver ototoxicidade, especialmente quando os diuréticos de alça são usados por via intravenosa, em doses altas ou em combinação com aminoglicosídeos (o ácido etacrínico é mais ototóxico que a furosemida). O ácido etacrínico também causa distúrbios gastrointestinais (KESTER et al, 2008). A hipocalemia pode ser evitada ou tratada por meio da administração concomitante de diuréticos poupadores de $K^+$ ou suplementos de potássio. Nos pacientes idosos, a diurese profusa produzida por esses agentes pode ser acompanhada de hipovolemia e hipotensão, com colapso em decorrência da súbita perda do volume de líquido extracelular (RANG et al, 2004).

### 1.2.3 Pesquisa de atividade diurética em plantas medicinais

Wright et al (2007) realizaram uma revisão sistemática da base de dados MEDLINE. Todos os relevantes artigos em idioma Inglês, publicados entre 1970 e 2005 foram pesquisados usando os termos 'natriurese', 'natriurético', 'diurese ', 'diurético', 'aquarético', 'fluxo urinário", combinado com os termos "alimento", "erva", "botânica", "nutrientes" ou "extrair". A revisão visou fornecer uma visão geral do conhecimento atual em torno do uso de extratos de plantas com efeito diurético. De um total de 100 plantas supostamente detentores de efeitos diuréticos, foram identificados 21 plantas com efeitos simultâneos sobre o volume urinário e excreção urinária de sódio. Os extratos que foram considerados como sendo potencialmente mais eficazes incluem espécies pertencentes ao gênero *Equisetum sp* e *Spergularia purpurea*. Outros incluem *Foeniculum vulgare, Fraxinus excelsior, Hibiscus sabdariffa, Petroselinum sativum*, e as espécies pertencentes ao gênero Cucumis, Lepidium, Phyllantus e Sambucus.

Carvalho et al (2008) buscaram traçar um panorama sobre os medicamentos fitoterápicos registrados no país e as espécies vegetais que lhes deram origem. Fez-se um levantamento, buscando-se através dos nomes populares e científicos das espécies vegetais no Site da ANVISA. O artigo traz as espécies *Equisetum arvense e Orthosiphon stamineus* com principal categoria terapêutica comprovada nos registros sendo diurética.

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. (VEIGA et al, 2005).Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO et al, 2000 ).

## 1.3 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

Medicamentos e, em menor grau, a maioria dos outros produtos de consumo são rotineiramente testados para a segurança. O objetivo é caracterizar os potenciais efeitos tóxicos dos componentes ativos do produto, estimar o grau de perigo em uso e entender o mecanismo de toxicidade induzida pelo produto. A toxicidade é um parâmetro necessário de qualquer estudo *in vivo* ou *in vitro* que atende a esse objetivo (PURCHASE et al, 1998). Esses estudos são realizados seguindo-se protocolos bem aceitos internacionalmente, ainda que, dentro do todo aprovado, as exigências legais variem de país a país (LAPA et al, 2003).

No estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o produto em teste ou, enventualmente, com doses parceladas em período não superior a 24 horas (LAPA et al, 2003). O teste permite conhecer a espécie mais sensível e o índice de letalidade; a forma de morte produzida pelo excesso dos produtos em teste e os órgãos alvo; as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte: as alterações hematológicas, da bioquímica plasmática e urinária; prever risco para espécies não-alvo ou toxicidade às espécies-alvo,

fornecer informações para avaliação dos riscos de exposição aguda ao produto; selecionar os valores de dose para estudos prolongados; prever o mecanismo de toxicidade e a relação da atividade- estrutura; indicar as lesões dos órgãos afetados, e verificar os efeitos tardios do tratamento e se há reversibilidade da resposta tóxica (HAYES & DiPASQUALE , 2001) . Esse teste agudo é obrigatório para todos os tipos de materiais em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidencia o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (KLAASSEN, 2007).

A vantagem maior de usar um animal para testar a segurança do produto é que é um modelo inclusivo de todos os fatores envolvidos na exposição humana. A dosagem pode ser alcançada pela rota destinada, e o produto químico é distribuído e modificado por mecanismos fisiológicos e bioquímicos adequados que permitam determinar a concentração da substância química ou seus metabólitos reativos (s) em todos os órgãos alvo afetados negativamente. Apesar da semelhança dos fatores envolvidos, o valor dos animais para a segurança pode ser exagerada, pois a toxicidade em animais nem sempre prediz toxicidade para o homem (PURCHASE et al, 1998).

Os testes de toxicidade geral devem guardar relação dose-efeito satisfatória e permitir estabelecer relação causa- efeito. A experiência da equipe, as condições dos laboratórios, a qualidade dos animais e a definição clara dos objetivos são condições mais importantes do que o cumprimento das normas aparentemente rígidas dos protocolos oficiais (LAPA et al, 2003).

A DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) em sua forma mais simples é a dose de um composto que provoca  mortalidade de 50% em uma população. Uma definição mais precisa foi fornecida pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) como a "dose única, calculada estatisticamente, de uma substância que pode ser esperada para causar a morte em 50% dos animais” (OECD, 1991). Em outras palavras, uma DL50 de um composto não é uma constante, mesmo que tenha sido tratado dessa forma por muitos, mas sim um termo estatístico desenvolvido para descrever a resposta letal de um composto em uma determinada população em um discreto conjunto de condições experimentais (HAYES & DiPASQUALE, 2001).

### 1.3.1 Legislação brasileira

Os estudos de toxicidade de produtos fitoterápicos, bem como seus protocolos devem seguir as diretrizes da Portaria nº 116/Ministério da Saúde/Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, de 8 de agosto de 1996 e da Resolução nº 48, de 16 de março de 2004 da ANVISA (PUCCI, 2009) , revogada pela RDC n°14 de 31 de março de 2010 da ANVISA (BR ASIL, 2010a).

Segundo a RDC n°14 de 31 de março de 2010 da ANVIS A, o relatório técnico do medicamento fitoterápico deve conter informações sobre segurança e eficácia, comprovadas por uma das opções: I - pontuação em literatura técnico-científica; II - ensaios pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia; III - tradicionalidade de uso; ou IV - presença na "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado", publicada pela ANVISA na IN 5, de 11 de dezembro de 2008, ou suas atualizações. A pontuação em literatura deverá ser comprovada pela apresentação de, no mínimo, seis pontos em estudos referenciados na "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos", publicada pela ANVISA. Quando não existirem estudos que comprovem a segurança pré-clínica, os mesmos deverão ser realizados seguindo, como parâmetro mínimo, o "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos" publicado pela ANVISA na Resolução 90, de 16 de março de 2004, ou suas atualizações. A tradicionalidade de uso deverá ser comprovada por meio de estudo etnofarmacológico, ou etno-orientado de utilização, documentações técnico-científicas, como a Farmacopéia Brasileira, ou outras publicações (BRASIL, 2010a).

A Resolução 90 da ANVISA de outubro 2004 avalia segundo os seguintes critérios: a espécie animal deve ser mamífero, devem ser utilizados machos e fêmeas; no mínimo 6 machos e 6 fêmeas,por dose do produto;os animais devem estar em idade adulta; a via de administração deve ser  a mesma via proposta para o uso do produto; as doses devem ser suficientes para observação de possíveis efeitos adversos e estimativa da DL50, se não forem observados efeitos adversos, utilizar a dose máxima possível; sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas devem ser anotados. Deve ser observado o maior número possível de parâmetros, incluindo o número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológico.

O período de observação deve ser durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, visando observar reversão ou não destes sinais; desde a 24ª hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser observados a variação de peso e o consumo de alimentos. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes devem ser eutanasiados e autopsiados e caso sejam observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem ser realizados (BRASIL, 2004d).

### 1.3.2 Métodos alternativos para o teste de toxicidade aguda oral

A preocupação pública com o bem-estar animal tem sido expressa por meio de controle legislativo do uso de animais para fins experimentais desde 1876 no Reino Unido. Os avanços científicos resultaram no desenvolvimento do conceito dos três Rs-refinamento, redução e substituição por Russell e Burch, em 1959. Leis foram introduzidas em praticamente todos os países desenvolvidos, com iniciativas importantes na Europa (1986) e os Estados Unidos (1966 e 1985). Assim, o campo tem se expandido consideravelmente com revistas científicas especialistas dedicadas a alternativas em pesquisa animal, congressos mundiais organizados para discutir as questões científicas e filosóficas, e organizações européias e dos EUA de validação sendo lançadas. A atenção científica atual é focada na validação de métodos alternativos .O progresso futuro dependerá do desenvolvimento de novos métodos, que agora são validados por meio de esforços de colaboração internacional (PURCHASE et al, 1998).

O teste da DL50 foi inicialmente introduzido em 1927 e, na década de setenta, este teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Para a realização do teste da DL50 eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada (normalmente ratos e camundongos) e para cada substância testada. Em 1981, a OECD incorporou o Teste da DL50 em suas diretrizes (BOTHAM, 2004). A diretriz de 1981 para toxicidade aguda oral (OECD, 401) estabeleceu o uso de apenas 5 animais por sexo, por dose, por grupo, com 3 grupos de doses por teste, sendo estas doses

escolhidas a partir de estudos prévios ou dados históricos, para estimar o valor da DL50. A diretriz 401da OECD foi revisada e os testes passaram a ser conduzidos utilizando apenas um sexo. Além disso, a dose limite que antes era de 5.000mg/kg foi reduzida para 2.000 mg/kg (OECD, 1987).

Em 1990 foi publicado o método que ficou conhecido como o Teste da Dose Fixa (TDF). O TDF utilizava um número menor de animais do que aquele preconizado pela OECD 401; causava menor mortalidade associada ao composto teste; além de menor dor e sofrimento aos animais (OECD, 2001).

Em 1996, surgiu uma segunda alternativa a OECD 401, o método da Toxicidade Aguda de Classe (TAC), o qual foi adotado pela OECD (OECD 423) e, em 1998, surgiu o Teste "*Up and Down*" (TUD) sendo, também, posteriormente recomendado pela OECD (OECD 425). O Teste TAC também utiliza o conceito de dose fixas, porém o objetivo final seria a mortalidade. O TUD, como o nome sugere objetiva estimar o valor da DL50 testando sequencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior (OECD, 2001a; OECD 2001b).

Desde 2000, o grupo de trabalho da OECD para químicos, pesticidas e produtos biotecnológicos concluiu que a OECD 401 passaria a não ser preconizada e as diretrizes 420, 423 e 425, então revisadas, foram definitivamente adotadas e recomendadas (BOTHAM, 2004). O quadro 2 mostra as diferenças entre os métodos das diretrizes 420, 423 e 425 da OECD.

**Quadro 2.** Princípios dos 3 métodos de avaliação de toxicidade aguda oral (VALADARES, 2006).

| | **Dose fixa** | **Classe tóxica** | ***"Up and Down"*** |
|---|---|---|---|
| **Nível da dose** | Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg, 5 animais por dose | Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg, 3 animais por dose | Dose inicial estimada (175mg/kg), fator de progressão de 3.2, 1 animal |
| **Princípio** | Identificar a menor dose que cause toxicidade evidente | Identificar a menor dose que cause mortalidade | Estimar a $DL_{50}$ |
| **Dados Obtidos** | Faixa estimada da $DL_{50}$, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo | Faixa estimada da $DL_{50}$, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo | Estimar a $DL_{50}$, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo |

#### 1.3.2.1 Guia 423 da OECD - Método da Toxicidade Aguda de Classe (TAC)

O método *in vivo* é um procedimento gradual com a utilização de 3 animais do mesmo sexo por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou estado moribundo dos animais, em média, 2-4 etapas podem ser necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Este procedimento é reprodutível, utiliza muito poucos animais e é capaz de classificar substâncias de uma forma semelhante a outros métodos de testes de toxicidade aguda (Guia de Teste 420 e 425). O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco. O método, adotado em 1996, foi amplamente validado contra dados de DL50 obtidos na literatura (OECD, 2001).

Três animais são usados para cada dose. A dose inicial deve ser selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo aquela mais propensa a produzir mortalidade com base em relatos de dose com toxidade evidente, quando possível, ou por meio de relatos evidenciados com base na estrutura química. Na ausência de ambas, a informação pode iniciar o estudo de triagem com a dose de 300 mg/kg (OECD, 2001).

Quando informações avaliadas sugerem que a mortalidade significativa não seja iniciada com o valor maior de dose 2000 mg/kg de peso corpóreo, o teste para se conhecer o limite deve ser conduzido. Excepcionalmente, e somente quando justificado por necessidades específicas, o uso de um valor de dose maior de 5000 mg/kg pode ser considerada. O tempo de intervalo entre o tratamento dos grupos é determinado pelo início, duração e gravidade dos sinais tóxicos. O tratamento de animais com a próxima dose deve ser esperado até que se confirme a sobrevivência de um animal previamente doseado (OECD, 2001).

Os animais são observados nos tempos de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Dependendo da mortalidade ou do estado moribundo dos animais outras doses são necessárias para que se admita um critério da toxicidade aguda da sustância

testada. A classificação da substância administrada é feita de acordo com o *Globally Harmonised System,* estimando-se sua DL50 (OECD, 2001).

Considerando que a espécie *Celtis iguanaea* é utilizada pela população no tratamento de várias doenças e a inexistência de estudos de atividade diurética e toxicidade com esta espécie, os resultados deste trabalho são úteis por avaliar a segurança de seu uso popular e sua eficácia terapêutica como planta medicinal diurética.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a utilização popular de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent no tratamento de enfermidades que acometem as vias urinárias, objetivou-se avaliar a atividade diurética do extrato aquoso de folhas dessa planta, assim como a segurança de seu uso.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito do extrato aquoso de folhas de *Celtis iguanaea* sobre o volume de excreção urinária e produtos do metabolismo (creatinina e ureia) na urina e no plasma sanguíneo após administração única em ratos *Wistar* .

- ✓ Avaliar o volume de excreção urinária, produção de eletrólitos (sódio e potássio) e produtos do metabolismo creatinina (no plasma sanguíneo e na urina), após administração do extrato aquoso de folhas de *Celtis iguanaea* sob dose múltipla em ratos *Wistar*.

- ✓ Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* em ratos *Wistar* e camundongos *Swiss.*

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent foram coletados de um espécime adulto localizado em região de mata ciliar do município de Campestre – Goiás, Brasil (612 m, 16º 46’ 01,7” Sul, 49º 42’ 00,6” Oeste). O material botânico coletado foi identificado pelo Professor Dr. José Realino de Paula – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás (UFG) e uma exsicata depositada no Herbário da UFG sob o número 40110.

## 3.2 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO LIOFILIZADO DE ESPORÃO-DE-GALO (EAEG)

O preparo foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais - ICB/UFG. As folhas de esporão-de-galo (*Celtis iguanaea*) foram dessecadas em estufa a 40 ℃ com ventilação forçada de ar, em seguida trituradas em moinho de facas do Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia. Sobre o material pulverizado (30 g) foi acrescentado água a 100℃(1L), mantendo o sistema aquecido a aproximadamente 80℃ por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos, obtendo-se o Extrato aquoso. Em seguida, o Extrato aquoso foi filtrado à vácuo, concentrado em rotaevaporador a temperatura de aproximadamente 60 ℃ e pressão de aproximadamente -650 mmHg, liofilizado por aproximadamente 20 horas, obtendo-se o Extrato aquoso Bruto Liofilizado de Esporão-de-galo (EAEG), que foi armazenado a -20℃. O processo extrativo foi feito quatro vezes e o rendimento total do processo foi de 21,86%.

## 3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvergicus*) *Wistar* jovens machos no teste de atividade diurética com administração em dose única, 30 ratas (*Rattus novergicus*) *Wistar* jovens no teste de atividade diurética com administração em

dose múltipla, e 6 ratos (*Rattus norvergicus*) *Wistar* jovens (3 machos e 3 fêmeas) e 12 camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* adultos jovens (6 machos e 6 fêmeas) para o teste de toxicidade oral aguda, provindos do Biotério Central da UFG. O peso de cada um não excedeu a 20% da média dos grupos, sendo que os ratos pesavam entre 200 e 250 g e os camundongos pesavam entre 25 e 30 g.

Os animais foram mantidos na Sala de Experimentação Animal do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) da UFG sob condições ambientais controladas (temperatura de 25±2 ºC, umidade relativa do ar de 30–80% com controle do ciclo claro/escuro de 12 h), água e ração *ad libitum,* exceto nas horas de jejum (somente água *ad libitum*) que antecederam o experimento de toxicidade aguda e o de atividade diurética em dose única (over-night para ratos e 3-4h para camundongos). Após as administrações a dieta de sólidos foi restabelecida dentro de 3-4 h para ratos e 1-2 h para camudongos. Para o tratamento realizado por gavagem, utilizou-se volume máximo de administração de 1 mL/100g de peso corporal (10 mL/kg de peso corporal).

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás sob protocolo 232/09, atendendo à lei 11.794 de 11 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008a) e aos "*Princípios éticos na experimentação animal* do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal" (COBEA, 2003).

## 3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA E DA TOXICIDADE AGUDA ORAL DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE ESPORÃO-DE-GALO – *CELTIS IGUANAEA* (JACQ.) SARGENT.

Para a realização dos testes de toxicidade aguda oral e de atividade diurética foram tomadas alíquotas do EAEG diluídas e solubilizadas em solução salina (0,9%) nas doses de 2000 mg/kg para o teste de toxicidade aguda oral e 70, 200 e 600 mg/kg para os testes de atividade diurética em dose única e de atividade diurética em dose múltipla por oito dias. De acordo com informações coletadas no Mercado Central de Goiânia, Goiás, a população utiliza uma mão cheia de folhas de esporão-de-galo em 1 litro de água. Considerando que uma mão cheia tem aproximadamente 9 g e que o preparo do extrato teve rendimento de 21, 86%, a

dose utilizada pela população é 1,9674 g, e para um indivíduo com 70 kg a dose utlizada é de 28,1057 mg/kg. A dose de 70 mg/kg corresponde a 2,5 vezes a dose utilizada pela população (28,1057 mg/kg), a dose de 200 mg/kg corresponde a aproximadamente 7 vezes a dose utilizada e a dose de 600mg/kg corresponde a aproximadamente 21 vezes a dose utilizada pela população. O controle positivo (furosemida 20 mg/kg) foi preparado a partir da diluição do medicamento Lasix ® (solução injetável) em Solução Salina (0,9% de NaCl). A escolha do diurético baseou-se no utilizado nos trabalhos de Lahlou et al(2006), Gasparotto et al (2009) e Pucci (2009), e a dose baseou-se na utilizada no trabalho de Pucci (2009).

## 3.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE ÚNICA

A avaliação da atividade diurética foi realizada segundo método de Lahlou et al (2006), com modificações. Os ratos *Wistar* foram distribuídos de forma aleatória em gaiolas semi- metabólicas individuais (figura 3) e organizadas em cinco grupos (n=6). Antes do início da administração do extrato (fase de pré-tratamento) o consumo de água e ração, e excreção de urina foi monitorado para verificação da homogeneidade destes parâmetros, e após a administração também.

*(a)*

*(b)*

**Figura 3**. Gaiola semi-metabólica pertencente ao Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas- Universidade Federal de Goiás. (a) Gaiola individual. (b) Estante com 48 gaiolas individuais.

Três grupos foram tratados com EAEG em doses únicas de 70 mg/kg, 200 mg/kg e 600 mg/kg respectivamente, um grupo foi tratado com solução de furosemida 20mg/kg (controle positivo) e outro grupo com solução salina 0,9% (controle negativo).

A coleta de urina foi realizada nos intervalos: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 h após as administrações. Essas amostras foram submetidas a dosagens bioquímicas no Laboratório de Análises Clínicas Rômulo Rocha da UFG visando quantificar os metabólitos ureia pelo método da urease/glutamato desidrogenase e creatinina pelo método do picrato alcalino. O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca sob anestesia e submetido às análises dos metabólitos ureia e creatinina no mesmo laboratório e pelos mesmos métodos.

## 3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE MÚLTIPLA POR OITO DIAS

A avaliação da atividade diurética foi realizada segundo método de Lahlou et al (2006) com modificações. As ratas foram distribuídos de forma aleatória em gaiolas semi-metabólicas individuais e organizadas em cinco grupos (n=6). Antes do início da administração dos extratos (fase de pré-tratamento) o consumo de água e ração e excreção de urina foi monitorado para verificação da homogeneidade destes parâmetros, e após a administração também.

Três grupos foram tratados com EAEG em dose única de 70 mg/kg, 200 mg/kg e 600 mg/kg respectivamente, um grupo foi tratado com solução de furosemida 20mg/kg (controle positivo) e outro grupo com solução salina 0,9% (controle negativo).

A coleta de excreção urinária foi realizada diariamente no mesmo horário por oito dias. As amostras foram submetidas a dosagens bioquímicas no Hospital Veterinário da UFG visando quantificar os eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) por meio do método de fotometria de chama e o metabólito creatinina pelo método do picrato alcalino. O sangue dos animais foi coletado ao final do experimento por punção venosa sob anestesia e submetido a análise de creatinina pelo método de picrato alcalino no mesmo local.

## 3.7 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA ORAL-TESTE DE DOSE ÚNICA– MÉTODO DE TOXICIDADE AGUDA DE CLASSES

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado segundo metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD.

Foi administrada a dose de 2000 mg/ kg a 6 camundongos (três machos e três fêmeas) e 6 ratos (3 machos e 3 fêmeas) e realizadas observações comportamentais sistemáticas nos tempos de 15min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 8h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, por meio do *screening hipocrático*. Os parâmetros analisados foram atividade geral, frênito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte. Sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-as numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise (MALONE, 1962; MALONE, 1977).

O peso de cada animal foi determinado no primeiro dia de experimento e semanalmente posteriormente, sendo que o ganho ponderal corporal foi calculado por meio da média das diferenças de peso a cada semana. Os parâmetros fisiológicos (consumo de ração e produção de excretas) foram determinados semanalmente. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados.

O procedimento de preparo e avaliação histopatológica foi realizado no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)- UFG no Setor de Patologia Geral, utilizando método duplo-cego. As amostras teciduais foram colhidas dos órgãos de todos os animais (fígado, pulmão, rim, coração, baço, pâncreas, intestino grosso e intestino delgado). Em seguida, foram fixadas, por no mínimo 24 h, em solução de formol tamponado (100mL de formaldeido 37%: 900 mL de água destilada; 4,0 g de fosfato de sódio monobásico; 6,5 g de fosfato de sódio dibásico (anidro) a 10%), na proporção de 20 vezes o volume do fixador em relação ao volume das peças. Após a fixação, os

fragmentos foram lavados em água corrente por cinco minutos, iniciando-se assim o processo de desidratação em álcool etílico, em série crescente desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente prOECDeu-se a clarificação com xilol, inclusão em parafina histológica, seccionadas à 5µm e corados com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA, 1983).

### 3.8 MÉTODO DE EUTANÁSIA

Ao final dos experimentos os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g (8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), conforme protocolo da Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education (FLECKNELL, 1996; KOHN et al , 1997), e posteriormente, nos experimentos de atividade diurética em dose única e múltipla, sofreram punção cardíaca para coleta de sangue, seguida de morte, e no experimento de toxicidade oral aguda sofreram deslocamento cervical, seguido de morte. Todos os animais passaram por eutanásia realizada de acordo com “Os princípios éticos de experimentação animal”, proposta pelo SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em Média ± Erro Padrão Médio (EPM). A análise estatística foi feita usando One-Way Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnet e usando o teste t de Student, através do software Graphpad Instat (Versão 3). As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas quando *p* é menor que 0,05.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 TESTE DE ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE ÚNICA

### 4.1.1 Volume de excreção urinária durante 24h

Os resultados demonstraram que as administrações orais das três doses do EAEG (70, 200 e 600 mg/kg, p.o.) não obtiveram valores significativos sobre os volumes de excreção urinária coletados nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 h após administração oral nos grupos em estudo em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1mL/kg, p.o.) (Tabela 1 – Apêndice A e Figura 4 ). É possível observar que o grupo que recebeu a dose de 200 mg/kg p.o. do EAEG apresentou um padrão menor de excreção urinária em relação ao grupo controle negativo (Solução Salina 1mL/kg, p.o.), o que pode ser explicado utilizando-se os valores basais obtidos antes do experimento para o grupo, com média 3,6 e desvio padrão 0,5 para volume de excreção urinária.

Houve diferenças significativas somente entre os valores do controle positivo (furosemida 20 mg/kg, p.o.) 5,72± 3,14 mL, 7,47±1,77mL, 8,77±1,75 mL, 8,77±1,75 mL, 9,22±1,84 mL, e os valores do controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.) 1,57±0,63 mL, 2,02±0,84 mL, 3,38±1,01 mL, 3,38±1,01 mL, 4,03±0,48 mL nos tempos 2 , 3 , 4 , 6 e 8 horas, respectivamente, após as administrações orais nos grupos em estudo, com (Tabela 1 - Apêndice A e Figura 4).

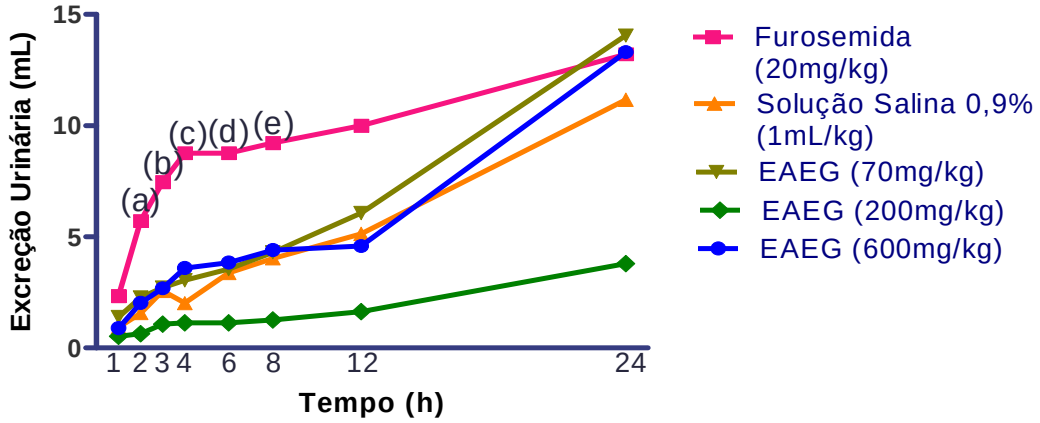


**Figura 4**. Volumes de excreção urinária durante 24h (média ± EPM) de ratos *Wistar* machos (n=6), p.o.. (a) p=0,0011(Dunnet) e p=0,0158 (t de Student), (b) p= 0,0009 (Dunnet) e p= 0,0192 (t de Student), (c) p= 0,0005 (Dunnet) e p= 0,024 (t de Student), (d) p=0,0008 (Dunnet) e p=0,0240 (t de Student) e (e) p= 0,0007 (Dunnet) e p= 0,0326 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

A ausência de aumento no volume urinário em nenhum tempo de coleta após administração do EAEG na suas três doses (70, 200 e 600 mg/kg, p.o.) indicam que o mesmo não apresentou atividade diurética nestas condições experimentais.

### 4.1.2 Valores de excreção urinária e de concentração no plasma sanguíneo dos metabólitos ureia e creatinina

Não houve diferença significativa para os valores de excreção urinária do metabólito ureia dos grupos do EAEG (70, 200 e 600 mg/kg, p.o.) em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.). Houve diferença significativa somente entre os valores de 30,12 ± 7,86 mg do controle positivo (furosemida 20 mg/kg, p.o.) e 3,07 ± 1,25 mg do controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.) (Tabela 2- Apêndice B e Figura 5), presentes na urina de 24 h após as administrações orais dos grupos em estudo. O EAEG (70, 200 e 600 mg/kg, p.o.) novamente não confirmou um efeito diurético, pois não alterou a excreção do metabólito ureia.

Também não houve diferença significativa para os valores plasmáticos do metabólito ureia nos grupos do EAEG (70 e 600 mg/kg, p.o.) em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.). Houve diferença significativa somente para os valores de 36,72± 9,62 mg/dL do grupo do EAEG de 200 mg/kg em relação ao valor de 62,72±4,83 mg/dL do grupo controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.) de concentração do metabólito ureia no plasma sanguíneo de sangue coletado ao final do experimento (Tabela 2 – Apêndice B e Figura 6). Apesar de o EAEG (200mg/kg, p.o.) ter apresentado menor concentração de ureia no plasma sanguíneo em relação ao grupo controle (solução salina 1 mL/kg, p.o.), este achado isolado não é suficiente para predizer uma possível atividade diurética, pois a atividade diurética está associada ao aumento de volume de excreção urinária e de excreção urinária de eletrólitos, o que não ocorreu nos dois experimentos de dose única e múltipla.

A furosemida e o ácido etacrínico diminuem a resistência vascular renal e, consequentemente, aumentam o fluxo plasmático renal, efeitos esses que

favorecem o aumento da filtração glomerular. Há evidências de que esse efeito seja mediado por um aumento da produção de prostaglandina E2. Como a porção do ramo ascendente da alça de Henle faz parte do segmento de diluição urinária, a furosemida e o ácido etacrínico aumentam a excreção de amônia e a acidez titulável e, agudamente, aumentam a excreção de ácido úrico, embora durante a administração crônica causem hiperuricemia. (LOPES E MARTINELLI, 2006). Estes achados podem justificar o aumento da excreção urinária de uréia após a administração de furosemida (20mg/kg).

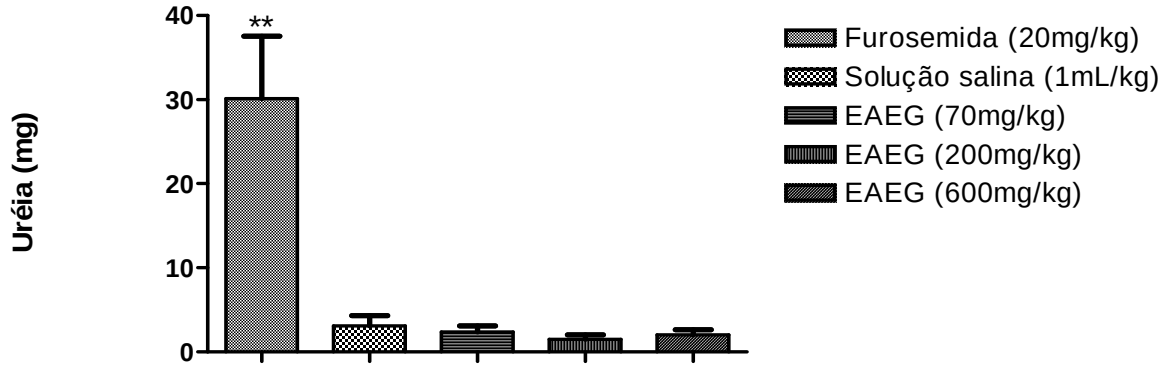


**Figura 5.** Excreção urinária (24h) do metabólito ureia de ratos *Wistar* (média ± EPM) (n=6), p.o.. **Estatisticamente significativo em relação à salina, p < 0,0001(Dunnet) e p=0,0048 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

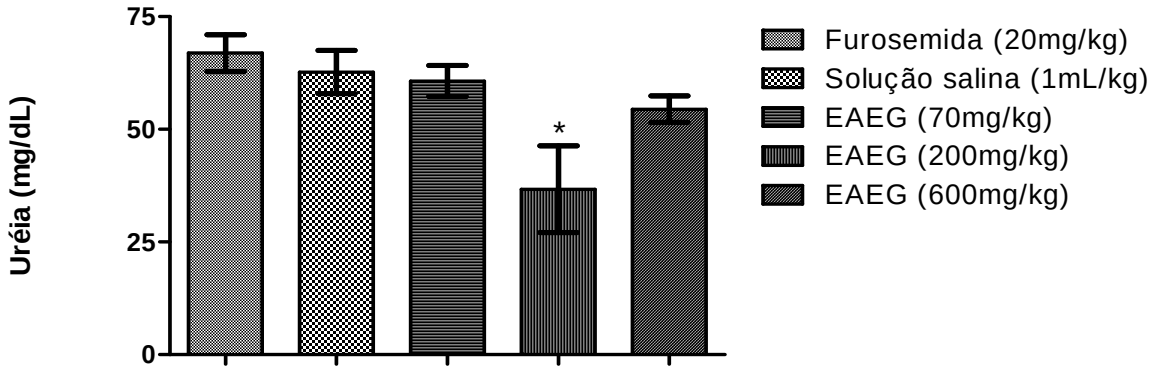


**Figura 6.** Concentração do metabólito ureia no plasma sanguíneo 24horas após dose única de EAEG (média ± EPM) de ratos *Wistar* (n=6), p.o.. *Estatisticamente significativo em relação à salina, p= 0,0065 (Dunnet) e p=0,0363 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

Não houve diferença significativa entre os valores de concentração do metabólito creatinina no plasma sanguineo do sangue coletado após o experimento e na excreção urinária de 24 h após as administrações orais nos grupos em estudo (Tabela 3 – Apêndice C e Figuras 7 e 8). No trabalho de Lahlou et al (2006), que apresentou a mesma metodologia, este metabólito não teve sua excreção alterada.

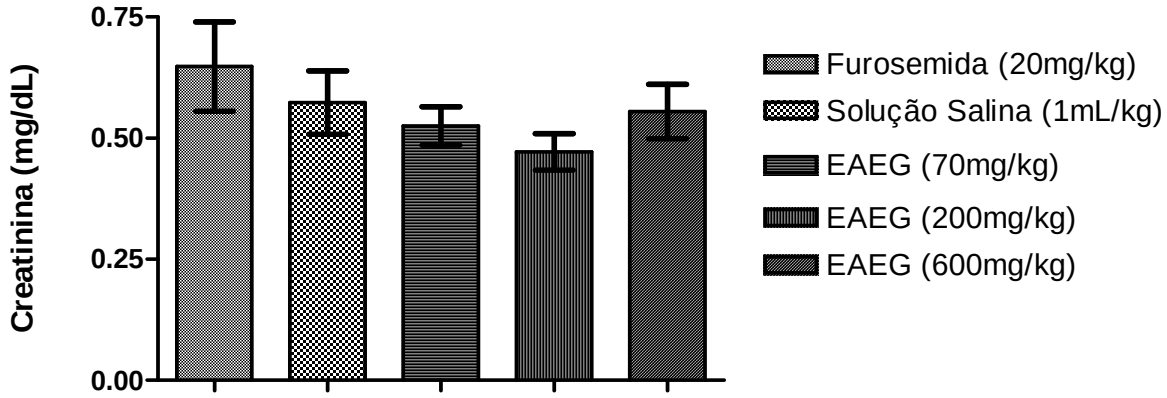


**Figura 7.** Concentração do metabólito creatinina no plasma sanguíneo 24horas após dose única de EAEG (média ± EPM) de ratos *Wistar* machos (n=6), p.o.. EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

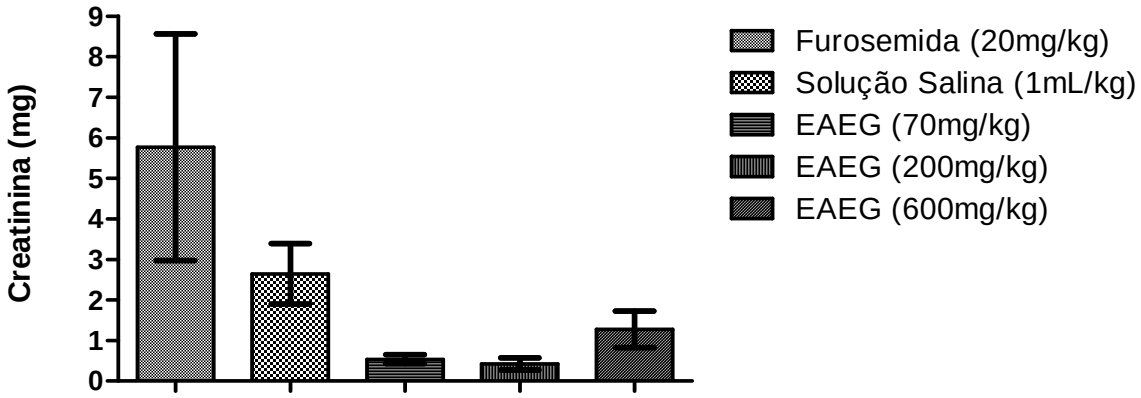


**Figura 8.** Excreção urinária (24h) do metabólito creatinina (média ± EPM) de ratos *Wistar* machos (n=6), p.o.. EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

Exemplificando diferentes metodologias, a partir de pesquisa realizada no portal eletrônico “Periódicos CAPES” utilizando o termo em inglês “diuretic”, trabalhos que investigaram o mecanismo de ação da atividade diurética, Gasparotto et al (2009) avaliaram a atividade diurética e toxicidade aguda da infusão e extrato hidroetanólico de *Tropaeolum majus* (HETM), e possível mecanismo de ação. A

excreção urinária, a concentração de eletrólitos ($Na^+$ e $K^+$), ureia e creatinina foram medidos em ratos pré-tratados com solução salina 0,9%, após dose única e dose repetida por sete dias. Para ganhar algumas provas em um possível envolvimento do sistema de prostaglandinas na ação diurética, a administração oral de HETM (300 mg / kg) em associação a indometacina (5 mg / kg) reduziu o sódio urinário e a excreção urinária, quando comparado somente o grupo HETM. Os resultados sugerem que o mecanismo poderia envolver sistema de prostaglandinas. Zhang et al (2009) avaliaram o efeito diurético da concentração de eletrólitos da urina ($Na^+$, $K^+$ e $Cl^-$) e regulação da expressão relativa de mRNA de aquaporina-1 (AQP1), aquaporina-2 (AQP2), aquaporina-3 (AQP3) e receptor da vasopressina V2 (V2R) após administração de Extrato aquoso de *Polyporus umbellatus* em ratos normais. O Extrato aquoso confirmou ter efeito diurético conspícuo confirmando sua utilização etnofarmacológica. À partir do padrão de excreção de água, sódio, potássio, cloreto, níveis de RNAm de AQP2 e V2R , foi concluído que o extrato tem efeitos a partir da baixa regulação de AQP2 e de V2R.

Ainda a partir da mesma pesquisa, achou-se uma variação na metodologia empregada, com a investigação de atividade diurética em seres humanos por Clare et al (2009). Investigou-se o efeito do extrato hidroetanólico de *Taraxacum officinale* (L.) Weber (Asteraceae) sobre frequência urinária e proporção de excreção (volume de urina: ingestão de líquidos) em mulheres entre 18 e 65 anos. Estes foram estabelecidos dois dias antes da dosagem de 8 mL, durante todo o período de 1 dia de dosagem (a cada 5 horas) e 24 horas após a dosagem, que ocorreu três vezes ao dia a cada 5 horas. O extrato demonstrou resultados promissores como um diurético em seres humanos. Rangineni et al (2007) também estudaram o efeito diurético do pó das folhas de *Eclipta alba* encapsulado em indivíduos portadores de hipertensão do sexo masculino com idade entre 40 e 55 anos. Os sujeitos foram distribuidos em dois grupos, ou seja, um controle e grupo *Eclipta*, e ingeriram seis cápsulas (500mg cada) por dia em três doses iguais durante um período de 60 dias. O volume urinário e elétrólitos na urina ($Na^+$ e $K^+$) foram determinados a cada 15 dias. Houve efeito diurético, com aumento de volume de excreção urinária e excreção urinária de sódio.

Outros trabalhos a partir da mesma pesquisa, como o de Sadki et al (2010) avaliaram o potencial diurético, os efeitos sobre eletrólitos urinários sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) e toxicidade aguda do extrato de flores de *Erica multiflora* L. (Ericaceae) e de rizomas de *Cynodon dactylon* L. (Poaceae) em ratos *Wistar* machos pré- hidratados. A excreção urinária foi medida em intervalos de tempo (1, 2, 4 e 24h) após administração em dose única. Mediu-se o teor de $K^+$ das plantas e o pH urinário de 24h durante o estudo. Os extratos apresentaram efeito diurético e sobre os eletrólitos. Rajamanickam et al (2010) testaram os extratos benzênico e acetato de etila de *Alangium salvifolium* quanto à atividade diurética em ratos albinos de ambos os sexos, determinando o volume total de urina e de $Na^+$, $K^+$ e $Cl^+$ . A coleta foi feita no final de 24h. Houve resultado positivo para atividade diurética, com aumento do volume de excreção urinária e sobre a excreção urinária dos eletrólitos $Na^+$, $K^+$ e $Cl^+$.

Gasparotto et al (2009) e Lahlou et al (2006) avaliaram a atividade diurética em ratos pré-tratados com solução salina 0,9%, após dose única e dose múltipla. O presente trabalho não utilizou a mesma metodologia de administrar Solução Salina 0,9% a todos os animais antes de iniciar o experimento. A administração de Solução Salina 0,9% cria uma condição de equilíbrio hídrico aos animais, ajudando na percepção de resultados. Mas, em relação à avaliação de efeito em dose múltipla, o presente trabalho levou em consideração que o efeito farmacológico pode não ser observado após dose única, sendo necessária a observação de efeito após dose múltipla também, como fizeram os autores acima citados.

## 4.2 TESTE DE ATIVIDADE DIURÉTICA EM DOSE MÚLTIPLA POR OITO DIAS

### 4.2.1 Volumes de excreção urinária diária por oito dias

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa para os volumes de excreção urinária diária por oito dias dos grupos do EAEG (70, 200 e 600 mg/kg, p.o.) em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.). Somente houve diferença significativa entre os valores de volume de excreção urinária diária do grupo controle positivo (furosemida 20 mg/kg, p.o.) e do grupo

controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.), sendo os valores de 13,25±1,38 mL e 4,60±1,21 mL, respectivamente, observados no quarto dia, 9,2±0,58 e 4±0,58 mL, respectivamente, observados no sétimo dia e de 13,80±1,53 mL e 6,00±0,41mL, respectivamente, observados no oitavo dia (Tabela 3 – Apêndice C e Figura 9). Confirmou-se a ausência de atividade diurética do EAEG verificada no experimento de dose única, ou seja, o EAEG não possui seu efeito relacionado ao seu uso contínuo por oito dias.

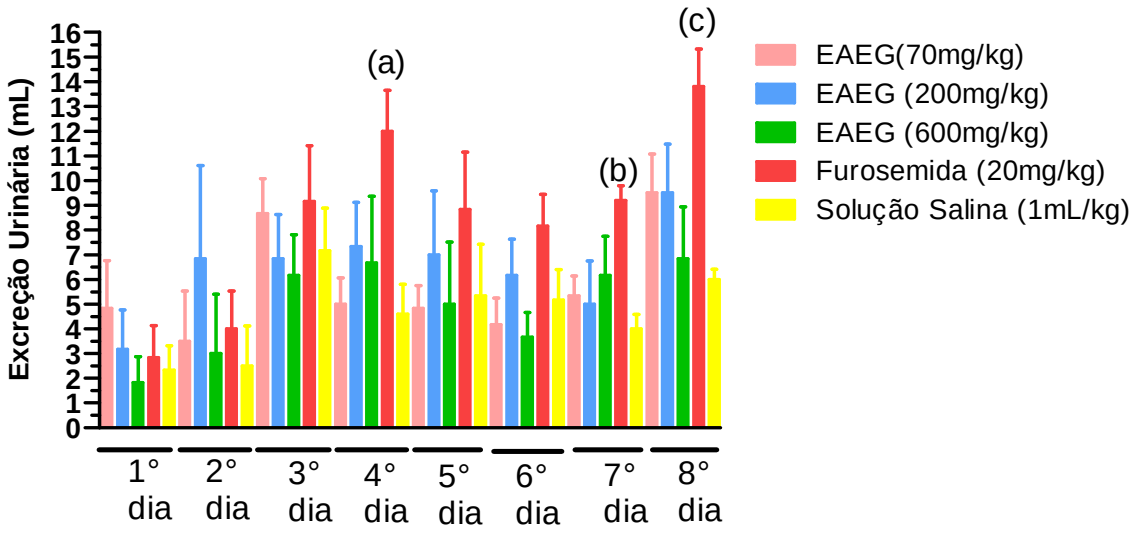


**Figura 9**. Volumes de excreção urinária diária por oito dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. (a) p= 0,0331 (Dunnet) e p= 0,0007 (t de Student), (b) p= 0,0004 (t de Student) e (c) p= 0,0586 (Dunnet) e 0,0031 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

Ao se fazer a análise estatística das excreções diárias acumuladas nos oito dias, o EAEG (70, 200 e 600 mg/kg, p.o.) continuou não apresentando aumento de volume de excreção urinária em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o.). Houve diferença significativa do valor de 8,00 ± 0,73 mL do grupo controle positivo (furosemida 20 mg/kg, p.o.) em relação ao valor de 5,109 ± 0,5729 mL do grupo controle negativo (salina 1 mL/kg, p.o.) (Tabela 3- Apêndice C e

Figura10).

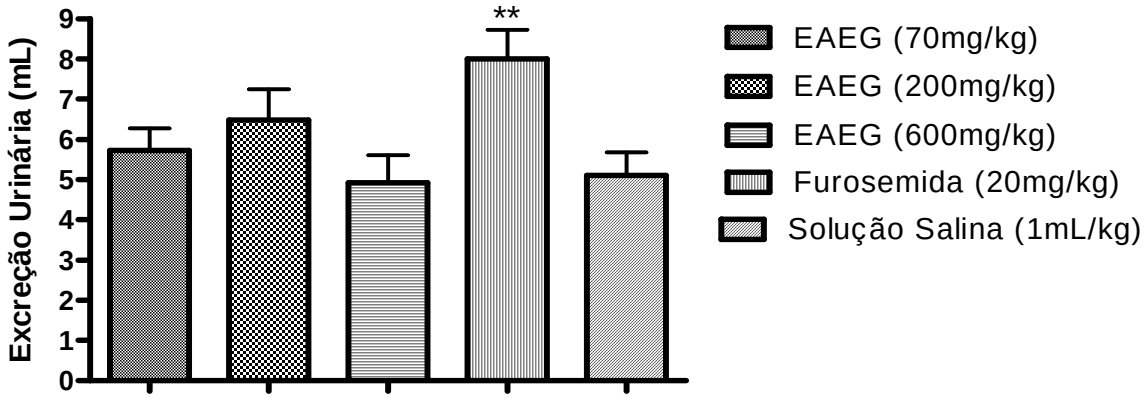


**Figura 10**. Volumes de excreção urinária de 24 h somando os oito dias de ratas *Wistar* (média dos oito dias ± EPM) (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). ** p= 0,0121 (Dunnet) e 0,0055 (t de Student).EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

4.2.2 Excreção urinária e valores de concentração no plasma sanguíneo do metabólito creatinina e dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$)

Não houve diferença significativa para os valores de excreção urinária e concentração no plasma sanguíneo do metabólito creatinina dos grupos em estudo (Tabela 4- Apêndice D e Figuras 11 e 12).

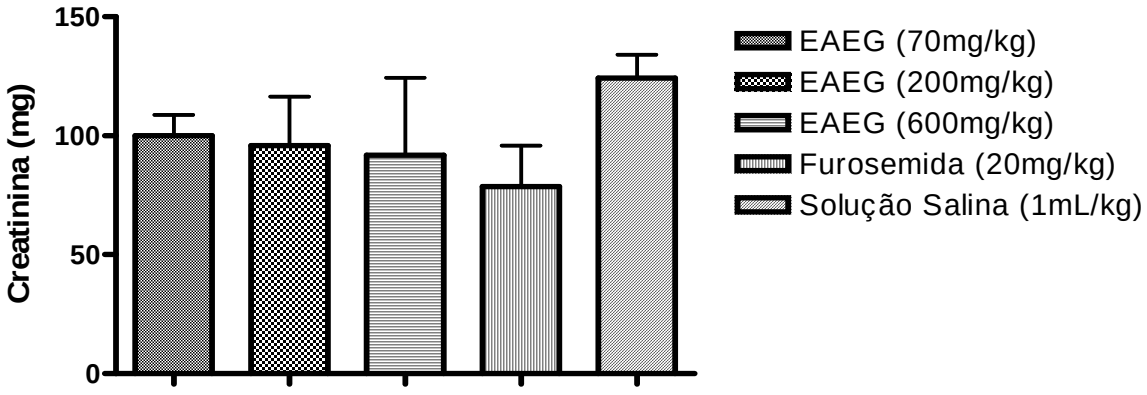


**Figura 11.** Excreção urinária do metabólito creatinina do 8° dia de experimento de ratas *Wistar* (média ± EPM) (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

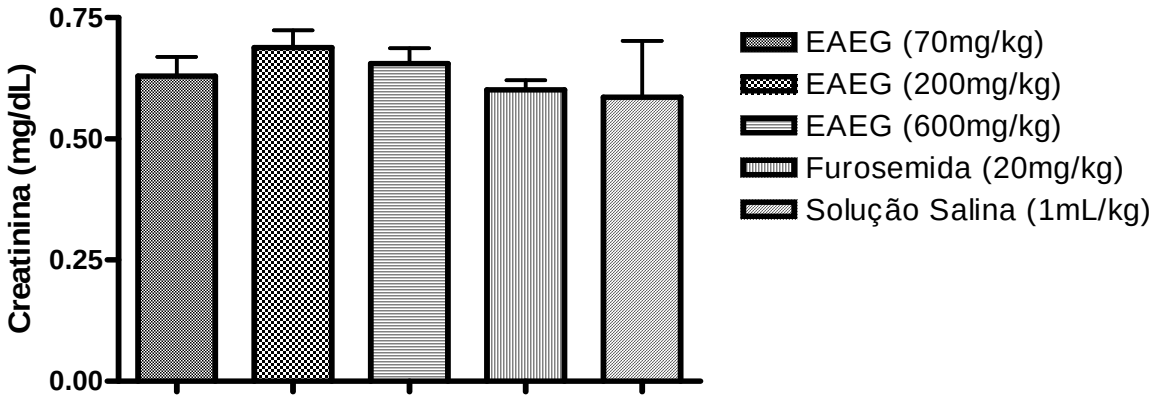


**Figura 12**. Concentração do metabólito creatinina no plasma sanguíneo após administração por 8 dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student ). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

Não houve diferença significativa para os valores de concentração dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) presentes no plasma sanguíneo (Tabela 4-Apêndice D e Figuras 13 e 14). Também não houve diferença significativa para os valores de excreção urinária dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) dos grupos em estudo coletadas diariamente por oito dias, exceto no 4° dia com os valores de 1,15 ± 0,07 mmol do controle positivo (furosemida 20mg/kg) e 0,69 ± 0,13 mmol do controle negativo (solução salina 1 mL/kg, p.o) do eletrólito sódio ($Na^+$). Quando somou-se os valores de excreção urinária dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) de todos os animais dos grupos em estudo coletadas diariamente por oito dias não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 5). Os achados confirmam que o EAEG não possui atividade diurética nestas condições experimentais, pois não apresentou um aumento na excreção urinária de eletrólitos como espera-se para os fármacos diuréticos.

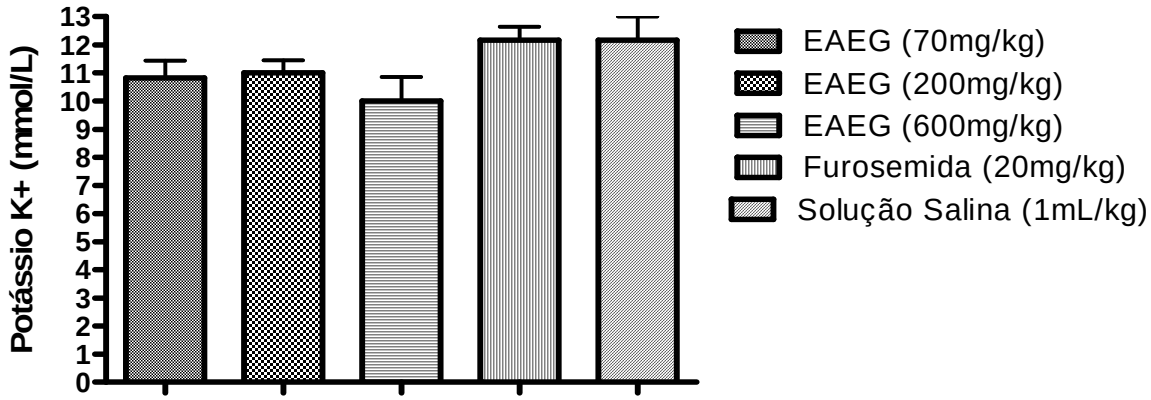


**Figura 13.** Concentração do eletrólito potássio ($K^+$) no plasma sanguíneo após administração por 8 dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. Valores expressos em média ± EPM (n=6)(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

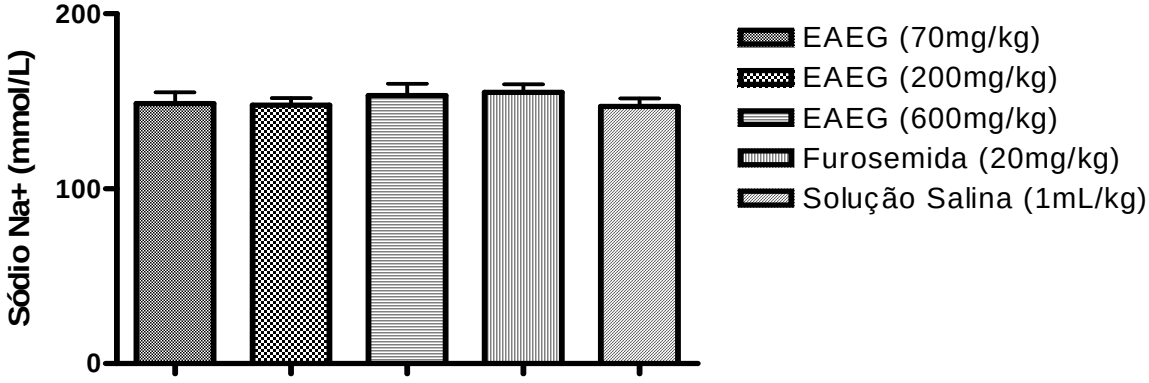


**Figura 14.** Concentração do eletrólito sódio ($Na^+$) no plasma sanguíneo após administração por 8 dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

**Tabela 5.** Excreção urinária diária dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) por oito dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o.(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student).Legenda: Grupo I (tratadas com EAEG, 70mg/kg); Grupo II (tratadas com EAEG, 200 mg/kg); Grupo III (tratadas com EAEG, 600mg/kg), Grupo IV (tratadas com furosemida, 20mg/kg- controle positivo) e Grupo V (tratadas com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo) (*) Estatisticamente significativo em relação à salina, p= 0,0121 (Dunnet) e p= 0,0324 (t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

**Excreção de sódio ($Na^+$), diariamente (mmol)**

| GRUPO | 1ºdia | 2ºdia | 3ºdia | 4ºdia | 5ºdia | 6ºdia | 7ºdia | 8ºdia | Média | Acumulado (8 dias) (+) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I** | 0,77±0,32 | 0,41±0,15 | 0,60±1,13 | 0,50±0,08 | 0,51±0,45 | 0,48±0,13 | 0,87±0,11 | 1,01±0,16 | 0,65±0,06 | 30,52 |
| **II** | 0,31±0,10 | 0,83±0,22 | 0,66±0,17 | 0,89±0,19 | 0,65±0,65 | 0,59±0,2 | 1,00± 0,28 | 1,02±0,26 | 0,73±0,07 | 33,84 |
| **III** | 0,24±0,12 | 0,35±0,16 | 0,56±0,08 | 0,57±0,16 | 0,41±0,01 | 0,40±0,35 | 1,00±0,22 | 1,03±0,39 | 0,57±0,07 | 25,59 |
| **IV** | 0,30±0,13 | 0,64±0,17 | 0,97±0,18 | 1,15±0,13(*) | 0,67±0,69 | 0,83±0,91 | 1,39±0,06 | 2,23±1,07 | 0,87±0,08 | 39,93 |
| **V** | 0,26±0,07 | 0,25±0,10 | 0,86±0,18 | 0,69±0,13 | 0,62±0,57 | 0,71±0,72 | 0,87±0,26 | 1,04±0,24 | 0,67±0,07 | 31,62 |

**Excreção de potássio ($K^+$), diariamente (mmol)**

| GRUPO | 1ºdia | 2ºdia | 3ºdia | 4ºdia | 5ºdia | 6ºdia | 7ºdia | 8ºdia | Média | Acumulado (8 dias) (+) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **I** | 1,35±0,68 | 0,86 ±0,31 | 1,7±0,23 | 1,32±0,30 | 0,96±0,11 | 0,96±0,24 | 1,89± 0,43 | 1,83±0,28 | 1,37±0,13 | 64,35 |
| **II** | 0,57±0,20 | 1,89 ± 0,66 | 1,27±0,29 | 1,72±0,43 | 1,36±0,23 | 1,29±0,18 | 1,75±0,7132 | 0,26±0,06 | 1,27±0,15 | 58,31 |
| **III** | 0,43±0,2 | 0,60 ±0,27 | 1,16±0,22 | 1,06±0,33 | 0,68±0,23 | 0,88±0,24 | 1,50±0,33 | 0,36±0,1 | 0,87±0,10 | 39,02 |
| **IV** | 0,59±0,21 | 0,77±0,32 | 1,73±0,68 | 1,94±0,28 | 1,49±0,37 | 1,82±0,32 | 2,77±0,7 | 0,40±0,04 | 1,46±0,17 | 67 |
| **V** | 0,40±0,1 | 0,48±0,17 | 1,80± 0,35 | 1,42±0,27 | 1,09±0,27 | 1,74±0,56 | 1,89±0,36 | 0,28±0,05 | 1,16±0,14 | 54,35 |

(+) – Valor da somatória da excreção de sódio ou potássio em 8 dias, para 6 animais por grupo.

Um medicamento fitoterápico que pode ser citado como possuindo efeito diurético é o Herbarium ®, cuja forma farmacêutica é cápsula gelatinosa dura, administração via oral, composto pelo extrato seco de *Equisetum arvense* L., Equisetaceae, (Cavalinha), padronizado em 2,0 a 2,5% de flavonóides totais calculados como isoquercitrosídeo. Segundo Paula (2009) as folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent apresentam mucilagem, cumarina e flavonóides. O fato de apresentar flavonóides em suas folhas poderia ser um indicativo que uma possível atividade diurética poderia estar relacionada a estes metabólitos. Entretanto, os flavonóides são um grupo bastante amplo de constituintes, com variadas atividades biológicas.

Wright et al (2007) criticaram, nos artigos analisados em sua revisão, a falta de um grupo controle, a variabilidade na droga vegetal (ou seja, sementes, frutas e folhas), falhas na metodologia, tais como a falta de medir volume urinário e excreção de sódio simultaneamente, não ter alguma variação na duração e doses utilizadas, não saber se os extratos são seguros para consumo humano, quando tomados isoladamente ou com outros alimentos ou drogas, falta de informação sobre o sítio de ação dentro do rim e os efeitos que têm sobre o sistema vascular. O presente trabalho, ao contrário, utilizou um controle positivo (diurético conhecido) e um controle negativo (solução salina 0,9%), utilizou o mesmo extrato utilizado pela população (chá das folhas), investigou os efeitos simultâneos sobre volume urinário e excreção de sódio e também se o extrato pode ser considerado seguro para uso humano.

Deve-se levar em consideração o fato de que *Celtis iguanaea* é utilizado sob a forma de chá e isso pode ser a causa de um efeito diurético falso positivo no uso popular, pelo aumento da ingestão hídrica.

## 4.3 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

### 4.3.1 Morte e alterações comportamentais

Em relação aos camundongos houve morte de uma fêmea no quinto dia de experimento, sendo que a mesma apresentava valor 3 (moderado) de atividade geral, tremores, respiração e ataxia e valor 4 (intenso) para aperto de calda nas

primeiras 24 horas. Os outros camundongos e os ratos não demonstraram mudanças comportamentais anormais durante o estudo, nem foram encontradas alterações macroscópicas nos órgãos durante a necropsia.

De acordo com o Guia 423 (OECD, 2001), em um ensaio de toxicidade aguda no qual não ocorra óbito de mais de um dos seis animais ao ser administrada a dose de 2000 mg/kg, o valor da DL50 pode ser considerado como sendo maior que 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg.

O presente estudo considerou o que é determinado pelo “Guia para a realização de Estudos de Toxicidade Pré- clínica de Fitoterápicos” (RDC n° 90-ANVISA) em relação a diferença de sexo, pois utilizou ambos os sexos, porém desconsiderou o número de seis animais para cada espécie e a utilização de somente uma espécie. A utilização de duas espécies animais neste estudo justifica-se pela possível diferença de resultados entre as espécies, apesar de ambas serem roedores.

A utilização de somente 3 animais por sexo possibilitou a estimativa de DL50 a partir do Guia 423, e a ANVISA não restringe a utilização de métodos alternativos para estimar a DL50 de produtos fitoterápicos, além de o Brasil aceitar as normas da OECD.

A portaria 116/MS/SNVS de 1996 estabelece para Toxicidade de uma dose ou de várias doses administradas no período de 24 horas (toxicidade aguda) que devem ser duas espécies animais: (uma não roedor), dez machos e dez fêmeas (roedores), três machos e três fêmeas (não roedores) (BRASIL, 1996). Em desacordo ao preconizado pela portaria, o presente estudo não utilizou uma espécie não-roedora.

### 4.3.2 Análise de pesos absolutos e relativos (g/100 g de peso vivo) dos órgãos e dos parâmetros fisiológicos

Os ratos machos tratados com EAEG (2000 mg/kg, p.o.) apresentaram rins e coração com pesos absolutos aumentados em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1mL/kg), com valores de 3,12±0,15 g e 1,19±0,072 g dos rins e coração do grupo tratado com EAEG (2000 mg/kg, p.o.) respectivamente, e

2,50±0,07g e 0,97±0,02 g dos rins e coração do grupo controle negativo (solução salina 1mL/kg) respectivamente (Tabela 6).

Os camundongos machos tratados com EAEG (2000 mg/kg, p.o.) também apresentaram rins e coração com pesos absolutos aumentados em relação ao grupo controle (solução salina 1mL/kg), com valores de 0,64± 0,05g e 0,29 ± 0,009 g dos rins e coração do grupo tratado com EAEG respectivamente, e 0,48 ± 0,03 g e 0,2 ± 0,02 g dos rins e coração do grupo controle negativo (salina 0,9%) respectivamente (Tabela 6). Estes achados sugerem cardiotoxicidade e nefrotoxicidade relacionadas ao sexo masculino, após a dose e via utilizadas do extrato, porém os valores relativos de peso dos órgãos (g/100g de peso corporal) não apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle (Tabela 7).

O monitoramento dos parâmetros fisiológicos no último dia de cada semana do experimento não sugeriram alteração no comportamento dos animais (Tabela 8). O valores pequenos encontrados para o grupo de ratas e camundongos machos tratados com o controle negativo (Sol. Salina 0,9%, p.o.) podem ser explicados por questões de manipulação dos animais, o que pode ter gerado estresse aos mesmos, alterando os parâmetros fisiológicos.

**Tabela 6.** Pesos absolutos dos órgãos e evolução ponderal (média ± EPM) de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* (n=3), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (animais machos, tratados com solução salina, 1 mL/kg – controle); Grupo II (machos, tratados com EAEG 2000 mg/kg); Grupo III (fêmeas, tratadas com solução salina, 1 mL/kg – controle) e Grupo IV (fêmeas, tratadas com EAEG 2000 mg/kg). (a) p= 0,0053, (b) p= 0,0082, (c) p= 0,0198, (d) p= 0,049 e (e) 0,0179. (t de Student) EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

| **Pesos absolutos dos órgãos dos ratos e ganho corporal** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **GRUPO** | **Fígado (g)** | **Rins (g)** | **Coração (g)** | **Baço (g)** | **Evolução ponderal (X±EPM) (g)** |
| **I** | 12,73±1,16 | 2,50±0,07 | 0,97±0,2 | 0,67±0,03 | 13,17±0,88 |
| **II** | 13,57±1,250 | 3,12±0,15(a) | 1,19±0,07(b) | 0,87±0,08 | 21, 50±3,75 |
| **III** | 9,33±1,05 | 1,90±0,06 | 0,80±0,02 | 0,58±0,07 | 1,83±1,45 |
| **IV** | 8,04±0,29 | 1,95±0,04 | 0,83±0,03 | 0,64±0,05 | 8,00±0,76(c ) |
| **Pesos absolutos dos órgãos dos camundongos e ganho corporal** | | | | | |
| **GRUPO** | **Fígado (g)** | **Rins (g)** | **Coração (g)** | **Baço (g)** | **Evolução ponderal (X±EPM) (g)** |
| **I** | 1,92±0,11 | 0,48±0,03 | 0,2±0,02 | 0,08±0,01 | -1,17±2,40 |
| **II** | 1,87 ±0,15 | 0,64±0,05(d) | 0,29±0,009(e) | 0,10 ±0,01 | 5,17±2,95 |
| **III** | 1,60±0,04 | 0,32±0,11 | 0,25 ±0,09 | 0,15 ±0,02 | 4,17±1,96 |
| **IV** | 1,44 ±0,14 | 0,37 ±0,15 | 0,18 ±0 | 0,11 ±0,06 | 1,50±0,50 |

**Tabela 7.** Pesos relativos aos pesos corporais dos órgãos (média ± EPM) de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* (n=3), p.o..(ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student) Legenda: Grupo I (animais machos, tratados com solução salina, 1 mL/kg – controle); Grupo II (machos, tratados com EAEG 2000 mg/kg); Grupo III (fêmeas, tratadas com solução salina, 1 mL/kg – controle) e Grupo IV (fêmeas, tratadas com EAEG 2000 mg/kg). (a) p= 0,0059 e (b) p= 0,0160. (t de Student) EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

| **Peso relativo de órgãos (g/100 g peso vivo) (ratos)** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **GRUPO** | **Fígado** | **Rins** | **Coração** | **Baço** |
| **I** | 4,62±0,29 | 0,91±0,0007 | 0,35±0,01 | 0,24±0,013 |
| **II** | 4,14±0,32 | 0,95 ±0,03 | 0,36±0,02 | 0,32±0,03 |
| **III** | 4,72±0,49 | 0,96±0,0004 | 0,40±0,004 | 0,29±0,03 |
| **IV** | 3,49±0,18 | 0,85±0,02(a) | 0,36±0,008 | 0,9±0,60 |
| **Peso relativo de órgãos (g/100 g peso vivo) (camundongos)** | | | | |
| **GRUPO** | **Fígado** | **Rins** | **Coração** | **Baço** |
| **I** | 6,39± 0,27 | 1,6±0,07465 | 0,66 ±0,09 | 0,28±0,05 |
| **II** | 4,15±0,28 | 1,43±0,10 | 0,65±0,04 | 0,22±0,02 |
| **III** | 6,59±0,29 | 1,35±0,49 | 0,58±0,09 | 0,60±0,07 |
| **IV** | 4,56±0,23(b) | 1,19 ±0,009 | 0,57±0,03 | 0,35±0,19 |

**Tabela 8**. Consumo de água, ração e produção de excretas, medidos nos 7° e 14° dias do confinamento (média ± EPM) de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* (n=3), p.o.. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (animais machos, tratados com EAEG 2000 mg/kg), Grupo II (animais machos, tratados com solução salina, 1 mL/kg – controle); Grupo III (fêmeas, tratadas com EAEG 2000 mg/kg) e Grupo IV(fêmeas, tratadas com solução salina, 1 mL/kg – controle).(*) Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,05$). ** Estatisticamente significativo em relação à salina ($p< 0,01$). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

**Consumo de ração e produção de excretas (ratos)**

| | **I** | | **II** | | **III** | | **IV** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7° dia | 14° dia | 7° dia | 14° dia | 7° dia | 14° dia | 7° dia | 14° dia |
| **Ração (g)** | 69 | 58 | 59 | 62 | 43 | 38 | 46 | 4 |
| **Excretas (g)** | 29 | 26 | 36 | 53 | 25 | 30 | 41 | 5 |

**Consumo de ração e produção de excretas (camundongos)**

| | **I** | | **II** | | **III** | | **IV** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7° dia | 14° dia | 7° dia | 14° dia | 7° dia | 14° dia | 7° dia | 14° dia |
| **Ração (g)** | 20 | 19 | 18 | 5 | 12 | 8 | 13 | 18 |
| **Excretas (g)** | 12 | 10 | 4 | 1 | 2 | 3 | 7 | 5 |

### 4.3.3 Análise histopatológica

Os exames histopatológicos (de peso e microscópico) dos grupos tratados revelaram integridade tecidual do fígado, pulmão, coração, baço, pâncreas, intestino grosso e intestino delgado (Tabelas 10 e 11 Apêndice). Porém, os animais do grupo tratado com EAEG 2000mg/kg p.o. tiveram alterações patológicas do rim de rato macho após análise microscópica, apresentando hiperemia, infiltrado inflamatório e cilindros hialinos no glomérulo, com atenção especial para esta cilindrúria, apesar desta não apresentar diferença estatisticamente significativa de acordo com a escala de pontuação utilizada (P=0,067, Teste t de Student) (Figura 15 e Tabela 10 Apêndice).

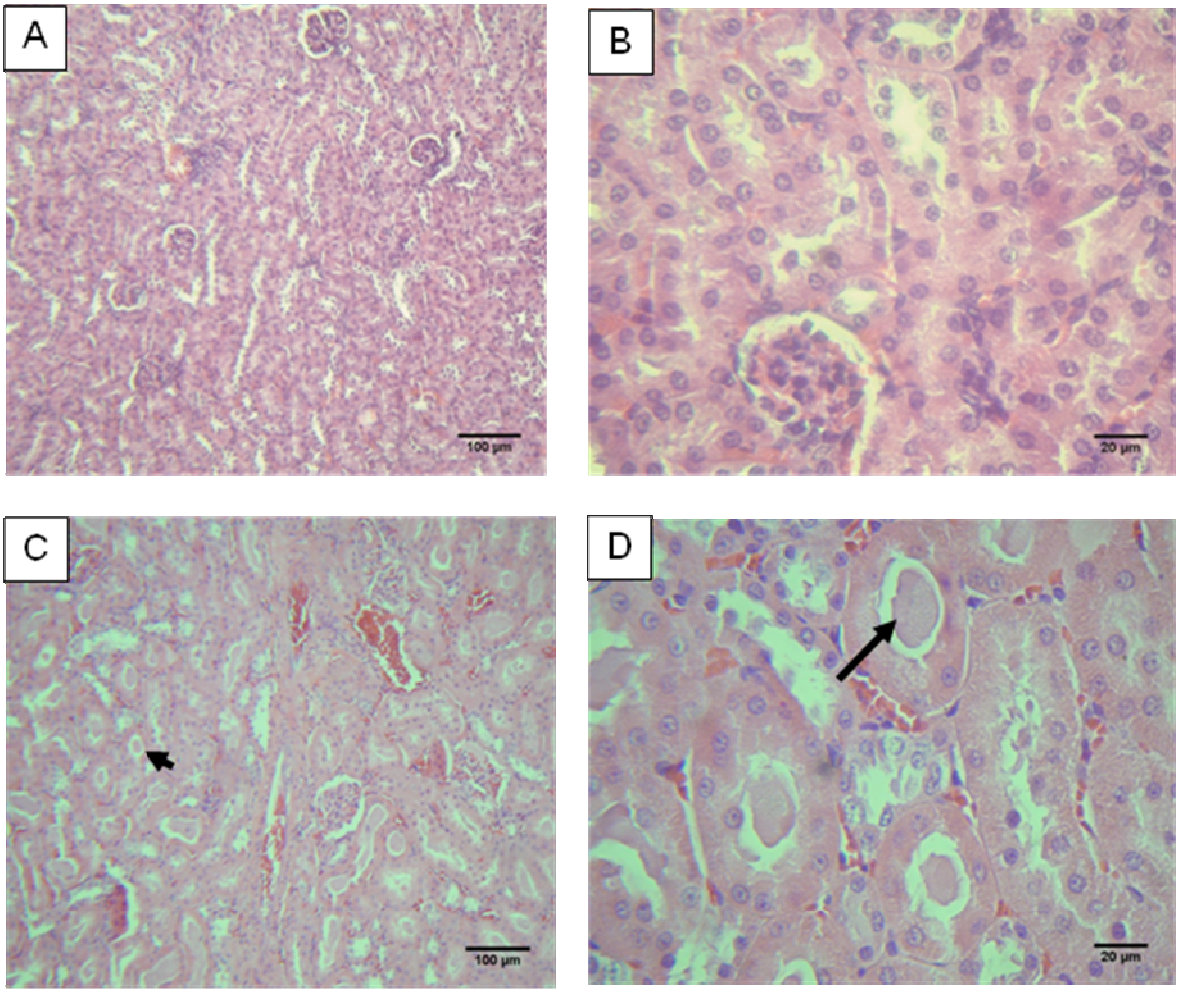


**Figura 15.** Fotomicrografia de rim de ratos da linhagem *Wistar* machos submetidos ao tratamento com EAEG 2000mg/kg e solução Salina 1mL/kg. Em (A) Rim de rato controle com aspecto normal (H&E, escala = 100µm); em (B) aumento da figura anterior (H&E, escala = 20µm); em (C) Rim de rato tratado apresentando cilindros hialinos (seta) (H&E, escala = 100µm); em (D) aumento da figura anterior destacando os cilindros hialinos (seta) (H&E, escala = 20µm).

O glomérulo é o local inicial da exposição a substâncias químicas dentro do néfron, e uma série de nefrontoxicantes podem produzir lesões neste local. Em certos casos, os produtos químicos alteram a permeabilidade glomerular às proteínas, alterando as tamanho e carga- seletiva funções. Imunocomplexos circulantes podem ser aprisionados dentro dos glomérulos podendo resultar em ativação do complemento, a atração dos neutrófilos e fagocitose. Neutrófilos e macrófagos são comumente observados no glomérulo na glomerulonefrite membranosa e, a liberação local de citocinas e espécies reativas de oxigênio, podem contribuir para a lesão glomerular. Reações de anticorpos com antígenos de superfície da célula podem levar à formação de depósitos imunes no glomérulo e após, a lesão do tecido glomerular (KLAASSEN, 2007). Na glomerulonefrite são

encontrados numerosos cilindros (hialinos, granulosos e hemácicos), células renais e alguns leucócitos, além de franca hematúria e albuminúria (LIMA, et al, 2001).

A Resolução 90 da ANVISA de 2004 e Guia 423 da OECD (OECD, 2001) determinam que os exames histopatógicos sejam feitos somente se houver alterações macroscópicas nos órgãos, mas o presente estudo realizou a investigação histopatológica mesmo os órgãos não apresentando alteração macroscópica, afim de aumentar a possibilidade de detectar alguma possível toxicidade.

# 5. CONCLUSÕES

O Extrato aquoso de esporão-de-galo nas suas três doses (70, 200 e 600 mg/kg) não apresentou atividade diurética em esquemas de dose única e múltipla, em ratos, por via oral, no intervalo de doses e no modelo experimental utilizado.

O Extrato aquoso de esporão-de-galo foi classificado na Classe 5 (substância com DL50 superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerado de baixa toxicidade e apresentou discretos sinais de nefrotoxicidade e cardiotoxicidade em ratos e camundongos machos na dose de 2000 mg/kg, que necessitam de estudos específicos e mais detalhados.

# 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro,** v 18, p 227–230, 2004.

BRASIL. Casa civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 09 de outubro de 2008. Seção 1. Página 1.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **Assistência Farmacêutica no SUS / Conselho Nacional de Secretários de Saúde**. – Brasília : CONASS, 2011. 186 p. (Coleção Para Entender a Gestão do SUS 2011, 7).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n° 5 de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2008. Seção 1. Página 56.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n° 5 de 31 de março de 2010. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 de abril de 2010. Seção 1. Página 91.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Seção 1. Página 39.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 88, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 18 de março de 2004. Seção 1. Página 32.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 89, de 16 de março de 2004. Determina a publicaç ão da "Lista de Registro Simplificado de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 18 de março de 2004. Seção 1. Página 32.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).. Resolução - RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação de normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 18 de março de 2004. Seção 1. Página 34.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução - RE 91, de 16 de março de 2004.Determina a publicação do " Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós registro de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 18 de março de 2004. Seção 1. Página 35.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução – RDC 14 de 31 de março de 2010. Estabelece os requisitos mínimos para registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF. Brasília, DF, 05 de abril de 2010. Seção 1. Página 85.

BRASIL. **Decreto n° 5.813, de 22 de junho de 2006** . Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em: http:// www.planalto.gov.br/ccivil03/Ato2004-2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em: 02 de dezembro de 2010.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 04 mai. 2006. Seção 1. Página 20.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116 de 08 de Agosto de 1996. Publica proposta de normas para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil],** Brasília, DF, 12 de ago. 1996. Seção 1. Página 15199.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131–134, 2005.

CAPASSO R., et al Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71 S58- S65, 2000.

CARVALHO, A. C. B. et al Situação do registro de medicamentos fi toterápicos no Brasil**. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 314-319, Abr./Jun. 2008.

CLARE, B.A.; CONROY, R.S.; SPELMAN, K. The Diuretic Effect in Human Subjects of an Extract of Taraxacum officinale Folium over a Single Day. **The journal of alternative and complementary medicine,** v. 15, n. 8, p. 929–934, 2009.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e exóticas cultivadas**. Brasilia, [D.F.] : Ministerio da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 6, p. 465 - 466, 1984.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 6, p. 465 -466, 1969-1978.

FERRO, D. **Fitoterapia**: conceitos clínicos. São Paulo: Editora Athneu, 502p, 2006.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anesthesia**. New York: Academic Press, 1996.

GIEHL, E. L. H.; JARENKOW, J. A. Structural gradient of the tree component and relationship with flooding in a riverine forest, Rio Uruguai, southern Brazil. **Bot. Bras**., v.22, n. 03, 2008.

GASPAROTTO J. A. et al Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.517–522, 2009.

GILANI, A. H.; ATTA, U.R. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.43–49, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

RANG, H.P. et al **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 23, p. 402- 418, 2004.

HAYES, W. A.; DiPASQUALE, L.C. Acute toxicity and eye irritance. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology.** 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

HEYWOOD, V.H. **Flowering Plants of the World**. Batsford, London, 336 p, 1993.

JUNQUEIRA, LCU; JUNQUEIRA, LMMS. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia**: básica e clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.15, p.203 -217, 2005.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology:** The Basic Science of Poisons, 7. ed. Portugal: Mc Graw-Hill, 2007.

KESTER, M. et al **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 9, p. 153- 161, 2008

KOHN, D. F. et al **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. New York: Academic Press, 1997.

LAHLOU, S.; A. TAHRAOUI; Z. ISRAILI; B. LYOUSSI. Diretic activity of aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum* vulgare in normal rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n.5, 2006.

LAPA, J. A. et al Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C. M. O. ; SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. 1102p.

LIMA, A.O. et al **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. Técnica e Interpretação**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LOPES, A.A.; MARTINELLI, R. Fármacos Diuréticos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 71, p. 717 - 727, 2006.

MALONE, M.H., R.C. ROBICHAUD. **Lloydia**, v. 25, p. 23-53, 1962.

MALONE, M. H. – Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity.** Berlin: H. Wagner, Wolf Springer–Verlag, 1977.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1987. OECD 401.**Acute Oral Toxicity**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2001. OECD 420. **Acute Oral Toxicity—Fixed Dose PrOECDure**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2001. OECD 423. **Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2001. OECD 425. **Acute Oral Toxicity—Modified Up and Down PrOECDure**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

PAULA, M.A. **Caracterização farmacognóstica e atividade gastroprotetora do Extrato aquoso das folhas de C*eltis iguanaea* (Jacq.) Sargent. 2009**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. Brasilia: Thesaurus, 373p, 1994.

PUCCI, L. L. ; CUNHA, L.C.; TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R. de; BOZINIS, M. C.V.; FREITAS, P. C. M. de. Avaliação da Toxicidade Aguda Oral e da Atividade Diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (congonha-de-bugre). Latin American Journal of Pharmacy, v. 29, n.1, p. 30-7, 2010.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences,** v.43, n.2, p.86-101, 1998.

RAJAMANICKAM, V. Diuretic activity of *Alangium salvifolium* sub.sp.hexapetalum. **Journal of Alternative Medicine**, v. 8, n.1, p 8-8, 2010.

RANGINENI, V.; SHADARA, D.; SAXENA, S. Diuretic, Hypotensive, and Hypocholesterolemic Effects of *Eclipta alba* in Mild Hypertensive Subjects: A Pilot Study. **Journal of Medicinal Food,** v. 10, n.1, p.143–148, 2007.

SADKI, C. et al Acute diuretic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers and *Cynodon dactylon* rhizomes extracts in rats.**Journal of Ethnopharmacology,** v. 128, n. 2, p352-356, 2010.

SILVA, C. S. P.; PROENÇA, C. E. B. Use and availability of medicinal resources in Ouro Verde de Goiás, Goiás State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 02, 2008.

SIMÕES, C. M. O. ; SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. 1102p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para a identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII, 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium, p. 704, 2008.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.1,p. 23-28, 2006.

WRIGHT, C. I. et al Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology,** v.114, 2007.

VEIGA, J.V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL ”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.2, p. 93-98, 2006.
50

ZHANG, G. et al Diuretic activity and kidney medulla AQP1, AQP2, AQP3, VR2 expression of the aquous extract of sclerotia of Polyporus umbellatus FRIES in normal rats. **Journal of Ethnopharmacology,** v.128, p.517–522, 2009.

# APÊNDICE

APÊNDICE A- **Tabela 1.** Volumes de excreção urinária durante 24h (média ± EPM) de ratos *Wistar* machos (n=6), p.o.. (a) p=0,0011(Dunnet) e p=0,0158 (t de Student), (b) p= 0,0009 (Dunnet) e p= 0,0192 (t de Student), (c) p= 0,0005 (Dunnet) e p= 0,024 (t de Student), (d) p=0,0008 (Dunnet) e p=0,0240 (t de Student) e (e) p= 0,0007 (Dunnet) e p= 0,0326 (t de Student). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

| GRUPO | 1h | 2h | 3h | 4h | 6h | 8h | 12h | 24h | Acum. 24 h (+) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 2,35± 0,75 | 5,72± 1,28(a) | 7,47± 1,77(b) | 8,77± 1,75(c) | 8,77± 1,75(d) | 9,22± 1,84(e) | 9,98± 1,86 | 13,22± 2,74 | 79,3 |
| II | 0,93± 0,43 | 1,57± 0,63 | 2,02± 0,84 | 3,38± 1,01 | 3,38± 1,01 | 4,03± 0,98 | 5,13± 1,23 | 11,17± 2,23 | 67 |
| III | 1,40± 0,44 | 2,27± 0,66 | 2,72± 0,55 | 3,05± 0,66 | 3,55± 0,42 | 4,30± 0,41 | 6,07± 0,97 | 14,05± 3,04 | 84,3 |
| IV | 0,5333± 0,08 | 0,65± 0,11 | 1,07± 0,05 | 1,133± 0,2963 | 1,13± 0,3 | 1,25± 0,29 | 1,63± 0,33 | 3,80± 0,56 | 22,8 |
| V | 0,90± 0,08 | 2,03± 0,63 | 2,68± 0,67 | 3,60± 1,00 | 3,85± 1,23 | 4,42± 1,15 | 4,58± 1,99 | 13,30± 2,61 | 72,8 |

(+) – Valor da somatória dos volumes de urina (mL) em 24h, para 6 animais por grupo.

APÊNDICE B- **Tabela 2.** Excreção urinária dos metabólitos ureia e creatinina e concentração dos metabólitos ureia e creatinina no plasma sanguíneo de ratos *Wistar* machos após dose única de EAEG (média ± EPM) (n=6), p.o. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student).Legenda: Grupo I (tratados com furosemida, 20mg/kg- controle positivo); Grupo II (tratados com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo); Grupo III (tratados com EAEG, 70mg/kg), Grupo IV (tratados com EAEG, 200mg/kg) e Grupo V (tratados com EAEG, 600mg/kg). (a) p< 0,0001 (Dunnet) e p= 0,0048 (t de Student) (b) p= 0,0065 (Dunnet) e p= 0,0363 (t de Student). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

| GRUPO | Creatinina Urina (mg) | Creatinina Plasma (mg/dL) | Ureia Urina (mg) | Ureia plasma (mg/dL) |
|---|---|---|---|---|
| I | 5,76±2,79 | 0,65±0,092 | 30,12±7,86(a) | 66,95±4,08 |
| II | 2,64±0,75 | 0,57± 0,06 | 3,07±1,25 | 62,72±4,83 |
| II | 0,54±0,11 | 0,52± 0,1 | 2,90±0,71 | 60,70±3,44 |
| IV | 0,42±0,15 | 0,47±0,038 | 1,48±0,58 | 36,72±9,62 (b) |
| V | 1,27±0,45 | 0,55±0,05 | 2,03±0,61 | 54,47±2,93 |

APÊNDICE C - **Tabela 3.** Volumes de excreção urinária diária por oito dias (média ± EPM) de ratas *Wistar* (n=6), p.o. (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (tratadas com EAEG, 70mg/kg); Grupo II (tratadas com EAEG, 200 mg/kg); Grupo III (tratadas com EAEG, 600mg/kg), Grupo IV (tratadas com furosemida, 20mg/kg- controle positivo) e Grupo V (tratadas com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo) (a) p= 0,0331 (Dunnet) e p= 0,0007 (t de Student) (b) p= 0,0004 (t de Student) (c) p= 0,0586 (Dunnet) e p= 0,0031 (t de Student) (d) p= 0,0121 (Dunnet) e p= 0,0055 (t de Student) e (e) p= 0,0121 (Dunnet) e p= 0,0055 (t de Student.EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

| | **1° dia** | **2 °dia** | **3° dia** | **4° dia** | **5° dia** | **6° dia** | **7° dia** | **8° dia** | **Média** | **Acumulado 8 dias** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **GRUPO** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL)** | **Vol.Urina (mL)** | **Vol. Urina (mL) (+)** |
| **I** | 4,83±1,92 | 3,50±2,02 | 8,67±1,41 | 5,00±1,06 | 4,83±0,91 | 4 ,17±1,08 | 5,33±0,80 | 9,5±1,56 | 5,73±0,55 | 275 |
| **II** | 3,167±1,6 | 6,83±3,77 | 6,83±1,8 | 7,33±1,78 | 7,00±2,58 | 6, 17±1,47 | 5,00±1,75 | 9,5±1,98 | 6,48±0,76 | 311 |
| **III** | 1,83±1,05 | 3,00±2,41 | 6,17±1,64 | 6,67±2,70 | 5,00±2,50 | 3 ,67±0,98 | 6,17±1,58 | 8,2±1,96 | 4,91±0,69 | 236 |
| **IV** | 2,83±1,30 | 4,00±1,53 | 9,17±2,24 | 13,25±1,38(a) | 8,83±2,31 | 8,17±1,28 | 9,20±0,58 (b) | 13,8±1,53 (c) | 8,00±0,73 (d) | 384 (e) |
| **V** | 2,33±0,99 | 2,50±1,63 | 7,17±1,72 | 4,60±1,21 | 5,33±2,09 | 5 ,17±1,22 | 4,00±0,58 | 6,00±0,41 | 5,11±0,57 | 245 |

(+) – Valor da somatória dos volumes de urina em 8 dias, para 6 animais por grupo.

APÊNDICE D**- Tabela 4.** Excreção urinária e concentração no plasma sanguíneo do metabólito creatinina, e concentração no plasma sanguíneo dos eletrólitos sódio ($Na^+$) e potássio ($K^+$) de ratas *Wistar* após administração repetida de EAEG (n=6), p.o.. Valores expressos em média ± EPM (n=6). (ANOVA, teste de Dunnett e teste t de Student). Legenda: Grupo I (tratados com furosemida, 20mg/kg- controle positivo); Grupo II (tratados com Sol. Salina, 1mL/kg- controle negativo); Grupo III (tratados com EAEG, 70mg/kg), Grupo IV (tratados com EAEG, 200mg/kg) e Grupo V (tratados com EAEG, 600mg/kg). EAEG= Extrato aquoso das folhas de esporão-de-galo.

| **GRUPO** | **Creatinina urinária 8° dia (mg)** | **Creatinina plasma (mg/dL)** | **$Na^+$plasma (mmol/L)** | **$K^+$ plasma (mmol/L)** |
|---|---|---|---|---|
| **I** | 7,80 ± 4,45 | 0,60±0,04 | 148,83±6,31 | 10,83±5,32 |
| **II** | 2,57±0,6 | 0,69±0,03 | 147,83±4,028 | 11,00±0,45 |
| **III** | 4,93±1,59 | 0,65±0,03 | 153,3±6,68 | 10,00±0,86 |
| **IV** | 3,88±0,76 | 0,60±0,019 | 155,0±4,76 | 12,17±0,48 |
| **V** | 1,2±0,53 | 0,58±0,12 | 147,0±4,55 | 12,17±0,83 |

APÊNDICE E**- Tabela 9.** Intensidade de lesão dos órgãos de ratos *Wistar.* EAEG= Extrato aquoso de esporão-de-galo. 0= ausente, 1=discreto, 2=moderado e 3=intenso.

| | **Machos (Sol. Salina)** | | | **Fêmeas (Sol. Salina)** | | | **Machos (EAEG 2000 mg/kg)** | | | **Fêmeas (EAEG 2000 mg/kg)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| **Fígado** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Infiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Pulmão** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 0 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 |
| Infiltrado inflamatório | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Colapso | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| **Rim** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| Infiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Cilindrúria | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Coração** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Congestão | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Baço** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| Imfiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Pâncreas** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Int. Grosso** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Int. Delgado** | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Infiltrado inflamatório | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

APÊNDICE F- **Tabela 10.** Intensidade de lesão dos órgãos de camundongos *Swiss.* EAEG= Extrato aquoso de esporão- de- galo. 0= ausente, 1=discreto, 2=moderado e 3=intenso.

| | **Machos (Sol. Sal.)** | | | **Fêmeas (Sol. Sal.)** | | | **Machos (EAEG 2000mg/kg)** | | | **Fêmeas (EAEG 2000 mg/kg)** | | | **Fêmeas (EAEG 2000 mg/kg)** | | | **Machos (EAEg 2000 mg/kg)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| **Fígado** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Pulmão** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Colapso | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Rim** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cilindrúria | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Coração** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Congestão | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Baço** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Imfiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Pâncreas** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Int. Grosso** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Int.Delgado** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hiperemia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltrado inflamat. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |