



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE TOXICIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO  
FRUTO DE *DILLENIA INDICA* PADRONIZADO EM ÁCIDO BETULÍNICO E  
ADMINISTRADO TOPICAMENTE EM CAMUNDONGOS**

Palhoça/SC

2017

**FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE TOXICIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO  
FRUTO DE *DILLENIA INDICA* PADRONIZADO EM ÁCIDO BETULÍNICO E  
ADMINISTRADO TOPICAMENTE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Maicon Roberto Kwiecinski, Dr.

Palhoça/SC

2017

**FLÁVIA DE SOUZA FERNANDES**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE TOXICIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO  
FRUTO DE *DILLENIA INDICA* PADRONIZADO EM ÁCIDO BETULÍNICO E  
ADMINISTRADO TOPICAMENTE EM CAMUNDONGOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Palhoça/SC, 13 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:

---

Orientador: Prof. Dr. Maicon Roberto Kwiecinski

Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis

Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Profa Dra. Karina Bettega Felipe

Universidade Federal do Paraná

Aos meus pais, Aníbal Costa Almeida e Terezinha de Souza Fernandes, que me adotaram e juntos construímos uma família, baseada no amor e consideração que criamos uns pelos outros. Aos meus irmãos: Maria Aparecida de Souza Raimundo, Aníbal de Souza Fernandes e Flávio de Souza Fernandes Almeida. Meus irmãos de corpo, alma e coração. Esse amor será eterno!

## **AGRADECIMENTOS**

A meu querido e amado esposo, Alexandre Vanzuita, por ser tão presente na minha vida. Por estar sempre ao meu lado, incentivando-me a prosseguir na vida acadêmica e fazendo-me acreditar que posso mais que imagino. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho. Amo-te!

Aos amores da minha vida, Miriã Tamilli Fernandes Lemonie e Sarah Stefani Fernandes Lemonie que embora não tenham conhecimento do que é uma dissertação, mas iluminaram de maneira especial os meus pensamentos, levando-me a buscar mais conhecimentos.

À Universidade do Sul do Estado de Santa Catarina - UNISUL onde encontrei um ambiente acolhedor e com ótima infra-estrutura.

Ao programa do Estado de Santa Catarina, executado pela Secretaria da Educação que agrega o Programa de Bolsas do Fundo de apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior UNIEDU/FUMDES por proporcionar-me minha bolsa de mestrado.

Aos Professores, Professor. Dr. Luiz Alberto Kanis e Professora Dra. Karina Bettega Feliipe por aceitarem avaliar esta dissertação e contribuírem com suas sugestões e análises significativas. Especialmente ao Professor Dr. Maicon Roberto Kwiecinski, meu orientador, que com tanta presteza e dedicação orientou-me com sabedoria. Sempre disponível e disposto a ajudar-me, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do Programa para absorver algum tipo de conhecimento. Obrigada por não permitir que desistisse e pela confiança.

Aos colegas de turma, que contribuíram de alguma forma na minha passagem pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, especialmente a minha amiga Isabela Machado David, com quem convivi com muita alegria, fazendo-me sentir a leveza da vida, mesmo em momentos tão tensos. A colega Maria Biatriz Rodrigues Kopper que contribuiu muitíssimo com os resultados da presente dissertação. Nossas histórias de laboratório ficarão guardadas.

“Só existe saber na invenção, na reinvenção, na busca inquieta, impaciente, permanente, que os homens fazem no mundo, com o mundo e com os outros. Busca esperançosa também<sup>1</sup>”.

## RESUMO

**Introdução:** A literatura apresenta muitos estudos de eficácia de extratos de *Dillenia indica* Linn. (Dileniaceae) para tratar várias enfermidades. Por outro lado, havia escassez de estudos de toxicidade.

**Objetivo:** Avaliar em fase pré-clínica a toxicidade sistêmica do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* padronizado em ácido betulínico e administrado topicamente em camundongos.

**Métodos:** Primeiro, camundongos foram divididos: grupo teste tratado com extrato (150 mg/mL), controle positivo tratado com clobetasol (0,5 mg/mL) e controle negativo tratado com excipiente, diariamente por 10 dias (N = 20, machos e fêmeas 1:1). Foi avaliada mortalidade, agressividade, piloereção, diarreia, convulsões, contorções abdominais, consumo de ração e água, o peso dos animais e órgãos, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Foram realizados os teste de campo aberto e força de preensão. Com outros animais, foram formados quatro grupos, como anteriormente, incluindo um grupo *naïve* tratado com excipiente e controle positivo tratado com metoxipsoraleno 1% (doses únicas). Meia hora depois, os animais foram expostos à radiação ultravioleta em dose mínima de eritema, sendo julgado o efeito fotossensibilizante.

**Resultados:** Não foi observado mortalidade, agressividade, piloereção, diarreia, vômito, contorções abdominais, convulsões e alterações neuromotoras. O ganho médio de peso corporal foi  $1,2 \pm 0,3$  g. O peso médio do fígado foi  $1,5 \pm 0,1$  g, coração ( $0,14 \pm 0,01$  g), baço ( $0,07 \pm 0,01$  g), rins ( $0,53 \pm 0,05$  g), o consumo de água ( $223,2 \pm 40,3$  ml) e ração ( $241,9 \pm 27,2$  g). A glicemia média foi  $52,8 \pm 5,0$  mg/dL, colesterolemia ( $91,2 \pm 6,9$  mg/dL), trigliceridemia ( $46,6 \pm 4,0$  mg/dL), os níveis séricos de ureia ( $52,8 \pm 4,9$  mg/dl) e a atividade da aspartato e alanina-aminotransferase foram  $27.1 \pm 3.8$  e  $30.7 \pm 8.4$  U, respectivamente. O extrato induziu fotossensibilidade próxima aquela induzida pelo metóxipsoraleno.

**Conclusão:** O tratamento com extrato não causou mortalidade ou outros efeitos adversos. Por outro lado, os dados indicaram um potencial fotossensibilizante para o extrato.

**Descritores:** *Dillenia indica*. Toxicidade. Segurança.

## ABSTRACT

**Introduction:** The literature contains several efficacy studies of extracts from *Dillenia indica* Linn. (Dilleniaceae). On the other hand, there were few studies of toxicity.

**Objective:** To evaluate in pre-clinical phase the systemic toxicity of the ethyl acetate extract of the fruit of *D. indica* standardized in betulinic acid and administered topically in mice.

**Methods:** First, mice were divided into: a test-group treated with extract (150 mg/mL), positive control treated with clobetasol (0,5 mg/mL) and a negative one treated with excipient daily for 10 days (N=20, male and female 1:1). The evaluations were related to mortality, aggressiveness, piloerection, diarrhea, convulsions, abdominal contortions, food and water consumption, body and organs-weight, hematological and biochemical parameters. The open field and the grip force tests were performed. With another set of mice, another groups were formed, just like before but including a *naïve* group treated with excipient, being the positive control treated with methoxypsoralen 1% (single doses). Half hour later, mice were exposed to ultraviolet radiation in minimal dose of erythema, being the photosensitizing effect judged 24 h later.

**Results:** No mortality, aggressiveness, piloerection, diarrhea, convulsions and neuromotor alterations were observed. The average body weight gain was  $1.2 \pm 0.3$  g, liver weight was  $1.5 \pm 0.1$  g, heart ( $0.14 \pm 0.01$  g), spleen ( $0.07 \pm 0.01$  g), kidneys ( $0.53 \pm 0.05$  g). Average of water consumption ( $223.2 \pm 40.3$  mL) and food ( $241.9 \pm 27.2$  g). The average glycemia was  $52.8 \pm 5.0$  mg/dL, cholesterolemia ( $91.2 \pm 6.9$  mg/dL), triglyceridemia ( $46.6 \pm 4.0$  mg/dL), serum urea levels ( $52.8 \pm 4.9$  mg/dL) and the activity of aspartate and alanine aminotransferase were  $27.1 \pm 3.8$  and  $30.7 \pm 8.4$  U, respectively. The extract induced photosensitivity close to that induced by methoxypsoralen.

**Conclusion:** Treatment with extract did not cause mortality or other adverse effects. On the other hand, the data indicated a photosensitizer potential for the extract.

**Keywords:** *Dillenia indica*. Toxicity. Safety.

## LISTAS

### Lista de abreviaturas

ALINDI – Grupo de Pesquisa em Alergia, Inflamação e Doenças Infecciosas

ALT – Alanina transaminase

AST - Aspartato transaminase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CONITEC – Comissão Nacional de Incorporação e Tecnologias no SUS

COFEN – Conselho Federal de Enfermagem

D. indica – *Dillenia indica*

DME – Dose Limiar de Eritema

eNOS – Síntese de Óxido Nítrico Endotelial

HED – Dose equivalente em humano

LABIOEX –Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina

LANEX – Laboratório de Neurociência Experimental

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HU – Hospital Universitário

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

HDL – lipoproteína de alta densidade

Na EDTA – Ácido etinodiamino tetra-acético de sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA – Para análise

P/V – Peso/volume

PLGA – Ácido Lático-co-Glicólico

PUVA – Psoraleno e radiação

RE – Resoluções específicas

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

SC - Santa Catarina

SOBEND – Sociedade Brasileira de Enfermagem Dermatológica

SOBEST – Associação Brasileira de Estomatoterapia  
TECFARMA- Grupo de Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica  
TFD – Terapia Fotodinâmica  
TGO – Transaminase Oxalacética  
TGP – Transaminase purúvica  
UV – Ultra Violeta  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina  
UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina  
VCM – Volume Corpuscular Médio  
VHS – Velocidade de Hemossedimentação

#### Lista de figuras

Figura 1 - <i>Dillenia indica</i> Linn .....	24
Figura 2 - Estrutura química flavonóides e ácido betulínico .....	29
Figura 3 - Desenho do estudo .....	42
Figura 4 - Teste de campo aberto e força de prensão .....	51
Figura 5 - Avaliação do potencial indutor de fotossensibilidade.....	57

#### Lista de tabelas

Tabela 1 - Tabela de variáveis.....	48
Tabela 2 - Indicadores de toxicidade.....	50
Tabela 3 - Indicadores de integridade nutricional-metabólico .....	53
Tabela 4 - Peso dos órgãos .....	54
Tabela 5 - Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	55
Tabela 6 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	56

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 LESÕES DERMATOLÓGICAS PERSISTENTES .....	14
1.2 FERIDAS TRAUMÁTICAS CRÔNICAS .....	14
1.3 LESÕES DERMATOLÓGICAS PERSISTENTES IMUNOMEDIADAS .....	16
1.4 PSORÍASE .....	18
1.5 O DESAFIO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS E PSORIÁTICAS ..	20
1.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS .....	22
1.7 ETNOFARMACOLOGIA: UMA ABORDAGEM PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS .....	23
1.8 <i>DILLENIA INDICA</i> : BOTÂNICA E POTENCIAL MEDICINAL .....	23
1.9 <i>DILLENIA INDICA</i> PODE SER FONTE DE UM NOVO MEDICAMENTO ANTI- INFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE .....	25
1.10 O USO DE FITOTERÁPICOS PRECISA SER SEGURO.....	27
1.11 FLAVONOIDES: EFICÁCIA E SEGURANÇA .....	28
1.12 ÁCIDO BETULÍNICO: EFICÁCIA E SEGURANÇA .....	29
1.13 EFEITOS DOS FÁRMACOS SOB RADIAÇÃO LUMINOSA .....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	38
2.1 OBJETIVO GERAL .....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3. MÉTODOS</b> .....	39
3.1 TIPO DE ESTUDO .....	39
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	39
<b>3.2.1 Planta e extrato</b> .....	40
3.3 ANIMAIS.....	41
3.4 DETERMINAÇÃO DAS DOSES.....	41
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	42
3.6 EXPERIMENTO 1 .....	42
<b>3.6.1 Ensaio de campo aberto</b> .....	43
<b>3.6.2 Avaliação da força de prensão</b> .....	44
<b>3.6.3 Avaliações nutricionais</b> .....	44
<b>3.6.4 Coleta e preparação do sangue e dos órgãos</b> .....	44
<b>3.6.5 Análises hematológicas</b> .....	45
<b>3.6.6 Análises sérico-bioquímicas</b> .....	46
3.7 EXPERIMENTO 2 .....	47
3.8 ANÁLISE DOS DADOS.....	48
3.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	50
4.1 DADOS DO EXPERIMENTO 1 .....	50

4.2 DADOS DO EXPERIMENTO 2: POTENCIAL INDUTOR DE FOTOSSENSIBILIDADE .....	57
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	72
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>ANEXO</b> .....	94
ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética .....	94

## 1. INTRODUÇÃO

O contexto do presente estudo foi relacionado como desenvolvimento de um novo fármaco, sendo um fitoterápico neste caso. Este processo ocorre inicialmente através de uma série de ensaios farmacológicos e de toxicidade em fase pré-clínica, seja através de ensaios *in vitro* ou com o uso de seres vivos, incluindo animais. Estes ensaios visam primeiramente demonstrar a eficácia e depois, fazer uma estimativa de riscos, quando é avaliada a segurança de um composto potencialmente terapêutico e inovador. A fase de estudo da toxicidade é importante para identificar possíveis efeitos nocivos e também para estimar doses que posteriormente deverão ser utilizadas nos ensaios clínicos em humanos<sup>2,3</sup>. Para a descoberta de uma molécula, algumas abordagens podem ser consideradas. A etnofarmacologia, por exemplo, é uma abordagem que inclui a avaliação do uso e de relatos populares sobre determinados produtos, normalmente naturais<sup>2,4-6</sup>.

O gatilho para esta pesquisa esteve relacionado com os vários estudos pré-clínicos encontrados na literatura que demonstram uma série de efeitos terapêuticos de *Dillenia indica* Linn. (Dilleniaceae) e seus derivados<sup>7-14</sup>. Se por um lado, os estudos de eficácia eram abundantes; por outro lado, os estudos de toxicidade necessários para avaliar a segurança e para que as pesquisas pudessem avançar para as fases mais adiantadas do desenvolvimento, estes eram escassos. *Dillenia indica* (*D. indica*) é uma árvore nativa da Ásia que foi mais tarde introduzida no Brasil, sendo conhecida como maçã-de-elefante, árvore de pataca, dilênia, entre outros. Na região litorânea de Santa Catarina (SC), é facilmente encontrada e utilizada tradicionalmente em garrafadas (macerações hidro- e/ou etanólicas, normalmente), para o tratamento de uma série de enfermidades, assim como ocorre em outras partes do mundo onde *D. indica* é encontrada<sup>148,15-19</sup>.

O projeto desta pesquisa foi concebido inicialmente no ambiente de dois Grupos de Pesquisa da Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul), são eles: Grupo de Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (Tecfarma) e Grupo de Pesquisa em Alergia, Inflamação e Doenças Infecciosas (Alindi). Inicialmente, a autora encontrou um contexto no qual pesquisadores do Tecfarma e Alindi haviam demonstrado o efeito anti-inflamatório e cicatrizante de extratos do fruto de *D. indica*

padronizados em ácido betulínico sobre lesões dermatológicas psoriasiformes<sup>14</sup>. O ácido betulínico é um dos constituintes mais abundantes presentes em *D. indica*, juntamente com flavonoides e outros constituintes menos abundantes<sup>19</sup>.

A psoríase é considerada atualmente a doença autoimune mais prevalente mundialmente<sup>20-22</sup>. Um aspecto crítico no caso desta doença é que o tratamento disponível é apenas paliativo e apresenta uma série de efeitos colaterais, o que justifica as pesquisas pelo desenvolvimento de novas alternativas para tratar psoríase<sup>22-24</sup>. Os pesquisadores do Tecfarma e Alindi vislumbravam a possibilidade de testar o extrato acetato de etila do fruto de *D. indica*, rico em ácido betulínico e previamente apontado como o mais promissor<sup>14</sup>, em humanos portadores de psoríase. Por isto, existia um interesse sobre os dados necessários relacionados à segurança da administração tópica deste composto. A pergunta de pesquisa deste trabalho foi: A administração tópica de extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* é segura suficientemente para considerar ensaios clínicos?

No Brasil, há pelo menos cinco regulamentos que apresentam critérios específicos para medicamentos fitoterápicos, que são as Resoluções Específicas (RE): RE nº 88/04 - Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia; RE nº 89/04 - Lista de registro simplificado para registro de fitoterápicos; a RE nº 90/04 - Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, no qual este estudo se insere; RE nº 91/04 - Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro e a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48/04 que prevê diferentes formas de se comprovar a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos, entre elas, através da utilização de informações disponíveis sobre a tradição de uso popular da planta para as indicações propostas, através de levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações técnico-científicas ou publicações) ou também através da comprovação de uso seguro da planta por um período igual ou superior a 20 anos<sup>25,26</sup>.

Contando com as definições destas resoluções, este trabalho fez um estudo pré-clínico da toxicidade do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* padronizado em ácido betulínico e administrado topicamente em camundongos.

## 1.1 LESÕES DERMATOLÓGICAS PERSISTENTES

No geral, para a maioria das pessoas, o processo de recuperação de uma injúria na pele ocorre de maneira simples e sem sequelas aparentes. No entanto, em alguns indivíduos pode ocorrer disfunção no processo fisiológico de reparo, devido a fatores como isquemia, alguma infecção; ou fatores sistêmicos como idade avançada, má nutrição, uso de medicamentos, diabetes mellitus ou insuficiência renal<sup>27-29</sup>. Segundo Brito e colaboradores, a incidência e a prevalência de lesões dermatológicas vêm crescendo em decorrência da mudança do perfil da população, com o aumento da longevidade, acompanhado de hábitos de vida inadequados, que geram altos índices de doenças crônicas, como diabetes mellitus, doenças vasculares, entre outras<sup>30</sup>.

É pertinente considerar que as lesões dermatológicas podem ocasionar problemas tanto de ordem física, quanto de ordem emocional porque podem incapacitar a pessoa a desenvolver sua vida cotidiana e comprometer sua imagem corporal, levando a um sofrimento psíquico<sup>31</sup>. Outro aspecto muito importante na vida de pessoas que sofrem com estas lesões é a aceitação e preparo familiar para lidar com as mudanças na rotina de vida, com o tratamento prolongado e muitas vezes ineficaz<sup>30</sup>.

## 1.2 FERIDAS TRAUMÁTICAS CRÔNICAS

Segundo Laureano e colaboradores as feridas podem ser classificadas de acordo com o tempo de reparação tissular. As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. Já as feridas crônicas são aquelas que não são reparadas em tempo esperado e apresentam complicações<sup>32</sup>.

A fisiopatologia das feridas crônicas é um processo complexo que apresenta um estado de inflamação crônica que leva as pessoas a um desgaste permanente, além da dependência contínua de medicamentos para um tratamento de longa duração. Muitas vezes, estas lesões não cicatrizam, tornam-se irreversíveis e até degenerativas, pois resultam de um desequilíbrio no processo de reparo que envolve reações anabólicas e catabólicas<sup>30</sup>. As feridas crônicas são atualmente chamadas de feridas complexas e constituem um problema de saúde pública<sup>30</sup>. Sua incidência

e prevalência têm aumentado a cada ano, com o aumento do número de pessoas sedentárias, portadoras de doenças crônicas e obesas, contribuindo para que este problema torne-se uma possível epidemia silenciosa, causadora de aposentadorias precoces e, conseqüentemente, de diminuição da mão-de-obra ativa<sup>33</sup>. Mestre e colaboradores<sup>27</sup> afirmam que no Brasil há escassez em termos de estudos epidemiológicos robustos que aborde a problemática das feridas crônicas. Para estes autores, o problema atinge cerca de 1% da população mundial e tem aumentado cerca de 4 a 5% em pessoas com idade superior a 80 anos. Nos Estados Unidos da América, cerca de seis milhões de pessoas apresentam feridas crônicas e na população idosa a prevalência pode chegar a 15%. Projetando esses dados para o futuro, estima-se que em 2050, cerca de 25% da população idosa vai apresentar uma ou mais lesões desta espécie. Estudos realizados no referido país, revelam que cerca de 10% da população com diabetes desenvolvem feridas crônicas e 84% desses casos evoluem para amputação. Desses casos, o tempo médio de sobrevivência de três anos é de 50%, após a amputação<sup>34</sup>.

No Brasil, um estudo epidemiológico realizado no Hospital Universitário localizado na cidade de Niterói/RJ, no ano de 2010, demonstrou que fatores extrínsecos e intrínsecos ao paciente podem interferir em maior ou menor grau no processo de cicatrização. Os fatores extrínsecos estão relacionados às condições da ferida e ao tratamento realizado, enquanto que os fatores intrínsecos estão relacionados às condições clínicas do paciente e podem ser agravados na presença de doenças crônicas, como o diabetes, as doenças cardiovasculares e imunossupressoras, que alteram o fluxo sanguíneo normal e o estado imunológico<sup>35-37</sup>. Outro estudo realizado no Ambulatório de Reparo de Feridas do mesmo hospital, com 186 pacientes maiores de 18 anos, relatou que o maior percentual de pacientes com feridas crônicas estava na faixa etária entre 57 e 69 anos (28%), seguidos de 69 a 82 anos (27%), de 44 a 57 anos (24%), de 31 a 44anos (11%). Os menores percentuais foram registrados junto a pessoas menores de 31 anos (5%) e maiores que 82 anos (5%), sendo as pessoas idosas foram as mais acometidas<sup>37</sup>.

Ao considerar os relatos da literatura, é possível concluir que as práticas de saúde voltadas ao cuidado com feridas precisam ser vistas também com uma óptica holística e não-fragmentada, visando não apenas as necessidades biológicas, mas também devem considerar as necessidades emocionais, psicológicas e

sociais<sup>30,31,38</sup>. A prática de cuidados a pacientes portadores de feridas é uma especialidade dentro da Enfermagem, reconhecida pela Sociedade Brasileira de Enfermagem Dermatológica (SOBEND) e Associação Brasileira de Estomaterapia (SOBEST), sendo recentemente publicada no diário oficial da união, a Resolução Nº 0501/2015 do Conselho Federal de Enfermagem (COFEN) que aprovou e instituiu o regulamento sobre a competência da equipe de Enfermagem no cuidado com feridas. Esta autonomia é mais um desafio para as equipes de Enfermagem que acompanham a evolução das diversas etapas do tratamento, como também realizam o planejamento de tratamento adequado, através de métodos terapêuticos que poderão ser aplicados juntamente com uma equipe multidisciplinar que, por sua vez, utilizará procedimentos e materiais, com a finalidade de levar a cicatrização da ferida<sup>39,40</sup>.

### 1.3 LESÕES DERMATOLÓGICAS PERSISTENTES IMUNOMEDIADAS

O sistema imunológico atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. Neste cenário encontra-se o delicado equilíbrio entre a saúde e a doença, em que tanto a deficiência quanto o exagero resultam em dano tecidual<sup>41</sup>. Certos tipos de lesões dermatológicas têm como causa um desequilíbrio mediado pelo sistema imunológico. As doenças dermatológicas imunologicamente mediadas são condições patológicas decorrentes da ativação do sistema imunológico contra constituintes cutâneos próprios do organismo<sup>42</sup>. Esta desordem ocorre pela presença de autoanticorpos naturais derivados de linfócitos B com atividade autorreativa e também em decorrência de uma ativação inapropriada de linfócitos T<sup>43</sup>.

As doenças autoimunes são causadas por uma perda persistente dos mecanismos de controle responsáveis pela manutenção da tolerância aos antígenos próprios. A não-responsividade das células do sistema imune contra os antígenos próprios tem sido designada como tolerância imunológica, ao passo que a perda do controle dos mecanismos que mantêm a tolerância tem sido referida como autoimunidade<sup>44</sup>.

Existem várias doenças crônicas da pele que são imunomediadas. Por exemplo, a esclerodermia, o pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, lúpus eritematoso, dermatomiosite, alopecia, urticária crônica autoimune, entre outras. No entanto, entre estas afecções, cabe destacar a psoríase porque ela representa cerca de 4% de todas as dermatoses em menores de 16 anos e acomete cerca 3,5% de toda a população mundial. A psoríase chega a ser considerada a mais prevalente das doenças autoimunes no mundo<sup>20,21</sup>. As formas cutâneas de psoríase causam feridas persistentes<sup>45-51</sup>.

A esclerodermia é uma doença rara que para algumas pessoas representa apenas um ligeiro incômodo, mas para outras pode ser uma doença muito grave. Sua incidência anual foi de 2,7 casos por 100.000 habitantes, sendo a média de idade para o diagnóstico 30 anos de idade<sup>47</sup>. Já o pênfigo descreve um grupo de doenças autoimunes bolhosas envolvendo a pele e mucosas. Há dois tipos principais de pênfigo, o pênfigo vulgar e o pênfigo foliáceo também conhecido como fogo selvagem. A incidência mundial dos pênfigos varia de 0,75-5 casos/1.000.000 ao ano, dependendo do país<sup>46,50</sup>. O lúpus eritematoso é uma doença rara e autoimune, no qual ocorre uma inflamação e danos aos tecidos com muita frequência na pele, mas podendo afetar também o coração, articulação, pulmão, vasos sanguíneos, fígado, rins e o sistema nervoso central, entre outros órgãos. Sua prevalência é de 14 a 50/100.000 habitantes numa proporção de nove a dez mulheres para um homem, na fase reprodutiva da mulher<sup>52,53</sup>.

A dermatomiosite é uma doença sistêmica crônica que se caracteriza por acometimento inflamatório da pele e dos músculos, afetando em maior proporção as mulheres com idade média do diagnóstico aos 40 anos. A dermatosite possui pelo menos duas formas de apresentação. Na forma miopática, mais frequente, são encontradas lesões musculares e cutâneas e na forma amiopática, somente com lesões cutâneas<sup>48</sup>. Já a alopecia é uma afecção crônica dos folículos pilosos e das unhas, com evidentes componentes autoimunes e genéticos, porém muitas vezes ela é reversível. Estima-se que cerca de 1,7% da população apresente pelo menos um episódio da doença durante sua vida<sup>49</sup>.

No caso das urticárias, a incidência deste grupo de doenças é desconhecida, porém estima-se uma variação de 0,1% a 3% na população em geral, sendo mais comum em mulheres, numa proporção de duas mulheres para cada homem. É

classificada do ponto de vista da duração da evolução temporal em aguda (inferior a seis semanas) ou crônica (superior a seis semanas) A urticária crônica tem sido observada como uma doença autoimune e constitui cerca de 70% das urticárias<sup>45,54</sup>.

#### 1.4 PSORÍASE

Assim como outras doenças que atacam a pele, a psoríase tem grande impacto na qualidade de vida, pois além do desconforto o paciente sofre com as questões estéticas e emocionais<sup>31</sup>. Atualmente, o tratamento disponível para a psoríase é apenas paliativo e precisa ser feito sob acompanhamento médico durante a vida toda. A psoríase é doença inflamatória crônica, imunologicamente mediada que pode estender-se às articulações e até outros órgãos<sup>55</sup>. É uma doença recorrente e de caráter universal, no entanto aproximadamente um terço dos adultos acometidos refere o início da doença antes dos 16 anos de idade. Estimativas indicam que a psoríase atinge cerca de 2-3% da população mundial e 20 a 40% podem apresentar comprometimento articular. Esse tipo de dermatose atinge de igual forma homens e mulheres, porém geralmente seu início é mais precoce no sexo feminino, mas o aumento de casos ocorre na segunda ou terceira década de vida<sup>56</sup>. No Brasil, não existem estimativas acuradas sobre a prevalência de psoríase, mas a Sociedade Brasileira de Dermatologia considera que isto siga uma tendência mundial, estimando uma prevalência de cerca de 1% da população<sup>22</sup>. Em nível nacional, os estudos epidemiológicos relacionados sobre a psoríase são escassos e ainda mais se considerado um estudo realizado no estado de Santa Catarina. Em um artigo de revisão de autoria de Duarte e colaboradores<sup>57</sup>, publicado no ano de 2015 na revista *Psoriasis: Targets and Therapy* (Editora Dovepress), os autores avaliaram estudos envolvendo sujeitos brasileiros. Estes autores estimaram uma prevalência de psoríase de cerca de 2,5% na população brasileira, mesmo tendo sido explicado que nenhum estudo de base populacional tenha sido realizado até o momento<sup>57</sup>.

A doença apresenta-se sob formas variadas, sendo as mais comuns: a psoríase vulgar, gutata, pustulosa e eritrodérmica. A psoríase vulgar é a mais frequente. Ela aparece no geral na forma de placas concentradas nas flexuras dos joelhos, cotovelos e couro cabeludo. A psoríase gutata surge de maneira abrupta

com inúmeras pápulas e placas pequenas e disseminadas sobre a pele, que geralmente aparecem após um episódio de infecção das vias aéreas superiores de causa estreptocócica. Este tipo de psoríase é mais comum em crianças<sup>58,59</sup>. A forma pustulosa é caracterizada pela presença de pústulas subcórneas e pode ser generalizada, localizada, ou acometer as palmas das mãos e plantas dos pés<sup>58</sup>. A forma eritrodérmica é grave, talvez seja a forma mais dolorosa e caracteriza-se por eritema e descamação generalizados, envolvendo pelo menos 90% da superfície corpórea<sup>58,60</sup>.

No geral, a psoríase aparece como uma dermatose incômoda que desaparece espontaneamente em um período de latência, mas depois reincide<sup>49</sup>. Outra característica bastante marcante da psoríase é a hiperplasia da epiderme com intensa descamação. Como descreve Lopes<sup>61</sup> a hiperplasia epidérmica e a renovação dos queratinócitos ocorrem de forma acelerada, acompanhadas por uma ativação linfocitária estimulada por citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, entre outros fatores relacionados com a etiopatogenia, tais como componentes genéticos, fatores ambientais, infecções e estresse, sendo estes os principais desencadeantes e agravantes da doença. Traços hereditários desempenham um papel importante na transmissibilidade da doença aos filhos<sup>58,60,62</sup>. Fatores ambientais podem influenciar no aparecimento e progressão das lesões<sup>63</sup>. Cabe explicar que a psoríase não é uma doença com manifestações restritas somente à pele. A doença tem relação com a incidência de doenças cardiovasculares, alta frequência de artrite psoriática, hipertensão, obesidade, diabetes e risco aumentado para infarto agudo do miocárdio<sup>51,64</sup>. Já o estresse psicológico é considerado agravante ou desencadeante bem conhecido<sup>65</sup>.

O processo natural de cicatrização de lesões na pele ocorre aproximadamente em 28 dias, já no caso da psoríase o ciclo celular é acelerado, podendo ser reduzido a quatro dias. Essa diminuição no tempo de diferenciação prejudica a maturação apropriada das células e produz falhas da queratinização. Conseqüentemente, há um acúmulo de queratina na camada córnea, resultando nas características apresentadas pela doença<sup>62</sup>.

Mesmo com os avanços na assistência do cuidado e no tratamento disponível, nas últimas décadas, a causa da psoríase permanece desconhecida<sup>55,56</sup>. Quanto mais precoce, mais grave tende a ser a evolução do quadro. Em crianças, as lesões

podem ser fisicamente desfigurantes, causando prejuízos psicológicos e um evidente comprometimento da qualidade de vida<sup>56,66</sup>.

## 1.5 O DESAFIO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS E PSORIÁTICAS

Para que o tratamento de feridas crônicas aconteça integralmente é necessário realizar uma avaliação criteriosa da lesão, da doença em si, levando também em consideração aspectos biopsicossociais<sup>67</sup>. A avaliação deve ser compartilhada com uma equipe multiprofissional e contar com a participação ativa do paciente e da família, quando possível. Para a efetividade do tratamento, o profissional deve estabelecer uma interação com a pessoa portadora da doença, esclarecendo o seu diagnóstico, a importância da adesão e a continuidade do tratamento<sup>68,69</sup>.

Durante séculos, o tratamento de feridas variou com os objetivos de melhores resultados cicatriciais em menor tempo possível<sup>70</sup>. Em uma revisão de literatura, descreve-se que já na pré-história vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas<sup>71</sup>. Nos dias de hoje, instituições de reconhecida experiência, como o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, têm utilizado muito para o tratamento de feridas crônicas, coberturas como: hidrocoloide (1%); acquasept gel (1%); alginato de cálcio (4%); pomada colagenase (11%); ácidos graxos essenciais (26%); sulfadiazina de prata (5%); carvão ativado (1%); antibiótico tópico (1%); antifúngico tópico (1%); hidrogel (32%); vaselina (12%); bota de unha (1%)<sup>72</sup>.

Contudo, além do tratamento com coberturas adequadas, o tratamento de feridas é interferido pelos fatores sistêmicos, tais como: idade avançada, imobilidade, estado nutricional, doenças associadas e ao uso de medicamentos contínuos, principalmente os imunossupressores<sup>68</sup>. Para complementar o tratamento de feridas, alguns medicamentos são utilizados, porém estes podem comprometer o processo de reparação tissular, como a radioterapia, a quimioterapia, esteroides e drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras<sup>73</sup>.

As feridas de difícil cicatrização não respondem aos tratamentos convencionais e apresentam complicações, por isso é necessário o desenvolvimento tecnológico e científico nesta área, além do desenvolvimento de novos medicamentos para tratar

as lesões sem causar efeitos colaterais extremos<sup>74</sup>. Os custos dos tratamentos das doenças relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo, o que justifica o interesse da ciência em buscar evidências para resolver problemas complexos da prática assistencial. Mesmo que se saiba que ainda a melhor forma de se evitar os altos custos destinados ao tratamento destas lesões reside no processo de prevenção das mesmas<sup>30,72</sup>.

No que se refere ao tratamento da psoríase, devido ao curso crônico da doença, um paciente geralmente utiliza muitos medicamentos durante sua vida, variando de acordo com os períodos de remissão, manutenção e efeitos adversos. Os casos leves a moderados são tratados com substâncias de aplicação tópica à base de corticosteroide, clobetasol ou dexametasona. O primeiro tem potência muito alta e pode ser utilizado na maioria das lesões de psoríase. A dexametasona tem potência média, ficando reservada para regiões em que não se pode utilizar clobetasol por risco de atrofia cutânea ou telangiectasias (vasos muito finos existentes na superfície da pele), como na face e genitais. Os fármacos classicamente usados no tratamento sistêmico da psoríase moderada ou grave são o metotrexato, a acitretina e a ciclosporina. O metotrexato é um antimetabólito e uma droga antifolato usada no tratamento do câncer e doenças autoimunes. Essa droga age inibindo o metabolismo do ácido fólico. A acitretina é um fármaco, derivado da vitamina A que atua reduzindo a descamação da pele. Já a ciclosporina é um fármaco imunossupressor inibidor da calcineurina, um mediador da síntese de interleucinas, como por exemplo, interleucina 2<sup>75-77</sup>. O uso desses fármacos pode causar imunossupressão severa levando a infecções oportunistas, podendo ser necessária a hospitalização do paciente, o que conseqüentemente gera aumento dos custos para o governo com a hospitalização e para o paciente com o tratamento, além da debilidade física causada<sup>55,78</sup>.

As medicações sistêmicas utilizadas na psoríase têm indicação limitada na infância e durante a gestação devido aos efeitos cumulativos das drogas, à baixa aceitação e ao risco de teratogenicidade<sup>56</sup>. Os medicamentos mais sofisticados atualmente disponíveis para tratar psoríase são compostos biológicos, a maioria deles são anticorpos anticitocinas, principalmente IL-17 e IL-23<sup>78</sup>. No entanto, estes

medicamentos têm custos elevados, muitas vezes ainda estão em fase de desenvolvimento, não sendo disponibilizados pela maioria do serviço de saúde no Brasil.

## 1.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

As substâncias ou compostos candidatos a tornarem-se novos fármacos são desenvolvidos, em sua maioria, a partir de uma ou mais das cinco abordagens a seguir:

I. Identificação e elucidação de um novo alvo para o fármaco; II. Planejamento racional do fármaco, com base no conhecimento dos mecanismos biológicos, estruturas dos receptores do fármaco e estrutura do fármaco; III. Modificação química de uma molécula conhecida; IV. Triagem de produtos naturais à procura de atividade biológica. V. Biotecnologia e clonagem, utilizando genes para produzir peptídeos e proteínas <sup>2</sup>.

No geral, o processo de desenvolvimento de um novo fármaco passa por pelo menos três fases principais: Primeiro, a fase pré-clínica, depois a fase clínica e, finalmente, há o período pós-lançamento, configurando-se assim um processo lento e oneroso. Na fase pré-clínica ocorre a descoberta da molécula ou composto que será testado em testes farmacológicos e toxicológicos por sua eficácia e segurança. Nesta primeira fase, são realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* que podem utilizar animais roedores e não roedores. As moléculas ou compostos que demonstrarem efeitos promissores nesta primeira fase passarão à fase clínica de avaliação, quando são realizados ensaios envolvendo humanos. A fase clínica é subdividida em fase I, II e III. Na fase I, normalmente avalia-se a tolerabilidade do fármaco ou composto em indivíduos saudáveis, primeiramente. Na fase II, indivíduos saudáveis e também pacientes são incluídos nos testes que visam primariamente definir a dose ideal. Na fase III, a eficácia e segurança são avaliadas em humanos portadores da doença que o novo fármaco deve tratar<sup>2</sup>.

Obtido sucesso nestas etapas, adentra-se então com o processo de solicitação de licenciamento do fármaco juntamente às autoridades competentes. Depois que o fármaco é lançado no mercado, o processo de desenvolvimento continua, numa fase pós-lançamento, quando são feitas medidas de farmacovigilância. O desempenho do fármaco segue sendo monitorado, pois é somente nesta fase que algumas

respostas aparecem. Como por exemplo, o efeito/segurança do fármaco sobre populações que normalmente não são incluídas em fases de pesquisa, como crianças, gestantes, idosos, minorias étnicas. Também os efeitos devidos ao polimorfismo genético são notificados<sup>2,79</sup>.

## 1.7 ETNOFARMACOLOGIA: UMA ABORDAGEM PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

A etnofarmacologia é uma abordagem para a descoberta de novos fármacos. Esta ciência busca associar informações adquiridas junto às comunidades locais, pessoas experientes ou profissionais de saúde, que fazem uso de produtos naturais com fins medicinais, aos estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Inclui procedimentos que vão desde estudos observacionais, entrevistas, até à análise dos dados etnofarmacológicos, à elucidação das estruturas das substâncias ativas isoladas e/ou a obtenção de derivados.

Esta abordagem resgata as informações acumuladas sobre a medicina popular e o uso de produtos naturais; um conhecimento passado através das gerações. Obtém dados através de entrevistas feitas com curandeiros, benzedeiros, xamãs, ou pessoas que fazem uso de produtos naturais medicinais, coleta dados da literatura sobre a medicina popular e pode proporcionar pistas valiosas sobre as propriedades farmacológicas anti-inflamatórias das espécies. A descoberta de vários medicamentos disponíveis atualmente, muitas vezes ocorreu através de estudos iniciados pelas abordagem etnofarmacológica<sup>4,5,80</sup>.

## 1.8 *DILLENIA INDICA*: BOTÂNICA E POTENCIAL MEDICINAL

Foi inicialmente a partir de uma abordagem etnofarmacológica que *D.indica* foi selecionada para estudo. *D.indica*, apresentada por meio de fotos na Figura 1, é uma espécie vegetal pertencente à família Dilleniaceae. É uma árvore perene nativa das florestas tropicais da Ásia, que cresce abundantemente no centro e sul da Índia até a China e Austrália, Indonésia, Sri Lanka, Malásia, Tailândia e Vietnã<sup>8,19,81</sup>. Muito conhecida na Ásia tropical, sua árvore tem porte médio a alto, com uma copa abundante e o fruto duro e grande, de cerca de quatro centímetros de diâmetro<sup>7,74,76</sup>.

Trazida para o Brasil, adaptou-se bem, notavelmente em áreas mais próximas à costa litorânea, alcançando até o sul do país<sup>15,16,83</sup>.



Figura 1- *Dillenia indica* Linn (Dileniaceae).

Aspectos ecológicos e culturais distinguem as relações naturais estabelecidas entre esta planta e as pessoas na Ásia, onde *D. indica* é nativa e no Brasil, onde ela foi introduzida mais tarde. Na Ásia, os elefantes alimentam-se do fruto de *D. indica* e agem como disseminadores das sementes. Todavia, os frutos caídos também disseminam as sementes através dos córregos, pois são flutuantes. Um dos nomes comuns da planta nos países de língua inglesa é “*elephant-apple*”, ou maçã de elefante. No Brasil, a depender da região, a espécie é reconhecida por nomes como maçã-de-elefante, árvore de (a) pataca, fruta-cofre ou fruta-do-dinheiro, dilênia, entre outros<sup>15,16,83</sup>. Acredita-se que estes nomes devem-se a árvore ter sido trazida para o Brasil por ordem de D. João VI, tornando-se costume entre as pessoas encaixar moedas sob as calotas dos frutos por diversão<sup>15-17</sup>. Um estudo etnofarmacológico anterior indicou que na região sul do estado de Santa Catarina, as pessoas reconhecem esta planta pelo nome “coco-de-Adão” (dados não publicados).

Ainda na Ásia, a importância desta planta vai além das questões ornamentais e do sombreamento que proporciona. A madeira, moderadamente dura e pesada, tem alto valor calorífico, sendo utilizada como lenha; podendo também ser utilizada na construção civil, na forma de pranchas e vigas com durabilidade moderada, além de serem usados para fabricação de utensílios manuais, barcos, remos, postes de

telégrafos, entre outros. As partes aéreas são utilizadas com propósitos medicinais e os frutos e sépatalas azedos são usados na culinária<sup>19,82</sup>.

No campo da medicina popular, existem relatos sobre o uso de *D. indica* em sistemas de medicina tribais e indígenas, principalmente na Índia. As pessoas alegam a utilidade das folhas, casca do tronco e fruto, que são preparados e administrados por via oral ou tópica, para tratar dores abdominais ou nas articulações, tosse, diarreia, febre, tumores, diabetes, como tonificante do sistema nervoso que alivia o cansaço. As folhas e a casca do tronco são utilizadas como laxativos e adstringentes<sup>7,19,81,84-86</sup>. De fato, estudos fitoquímicos já revelaram que diferentes partes de *D. indica* contêm muitos metabólitos primários e secundários, notavelmente triterpenoides, tais como o ácido betulínico e flavonoides, além de taninos e vários outros constituintes menos abundantes<sup>12,19,87</sup>. Yeshwante e colaboradores<sup>7</sup> já denotaram que, no geral, a maioria dos usos tradicionais de *D. indica* estão associados a propósitos anti-inflamatórios. Aparentemente, as alegações populares no Brasil são corroborativas, particularmente no que se refere às questões ornamentais e à utilização do fruto com propósitos anti-inflamatórios<sup>88,89</sup>.

*D. indica* tem sido investigada cientificamente. Os estudos têm demonstrado uma variedade de efeitos farmacológicos, tais como efeitos antimicrobianos, anti-diabético, efeitos hipolipidêmicos, antidiarreicos e anti-inflamatórios para os extratos feitos a partir de folhas<sup>7,8,10,12,90</sup>. Atividades antinoceptiva e antioxidante foram demonstradas para o extrato metanólico da casca de *D. indica*<sup>11</sup>. Ações antileucêmica, antidiarreicas e anti-inflamatórias foram demonstradas para extratos do fruto de *D. indica*<sup>13,87,90</sup>.

### 1.9 DILLENIA INDICA PODE SER FONTE DE UM NOVO MEDICAMENTO ANTI-INFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE

Visando o desenvolvimento de um fitoterápico inovador para o tratamento de lesões dermatológicas crônicas e psoríase, uma pesquisa sobre o potencial anti-inflamatório e cicatrizante de *D. indica* foi iniciada na UNISUL a partir do ano de 2013. O gatilho para iniciar este trabalho foi às informações da medicina popular somadas às informações científicas<sup>13,87,90,91</sup>. Foram testados diferentes extratos

(hidroetanólico, acetato de etila e éter de petróleo) para o tratamento de lesões cutâneas induzidas com radiação ultravioleta por intermédio do modelo científico de Perry de indução de feridas psoriasiformes na cauda de camundongos<sup>14,89</sup>. Na procura por pistas sobre os princípios ativos, avaliou-se a constituição fitoquímica do material vegetal e dos extratos, junto a informações da literatura e também através de ensaios para caracterização química e padronização de extratos<sup>14</sup>. Na maioria dos casos, os estudos realizados anteriormente não haviam utilizado substâncias isoladas, tão pouco extratos padronizados, tornando difícil uma inferência sobre o papel de qualquer um dos constituintes de *D. indica*. Em um trabalho desenvolvido por Kumar e colaboradores<sup>87</sup>, os pesquisadores haviam demonstrado uma atividade antileucêmica para o extrato metanólico do fruto de *D. indica*. Os pesquisadores relatavam um alto conteúdo de ácido betulínico no extrato testado (cerca de 10%). Kumar e colaboradores relataram que o ácido betulínico estava muito possivelmente entre os reais princípios ativos encontrados no extrato. Por estes motivos, os pesquisadores da UNISUL, ao fazer os estudos fotoquímicos, realizarem testes qualitativos que demonstraram um considerável conteúdo de flavonoides nos extratos e também padronizaram seus extratos em termos de ácido betulínico, demonstrando um conteúdo de 4,6 mg/g no extrato hidroetanólico e, um conteúdo bastante superior (107,6 mg/g) no extrato acetato de etila, sendo ambos os extratos obtidos de frutos<sup>14,89</sup>.

No estudo realizado por Kwiecinski e colaboradores<sup>14</sup>, foram induzidas feridas na cauda de ratos que foram tratados topicamente a cada 24 h por sete dias. Os animais foram alocados em seis grupos: O grupo controle negativo foi tratado somente com excipiente (1 mL de água-etanol), o grupo controle positivo foi tratado com dipropionato de clobetasol (0,5 mg/mL). Existiram quatro grupos-teste que foram tratados com extratos hidroetanólico e acetato de etila em doses de 5 ou 50 mg/mL, respectivamente. A máxima dose utilizada foi definida levando em consideração a solubilidade dos extratos no excipiente. Após o tratamento, a metade de cada grupo foi eutanasiada para avaliação de biomarcadores histológicos e de danos oxidativos, ao passo que os animais remanescentes foram mantidos para determinar o tempo para cicatrização e avaliar a remissão das feridas. Os resultados desta pesquisa demonstraram que o ácido betulínico pode estar entre os princípios ativos responsáveis pelos efeitos cicatrizantes, pois foi justamente o extrato acetato

de etila rico em ácido betulínico administrado na dose de 50 mg/mL que causou os efeitos cicatrizantes mais potentes. Os autores concluíram afirmando que valeria a pena investir em mais estudos com o objetivo de desenvolver um medicamento inovador obtido a partir de substâncias encontradas no fruto de *D. indica* para o tratamento de feridas crônicas e psoriáticas. Estes dados foram compilados em um artigo publicado na revista *Pharmaceutical Biology*, Editora Taylor & Francis Online<sup>14</sup>.

#### 1.10 O USO DE FITOTERÁPICOS PRECISA SER SEGURO

Para que uma alternativa fitoterápica seja considerada para ser testada e administrada em humanos, além da comprovação da eficácia, impõe-se a necessidade de garantir a segurança da administração, ou seja, um baixo potencial de toxicidade<sup>92</sup>. Os estudos toxicológicos fazem parte das exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) para a permissão de fabricação e comercialização de fitoterápicos<sup>93</sup>. Os estudos pré-clínicos de toxicidade têm por objetivo identificar efeitos tóxicos potenciais para os seres humanos e definir detalhadamente seus mecanismos, prevenindo as limitações mais relevantes que precisarão ser monitoradas nos estudos clínicos<sup>2</sup>. Autores como Valente e colaboradores<sup>94</sup>, sugerem que toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração<sup>94</sup>.

Para todo novo medicamento a ser desenvolvido, devem ser realizados testes preliminares, que em um determinado ponto, no geral, incluem animais de diferentes espécies para determinar a eficácia, segurança e toxicidade. Esses testes são geralmente realizados em camundongos, ratos e coelhos e proporcionam informações que servirão de base para pesquisa em seres humanos, pois permitem uma avaliação quanto à dose eficaz, a dose tóxica e a dose letal, sendo que alguns desses achados experimentais reproduzem com relevante identidade as características farmacológicas, fisiopatológicas ou comportamentais do que acontece na área clínica em humanos<sup>95</sup>.

Os estudos realizados com extratos obtidos de *D. indica* relataram que os constituintes principais frequentemente considerados majoritários no vegetal são

triterpenos, tais como o ácido betulínico e flavonoides<sup>12,19,87</sup> que serão discutidos em maiores detalhes a seguir.

### 1.11 FLAVONOIDES: EFICÁCIA E SEGURANÇA

Os flavonoides são polifenóis de baixo peso molecular e amplamente distribuídos nas plantas, nas quais desempenham papéis fundamentais durante a fotossíntese<sup>96-99</sup>. São metabólitos secundários e as substâncias estruturalmente relacionadas que representam os flavonoides apresentam um esqueleto crono que possui substituinte fenila na posição do carbono 2 e 3. A característica estrutural básica dos flavonoides é o núcleo 2-fenil-benzo- $\gamma$ -pirano constituído de dois anéis benzênicos ligados através de um anel heterocíclico pirano (Figura 2A)<sup>99</sup>.

Nas plantas, flavonoides tais como as antocianinas funcionam como pigmentos presentes nas flores e providenciam cor, contribuindo com a polinização. Flavonoides presentes nas folhas promovem sobrevivência fisiológica por protegerem os vegetais contra infecções fúngicas e das radiações UV. Existem flavonoides envolvidos em fotossensibilização por transferência de energia, respiração, controle da fotossíntese, morfogênese e determinação do sexo<sup>99</sup>. Já foram evidenciadas ações farmacológicas dos flavonoides, tais como atividades antioxidantes<sup>100</sup>, na prevenção e tratamento de úlceras gástricas<sup>101</sup>, ações antitrombóticas<sup>102,103</sup> na prevenção e tratamento do câncer<sup>101,104</sup>, doenças cardiovasculares<sup>101,105</sup>, atividade antimicrobiana<sup>99</sup>, hepatoprotetora<sup>106</sup>, prevenção e tratamento do diabetes<sup>101,107,108</sup>. Ainda existem estudos demonstrando um papel dos flavonoides sobre a memória e a depressão, entre outros<sup>96,109-111</sup>.

Outros estudos têm demonstrado que os flavonoides são responsáveis por efeitos anti-inflamatórios através de diferentes modelos experimentais<sup>112,113</sup>. De fato, um estudo anterior já demonstrou que o extrato metanólico rico em flavonoides e triterpenos das folhas de *D. indica* foi responsável por efeitos anti-inflamatórios avaliados por meio do modelo de edema de pata induzido pela carragenina<sup>12</sup>.

Normalmente, os flavonoides são consumidos em grandes quantidades na dieta<sup>114</sup>, o que indica uma relativa segurança para sua administração. A partir daí, acredita-se que eles sejam atóxicos<sup>99,115</sup>. No entanto, essa família de compostos possui uma gama diversificada de atividades em células de mamíferos. *In vivo*, a

confirmação dos seus efeitos secundários seria necessária para uma avaliação completa da sua utilidade prática no campo da medicina moderna. Tendo em conta que a seletividade dos flavonoides para enzimas eucarióticas parece variar de composto para composto, um estudo sobre a avaliação da sua toxicidade precisa ser feito com estes fitoquímicos numa base individual<sup>99</sup>. Alguns flavonoides foram considerados tóxicos sobre algumas linhagens de células tumorais, mas são menos tóxicos para as células normais<sup>102</sup>. Devido à baixa solubilidade das agliconas dos flavonoides na água, o curto tempo de permanência dos flavonoides no intestino e o baixo coeficiente de absorção, seria pouco provável para humanos sofrer os efeitos tóxicos agudos do consumo de flavonoides, com a exceção de uma ocorrência rara de alergia. A margem de segurança em relação à utilização terapêutica dos flavonoides em seres humanos, por conseguinte, é muito grande e provavelmente não ultrapassada por qualquer uma destas substâncias de uso corrente<sup>101</sup>.

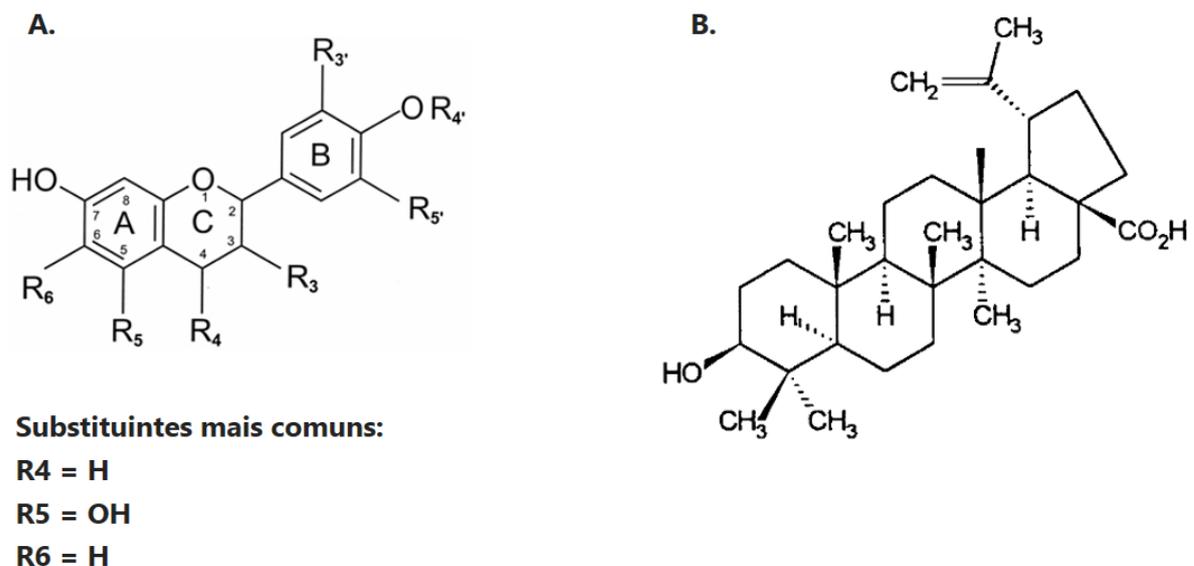


Figura 2. Núcleo 2-fenil-benzo- $\gamma$ -pirano, característica básica dos flavonoides (A). Estrutura química do ácido betulínico (B).

Fonte: Agrawal<sup>116</sup>; Cho & Gottlieb, 2001<sup>117</sup>.

### 1.12 ÁCIDO BETULÍNICO: EFICÁCIA E SEGURANÇA

O ácido betulínico representa uma molécula triterpenoide pentacíclica do tipo lupano (Figura 2B). Ele é abundante no reino vegetal. Em princípio, tem sido isolado de uma série de espécies, incluindo *Zizyphus joazeiro*<sup>118</sup>, *Syzygium clariflorum*<sup>119</sup>,

A molécula do ácido betulínico tem sido testada para uma série de finalidades que podem ser agrupadas em: a. atividades anti-inflamatórias e citoprotetoras e, b. efeitos citotóxicos para bactérias, protozoários, helmintos, fungos e células tumorais, valendo destacar seu potencial antiviral e antitumoral<sup>91,120,121</sup>.

Primeiro relatando os estudos de atividade anti-inflamatória e citoprotetora, um estudo prévio *in vivo* testou o ácido betulínico como um composto alternativo para modular a toxicidade induzida pela N-nitrosodimetilamina, presente nos alimentos e água contaminada. Os resultados mostraram que o pré-tratamento de ratos com ácido betulínico protegeu contra alterações induzidas pela N-nitrosodimetilamina, sugerindo um efeito protetor através de atividades antioxidantes e antiapoptóticas<sup>122</sup>. Acésio e colaboradores procuraram avaliar o efeito modulador do ácido betulínico em cultura de células, contra genotoxicidade induzida por diferentes agentes mutagênicos. Ao final do estudo, os autores concluíram que o ácido betulínico teve efeito antigenotóxico dependente do tipo de substância mutagênica e concentração<sup>123</sup>.

No estudo anterior de Jin e colaboradores<sup>124</sup>, os autores procuraram esclarecer o mecanismo do ácido betulínico sobre a sintetase do óxido nítrico endotelial (eNOS), principal enzima reguladora do endotélio vascular. Este estudo examinou efeitos sobre vias intracelulares subjacentes à atividade da eNOS e a produção de óxido nítrico em células endoteliais em cultura. Os resultados indicaram que ácido betulínico ativa a fosforilação de eNOS e a síntese de óxido nítrico através das vias  $Ca^{2+}$ /CaMKII e  $Ca^{2+}$ /CaMKK/AMPK. Esses achados fornecem informações sobre efeitos antiaterosclerose.

Em um estudo desenvolvido por Yi e colaboradores<sup>125</sup>, os autores procuraram investigar os mecanismos de imunomodulação estimulados pelo ácido betulínico contra o estresse oxidativo e imunossupressão causados pela dexametasona em timócitos de camundongos. Os resultados indicaram uma capacidade protetora do ácido betulínico contra morte celular induzida pela dexametasona, causando diminuição de espécies reativas de oxigênio nos timócitos, com diminuição da peroxidação lipídica e regulação de enzimas antioxidantes, da função mitocondrial e de enzimas relacionadas à apoptose, da família Bcl-2.

Outro estudo anterior avaliou o efeito antiulcerativo do extrato hidroalcoólico de *Davilla rugosa* (Dilleniaceae) em ratos. Este estudo demonstrou que o extrato

apresentou quatro substâncias, todas com atividades biológicas comprovadas, tanto efeito protetor contra o desenvolvimento de úlceras gástricas, assim como efeito estimulante da atividade motora, sendo destacado o efeito do ácido betulínico encontrado em quantidade considerável no extrato seco (0,4%)<sup>126,127</sup>.

Os efeitos anti-inflamatórios do ácido betulínico têm sido extensivamente estudados. Em um estudo anterior, Wang e colaboradores<sup>128</sup> procuraram explorar os possíveis efeitos do ácido betulínico sobre a nefropatia diabética, utilizando rins de ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina e células mesangiais glomerulares com alto teor de glicose. Os autores concluíram que o ácido betulínico inibiu a ativação de NF- $\kappa$ B, prevenindo assim a fibrose renal diabética<sup>128</sup>. Outro estudo do mesmo ano é corroborativo fornecendo informações importantes sobre o mecanismo anti-inflamatório do ácido betulínico. Kim e colaboradores<sup>129</sup> avaliaram os efeitos anti-inflamatórios de um extrato obtido das folhas de *Diospyros kaki* Thunb, rica em ácido betulínico. Os resultados deste estudo mostraram que o ácido betulínico induziu translocação do fator nuclear Nrf2, assim inibindo a ativação do NF- $\kappa$ B e a produção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo<sup>129</sup>.

Em outro estudo anterior, compostos ativos foram isolados da espécie *Alphitonia petriei* (Rhamnaceae), nominalmente o ácido emólico, alfitólico e ácido betulínico. Os autores relataram que, com exceção do ácido emólico, os demais ácidos testados exibiram potente atividade anti-inflamatória, porém também demonstraram alguma citotoxicidade sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo<sup>130</sup>.

Se por um lado, vários estudos apontam para um potencial anti-inflamatório e citoprotetor do ácido betulínico, outros estudos indicam mais uma atividade citotóxica, o que indica que existem diferenças de sensibilidade entre as células e receptores nos tecidos. Certamente a dose é outro fator que tem influência e que pode explicar as divergências. Foi demonstrado que o ácido apresenta citotoxicidade para algumas linhagens de células tumorais e que este efeito parece ser seletivo, sendo mínimo para as células normais<sup>131</sup>. O efeito de ácido betulínico sobre linhagens celulares de melanoma foi mais forte do que o seu efeito inibidor do crescimento em melanócitos normais em cultura primária<sup>131</sup>. Um estudo de uma combinação de ácido com betulínico com irradiação gama mostrou efeitos

claramente aditivos e indicou que eles diferem em seus modos de ação <sup>132</sup>. A esterificação no carbono 3 do ácido betulínico conduziu à descoberta do *Bevirimat* (PA - 457), um potente e inovador inibidor da maturação do vírus da imunodeficiência humana (HIV – 1) que foi patenteado pela Rhone-Poulenc (agora Sanofi- Aventis). O desenvolvimento clínico, no entanto, foi interrompido devido às fracas propriedades farmacodinâmicas da droga candidata triterpenoide como antiviral <sup>133</sup>.

Alguns estudos importantes sobre a atividade antitumoral do ácido betulínico foram publicados recentemente. Luo e colaboradores <sup>134</sup>, em um artigo de revisão, relataram que o ácido betulínico induziu apoptose por via mitocondrial e efeito antiangiogênico, inibindo a expressão de NF- $\kappa$ B e fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) em células de câncer de mama. Os autores ainda relataram um potencial antimetastático, uma vez que o ácido inibiu a expressão de metaloproteases de matriz <sup>134</sup>. Outra revisão de Zhang e colaboradores foi publicada no mesmo ano, corroborando o estudo Luo e colaboradores <sup>135</sup>.

Outro estudo de atividade antitumoral que vale ser citado foi desenvolvido por Das e colaboradores <sup>136</sup>, no qual os autores examinaram a eficácia do ácido betulínico e sua forma nanoencapsulada em Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Os autores demonstraram que a forma nanoencapsulada induziu citotoxicidade superior para células A549 de câncer de pulmão, no entanto a citotoxicidade foi desconsiderável em células L6 normais <sup>136</sup>.

O ácido betulínico isolado da árvore de jujuba (*Zizyphus jujuba* Mill), conhecida por uma ampla gama de propriedades biológicas e medicinais, tais como efeito antibacteriano, antipalúdico, anti-inflamatório, anti-helmíntico, antinociceptivo e anticancerígeno, foi investigado pela atividade antiviral utilizando uma linhagem celular epitelial de adenocarcinoma de pulmão humano A549 e murinos C57BL/6 infectados com vírus A/PR – 8. O ácido betulínico mostrou uma atividade anti-influenza em uma concentração de 50  $\mu$ M, sem causar citotoxicidade significativa sobre as células A549 infectadas. Além disto, o ácido betulínico atenuou significativamente a patologia pulmonar, incluindo aumento da necrose, número de células inflamatórias e edema pulmonar induzido pela infecção pelo vírus, sendo comparado seus efeitos com o fármaco oseltamivir *in vivo* <sup>137</sup>.

Um estudo etnofarmacológico realizado com comunidades quilombolas de Oriximiná, no estado do Pará, destacaram o valor da planta saracumirá, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, rica em ácido betulínico com vasto uso popular na prevenção e tratamento da malária, como tonificante e depurativa<sup>138</sup>. Os autores postularam que seria possível supor que as indicações de uso desta planta pelos quilombolas como fortificante e contra malária poderiam estar relacionadas a uma possível atividade adaptógena e imunoestimulante, dada à presença das saponinas e do ácido betulínico. Tem sido demonstrado um excelente efeito imunoestimulante para espécies da família Rhamnaceae, por exemplo, para *Zyziphus mauritiana* Lam., tendo sido seus extratos ativos padronizados em ácido betulínico. Estes extratos causaram aumento da função de imunócitos em camundongos<sup>139</sup>.

Recentemente, um estudo investigou a atividade anti- *Trypanosoma cruzi* do ácido betulínico e alguns derivados semi-sintéticos, O estudo demonstrou que o ácido induz o parasita à morte por necrose e que a associação de ácido betulínico com o fármaco benznidazol revelou efeitos sinérgicos sobre as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*<sup>140</sup>. Também, uma atividade anti- *Trichomonas vaginalis* foi demonstrada para o ácido betulínico e alguns derivados em estudos *in vitro*. Os autores concluíram que obtiveram dados suficientes para demonstrar o potencial antitricomonas deste ácido<sup>141</sup>.

### 1.13 EFEITOS DOS FÁRMACOS SOB RADIAÇÃO LUMINOSA

Outro aspecto válido de ser considerado durante uma avaliação da segurança de um tratamento contendo algum fármaco inovador, particularmente se for para uso tópico, diz respeito à fotoestabilidade e à fotossegurança. Muitos fármacos sob exposição à luz estão sujeitos à fotodecomposição, podem sofrer fotoativação ou causar fotossensibilidade, podendo causar uma reação fototóxica ou fotoalérgica<sup>142–144</sup>.

A luz pode ter efeitos sobre o princípio ativo ou outros componentes de uma formulação, bem como no produto final ou na embalagem. A Farmacopeia Europeia prescreve proteção contra a luz para um número de medicamentos e excipientes. Novos compostos vêm sendo gradativamente adicionados à lista de drogas fotolábeis. Embora muitos fármacos estejam sujeitos a uma reatividade frente à

exposição à luz, as consequências práticas podem não ser necessariamente as mesmas para todos estes compostos. Por exemplo, algumas drogas irão decompor-se em apenas uma pequena fração após a exposição por várias semanas, enquanto outras substâncias, como derivados do fármaco nifedipina têm uma meia-vida fotoquímica de apenas alguns minutos. Nestes exemplos, em todos os casos, é fato que os fármacos são sensíveis à luz, mas as mesmas precauções não serão necessárias no manuseio desses produtos. De qualquer maneira, os fármacos sensíveis à luz podem causar problemas, seja na formulação ou durante a administração. Por isto, deve ser estabelecido numa fase inicial de desenvolvimento, se o composto sendo testado é suscetível à fotorreatividade. Nesta avaliação, é possível considerar várias abordagens. Por isto, existe uma necessidade de compreensão da natureza e extensão da fotorreatividade. As condições que os produtos serão apresentados no uso irão variar claramente como resultado do tipo de produto, a proteção da embalagem, o modo de administração e das condições do local da clínica ou na farmácia<sup>142,145</sup>.

Um fármaco que exhibe reatividade fotoquímica pode dar origem a efeitos adversos de fotossensibilidade em pacientes após a administração. Inclusive, sabe-se que a luz solar penetra na pele em profundidade suficiente para atingir moléculas de fármaco que circulam nos capilares de superfície. Ela pode também reagir com os compostos acumulados, por exemplo, nos olhos ou na pele. A luz solar pode induzir interações entre a molécula do fármaco e substratos endógenos, converter o fármaco num produto de decomposição tóxico ou induzir a formação de espécies de oxigênio reativas, que são tóxicas para os tecidos humanos<sup>145,146</sup>.

Neste contexto, deve ser mencionado que uma combinação de drogas e de luz também pode ser benéfica, tais como no tratamento de vitiligo, da psoríase ou câncer e no desenvolvimento de sistemas específicos de liberação de fármacos. Por isto, as informações básicas sobre a fotorreatividade de fármacos em potencial são necessárias para proporcionar informações para o manuseamento, embalagem, rotulagem e utilização do fármaco ou do produto derivado<sup>145,146</sup>.

A fotossensibilidade é uma reação incomum de sensibilidade extrema, normalmente aparecendo sobre a pele quando exposta à luz do sol ou fontes luminosas artificiais, induzidas por substâncias químicas. A fotossensibilidade pode representar uma limitação para o uso ou até uma contra-indicação, quando aparece

no contexto de um efeito adverso de algum fármaco. Uma extensa lista de fármacos sistêmicos que com certa frequência causam reações de fotossensibilidade inclui fármacos, tais como o ácido nalidíxico, amiodarona, azapropazona, clorpromazina, piroxicam, protriptilina, psoralenos, retinóides especialmente a isotretinoína, sulfonamidas principalmente o cotrimoxazol, tetraciclina especialmente a dimetilclortetraciclina e tiazidas. Estas reações podem se instalar em menos de 30 minutos ou mais, e podem deixar marcas e lesões nas áreas expostas. A fotossensibilidade, neste caso, pode ser do tipo fototóxica ou fotoalérgica, sendo a primeira resultante da liberação de energia pelos agentes fotossensibilizantes que causam danos em longo prazo na pele. O segundo caso, mais raro, ocorre quando uma substância química induzida pelos raios ultra violeta (UV) alteram moléculas da pele, transformando-as em novas moléculas. Isto provoca uma resposta imunológica que ataca essas novas moléculas. A fotossensibilidade alérgica demora mais tempo para poder ser observada, pois precisa de um contato prévio com a substância para que ocorra a sensibilização. As reações costumam aparecer entre um e três dias após o contato e não se limitam ao local atingido, podendo espalhar-se para o resto do corpo<sup>147,148</sup>.

Por outro lado, as propriedades fotossensibilizantes de algum fármaco podem ser empregadas de forma benéfica para fotoquimioterapia de determinados tipos de lesões dermatológicas (terapia fotodinâmica ou TFD). Este tipo de terapia faz parte do tratamento clínico de pessoas que sofrem com algum tipo de câncer e certos tipos particulares de dermatoses de evolução crônica, tais como: psoríase, o vitiligo, o linfoma cutâneo, a parapsoríase, os eczemas, entre outras, trazendo resultados muito satisfatórios. Nesta terapia, emprega-se uma combinação de luz, oxigênio e um fotossensibilizador, este último caracterizado como moléculas capazes de reagir com a luz gerando espécies reativas de oxigênio<sup>149</sup>. A associação de luz e substâncias químicas para tratar doenças da pele é amplamente praticada na dermatologia<sup>150,151</sup>. A TFD deve ser considerada, em particular, para pacientes que apresentam lesões superficiais múltiplas, disseminadas e para pacientes imunossuprimidos. Ela tem sido uma opção segura para o tratamento de acne vulgar, psoríase, verrugas virais, esclerodermia localizada, fotoenvelhecimento, leishmaniose, entre outras<sup>151</sup>. É um tratamento de baixo custo, com poucos efeitos colaterais e não normalmente não possui efeitos sistêmicos. Nenhum efeito

mutagênico sobre as células sadias tem sido reportado até o momento, o que amplia a segurança de aplicação dessa modalidade terapêutica, permitindo ainda repetição do tratamento no caso de recorrência ou mesmo de grandes lesões<sup>150</sup>.

Os efeitos da fototerapia estão baseados nas ações da radiação UV que podem causar imunossupressão local, redução da hiperproliferação epidérmica e apoptose de linfócitos T. Além disso, a fototerapia pode ser utilizada associada a vários outros medicamentos sistêmicos, como os retinóides, o metotrexato, a ciclosporina, visando à obtenção de rápido controle das dermatoses com doses menores de medicamentos, onde o mecanismo de ação se dá através da atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e imunossupressora<sup>66</sup>.

Uma das modalidades mais utilizadas de TFD é aquela feita com associação de fármacos psoralenos e radiação UVA (PUVA). O tratamento com PUVA é realizado através da associação de psoralenos e irradiação de UVA originária de lâmpadas que emitem comprimentos de ondas entre 320 a 400 nm. Psoralenos é o termo usado genericamente para se descrever compostos chamados furocumarínicos, encontrados em plantas ou fabricados sinteticamente<sup>150,152,153</sup>. São substâncias que, quando estimuladas pela UV, ligam-se às bases pirimidínicas do DNA celular, iniciando reações fotoquímicas na pele. Os psoralenos mais utilizados são: metóxipsoraleno e o trimetilpsoraleno<sup>152,153</sup>. A modalidade varia entre a abordagem de PUVA tópico local a sistêmico. A PUVA sistêmica é uma modalidade terapêutica efetiva para o tratamento da psoríase. É indicada em casos de acometimento extenso da dermatose, em indivíduos com lesões espessas. Neste caso, o paciente é submetido à administração de psoralenos de alcance sistêmico e a dose inicial de UVA normalmente é baseada na cor da pele do paciente. Geralmente, inicia-se com 0,5 a 1 J/cm<sup>2</sup>. O eritema pós PUVA ocorre 48 a 72 horas após a sessão e, por isso, o intervalo entre as sessões é de 48 horas no mínimo. O tratamento pode ser realizado duas a três vezes por semana<sup>150,153,154</sup>. A fotoquimioterapia tópica local (PUVA tópico) é indicada em quadros localizados, como a região palmoplantar e o couro cabeludo. O PUVA tópico é realizado normalmente com a associação do trisoraleno com a luz UVA, aplicado na pele meia hora antes da realização da fototerapia. A dose varia de 0,1%, em locais onde a pele é mais fina, até 1%, como nas regiões plantares, sendo manipulado em loções cremosas ou alcoólicas. A dose inicial da UVA é de 0,12 a 0,5 J/cm<sup>2</sup>, até que se

aumente 0,12-0,25 J a cada sessão, consoante a intensidade do eritema e o local de aplicação. Outras modalidades de TFD têm sido desenvolvidas, tais como a PUVA imersão ou "bath PUVA", outras abordagens idealizadas para os casos em que há indicação de PUVA sistêmico, com o intuito de diminuir a dose de exposição à radiação UVA. Estas abordagens são particularmente úteis para os pacientes que tomam outras medicações sistêmicas, ou que apresentem intolerância aos psoralenos de uso sistêmico<sup>151,152,154,155</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em fase pré-clínica a toxicidade sistêmica do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* padronizado em ácido betulínico e administrado topicamente em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o tratamento experimental induz mortalidade em camundongos.
- Identificar efeitos adversos ocorrendo sobre o comportamento dos animais.
- Reconhecer alterações nutricionais e gastrointestinais associadas ao tratamento experimental.
- Avaliar alterações causadas sobre os órgãos dos animais submetidos ao tratamento experimental;
- Investigar possíveis alterações hematológicas e sérico-bioquímicas.
- Avaliar o efeito do tratamento associado à radiação ultravioleta.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental de fase pré-clínica<sup>2</sup>.

#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Ácido acético (Vetec®, EUA)
- Ácido etilenodiaminotetracético EDTA (Sigma-Aldrich, EUA)
- Agitador magnético, vortexador e centrífuga baby (Quimis®, Brasil)
- Arena open Field (Insight, Brasil)
- Balança analítica (Shimadzu AUY 220, Japão)
- Banho Maria (Fanem, Brasil)
- Câmara de Neubauer (Kasvi, Brasil)
- Câmara termográfica (FLIR, EUA)
- Cetamina (Syntec, Brasil)
- Centrífuga de microtubos (Eppendorf, Alemanha)
- Citrato trissódico (Sigma-Aldrich, EUA)
- Leitor de microplacas por espectrofotometria (Quimis®, Brasil)
- Etanol (Vetec®, EUA)
- Software Graph Pad Prism® (EUA)
- Grip force (Columbus Instruments, EUA)
- Kit de glicose Ref 137(Labtest, Brasil)
- Kit de triglicerídeos Ref 87 (Labtest, Brasil)
- Kit de colesterol Ref 76 (Labtest, Brasil)
- Kit de uréia Ref 104 (Labtest, Brasil)
- Kit de aminotransferase pirúvica (ALT) Ref-53 e oxalacética (AST) Ref 52 (Labtest, Brasil)
- Kit de dosagem de proteínas séricas totais Ref 99 (Labtest, Brasil)

- Kit de coloração Panótico (Laborclin, Brasil)
- Lâmpadas UV 100 Watts (Philips, Brasil)
- Microscópio com limites do campo de visão entre 4 e 100 vezes (Olympus, Japão)
- Microsoft Excel (Washington, EUA)
- Microtubos (Axygen, EUA)
- Proveta graduada, capilares de vidro e lâminas de vidro (Dist, Brasil)
- Salina (ADV®, Brasil)
- Violeta genciana (ADV®, Brasil)
- Xilazina (Syntec, Brasil)

### 3.2.1 Planta e extrato

Os extratos utilizados neste estudo haviam sido preparados e padronizados anteriormente por membros do Tecfarma. A metodologia descrita abaixo tem, portanto, finalidade informativa, uma vez que os dados resultantes destes procedimentos fitoquímicos já foram publicados<sup>14</sup>. Para preparar o extrato acetato de etila do fruto de *D. indica*, amostras da planta foram coletadas nos jardins da UNISUL campus Tubarão, SC, Brasil. A autenticidade da planta foi avaliada por comparação junto a uma exsicata depositada no Herbário *Laelia purpurata* na mesma instituição (SRS5103). Foram utilizados os frutos colhidos maduros e em bom estado, entre agosto e outubro de 2015. Este estudo foi realizado respeitando todas as normas que concernem à biodiversidade biológica<sup>156</sup>.

As frutas frescas foram limpas e moídas. O material vegetal foi submetido à maceração exaustiva sob agitação por 3 dias, repetida 3 vezes, em acetato de etila de grau analítico para análise (P.A.) da Marca Vetec® Química Fina (Saint Louis, Estados Unidos - EUA) na proporção 1 peso da planta para 2 volumes de acetato de etila (1:2 peso/volume). Após a extração, o solvente foi eliminado sob pressão reduzida para obtenção de um extrato seco, cujo rendimento foi calculado em percentual considerando a massa do material de partida<sup>157</sup>. O extrato foi padronizado em termos de ácido betulínico, sendo o conteúdo de ácido betulínico no extrato medido por cromatografia líquida de alta eficiência<sup>87</sup>.

### 3.3 ANIMAIS

Foi utilizada uma espécie de roedores, sendo eles camundongos da espécie *Mus musculus* da linhagem Balb-c procedentes do biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (LABIOEX). Os animais foram adultos jovens, com idade de aproximadamente 60 dias e pesando cerca de 20 gramas. Eles foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) da UNISUL, *campus* Pedra Branca, Palhoça, SC em condições controladas (ciclo claro e escuro de 12 horas, temperatura entre  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com aproximadamente 60% de umidade relativa do ar, recebendo ração laboratorial e água *ad libitum*). Ao final do estudo, foi induzida a morte indolor assistida, conforme preconizado pelas diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)<sup>158</sup>.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DAS DOSES

Para a determinação da dose de extrato a ser testada, foram levados em consideração os achados da pesquisa anterior de eficácia já realizada na Unisul<sup>14</sup>. A dose eficaz em ratos foi 50 mg/mL administrada em volume suficiente para cobrir completamente a cauda do animal (1 mL a cada 24 h). Desta vez, para os ensaios relacionados à segurança, a toxicidade potencial foi testada a partir da administração de uma dose três vezes superior. Foi avaliada a segurança da administração tópica do extrato em dose de 150 mg/mL em veículo em quantidade suficiente para cobrir totalmente a área da cauda/dorso do camundongo (100  $\mu\text{L}$  etanol:água 1:5 v/v). Esta definição teve bases em aspectos físico-químicos da formulação, pois testes preliminares demonstraram que formulações com concentrações superiores a 150 mg/mL não foram possíveis de serem bem preparadas, apresentando problemas de solubilidade, viscosidade e dificuldade de administração tópica. A definição da dose também considerou premissas da Resolução n.90 de 16 de março 2004 da ANVISA, que indica que para os ensaios de segurança de formulações de uso tópico, as formulações sejam preparadas em concentração máxima possível<sup>26</sup>. Derivando, cada camundongo recebeu 15 mg de extrato a cada 24 h. A dose equivalente em humanos (HED) foi calculada em

carácter informativo, utilizando a seguinte equação<sup>159</sup> (Eq. 1), onde a constante ( $K_m$ ) de camundongos tem valor 3, ao passo que para o caso de humanos,  $K_m = 37$ . Este cálculo resultou em uma estimativa de dose de cerca de 1,25 mg/kg para humanos.

$$HED \text{ (mg/kg)} = \text{dose em animais (mg/kg)} \times K_m \text{ do animal} / K_m \text{ de humanos} \dots \text{Eq. 1}$$

### 3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Esta investigação foi composta por dois experimentos principais (1 e 2). Os parâmetros avaliados em cada um dos experimentos estão esquematizados na Figura 3.

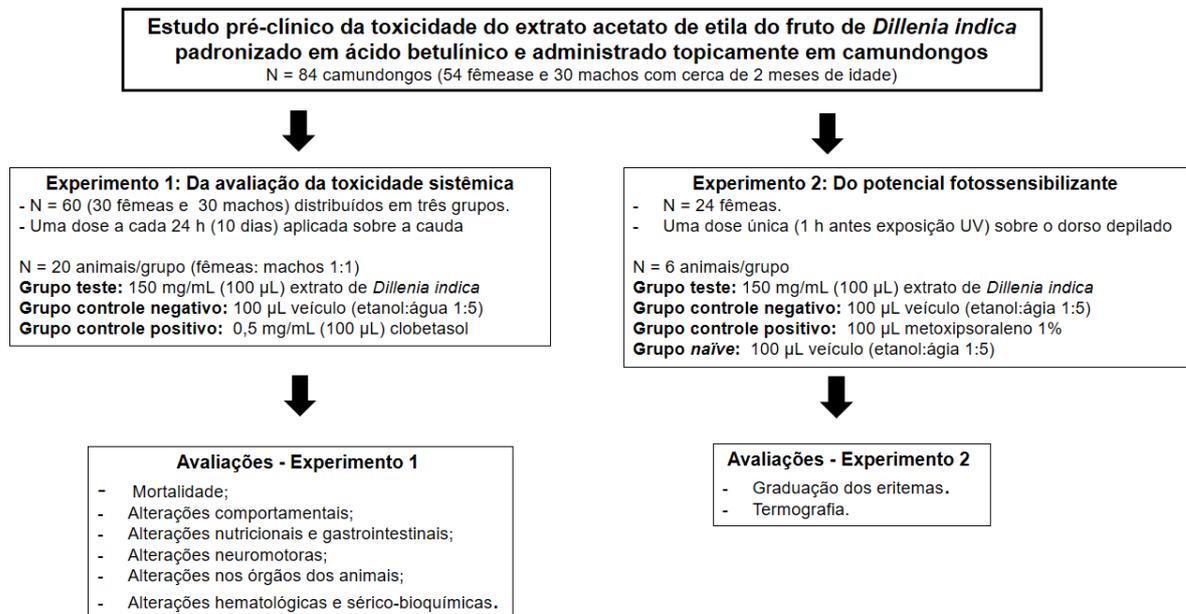


Figura 3 – Do desenho do estudo pré-clínico da segurança do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* administrado por via tópica em camundongos.

### 3.6 EXPERIMENTO 1

Para este experimento, os animais foram tratados topicamente sobre a cauda. Esta foi a mesma região anatômica utilizada anteriormente no estudo de eficácia que avaliou os efeitos cicatrizantes e anti-inflamatórios do extrato<sup>14</sup>. Outros estudos prévios de delineamento semelhante encontrados na literatura também escolheram a cauda como área para aplicação e avaliação de efeitos de novos fármacos<sup>160,161</sup>.

Como esquematizado na Figura 3, este experimento iniciou com a administração tópica dos tratamentos experimentais, respeitando as diferenças de cada grupo amostral. Neste experimento foram observados e registrados sinais de toxicidade, incluindo o tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade, sempre que possível. O tamanho dos grupos amostrais utilizados nesta etapa foi definido com base nas prerrogativas da Resolução nº 90 de 16/03/2004 da ANVISA<sup>93</sup>, sendo levada em consideração a utilização de um número mínimo de animais suficientes para o desenvolvimento do estudo, dispensando-se assim um cálculo amostral. De acordo com a mesma Resolução, os animais precisavam ser observados diariamente durante o período do tratamento. Cada grupo amostral foi composto por 20 animais, incluindo machos e fêmeas (1:1).

O grupo controle positivo foi tratado topicamente utilizando clobetasol, que é um fármaco anti-inflamatório corticosteroide eficaz e seguro utilizado no tratamento clínico de psoríase em humanos, cujos efeitos já foram avaliados em roedores. A concentração de clobetasol utilizada foi de 0.5 mg/mL, que corresponde àquela concentração na qual o fármaco é disponibilizado comercialmente<sup>23,162</sup>. O tratamento do grupo controle negativo foi feito somente com veículo etanol-água (1:5) em volume equivalente de 100 µL.

Durante o período de tratamento (10 dias), os animais foram monitorados diariamente para verificar a ocorrência de mortalidade<sup>163</sup>. Uma hora após a administração dos compostos era avaliada a ocorrência de alterações comportamentais, tais como agressividade e piloereção, as alterações gastrointestinais (diarréia, contorções abdominais e vômitos) e a ocorrência de convulsões, sendo os dados registrados em planilhas de Microsoft Excel®<sup>92,121,164</sup>

### **3.6.1 Ensaio de campo aberto**

Possíveis efeitos sobre o padrão locomotor dos animais foram avaliados através do ensaio de campo aberto, do inglês *Open Field Test* realizado a cada 3 dias, a contar do início do experimento 1. Uma hora após a administração dos compostos, cada animal era colocado em um dos cantos da arena, com aproximadamente 60 centímetros quadrados (cm<sup>2</sup>), demarcando 16 quadrantes, circundada por uma parede de 45 cm de altura. Era contabilizado o número de

quadrantes que o animal percorria pelo período de 5 minutos. Os resultados destas avaliações foram expressos através da média e o desvio padrão<sup>165</sup>.

### **3.6.2 Avaliação da força de preensão**

Alterações neuromusculares potenciais foram avaliadas através do teste de força de preensão, do inglês *grip force test* utilizando metodologia descrita anteriormente<sup>166</sup>. Este teste também foi realizado a cada 3 dias, a contar do início do experimento 1. Uma hora após a administração dos compostos por via tópica, cada camundongo era posicionado de maneira a agarrar o trapézio do dinamômetro aferidor com as patas anteriores (Equipamento Grip force). Então, o avaliador movia o animal em direção retrocaudal até o animal soltar o trapézio. O instrumento era capaz de registrar a força máxima de preensão exercida pelo animal em gramas. Os resultados desta avaliação foram expressos através da média e desvio padrão.

### **3.6.3 Avaliações nutricionais**

Potenciais alterações nutricionais foram monitoradas pela medida do peso dos animais, feita por intermédio de balança analítica. Os animais foram pesados no início (dia zero) e 24 h após a administração da última dose do tratamento experimental (dia 11). Para acompanhar o consumo de ração e água, a cada 3 dias, no momento da manutenção de ambos, a ração era pesada em balança analítica e o volume de água determinado em proveta graduada<sup>92,121</sup>. Os resultados destas avaliações são mostrados na Tabela 3 através da média e o desvio padrão.

### **3.6.4 Coleta e preparação do sangue e dos órgãos**

Para as análises sanguíneas, a coleta de sangue foi realizada por via retro-orbital<sup>167</sup>, tendo os animais sido submetidos a jejum de 6 h<sup>168</sup>. Uma gota de sangue foi utilizada imediatamente para preparação de um esfregaço delgado sobre uma lâmina de vidro<sup>169,170</sup>. Para obtenção do soro necessário às análises bioquímicas, uma determinada quantidade de sangue era incubada por cerca de 30 min em banho-maria a 37°C. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado em tubos

cônicos por cerca de 10 min (5.000 g)<sup>169,170</sup>. Adicionalmente, alíquotas de sangue total contendo ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio (Na EDTA) 1 mg/mL foram preparadas para as análises hematológicas<sup>171</sup>. Na sequência, foi realizada a morte indolor assistida dos animais<sup>158</sup>, sendo dissecados os órgãos: rins, coração, baço, e fígado. Os órgãos foram lavados em salina e pesados imediatamente em balança analítica<sup>92</sup>.

### 3.6.5 Análises hematológicas

Em termos hematológicos, utilizando as amostras de sangue total foram realizadas as seguintes análises: contagem absoluta de hemácias e leucócitos, contagem relativa diferencial de leucócitos, determinação da velocidade de hemossedimentação (VHS), hematócrito e volume corpuscular médio (VCM)<sup>171,172</sup>. A contagem absoluta de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. Para contagem de hemácias, 20 µL de sangue total foram diluídos em 4 mL de líquido diluidor de Dacie (1 mL de formol 40% e 99 mL de citrato trissódico 3%). Após homogeneização, 20 µL da mistura foram utilizados para carregar um lado da câmara de Neubauer, sendo contadas as células contidas em cinco quadrantes entre os 25 quadrantes localizados na região central da câmara. O número de hemácias foi calculado pela seguinte equação (Eq. 2)<sup>171</sup>:

$$\text{Número de hemácias/mm}^3 = \text{média da contagem de hemácias} \times 10.000 \dots \text{Eq. 2}$$

Para a contagem absoluta de leucócitos, uma alíquota de 50 µL de sangue total foi diluída em 950 µL de líquido de Turk (1 mL de solução de violeta genciana e 100 mL de solução de ácido acético 2%). Após homogeneização, novamente cerca de 20 µL da mistura foram utilizados para carregar um lado da câmara de Neubauer, sendo contadas desta vez as células contidas nos quatro quadrantes periféricos da câmara. O número de leucócitos foi calculado pela seguinte equação (Eq. 3):

$$\text{Número de leucócitos/mm}^3 = \text{média da contagem de leucócitos} \times 50 \dots \text{Eq. 3}$$

Para realizar a contagem relativa e diferencial dos leucócitos, foram utilizados os esfregaços sanguíneos que neste momento foram corados através da técnica de Romanowsky<sup>173</sup>, utilizando o kit de coloração Panótico (Marca Laborclin). Este é um corante utilizado em hematologia para corar porções basofílicas e eosinofílicas em uma amostra de sangue<sup>171,174</sup>. Cem leucócitos foram avaliados por lâmina, sendo cada lâmina correspondente à amostra de sangue de cada animal. Os leucócitos foram então classificados de acordo com suas características morfológicas em: linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos<sup>171,174</sup>. Os resultados foram expressos em percentual, através da média  $\pm$  desvio padrão.

Para medida da VHS, foram utilizados tubos de vidro de diâmetro interno constante e com uma escala graduada em milímetros. Os tubos foram preenchidos com sangue contendo anticoagulante até a marca zero e deixado em posição vertical por 1 hora, após a VHS foi lida diretamente na escala descendente do tubo; à distância percorrida pelos eritrócitos<sup>175</sup>.

Para determinação do hematócrito, foi utilizada a técnica de microhematócrito realizada em tubos capilares de 1,2 x 75 mm contendo anticoagulante, sendo preenchidos com sangue total até dois terços de seu volume e vedando uma das extremidades com fogo. O capilar com a extremidade vedada voltada para fora foi centrifugado (10.000 g 5 min). A interpretação do resultado foi feita em uma escala de leitura onde foram limitadas marcas de 0 a 100 mm, observando na escala o limite de separação da massa dos eritrócitos com o plasma. O resultado foi expresso em porcentagem de eritrócitos em relação ao volume de sangue total, através da média  $\pm$  desvio padrão<sup>176</sup>. O VCM que representa a média dos volumes das hemácias foi calculado a partir da equação (Eq. 4)<sup>177,178</sup>:

$$VCM \text{ (fL)} = \text{hematócrito (\%)} \times 10 / \text{hemácias (milhões/mm}^3\text{)} \dots\dots\dots \text{Eq. 4}$$

### 3.6.6 Análises sérico-bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria, utilizando kits de dosagem comercialmente disponíveis da marca Labtest® e seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante. Foram avaliadas as concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol, ureia, proteínas totais e as atividades das enzimas

aspartato e Alanina-aminotransferase (AST e ALT, respectivamente). As análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos através da média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.7 EXPERIMENTO 2

Para avaliar o efeito do tratamento associado à radiação ultravioleta, no experimento 2 foi avaliado o potencial do extrato para induzir fotossensibilidade cutânea do tipo tóxica<sup>147,148,179</sup>. A definição do número de animais componentes dos grupos amostrais desta vez foi baseada em estudos anteriores de delineamento semelhante<sup>179-181</sup>. Nesta etapa, a área de administração tópica foi o dorso depilado dos animais (1 cm<sup>2</sup>). A cauda dos camundongos neste caso não serviu, pois devido ao reduzido calibre, sob radiação UV, a cauda sofria ressecamento intenso, ao invés de ruborizar e inflamar. Sendo assim, os grupos amostrais foram compostos por 6 (seis) animais (fêmeas)<sup>180</sup> e, como esquematizado na Figura 3, os animais foram divididos em quatro grupos, incluindo um controle negativo pré-tratado somente com excipiente etanol-água 100  $\mu$ L (1:5), um grupo controle positivo pré-tratado com metóxiporaleno 1%, um fármaco entre as escolhas dos clínicos que fazem a fototerapia de algumas dermatoses crônicas<sup>150,152,153</sup>. Ainda, foi incluído um grupo controle *naïve* que não foi submetido ao banho UV, sendo pré-tratado somente com excipiente etanol-água 100  $\mu$ L (1:5). O grupo-teste foi pré-tratado com o extrato (100  $\mu$ L, 150 mg/mL). Neste experimento, os animais foram pré-tratados em dose única. Uma hora após a administração das doses, os animais eram anestesiados com xilazina 15 mg/kg e cetamina 90 mg/kg (I.M.), sendo a área cutânea do dorso exposta em campo fenestrado à radiação UV, feita no interior de uma câmara contendo cinco lâmpadas de UV (100 Watts) a uma distância vertical de 20 cm durante 25 min. O tempo e intensidade da radiação UV empregados neste momento foram determinados previamente através de estudos-piloto, sendo suficientes para causar um eritema leve (mínimo). A fotossensibilização potencialmente causada pelo extrato foi avaliada comparativamente frente aos grupos-controle, 24 h após a exposição à radiação UV, sendo os eritemas graduados em cada animal através de uma escala de 0 a 3, onde 0 (zero) representava a ausência de eritema (grupo *naïve*), o valor de 1 (um) correspondia à intensidade do eritema do grupo controle

negativo (eritema mínimo) e o valor 2 (dois) representava eritema aumentado, como aquele do grupo controle positivo. Um valor de 3 (três) era atribuído aos eritemas mais intensos que aqueles do grupo controle positivo. Adicionalmente, a avaliação dos eritemas foi acompanhada por fotos termográficas<sup>182,183</sup>. Os resultados foram expressos através da média destes valores de escore  $\pm$  desvio padrão<sup>184,185</sup>.

### 3.8 ANÁLISE DOS DADOS

Inicialmente foi realizado o teste de normalidade (Shapiro Wilk). Os dados paramétricos foram apresentados através da média e desvio padrão. Os dados foram processados pelo *software* Graph Pad Prism (San Diego, EUA), sendo as comparações e diferenças avaliadas em princípio pelo teste de análise de variância ANOVA, sendo complementado quando necessário pelo teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

Tabela 1. Tabela de variáveis

Variável	Dependente/ Independente	Natureza	Proposta de utilização
Toxicidade	Dependente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim/Não
Mortalidade	Independente	Quantitativa discreta	Número de óbitos
Agressividade	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim/Não
Piloereção	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim/Não
Consumo de água	Independente	Quantitativa contínua	Gramas
Consumo de alimento	Independente	Quantitativa contínua	Mililitros
Peso corporal	Independente	Quantitativa contínua	Gramas
Vômitos	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim/Não
Diarréia	Independente	Qualitativa nominal dicotômica)	Comparação com os grupos-controle
Contorções abdominais	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Comparação com os grupos-controle
Deambulação	Independente	Quantitativa discreta	Número de quadrantes
Glicemia	Independente	Quantitativa contínua	mg/dL
Colesterolemia	Independente	Quantitativa contínua	mg/dL
Trigliceridemia	Independente	Quantitativa contínua	mg/dL

Proteínas séricas totais	Independente	Quantitativa contínua	g/dL
Uremia	Independente	Quantitativa contínua	mg/dL
Atividade alaninoaminotransferase	Independente	Quantitativa contínua	U
Atividade aspartatoaminotransferase	Independente	Quantitativa contínua	U
Contagem hemácias	Independente	Quantitativa discreta	milhões/mm <sup>3</sup>
Contagem de leucócitos (absoluta)	Independente	Quantitativa discreta	mil/mm <sup>3</sup>
Contagem diferencial leucócitos	Independente	Quantitativa contínua	Percentual
VHS	Independente	Quantitativa discreta	mm/h
VCM	Independente	Quantitativa contínua	fL
Gradação de eritemas	Independente	Quantitativa discreta	Índice médio (0-3)
Alteração da temperatura dos eritemas	Independente	Quantitativa contínua	Graus Celsius

### 3.9 ASPECTOS ÉTICOS

Antes do início da execução desta pesquisa, este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL (Parecer n. 15.041.4.01.IV), sendo observadas as definições da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa (DBCA)<sup>186</sup>.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DADOS DO EXPERIMENTO 1

A Tabela 2 apresenta os dados da avaliação de indicadores de toxicidade, tais como a taxa de mortalidade e também dados sobre padrões de agressividade, piloereção, alterações gastrointestinais (diarreia, vômitos, contorções abdominais) e neurológicas (convulsões) monitorados em animais machos e fêmeas. Não foram observadas alterações nestes parâmetros nos grupos-teste tratados com extrato, quando comparados aos dados dos grupos controle negativo ou positivo, respectivamente. Evidências adicionais da integridade do componente comportamental (neurológico e motor) dos animais tratados com extrato são mostrados nas Figura 4(A) e Figura 4(B) que apresentam os dados do teste de campo aberto e força de preensão (*grip force*), realizado respectivamente em animais machos e fêmeas. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas quando comparados os dados dos grupos-teste de machos e fêmeas, frente aos dados dos grupos controles negativo ou positivo. Os valores de  $p$  foram demonstrados na Figura 4.

Tabela 2. Sinais de toxicidade em camundongos machos e fêmeas tratados topicamente com doses repetidas a cada 24 h por 10 dias de extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* 150 mg/mL (100  $\mu$ L). Os controles positivos foram tratados com clobetasol 0,5 mg/mL, ao passo que os controles negativos foram tratados com excipiente etanol: água (1:2).

Sinais de Toxicidade	Machos			Fêmeas		
	Controle negativo	Controle Positivo	Grupo teste	Controle negativo	Controle positivo	Grupo Teste
<b>Mortalidade</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<b>Agressividade</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<b>Piloereção</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<b>Diarreia</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<b>Vômitos</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<b>Contorções Abdominais</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<b>Convulsões</b>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s

n/s: nenhum sinal. N=20 camundongos Balb-c por grupo, sendo machos e fêmeas 1:1

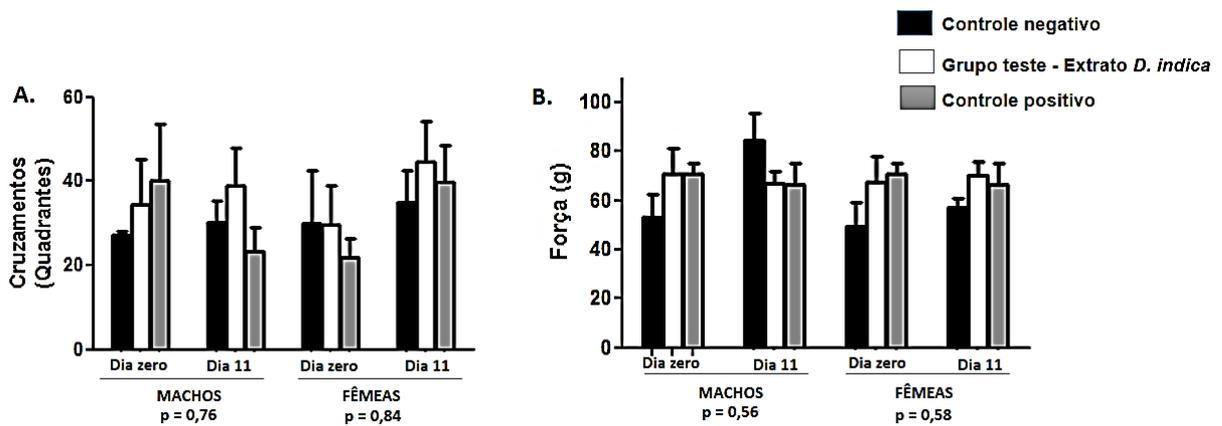


Figura 4. Dados referentes ao teste de campo aberto (A) e força de preensão (*grip force*) (B) realizados em camundongos Balb-c tratados com extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* por via tópica em dose de 150 mg/mL (100  $\mu$ L) a cada 24 h por 10 dias. Os animais dos grupos controles positivos foram tratados com dipropionato de clobetasol (0,5 mg/mL), ao passo que os animais dos controles negativos foram tratados com excipiente etanol: água (1:2). O valor de *p* foi obtido por análise de variância ANOVA. N = 20 animais, sendo machos e fêmeas 1:1.

Os resultados apresentados na Tabela 3 referem-se à avaliação de indicadores da integridade nutricional – metabólica (peso, consumo de água e ração) dos animais. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para estes parâmetros, quando comparados os dados dos grupos tratados com o extrato (machos e fêmeas) frente aos dados dos grupos controles negativo ou positivo, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta a média e desvio padrão do peso dos órgãos de todos os animais após necropsia. A avaliação estatística, realizada respeitando as diferenças entre machos e fêmeas, não revelou diferenças, novamente, quando comparados os dados obtidos junto aos grupos-teste tratados com extrato frente aos dados dos controles, fossem controles negativo ou positivo, respectivamente. Os valores de *p* foram inseridos na própria Tabela 4.

Os dados da avaliação dos parâmetros hematológicos foram apresentados na Tabela 5 através da média e desvio padrão. Uma noção sobre o perfil hematológico médio de animais machos e fêmeas saudáveis foi providenciada a partir dos dados dos grupos controles negativos, sendo reconhecidas as diferenças sutis existentes entre os perfis de animais machos e fêmeas. Os dados destas avaliações

novamente indicaram que não existiram diferenças significativas, quando comparados os dados dos grupos-teste machos e fêmeas frente aos respectivos controles negativos. Por outro lado, as comparações, realizadas entre os perfis hematológicos dos animais dos grupos controles-positivo tratados com clobetasol, revelaram que as contagens relativas de linfócitos e monócitos foram diminuídas nestes animais, machos e fêmeas, quando comparados os dados frente àqueles obtidos nos respectivos controles negativos. Esta diminuição também foi significativa na contagem absoluta dos leucócitos. Os valores de  $p$  foram apresentados na própria Tabela 5.

Os dados obtidos nas análises sérico-bioquímicas estão apresentados na Tabela 6. Mais uma vez, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos diversos parâmetros analisados e preconizados para a avaliação da toxicidade<sup>93</sup> entre os grupos-teste de machos e fêmeas, quando foram comparados os dados junto àqueles dos controles negativos ou positivos, respectivamente. Foram avaliados dados de glicemia, colesterolemia, triglicerídeos, ureia, proteínas totais e atividades das enzimas AST e ALT.

Tabela 3. Aumento do peso corporal, consumo de água e ração em camundongos Balb-c (N= 20), machos e fêmeas (1:1), tratados topicamente com doses repetidas a cada 24 h por 10 dias de extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* 150 mg/mL (100 µL). O controle positivo foi tratado com dipropionato de clobetasol 0,5 mg/mL, ao passo que o controle negativo foi tratado com excipiente etanol-água 1:2. O valor de *p* foi obtido por análise de variância ANOVA.

Grupos	Machos				Fêmeas			
	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de <i>p</i>	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de <i>p</i>
<b>Aumento do peso (g)</b>	0,8 ± 0,6	1,3±1,2	1,3 ± 1,2	0,4	0,1±0,1	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,5
<b>Consumo de água (mL)</b>	86,6 ± 20,2	60,0 ± 10,0	76,6 ± 41,9	0,1	60,0± 26,4	56,6 ± 16,0	56,6 ± 20,8	0,9
<b>Consumo de ração (g)</b>	88,3 ± 13,6	80,6 ± 11,0	83,0 ± 11,3	0,3	67,6± 28,0	75,6± 46,2	80,6 ± 49,6	0,7

Os valores são média ± desvio padrão. N= 20 (camundongos machos e fêmeas 1:1).

Tabela 4. Peso dos órgãos (mg) dos camundongos machos e fêmeas tratados com extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* 150 mg/mL (100 µL). O controle positivo foi tratado com clobetasol 0,5 mg/mL, ao passo que o controle negativo foi tratado com excipiente etanol-água 1:2. Os dados foram apresentados através da média  $\pm$  desvio padrão, sendo o valor de  $p$  obtido pelo teste de análise de variância ANOVA.

Órgão	Machos				Fêmeas			
	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de p	Controle negative	Controle Positive	Grupo teste	Valor de p
<b>Rins</b>	640 $\pm$ 60	550 $\pm$ 30	580 $\pm$ 30	0,3	320 $\pm$ 20	340 $\pm$ 20	380 $\pm$ 20	0,1
<b>Coração</b>	140 $\pm$ 10	150 $\pm$ 10	140 $\pm$ 10	0,9	110 $\pm$ 00	120 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10	0,2
<b>Baço</b>	80 $\pm$ 30	60 $\pm$ 10	90 $\pm$ 20	0,6	60 $\pm$ 20	40 $\pm$ 20	60 $\pm$ 10	0,6
<b>Fígado</b>	1510 $\pm$ 100	1495 $\pm$ 100	1500 $\pm$ 120	0,9	1170 $\pm$ 200	1140 $\pm$ 220	1120 $\pm$ 100	0,9

N= 20 (camundongos Balb/c isogênicos, machos e fêmeas 1:1).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos analisados em camundongos Balb-c isogênicos tratados topicamente com doses repetidas a cada 24 h por 10 dias de extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* 150 mg/mL (100 µL). Os controles positivos foram tratados com dipropionato de clobetasol 0,5 mg/mL, ao passo que os controles negativos foram tratados com excipiente etanol-água 1:2. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de análise de variância ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. (\*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos controles negativos, respectivamente.

Parâmetro hematológico	Machos				Fêmeas			
	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de p	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de p
<b>Hemácias (milhões/mm<sup>3</sup>)</b>	7,0 ± 0,8	6,8 ± 0,6	7,2 ± 1,1	0,58	5,6 ± 0,4	5,7 ± 0,5	6,0 ± 0,6	0,84
<b>Leucócitos (milhões/mm<sup>3</sup>)</b>	4,0 ± 1,1	1,4 ± 0,9*	3,5 ± 0,6	< 0,05	3,6 ± 0,8	1,7 ± 0,5*	3,5 ± 0,9	0,98
<b>Neutrófilos (%)</b>	70,0 ± 9,0	80,0 ± 10,0	66,0 ± 7,0	0,16	74,0 ± 5	73,0 ± 3,0	70,0 ± 5,0	0,80
<b>Linfócitos (%)</b>	25,0 ± 5,0	12,0 ± 3,0*	22,0 ± 3,0	< 0,05	23,0 ± 4,0	11,0 ± 4,0*	28,0 ± 2,0	0,56
<b>Monócitos (%)</b>	7,0 ± 2,0	3,0 ± 2,0*	9,0 ± 2,0	< 0,05	5,0 ± 2,0	2,0 ± 2,0*	2,0 ± 1,0	0
<b>Eosinófilos (%)</b>	1,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	0,05	0	0	0	0
<b>Basófilos (%)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>VHS (mm/h)</b>	< 5,0 ± 2,0	< 5,0 ± 20,0	< 5,0 ± 2,0	1,00	< 5,0 ± 2,0	< 5,0 ± 2,0	< 5,0 ± 2,0	1,00
<b>Hematócrito (%)</b>	58,4 ± 5,3	54,2 ± 6,30	59,2 ± 7,6	0,19	61,8 ± 5,6	58,2 ± 2,6	61,2 ± 1,7	0,76
<b>VCM (fL)</b>	83,4 ± 6,6	79,7 ± 10,5	82,2 ± 6,9	0,59	80,2 ± 11,0	76,5 ± 6,5	76,5 ± 2,8	0,92

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. N=20 camundongos por grupo, sendo machos e fêmeas 1:1. VHS: velocidade de hemossedimentação; VCM: volume corpuscular médio.

Tabela 6. Parâmetros sérico-bioquímicos analisados em camundongos Balb-c isogênicos tratados com extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* 150 mg/mL (100 µL). Os grupos controles-positivo foram tratados com clobetasol 0,5 mg/mL, ao passo que o controles negativos foram tratados com excipiente etanol-água 1:2. Os valores de *p* foram obtidos por análise de variância ANOVA.

Parâmetro sérico bioquímico	Machos				Fêmeas			
	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de <i>p</i>	Controle negativo	Controle positivo	Grupo teste	Valor de <i>p</i>
Glicemia (mg/dL)	67,6 ± 8,0	57,6 ± 12,0	63,2 ± 13,0	0,8	69,5 ± 9,4	74,6 ± 15,4	75,2 ± 16,6	0,9
Colesterolemia (mg/dL)	95,3 ± 14,0	95,3 ± 14,8	83,2 ± 27,0	0,8	95,8 ± 18,5	95,8 ± 18,6	86,4 ± 16,6	0,9
Trigliceridemia (mg/dL)	108,3 ± 35,0	90,30 ± 35,8	104,0 ± 35,0	0,9	164,2 ± 80,4	144,4 ± 42,1	192,0 ± 63,0	0,8
Uréia sérica (mg/dL)	37,6 ± 7,8	37,7 ± 13,4	33,2 ± 13,2	0,9	27,6 ± 7,8	37,7 ± 13,4	23,2 ± 13,2	0,6
Proteínas totais (g/dL)	7,0 ± 0,2	6,8 ± 0,5	7,0 ± 0,5	0,5	6,9 ± 0,4	7,1 ± 0,5	6,5 ± 1,0	0,1
Atividade Aspartato-aminotransferase (U)	28,6 ± 11,0	30,0 ± 8,0	22,8 ± 3,0	0,7	27,1 ± 18,1	23,0 ± 10,0	13,0 ± 5,4	0,7
Atividade Alanina-aminotransferase (U)	36,2 ± 8,0	35,0 ± 10,0	21,0 ± 18,0	0,6	32,1 ± 4,5	28,0 ± 10,0	31,2 ± 7,4	0,9

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão; N=20 camundongos por grupo, sendo machos e fêmeas 1:1; mg/dL: miligramas por decilitro; g/dL: gramas por decilitros; U: unidade internacional.

## 4.2 DADOS DO EXPERIMENTO 2: POTENCIAL INDUTOR DE FOTOSSENSIBILIDADE

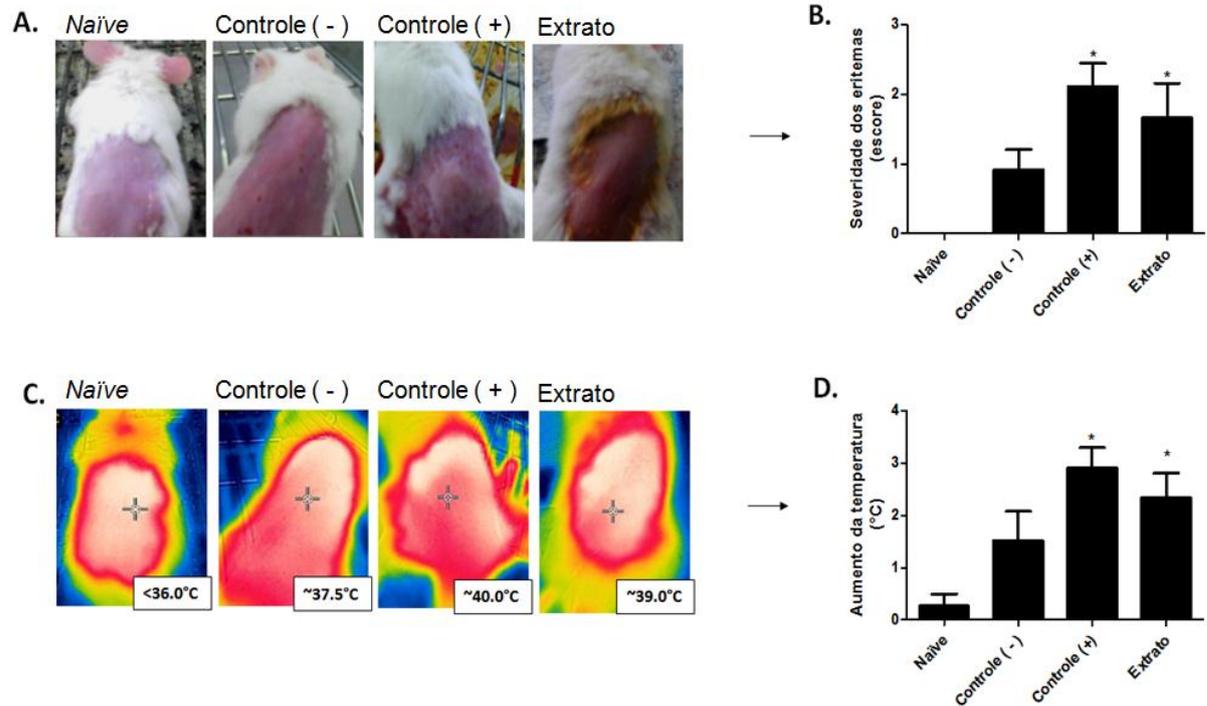


Figura 5. Avaliação do potencial indutor de fotossensibilidade do extrato acetato de etila do fruto de *Dillenia indica* administrado topicamente sobre o dorso de camundongos Balb-c (dose única). O grupo-teste foi tratado com extrato 150 mg/mL (100  $\mu$ L). O controle negativo e *naïve* foram tratados com excipiente etanol:água 1:2. O controle positivo foi tratado com metóxipsoaleno 1%, um agente fotossensibilizante<sup>152,153</sup>. Uma hora após os tratamentos, os animais foram submetidos à radiação ultravioleta, exceto grupo *naïve*. Fotos representativas dos eritemas resultantes nos diferentes grupos (A). Quantificação dos eritemas por escala visual (B). Fotos representativas da termografia (C) e sua quantificação (D). (\*) representa diferença estatística comparado ao controle negativo,  $p < 0,05$ . N = 6/grupo.

A Figura 5 apresenta os resultados do experimento 2, de avaliação do potencial indutor de fotossensibilidade do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica*. A Figura 5(B) mostra os resultados da graduação dos eritemas através da escala visual, explicada na seção de Métodos. O que é possível perceber na Figura

5(B) é a presença dos eritemas mínimos, comparado ao grupo *naïve*, que foram graduados nos animais do controle negativo, média próximo ao grau 1, ao passo que nos animais do controle positivo tratados com fotossensibilizante, os eritemas foram intensificados, em mais de duas vezes em média, comparado ao controle negativo. Os resultados da Figura 5(B) indicam que o extrato induziu fotossensibilidade, em potência um pouco inferior comparado ao controle positivo, mas, os animais tratados com extrato apresentaram eritemas intensificados com diferença estatística significativa, quando comparado ao grupo controle negativo. Os dados da termografia dos eritemas mostrados na Figura 5(D) são corroborativos, demonstrando que houve aumento na temperatura da área exposta à radiação UV em animais do grupo controle negativo, com eritemas mínimos, quando comparado ao grupo *naïve* (cerca de 1,5°C). Esta temperatura medida em animais do controle positivo foi superior, cerca de 2,5°C mais alta em relação ao controle negativo (Figura 5C e Figura 5D). A fotossensibilidade induzida pelo extrato foi detectada pela termografia, que mostrou que em animais tratados com extrato, após a radiação UV, a temperatura média dos eritemas foi cerca de 1,5°C superior àquela determinada em média nos animais do controle negativo.

## 5. DISCUSSÃO

Tendo sido apresentado o contexto do presente estudo em suas seções introdutórias, da avaliação da toxicidade de uma nova droga fitoterápica em potencial, cabe ao início desta seção de discussão apresentar aspectos adicionais que servem para se ter uma ideia sobre a real dimensão deste trabalho. Por princípio, avaliar a *segurança* de um novo fármaco é um processo bastante amplo e longo, que tem a ver com a avaliação de riscos e das possibilidades de minimizá-los, para que seja possível o avanço para as fases clínicas do desenvolvimento de um fármaco<sup>2</sup>. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>187,188</sup>, a avaliação da segurança de produtos farmacêuticos, ou farmacovigilância, tem a ver com uma ciência relacionada à coleta de dados toxicológicos, detecção de toxicidades, avaliação, monitoramento e prevenção de efeitos adversos. Isto leva a assumir que os dados obtidos no presente estudo podem *contribuir* com a avaliação da segurança, neste caso, através da avaliação de efeitos de toxicidade eventualmente causados a partir da administração tópica de extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* em camundongos. No caso deste extrato, a literatura era muito escassa no que diz respeito às informações de toxicidade sistêmica. As avaliações realizadas nesse estudo permitiram realizar inferências sobre a toxicidade crônica do tratamento feito em longo prazo com doses repetidas de extrato. O potencial de toxicidade foi avaliado a partir de um ponto de vista que considerou a integridade fisiológica de vários sistemas anatômicos, principalmente: o sistema nervoso, digestório, hematopoiético, imunológico, hepático e renal.

A possibilidade para o avanço verso às fases clínicas do desenvolvimento de um fitoterápico a partir do extrato estudado dependerá ainda de aspectos complementares com os quais os dados apresentados aqui devem ser somados. Como explicado anteriormente, este trabalho foi desenvolvido no ambiente dos grupos TECFARMA e ALINDI. Talvez este seja o principal estudo originário destes grupos de pesquisa que irá contribuir com a avaliação da segurança do tratamento tópico feito com o extrato, mas é necessário explicar que estudos paralelos já foram desenvolvidos por outros membros dos grupos, sendo um estudo de irritação dérmica realizado em ratos<sup>189</sup> e outro estudo realizado pela autora juntamente com

alunas do curso de Farmácia da UNISUL de Tubarão, que avaliou o uso popular do fruto de *D. indica* com propósitos anti-inflamatórios e cicatrizantes por participantes das pastorais da saúde e grupos da terceira idade na região sul do estado de SC, submetido para Revista Brasileira de Plantas Medicinas e, atualmente encontrado em fase de avaliação editorial.

Algo que não pode ser perdido de vista é que os dados deste estudo se referem a avaliações de toxicidade feitas em camundongos e não em humanos. A Resolução n. 90 da ANVISA sugere que para a garantia de riscos mínimos para os humanos, o produto farmacêutico deve ser testado em pelo menos duas espécies de mamíferos<sup>26</sup>. No entanto, nem sempre isto é necessário. A RDC n.48/04 prevê diferentes formas de comprovar tanto a segurança, assim como a eficácia de produtos fitoterápicos. Entre elas, a possibilidade de se utilizar de informações disponíveis sobre a tradição de uso popular de plantas para as indicações propostas<sup>25</sup>.

Agora é possível então voltar esta discussão para os estudos de toxicidade realizados aqui. Este trabalho foi realizado na área da toxicologia, que é uma ciência que busca conhecer as manifestações produzidas pelas substâncias químicas nos organismos. Por suas variadas áreas de interesse, é uma ciência multidisciplinar integrada, sendo a toxicologia farmacológica, a ciência que estuda os efeitos biológicos e mecanismos de ação das drogas. A toxicologia química estuda a estrutura química e a identificação de substâncias ou compostos tóxicos, ao passo que a toxicologia clínica estuda a sintomatologia, o diagnóstico e terapêutica das substâncias no organismo<sup>190</sup>.

A toxicidade está intimamente relacionada às propriedades físico-químicas das substâncias ou compostos, dentre elas: estrutura química e molecular, massa molecular, solubilidade e coeficiente de partição<sup>191</sup>. Como explicado na seção de referencial teórico, a composição química do extrato analisado aqui já foi estudada razoavelmente, quando foi demonstrado que entre os principais constituintes químicos estavam flavonoides e ácido betulínico. Sendo assim, alguma inferência sobre a toxicidade destes compostos pode ser tirada do presente estudo, sobretudo para o caso do ácido betulínico, uma vez que este estudo avaliou um extrato padronizado (concentração de ácido betulínico de cerca de 10%)<sup>14</sup>.

A avaliação dos efeitos sistêmicos de um composto constitui uma das primeiras etapas na avaliação da segurança de um novo fármaco em potencial<sup>192</sup>. Desta forma, serão discutidos os resultados avaliando os efeitos tóxicos potenciais sobre os diferentes sistemas da anatomia do camundongo. O primeiro indicador de toxicidade avaliado foi a mortalidade, cujos dados foram mostrados na Tabela 2. Não foi observada mortalidade neste estudo, dadas as condições experimentais. Em um artigo de revisão anterior, o autor Parasuraman<sup>193</sup> explicou que os testes de toxicidade pré-clínica ajudam a calcular o "nível de efeito adverso não observado" para um determinado composto, que é necessário para iniciar a avaliação clínica de produtos sob investigação. Este autor explica que a avaliação da mortalidade configura um dos principais indicadores de toxicidade, sendo que através desta avaliação é possível calcular a dose-letal 50 (DL50), que é a dose necessária para causar a morte de 50% dos indivíduos de uma amostra submetida a um tratamento experimental. A DL50 é um indicador de toxicidade internacionalmente reconhecido<sup>193</sup>. Uma vez que neste estudo não foi observado mortalidade, um cálculo de DL50 não foi possível. Por outro lado, os resultados indicaram que a dose testada de extrato no regime posológico utilizado ficou no campo do "nível de efeito adverso não observado", um contexto mais compatível com aquilo que se espera quando se avalia a administração tópica de um composto.

A literatura indica que alterações neurológicas podem ser causadas por substâncias químicas presentes em algumas espécies vegetais, estas que podem aparecer sob forma de distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrointestinais, incluindo diversos outros sintomas, tais como salivação, vômitos, convulsões, coma e levar até à morte<sup>194,195</sup>. No caso de uma neurotoxicidade, que é a capacidade que um agente químico físico ou biológico tem de causar um efeito adverso no sistema nervoso, ela pode ser causada por toxinas que agem diretamente sobre este sistema<sup>196</sup>. As encefalopatias, por exemplo, podem ser causadas por uma variedade de causas, incluindo causas metabólico-sistêmicas (hepatopatias e nefropatias), traumas, neoplasias, infecções e intoxicações exógenas<sup>197</sup>. Desta forma, alguma substância presente no extrato de *D. indica* poderia causar uma intoxicação sendo detectada a partir de alterações do componente neurológico dos animais, que dependendo da intensidade e duração das lesões poderiam causar desde alterações discretas do comportamento, alguma

diminuição do nível de consciência, até alterações súbitas do comportamento, agressividade, ou letargia, tremores, atrofia muscular, convulsões, entre outros<sup>198-202</sup>. Os resultados apresentados na Tabela 2 relativos aos padrões de agressividade, piloereção, diarreia, vômitos, contorções abdominais e convulsões, complementados pelos dados de avaliação de componentes neuromotores apresentados na Figura 4 levam a postular que nenhuma destas alterações foram observadas nos animais tratados topicamente com o extrato de *D. indica*.

A piloereção é uma resposta da pele dos animais, que pode ser observada em algumas ocasiões, como uma reação ao medo, frente a alguma ameaça, sendo um indicador de alterações nos padrões de agressividade, mas também podendo ser ocasionada em resposta ao frio<sup>203</sup>. Aqui vale lembrar, que o frio não esteve presente entre as condições do presente estudo, no qual os animais foram mantidos em um ambiente de temperatura controlada. No contexto do presente estudo, uma reação de piloereção seria esperada se houvesse algum comprometimento neurológico que alterasse os padrões de agressividade dos animais.

Possíveis efeitos tóxicos sendo provocados sobre o comportamento nutricional e ações sobre o sistema digestivo foram avaliados através de parâmetros, tais como o desenvolvimento de diarreia, vômitos e contorções abdominais (Tabela 2). Em toxicologia, os efeitos colaterais produzidos pela exposição a fármacos e outras substâncias químicas são classificados de acordo com a duração e tempo de exposição, capazes de causar diferentes sinais e sintomas, que podem ser agudos ou crônicos. A diarreia é um sinal que pode ser definido pelo excesso de fezes liquefeitas que ocorre por três ou mais vezes ao dia, caracterizadas por diminuição da consistência das fezes e aumento de sua frequência de evacuação num período inferior a 14 dias, podendo ser acompanhada de náuseas, vômitos, desconfortos abdominais, além de sintomas sistêmicos como febre e desnutrição<sup>204-206</sup>. Só para se ter uma ideia, quando há, por exemplo, alguma infecção severa, o número de evacuações diárias pode ultrapassar 20 episódios, com defecações ocorrendo a cada 20 ou 30 minutos<sup>204-206</sup>. Os resultados do presente estudo, mostrados na Tabela 2 indicam que não foram observadas alterações desta espécie entre os animais tratados com extrato de *D. indica*, quando comparados frente aos grupos-controle.

Para Andris e colaboradores<sup>197</sup>, o estado nutricional pode ser avaliado de várias formas tais como: através de triagem nutricional (para identificação dos fatores de riscos que podem levar à desnutrição); história clínica (se existe uma patologia associada que influencie o estado nutricional); exame físico (determina achados, tais como aumento ou diminuição do peso e que podem estar associados a uma alteração do estado nutricional e a má nutrição) e resultados laboratoriais (que podem detectar problemas nutricionais em fase precoce através de informações proteico-calóricas)<sup>197,207</sup>. Quando a ingestão calórica é inadequada, o organismo supre suas necessidades energéticas por meio da degradação e utilização de proteínas e gorduras<sup>197</sup>. Os resultados da Tabela 6 mostraram que não houveram diferenças entre os níveis séricos de proteínas totais de animais tratados com extrato e animais dos grupos-controle.

A desnutrição pode ser devida também a hepatopatias, sendo uma complicação resultante de efeitos deletérios que causam disfunção hepática sobre a digestão, absorção, armazenamento e metabolismo dos nutrientes<sup>207</sup>. Neste tipo de avaliação, os exames de análises clínicas são auxiliares, e no caso deste estudo, eles serão discutidos mais adiante. Aqui vale comentar, que os resultados da avaliação do componente nutricional-metabólico através da medida do peso dos animais, consumo de água e ração (Tabela 3) não revelaram alterações deste tipo sendo causadas em camundongos que foram tratados topicamente com o extrato de *D. indica*.

O monitoramento do peso corporal é essencial para avaliação do estado nutricional adequado, que é alcançado quando o suprimento ou a ingestão de nutrientes atende as demandas do organismo<sup>197</sup>. Esta avaliação também entra no contexto da toxicologia<sup>208</sup>. Para que a nutrição seja adequada, os animais devem receber os nutrientes corretos, incluindo carboidratos, lipídios, vitaminas, proteínas, água e mineral e ainda que o sistema digestório esteja funcionando adequadamente para que sejam utilizados esses nutrientes pelo organismo. O consumo de água é de fundamental importância para o transporte dos nutrientes<sup>197</sup>. Algumas toxinas, como por exemplo, ésteres de forbol que estão presentes em algumas plantas, principalmente da família Euphorbiaceae, causam efeitos tóxicos que podem expressar-se como dispepsias, diminuição do consumo de alimentos, perda de peso e desidratação. Sabe-se que assim, este tipo de intoxicação pode

culminar em comprometimento do crescimento e supressão do sistema imunológico<sup>209,210</sup>.

Os dados relativos ao peso dos órgãos avaliados nos camundongos tratados com extrato e de animais dos grupos-controle foram mostrados na Tabela 4. Nos testes de toxicidade crônica devem ser pesados os órgãos vitais, o que serve como um importante indicador para a avaliação da toxicidade de alguma substância ou composto, juntamente com o monitoramento da massa corporal do animal<sup>211-213</sup>. Os rins e o fígado estão entre os principais órgãos de biotransformação de xenobióticos<sup>214-217</sup>. A literatura indica que no caso dos rins, devidos estes órgãos serem o principal local de excreção química, eles têm maior propensão a exibir efeitos toxicológicos induzidos quimicamente do que a maioria dos outros órgãos<sup>208</sup>. No entanto, autores como Craig e colaboradores<sup>208</sup>, anteriormente, já chegaram a questionar se a medida do peso dos rins seria capaz de refletir as alterações histopatológicas renais devidas à alguma intoxicação química. Estes autores desenvolveram um estudo buscando determinar se existiria uma relação entre alterações de peso dos rins quimicamente induzidas e alterações histopatológicas renais. Foram examinadas também a utilidade de avaliar o peso renal absoluto e relativo (relação peso-rim / peso corporal) na predição de toxicidade renal. Os dados obtidos mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre peso renal absoluto e a histopatologia renal em ratos tratados quimicamente. Esta correlação positiva entre o peso absoluto do rim e a histopatologia foi observada tanto com compostos que diminuíram estatisticamente o peso corporal dos animais, assim como alterações no peso absoluto do rim ocorreram em exposições subcrônicas, possibilitando previsões sobre a presença ou ausência de histopatologia renal em exposições subcrônicas e crônicas. No caso do presente estudo, não foram observadas alterações seja no peso dos rins ou no peso corporal dos animais, quando comparados aos grupos-controle.

Também se sabe que o fígado é um alvo suscetível a danos químicos porque muitas vezes ele é um dos primeiros órgãos a entrar em contato com as substâncias químicas ingeridas e absorvidas, principalmente quando administradas por via oral, mas também porque ele é um sítio de concentração de xenobióticos, sendo o local onde a maioria das biotransformações ocorrem<sup>218</sup>. A Sociedade Européia de Patologia Toxicológica e da Sociedade Britânica de Toxicologia recomendam fazer a

pesagem do fígado nos estudos toxicológicos porque alterações no peso do fígado podem sugerir hipertrofia hepatocelular, sendo que o peso do fígado pode ser elevado em tempos inferiores a 7 dias por causa de algumas substâncias químicas capazes de induzir as enzimas hepáticas<sup>219</sup>. Estas instituições também sugerem a pesagem do coração afirmando que esta medida pode ser a única capaz de detectar hipertrofia cardíaca induzida quimicamente, pois muitas vezes a histopatologia pode falhar nesta análise<sup>219</sup>.

Algumas substâncias, por exemplo, fármacos utilizados no tratamento do câncer, são traíçoeiras, pois podem causar cardiotoxicidade<sup>220</sup>. Sabe-se que um atrofia cardíaca (diminuição do tamanho do coração) normalmente representa uma consequência secundária resultante de um fenômeno sistêmico maior, e neste caso seria possível considerar algum efeito tóxico induzido pelo extrato de *D. indica*. Um último indicativo de toxicidade procurado através da medida do peso dos órgãos, diz respeito à pesagem do baço. A lógica desta análise foi que efeitos tóxicos normalmente causados por substâncias químicas sobre as células sanguíneas, causando hemólise (algo frequente em tratamentos com certos fármacos, como por exemplo o cloranfenicol), estes eventos podem causar sobrecarga do baço e esplenomegalia. A esplenomegalia reativa pode ocorrer em processos de sobrecarga do baço, quando eritrócitos estão sendo destruídos massivamente<sup>221</sup> e esta anormalidade não foi observada nos grupos de animais tratados avaliados no presente estudo. Os dados mostrados na Tabela 4 revelam que não foram detectadas alterações no peso dos rins, coração, baço e fígado de animais tratados topicamente com o extrato acetato de etila do fruto de *D. indica*, quando comparados frente aos dados dos animais dos grupos-controle.

Os testes de triagem toxicológicos frequentemente utilizam uma amostra de sangue ou urina. No contexto dos humanos, estes testes podem ser feitos logo após a pessoa ter ingerido uma substância, através de lavagem gástrica ou até mesmo analisando o vômito<sup>222,223</sup>. No contexto dos animais, as amostras de sangue são mais utilizadas. Trata-se de um fluido complexo, constituído em grande parte de água (cerca de 80%), proteínas solúveis, gorduras, sais e células suspensas, sendo considerado uma matriz convencional amplamente estudada nas análises toxicológicas<sup>223</sup>.

Uma análise sanguínea além de providenciar informações sobre o próprio sangue e tecidos formadores de sangue (a medula óssea), pode trazer informações de outros órgãos e tecidos que são perfundidos pelo sangue<sup>224</sup>. Exames de sangue são muito usados em testes para detectar o abuso de drogas. Um exame sanguíneo típico inclui um painel metabólico básico (análises bioquímicas) e uma contagem sanguínea completa<sup>223,225,226</sup>. O painel metabólico pode incluir a medida de sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, nitrogênio ureico no sangue, magnésio, creatinina, glicose e cálcio. Testes centrados nos níveis de colesterol podem determinar os níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade), bem como os níveis de triglicerídeos. Alguns testes, como aqueles que medem a glicose ou o perfil lipídico requerem jejum<sup>223,225,226</sup>.

Ao estudo dos efeitos adversos de drogas sobre o sangue e/ou tecidos formadores de sangue dá-se o nome de hematotoxicologia<sup>227,228</sup>. Geralmente, um hemograma completo corresponde a um conjunto de testes laboratoriais que estabelece aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritograma), dos leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaquetograma) no sangue, onde o eritograma inclui os testes que determinam o perfil hematológico da série vermelha no sangue periférico, constituído por contagem de eritrócitos ou hemácias; dosagem de hemoglobina; hematócrito; VCM; hemoglobina corpuscular média; concentração da hemoglobina corpuscular média e avaliação da morfologia eritrocitária. O leucograma determina o perfil hematológico da série branca no sangue periférico sendo constituído da contagem global ou absoluta e diferencial (relativa) de leucócitos, sendo os dados expressos em valores relativos e absolutos. O plaquetograma envolve a contagem de plaquetas, sua morfologia e determinação do volume plaquetário<sup>229</sup>. A Tabela 5 apresentou os dados dos hemogramas dos animais tratados com o extrato de *D. indica*. Como é possível perceber através da Tabela 5, nem todos os constituintes do hemograma puderam ser determinados com as amostras de sangue analisadas, seja devido à falta de tecnologia analítica no local onde o estudo foi realizado ou devido à pequena quantidade de amostra possível de ser coletada dos camundongos. Mas, a maioria dos parâmetros foram determinados.

Em hematotoxicologia, a contagem absoluta de eritrócitos pode providenciar pistas de efeitos tóxicos acontecendo sobre a membrana das hemácias, o que pode

levar à hemólise. Sabe-se que compostos que possuem atividade biológica interessante podem ser considerados inúteis se provocarem hemólise <sup>230</sup>. Uma redução na contagem das hemácias também é observada em casos de supressão da medula óssea, quando se pode esperar pancitopenia<sup>231</sup>. A morfologia anormal das hemácias pode ser inferida através do VCM. O valor aumentado de VCM pode indicar doenças como anemia perniciosa, macrocítica ou megaloblástica, mas também se encontra aumentado em caso de dependência alcoólica, sangramentos agudos, síndromes mielodisplásicas, recém-nascidos, hipotireoidismo, síndrome de Down, deficiência de ácido fólico ou ainda de vitamina B12. O valor diminuído do VCM inclui a deficiência de ferro, talassemia menor, anemia microcítica, esferocitose congênita, uremia, doenças do colágeno ou infecções crônicas graves <sup>229</sup>. Foi possível verificar que o tratamento testado não causou diferenças estatísticas, seja em camundongos machos ou fêmeas, quando os dados das contagens de hemácias do grupo teste tratado com extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* foram comparados àqueles dos grupos controles. Também não houve alteração na determinação do VHS e hematócrito nestes animais. O VHS é a taxa na qual os glóbulos vermelhos sedimentam em um período de uma hora. É um teste hematológico comum e é uma medida não específica de inflamação. Para realizar o teste, o sangue contendo anticoagulante é tradicionalmente colocado em um tubo ereto, sendo a taxa na qual os glóbulos vermelhos sedimentam medida em mm/h<sup>232</sup>. O hematócrito serve para medir a proporção de glóbulos vermelhos que constitui uma amostra de sangue e geralmente é feito quando há uma suspeita de anemia ou policitemia (hematócrito alto). Pode ser usado para identificar e diagnosticar múltiplos distúrbios ou doenças do sangue. O teste pode indicar se há um problema com a produção de eritrócitos ou a vida útil, mas não é capaz de determinar a causa subjacente<sup>169,224</sup>.

Avaliando o leucograma dos animais (Tabela 5) com apoio da literatura<sup>233</sup>, é sabido que efeitos tóxicos de substâncias podem acometer principalmente os granulócitos, tanto no que diz respeito a sua proliferação, assim como sua função, também se sabe que alguns tipos de leucemias podem ser desencadeados a partir da exposição a produtos químicos. Devido ao elevado índice fisiológico de proliferação dos neutrófilos, esta célula e seus precursores são particularmente susceptíveis a inibidores de mitoses. Os fármacos citotóxicos são geralmente

inespecíficos, mas se afetarem os neutrófilos (e monócitos) apresentam um risco maior de sequelas tóxicas. Estes efeitos tendem a ser relacionados à dose, com comprometimento fagocitário mononuclear precedendo um comprometimento neutrofilico<sup>233</sup>. Os efeitos tóxicos sobre granulócitos (mielotoxicidade) são comumente observados com agentes quimioterápicos, que muitas vezes agem para inibir a síntese do DNA. Entretanto, células não proliferativas, como metamielócitos, bastonetes e neutrófilos maduros são relativamente resistentes. Acredita-se que a exposição contínua a substâncias que afetam as células troncos seja a causa da mielossupressão<sup>233</sup>.

Algumas substâncias, como o etanol e os glicocorticoides, prejudicam a fagocitose. A produção de superóxidos, requerida para quimiotaxia é declaradamente reduzida em pacientes que usam heroína, bem como usuários de opiáceos. A quimiotaxia também é prejudicada após o tratamento com sais de zinco e preparações anti-acne<sup>233</sup>.

São preocupantes os agentes que inesperadamente prejudicam os neutrófilos e precursores granulocíticos induzindo agranulocitose, que é caracterizada por uma profunda depleção dos neutrófilos. A agranulocitose idiossincrática induzida por xenobióticos envolve uma brusca depressão de neutrófilos circulantes<sup>233</sup>. Substâncias tóxicas que afetam células tronco induzem à falência medular, aí deve ocorrer também anemia aplástica (supressão da medula óssea)<sup>233</sup>.

A leucemia mieloblástica aguda é a principal forma de leucemia associada à exposição à fármacos ou produtos químicos, seguida pelas síndromes mieloblásticas. Isto representa uma resposta tóxica que pode estar ligada a uma anormalidade citogenética, em particular a perda de todo ou parte do cromossomo 5 e 7<sup>233</sup>.

Os dados apresentados na Tabela 5 relativos aos leucogramas de animais tratados com extrato de *D. indica* não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparados aos dados dos animais do controle negativo. Por outro lado, houve diferença quando comparados os dados dos animais do grupo controle positivo (tratados com clobetasol) frente aos dados do controle negativo, indicando redução na contagem global de leucócitos e na contagem relativa de mononucleares (linfócitos e monócitos). Este achado serve bem para demonstrar que mesmo para fármacos ditos seguros, isto não significa que eles sejam atóxicos ou não possam

causar efeitos colaterais. A imunossupressão causada pelo clobetasol é bem descrita na literatura, e é justamente por conta dela que os usuários deste fármaco devem ser avisados que seu uso não pode ser prolongado. A Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC.) no dia 01/06/2012 apreciou a proposta de incorporação no sistema do clobetasol para o tratamento tópico da psoríase. O clobetasol está entre os fármacos corticosteroides de maior potência farmacológica e, assim como os demais corticosteróides, o propionato de clobetasol apresenta propriedade anti-inflamatória, antipruriginosa, vasoconstritora e imunossupressora e seu uso prolongado pode levar à imunossupressão, atrofia cutânea, alteração na pigmentação e hipertricrose (crescimento excessivo de pelos). O uso em grandes superfícies pode levar a absorção sistêmica, com resultante hipercortisolismo (produção excessiva de hormônios pela região cortical da glândula supra-renal), por isso é restrito, especialmente em crianças e ainda pode surgir a forma pustulosa de psoríase como efeito rebote da retirada do corticóide<sup>234</sup>.

Os dados das análises bioquímicas foram apresentados na Tabela 6, onde é possível observar que também não houve alterações sérico-bioquímicas em animais tratados com o extrato de *D. indica* em comparação aos animais dos grupos-controle. Primeiramente, os valores da glicemia de jejum foram utilizados para evidenciar algum efeito tóxico ocorrendo sobre o pâncreas, pois em toxicologia, a hiperglicemia de jejum é utilizada como um marcador para identificar compostos com efeitos tóxicos sobre as células betas pancreáticas<sup>235</sup>.

As concentrações séricas de lipídios serviram para providenciar evidências sobre eventuais efeitos tóxicos sobre o metabolismo de lipídios e neste caso, o fígado seria o principal alvo da toxicidade<sup>236,237</sup>. Sabe-se que a hepatotoxicidade é um dos principais motivos da retirada de fármacos do mercado e que ela pode levar a alterações na biossíntese de lipídios e esteatose hepática<sup>237</sup>. Os triglicerídeos são combustíveis metabólicos produzidos no fígado e armazenados por células especializadas chamadas adipócitos, estas células formam o tecido adiposo que está presente sob a pele, na cavidade abdominal e nas glândulas mamárias<sup>236</sup>. Quando o fígado está comprometido, existem falhas no transporte extra-hepático de triglicerídeos que acabam acumulando no fígado, causando esteatose hepática e alterações nos níveis de triglicerídeos<sup>238</sup>. Com relação aos níveis séricos dos

triglicerídeos não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais do grupo tratado com extrato de *D. indica* e animais dos grupos-controle.

A ureia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas, gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo através da urina e suor. É livremente filtrada pelos glomérulos e reabsorvida em média 40% pelos túbulos proximais e está diretamente ligada ao grau de hidratação do indivíduo e o metabolismo proteico. Os níveis sanguíneos de ureia constituem um indicador da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular<sup>239</sup>. Quando os níveis de ureia estão elevados, existe indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico<sup>240</sup>. Em animais tratados com o extrato de *D. indica*, as concentrações inalteradas de ureia sérica reforçaram a ideia de que não foram induzidos efeitos tóxicos sobre os rins.

A atividade inalterada das aminotransferases ou transaminases providenciou evidências adicionais sugestivas da integridade de órgãos, tais como cérebro, fígado, rins e coração, principalmente. As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e a ALT no fígado, rim e coração<sup>236</sup>. A ALT, também conhecida como transaminase pirúvica (TGP) tem origem citoplasmática, se elevando rapidamente no caso de lesão hepática e por isso é um marcador importante da função hepática causada por medicamentos<sup>241</sup>.

A AST é um marcador de dano celular importante que serve para avaliar a exposição a substâncias químicas. Também conhecida como transaminase oxalacética (TGO), é encontrada em diferentes órgãos e tecidos conforme já mencionado. A AST pode estar elevada quando o indivíduo é portador de hepatite tóxica, cirrose, pancreatite, carcinoma e choque prolongado<sup>242</sup>. Esta enzima está presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular profundo, podendo no caso do hepatócito ser devida a necroses medicamentosas e isquêmicas. Quando seus valores estão aumentados é indicativo de infarto agudo do miocárdio, infarto pulmonar, infarto renal, na embolia pulmonar, dermatomiosite, cirrose alcoólica, hepatites induzidas por drogas, anemias hemolíticas, pancreatite e acidente vascular cerebral<sup>241</sup>. Como foi observado no presente estudo, o tratamento experimental com extrato de *D. indica* não causou alterações na atividade da AST em comparação aos grupos-controle.

Os últimos resultados a serem discutidos dizem respeito ao teste de fotossensibilidade cutânea induzida pelo extrato de *D. indica*. Este ensaio trouxe informações importantes que deverão ser consideradas na eventualidade do extrato tornar-se constituinte de um novo medicamento. Os achados deste estudo indicaram que o extrato possui propriedades fotossensibilizantes próximas àsquelas do metóxipsoaleno, fármaco utilizado como controle positivo neste experimento e, na clínica utilizado como fotossensibilizante para fazer fototerapia<sup>150,152,153</sup>. Uma vez que os tratamentos realizados foram feitos com o extrato e não através de substâncias isoladas, à despeito do extrato ter sido padronizado em ácido betulínico, tornou-se complicado inferir que o efeito fotossensibilizante foi devido a um constituinte em particular e não outro. Por outro lado, como citado na referencial teórico, existem relatos de fotossensibilidade causada por flavonoides<sup>99</sup>, que estão entre os principais constituintes do extrato avaliado<sup>14</sup>. A fotorreatividade de alguns flavonoides é evidente, pois alguns deles tem papel fisiológico na fotossíntese<sup>96-99</sup>. A fototoxicidade do ácido betulínico também já foi avaliada anteriormente, sendo que os estudos relataram não ter observado este efeito sendo causado pelo ácido betulínico extraído de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae<sup>243</sup>. Cabe explicar que o efeito fotossensibilizante do extrato avaliado não significa uma forte limitação para seu uso, mas que obviamente uma recomendação deverá incluir a informação de que uma vez aplicado sobre uma área cutânea, esta deverá ser protegida contra radiações UV presentes na luz solar e artificial. Vários fármacos ditos seguros e utilizados na clínica possuem esta característica, tais como a hidroquinona<sup>244</sup>, fluoroquinolonas<sup>180</sup>, amiodarona<sup>245</sup>, entre outros que devem ser utilizados com precauções. No caso do extrato acetato de etila de *D. indica* é possível especular que suas propriedades fotossensibilizantes poderiam ser utilizadas com benefícios, se considerado o caso do tratamento de lesões através da fototerapia. É possível imaginar situações nas quais o extrato fosse aplicado por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes<sup>14</sup>, sendo utilizado também para fazer a fototerapia. Esta possibilidade precisa ser mais bem avaliada em estudos futuros. Embora não fosse objetivo deste estudo, vale comentar que o emprego do metóxipsoaleno como controle positivo teve complicações, pois mais de uma vez foi observada mortalidade em animais tratados com esta droga.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- O extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* aplicado topicamente na dose 150 mg/mL (100 µL) diariamente por 10 dias não causou mortalidade em camundongos;
- O referido tratamento não causou efeitos adversos, tais como alterações do comportamento, alterações neuromotoras, padrões nutricionais e alterações gastrointestinais;
- Animais tratados com o referido extrato não apresentaram alterações na forma e peso de órgãos, tais como: rins, fígado, baço e coração;
- Não foram detectadas alterações hematológicas e sérico-bioquímicas associadas ao tratamento dos camundongos com extrato acetato de etila do fruto de *D. indica*;
- Por outro lado, os dados do ensaio de fotossensibilidade indicaram um potencial fotossensibilizante para o extrato acetato de etila do fruto de *D. indica*.

### 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os grupos de pesquisa envolvidos na geração desta dissertação consideram a partir de agora:

- Desenvolver um novo estudo de atividade antipsoriática do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* e do ácido betulínico purificado, utilizando o modelo de lesões psoriasiformes induzidas em camundongos com imiquimode. Este é um modelo inovador que tem sido considerado entre os mais apropriados para o estudo das propriedades antipsoriáticas de novos fármacos<sup>185</sup>;
- Articular e dar início a um ensaio clínico de avaliação de eficácia e segurança do extrato acetato de etila do fruto de *D. indica* em pacientes portadores de psoríase.

## REFERÊNCIAS

1. Freire P. *Pedagogia do oprimido*. 17th ed. Rio de Janeiro: Paz e Terra; 1987. p. 33.
2. Berkowitz B. Avaliação básica e clínica de novas drogas. In: Katzung B, editor. *Farmacologia básica e Clínica*. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 53–60.
3. Takimoto CH, Wick M. Preclinical Drug Development. *Principles of Clinical Pharmacology*. 2007;(2): 449–62.
4. Mans DR, Rocha AB, Schwartsmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist*. 2000;5(3):185–98.
5. Khafagi IK, Dewedar A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. *J Ethnopharmacol*. 2000;71(3):365–76.
6. Elizabetsky E, Souza G. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz A, Petrovick PR, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5th ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2004. p. 107–22.
7. Yeshwante S, Juvekar A, Nagmoti D, Wankhede S, Shah A, Pimprikar R, et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts of *Dillenia indica* L. leaves. *J Young Pharm*. 2009;1(1):63.
8. Apu A, Muhit M, Tareq S, Pathan A, Jamaluddin A, Ahmed M. Antimicrobial Activity and Brine Shrimp Lethality Bioassay of the Leaves Extract of *Dillenia indica* Linn. *J Young Pharm*. 2010;2(1):50–3.
9. Kumar D, Mallick S, Vedasiromoni JR, Pal BC. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine*. 2010;17(6):431–5.
10. Kumar S, Kumar V, Prakash O. Antidiabetic and hypolipidemic activities of *Dillenia indica* extract in diabetic rats. *J Chinese Integr Med*. 2011;9(5):570–4.
11. Alam MB, Rahman MS, Hasan M, Khan MM, Nahar K, Sultana S. Antinociceptive and antioxidant activities of the *Dillenia indica* bark. *Int J*

- Pharmacol. 2012;8(4):243–51.
12. Khare RK, Prasad AK, Kumar S, Iyer SV, Vaidya SK, Bigoniya P. Flavonoid and triterpene rich fraction of *Dillenia indica* Linn. leaves: as anti-inflammatory and anti-arthritic activity. *Indo Am Pharm Res.* 2013;3(8):6076–82.
  13. Migliato K, Chiosini M, Mendonca F, Esquisatto M, Salgado H, Santos G. Effect of Glycolic Extract of *Dillenia indica* L. Combined With Microcurrent Stimulation on Experimental Lesions in Wistar Rats. *Wounds.* 2011;23(5):111–20.
  14. Kwiecinski M, David I, Fernandes FS, Correa M, Clarinda M, Freitas A, et al. Healing effect of *Dillenia indica* fruit extracts standardized to betulinic acid on ultraviolet radiation-induced psoriasis-like wounds in rats. *Pharm Biol.* 2016;55(1): 641-48.
  15. Queiroz CM. Chácara Xavier: um estudo de caso em arqueologia histórica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
  16. Franco IJ. Minhas 500 ervas e plantas medicinais. São Paulo: Santuário; 2012.
  17. Lorenzi H, Matos F. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Plantarum; 2002.
  18. Ars.usda.gov [Internet]. Taxon: *Dillenia indica* L. US National Plant Germoplasm System. Acesso em 20/12/2016. Disponível em: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?14122>
  19. Gandhi D, Mehta P. *Dillenia indica* Linn. and *Dillenia pentagyna* Roxb.: pharmacognostic, phytochemical and therapeutic aspects. *J Appl Pharm Sci.* 2013;3(11):134–42.
  20. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity Reviews.* 2014;13(4-5):490-95.
  21. Duffin KC, Chandran V, Gladman DD, Krueger GG, Elder JT, Rahman P. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: Update and future direction. *Journal of Rheumatology.* 2008;35(7):1449-53.
  22. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso Brasileiro de Psoríase 2012: guias de avaliação e tratamento. 2th ed. Rio de Janeiro; 2012.
  23. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000Prime Reports.* 2014;6(1):2–9.
  24. Carneiro S. Psoríase: mecanismos de doença e implicações terapêuticas. São Paulo: 2007.

25. Carvalho ACB, Nunes DDSG, Baratelli TDG, Shuqair NSMSAQ, Manchado Netto E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amaz.* 2007;11:26–32.
26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 90 de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. *Diário oficial da União* 18 mar 2004.
27. Mestre T, Rodrigues A, Cardoso J. Cicatrização De Feridas Crônicas: algumas opções terapêuticas. *Rev da Soc Port Dermatologia e Venereol.* 2012;70(4):423–33.
28. Corbett LQ. Wound Care Nursing: professional issues and opportunities. *Adv wound care.* 2012;1(5):189–93.
29. Vowden P. Hard to Heal Wounds Made Easy. *Wounds A Compend Clin Res Pract.* 2011;2(4):1–6.
30. Brito KKG de, Sousa MJ de, Sousa ATO de, Meneses B de A, Oliveira SH dos S, Soares MJGO. Feridas crônicas: abordagem da enfermagem na produção científica da pós-graduação. *Rev enferm UFPE line.* 2013;7(2):414–21.
31. Waidman MAP, Rocha SC, Correa JL, Brischiliari A, Marcon SS. O cotidiano do indivíduo com ferida crônica e sua saúde mental. *Texto e Context Enferm.* 2011;20(4):691–9.
32. Campos A, Branco A, Groth A. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2007;20(1):51–8.
33. Pott FS, Meier MJ, Stocco JGD, Crozeta K, Ribas JD. The effectiveness of hydrocolloid dressings versus other dressings in the healing of pressure ulcers in adults and older adults: a systematic review and meta-analysis. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2014;22(3):511–20.
34. Abbade LPF, Lastoria S, Rollo HD, Stolf HO. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. *Int J Dermatol.* 2005;44:989–92.
35. Oliveira BGRB de, Castro JBA, Granjeiro JM. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. *Rev Enferm.* 2013;21(SPEC.ISS.):612–17.
36. Oliveira BGRB de, Nogueira G de A, Carvalho MR de, Abreu AM de. Caracterização dos pacientes com úlcera venosa acompanhados no Ambulatório de Reparo de Feridas. *Rev Eletrônica Enferm [Internet].*

- 2012;14(1):156–63.
37. Oliveira BGRB de, Castro JB de A, Granjeiro JM. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. *Rev enferm UERJ*,. 2013;21(1):612–7.
  38. Arruda C, Nogueira E, Oliveira M, Pereira E, Silva R. Avanços e desafios da enfermagem na produção científica sobre psoríase. *Rev Bras Enferm*. 2011;64(1):186–75.
  39. Cofen (Brasil). Resolução nº 0501/2015, de 17 de dezembro de 2015. Regulamenta a competência da equipe de enfermagem no cuidado às feridas e dá outras providências. *Diário oficial da União*. 2015. p. 7–8.
  40. Ferreira AM, Bogamil DDD, Tormena PC. O enfermeiro e o tratamento de feridas: em busca da autonomia do cuidado. *Arq Ciênc Saúde [Internet]*. 2008;15(3):105–09.
  41. Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol*. 2004;79(6):647–64.
  42. Carvalho CHP, Santos BRM, Vieira CC, Lima ENA, Santos PPA, Freitas RA. Estudo epidemiológico das doenças dermatológicas imunologicamente mediadas na cavidade oral. *An Bras Dermatol*. 2011;86(5):905–9.
  43. Ferreira A, Ávila S. Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. 2th ed. Rio de Janeiro: Koogan G; 2011.
  44. Rosmalen JGM, Leenen PJM, Drexhage H a. Autoimmune Disease: aetiology and pathogenesis. In: John WS editor. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Ltd Chichester. 2001. p. 11.
  45. Criado PR, Criado RFJ, Maruta CW, Martins JEC, Rivitti EA. Urticária. *An Bras Dermatol*. 2005;80(6):613–30.
  46. Cunha PR, Barraviera SRCS. Dermatoses bolhosas auto-imunes. *An Bras Dermatol*. 2009;84(2):111–22.
  47. Zancanaro PCQ, Isaac AR, Garcia LT, Costa IMC. Esclerodermia localizada na criança: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. *An Bras Dermatol*. 2009;84(2):161–72.
  48. Giácomo M, Bueno A, Vaz J, Salgado M. Atualização em dermatomiosite. *Rev Bras Clin Med*. 2010;8(5):434–9.

49. Rivitti EA. Alopecia areata: a revision and update. *An Bras Dermatol.* 2005;80(1):57–68.
50. Gonçalves GAP, Brito MMC, Salathiel AM, Ferraz TS, Alves D, Roselino AMF. Incidência do pênfigo vulgar ultrapassa a do pênfigo foliáceo em região endêmica para pênfigo foliáceo: análise histórica de 21 anos. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1109–12.
51. Lima EDA, Lima MDA. Imunopatogênese da psoríase: revisando conceitos. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1151–58.
52. Sato EI, Bonfá ED, Tereza L, Costallat L, Antonio N, Carlos J, et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). *Rev Bras Reumatol.* 2002;42(6):362–70.
53. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008;358(9):929–39.
54. Criado R, Criado P, Sittart J, Pires M, Mello J, Aun W. Urticária e doenças sistêmicas. *Rev Ass Med Bras.* 1999;45(4):349–56.
55. Arruda L, Ypiranga S, Martins GA. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte II: imunomoduladores biológicos. *An Bras Dermatol.* 2004;79(4):393–408.
56. Romiti R, Arnone M, Maragno L, Takahashi M. Psoríase na infância e na adolescência. *An Bras Dermatol.* 2009;84(1):9–20.
57. Duarte GV, Porto SL, Oliveira MFP. Epidemiology and treatment of psoriasis: a brazilian perspective. *Psoriasis Targets Ther.* 2015;5:55–64.
58. Carvalho M, Pires R, Florindo W, Cavalcanti A. Evidências para o uso de *Indigo naturalis* no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. *Natureza on line.* 2010;8(3):127–31.
59. Paixão MP, Ito LM, Machado CDA, Enokihara MMSS. Linear pustular psoriasis X Nevil: case report. *An Bras Dermatol.* 2005;80(6):607–10.
60. Chaves YN, Cardoso DN, Jorge PFL, Follador I, Oliveira MFP. Psoríase pustulosa da infância: relato de caso. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):899–902.
61. Lopes ACQ. Lúpus Eritematoso: principais sintomas, diagnósticos e terapêutica. *Dep Nac Pós Grad e Atualização.* 2013;(19):1–16.
62. Arruda C, Nogueira E, Oliveira M, Pereira E, Silva R. Avanços e desafios da enfermagem na produção científica sobre psoríase. *Rev Bras Enferm.* 2011;64(1):186–75.

63. Wastowski IJ, Carvalho IF de, Donadi EA. Patogenia das Doenças Auto-imunes [internet]. Acesso em 29/07/2016. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Patogenia%20das%20Doen%C3%A7as%20Auto-Imunes.pdf>
64. Kurd SK, Richardson SK, Gelfand JM. Update on the epidemiology and systemic treatment of psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2007;3:171–85.
65. Silva JDT, Müller MC. Uma integração teórica entre psicossomática, stress e doenças crônicas de pele. *Estud Psicol*. 2007;24(2):247–56.
66. Lopez A, Almeida YD, Rodrigues JB, Sanchez FAV, Guzman LMP. Psoríase invertida infantil extensa: abordagem do manejo. *Pediatr Mod*. 2014;50(1):33–6.
67. Lara MO, Júnior ACP, Pinto JSF, Vieira NF, Wichr P. Significado da ferida para portadores de úlceras crônicas. *Congitare Enferm*. 2011;16(3):471–77.
68. Secretaria de Saúde de São José o Rio Preto (Brasil). 2012. Protocolo de Enfermagem: prevenção e tratamento de feridas. [internet] Acesso em: 20/08/2016. Disponível em: [http://gestao.saude.riopreto.sp.gov.br/transparencia/arqu/mategraf/prot\\_enfer\\_t rat\\_fer.pdf](http://gestao.saude.riopreto.sp.gov.br/transparencia/arqu/mategraf/prot_enfer_t rat_fer.pdf)
69. Jorge H, Müller M, Ferreira V, Cassal C. Pacientes portadores de dermatoses: relações iniciais e auto-agressividade. *Rev Psicol d*. 2004;5(51):22–5.
70. Mandelbaum S, Santis E, Mandelbaum M. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):393–410.
71. Novato DA, Carvalho DV. Tratamento de feridas: uma contribuição ao ensino de enfermagem. *Rev Min Enf*. 2000;4(1/2):47–51.
72. Borges E, Gomes F, Saar S. Custo comparativo do tratamento de feridas. *R Bras Enferm*. 1999;52(2):215–22.
73. Lima E, Duarte A, Bernard G, Gomes Y, Lima M, Marques C, et al. Investigação de infecção tuberculosa latente em pacientes com psoríase candidatos ao uso de drogas imunobiológicas. *An Bras Dermatologia*. 2011;86(4):716–24.
74. Blanes L. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva JCC, editor. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. [internet] São Paulo: 2004. Acesso em 20/10/2016. Disponível em: <file:///localhost/C:/Users/Usuario/Downloads/Tratamento de>

Feridas.pdf

75. Maia CPA, Takahashi MDF, Romiti R. Consenso brasileiro de psoríase: guias de avaliação e tratamento. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2012.
76. Arruda L, Ypiranga S, Martins GA. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte II: imunomoduladores biológicos. *An Bras Dermatol.* 2004;79(4):393–408.
77. Kalb RE, Strober B, Weinstein G, Lebwohl M. Methotrexate and psoriasis: 2009 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2009;60(5):824–37.
78. Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000Prime Reports.* 2014;6(1):2–9.
79. Phrma. Biopharmaceutical Research & Development: the process behind new medicines. [internet] 2015. Acesso em: 29/07/2016. Disponível em: [http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd\\_brochure\\_022307.pdf](http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd_brochure_022307.pdf)
80. Elizabetsky E, Souza G. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões C, Schenckel E, Gosmann G, Mello J, Mentz A, Petrovick, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5th ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2004. p. 107–22.
81. Sharma HK, Chhangte L, Dolui AK. Traditional medicinal plants in Mizoram, India. *Fitoterapia.* 2001;72(2):146–61.
82. National Institute Of Science Communication and Information Resources, CSIR. [internet]. *The wealth of India: a dictionary of Indian raw materials and industrial products.* New Delhi; 2010. Acesso em: 10/10/2016. Disponível em: <http://www.niscair.res.in/activitiesandservices/products/wealth-of-indiaFolder2010.pdf>.
83. Lorenzi H. *Árvores exóticas no Brasil.* São Paulo: Nova Odessa, 2003.
84. Shome U, Khanna RK, Sharma HP. Pharmacognostic studies of *Dillenia indica* Linn. II-Fruit and seed. *Proc Plant Sci.* 1980;89(2):91–104.
85. Kirtikar KR, Basu BD. *Indian medicinal plants.* 2th ed. Dehra Dun: International Book Distributors; 1987.
86. Sood SK, Bhardwaj R, Lakhanpal TN. *Ethnic Indian plants in cure of diabetes.* Chicago: Scientific Publishers Journals Dept.; 2005.
87. Kumar D, Mallick S, Vedasiromoni JR, Pal BC. Anti-leukemic activity of *Dillenia*

- indica L. fruit extract and quantificaion of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine*. 2010;17(6):431–5.
88. Franco EAP, Barros RFM. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Rev Bras Plantas Med*. 2006;8(3):78–88.
  89. Kwiecinski M, Freitas A. Atividade antipsoriática de extratos do fruto de *Dillenia indica* Linnaeus (Dilleniaceae) ricos em ácido betulínico. In: IX Jornada UNISUL de Iniciação Científica. Tubarão SC: Editora UNISUL; 2014.
  90. Rahman MA, Hasanuzzaman M, Muhuri SR, Rahman AA. Antinociceptive, antidiarrhoeal and GI motility activities of *Dillenia indica* Linn. roots. *Pharmacologyonline*. 2011;1:1247–54.
  91. Alam MB, Hossain MS, Haque ME. Evaluation of antimicrobial and toxicity of different fractions of *Dillenia indica* Linn. bark extract. *J Glob Pharma Technol*. 2010;2(11):37–42.
  92. De Mello FB, Langeloh A, De Mello JRB. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. *Lat Am J Pharm*. 2007;26(2):191–200.
  93. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 90 de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Diário oficial da União 18 mar 2004.
  94. Valente R, Sampaio F, Higino J. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. *Brazilian J Pharmacogn*. 2009;19(2B):557–60.
  95. Silva JC, Barros RF, Penatti CAA. Paradigmas comportamentais de experimentação em roedores: em busca do entendimento das interações sociais na ansiedade. *REBSCAL*. 2015;3(1):7–15.
  96. Fernandez SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GAR, Paladini AC, et al. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol*. 2006;539(3):168–76.
  97. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002;13(10): 572–84.
  98. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: Intake, health effects and

- bioavailability. *Food Chem Toxicol.* 1999;37(9–10):937–42.
99. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26(5):343–56.
  100. Tripoli E, Guardia M La, Giammanco S, Majo D Di, Giammanco M. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem.* 2007;104(2):466–79.
  101. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(2–3):67–202.
  102. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):673–751.
  103. Tapas A, Sakarkar D, Kakde R. Flavonoids as Nutraceuticals: a review. *Trop J Pharm Res.* 2008;7(3):1089–99.
  104. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Sect Title Anim Nutr.* 2007;18(7):427–42.
  105. Mladenka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2010;49:963–75.
  106. Chatterjee M, Sil PC. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Phyllanthus niruri* on nimesulide-induced oxidative stress in vivo. *Indian J Biochem Biophys.* 2006;43(5):299–305.
  107. Zhou T, Luo D, Li X, Luo Y. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera gaertn*) leaf in diabetic mice. *J Med Plants Res.* 2009;3(4):290–93.
  108. Patra JC, Chua BH. Artificial neural network-based drug design for diabetes mellitus using flavonoids. *J Comput Chem.* 2011;32(4):555–67.
  109. Yi LT, Li CF, Zhan X, Cui CC, Xiao F, Zhou LP, et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2010;34(7):1223–28.
  110. Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A.* 2006;1112(1-2):31–63.

111. Williams RJ, Spencer JPE. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;52(1):35–45.
112. Miller AL. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Altern Med Rev*. 1996;1(2):103–11.
113. Bitis L, Kultur S, Melikoglu G, Ozsoy N, Can A. Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves. *Nat Prod Res*. 2010;24(6):580–89.
114. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Sci [Internet]*. 2011;1(1):25–41.
115. Cook N. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1996;7(2):66–76.
116. Agrawal A. Pharmacological activities of flavonoids: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2011;4(2):1394–98.
117. Cho USSH, Gottlieb K. Cosmetic compositions containing betulinic acid. 2001;07570(19):1–15. Acesso em 24/11/2016. Disponível em: <https://www.google.com/patents/EP0717983B1?cl=en>
118. Schühly W, Heilmann J, Calis I, Sticher O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med*. 1999;65(8):740–3.
119. Fujioaka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, et al. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products*. 1994;57(2):243–77.
120. Yogeewari P, Sriram D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem*. 2005;12(6):657–66.
121. Mello JRB, Mello FB, Langeloh A. Toxicity study of a phytotherapeutic with *Anemopaegma mirandum*, *cola nitida*, *passiflora alata*, *paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* and thiamin in rabbits. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2010;29(8):1431–35.
122. Adeleke G, Adaramoye OA. Modulatory role of betulinic acid in N-nitrosodimethylamine-induced hepatorenal toxicity in male Wistar rats. *Human and Experimental Toxicology*. 2016;1–10.
123. Acésio NO, Oliveira PF De, Mastrocola DFP, Lima IMDS, Munari CC, Sato

- VLFL, et al. Modulatory Effect of Betulinic Acid on the Genotoxicity Induced by Different Mutagens in V79 Cells. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2016(2):1-6.
124. Jin S, Choi C, Hwang Y, Kim H, Kim S, Chung Y, et al. Betulinic Acid Increases eNOS Phosphorylation and NO Synthesis via the Calcium-Signaling Pathway. *J Agric Food Chem*. 2016;64(4):785–91.
125. Yi J, Zhu R, Wu J, Wu J, Xia W, Zhu L, et al. In vivo protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress. *Pharmacol Reports*. 2016;68(1):95–100.
126. Guaraldo L, Chagas DA, Konno AC, Korn GP, Pfiffer T, Nasello AG. Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1–2):61–7.
127. David JM, Souza JC, Guedes MLS, David JP. Estudo fitoquímico de *Davilla rugosa* flavonóides e terpenóides. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(1):105–8.
128. Wang S, Yang Z, Xiong F, Chen C, X C, J H, et al. Betulinic acid ameliorates experimental diabetic-induced renal inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;434:135–43.
129. Kim K, Lee D, Kim D, Yoon C, W K, Oh H, et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Coussaric and Betulinic Acids Isolated from *Diospyros kaki* in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules*. 2016;21(9).
130. Raju R, Gunawardena D, Ahktar M, Low M, Reddell P, Münch G. Anti-Inflammatory Chemical Profiling of the Australian Rainforest Tree *Alphitonia petriei* (Rhamnaceae). *Molecules*. 2016;21(11).
131. Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett*. 2002;175(1):17–25.
132. Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2000;114(5):935–40.
133. Qian K, Yu D, Chen CH, Huang L, Morris-Natschke SL, Nitz TJ, et al. Anti-AIDS agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and

- antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents. *J Med Chem.* 2009;52(10):3248–58.
134. Luo R, Fang D, Chu P, Wu H, Zhang Z, Tang Z. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1321–30.
135. Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression. *Mol Med Rep.* 2016;14(5):4489–449.
136. Das J, Samadder A, Das S, Paul A, Khuda-Bukhsh A. Nanopharmaceutical Approach for Enhanced Anti-cancer Activity of Betulinic Acid in Lung-cancer Treatment via Activation of PARP: interaction with DNA as a target: anti-cancer potential of nano-betulinic acid in lung cancer. *J Pharmacopuncture.* 2016;19(1):37–44.
137. Hong EH, Song JH, Kang K Bin, Sung SH, Ko HJ, Yang H. Anti-influenza activity of betulinic acid from *Zizyphus Jujuba* on influenza A/PR/8 virus. *Biomol Ther.* 2015;23(4):345–49.
138. Oliveira DR, Costa ALMA, Leitão GG, Castro NG, Santos JP, Leitão SG. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. *Acta Amaz.* 2011;41(3):383–92.
139. Mishra T, Bhatia A. Augmentation of expression of immunocytes' functions by seed extract of *Zizyphus mauritiana* (Lamk.). *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):341–5.
140. Meira CS, Barbosa-Filho JM, Lanfredi-Rangel A, Guimarães ET, Moreira DRM, Soares MBP. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. *Exp Parasitol.* 2016;166:108–15.
141. Innocente AM, De Brum Vieira P, Frasson AP, Casanova BB, Gosmann G, Gnoatto SCB, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives. *Parasitol Res.* 2014;113(8):2933–40.
142. Tonessen HH. *Photostability of Drugs and Drug Formulations.* 2th ed. Florida, USA: CRC Press; 2004.
143. Rampone WM, McCullough JL, Weinstein GD, Towers GH, Berns MW, Abeysekera B. Characterization of cutaneous phototoxicity induced by topical

- alpha-terthienyl and ultraviolet A radiation. *J Invest Dermatol.* 1986;87(3):354–57.
144. Drucker AM, Rosen CF. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, management and prevention. *Drug Saf.* 2011;34(10):821–37.
145. Tonnesen HH. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 2001;225(1-2):1–14.
146. Beijersbergen van Henegouwen GM. Beijersbergen van Henegouwen. *Adv Drug Res.* 1997;29(79–170).
147. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Fotossensibilidade [Internet]. 2016 Acesso em 29/07/2016. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/doencas/fotossensibilidade/>.
148. Mang R, Stege H, Krutmann J. Mechanisms of Phototoxic and Photoallergic Reactions. In: Forsch PJ, Menné T, Lepoittevin JP, editors. *Contact Dermatitis.* 5th ed. Detmold Germany; 2010. p. 97-104.
149. Setlik J, Cássio RDS. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não- melanoma. *Rev Saúde e Desenvol.* 2015;7(4):195–206.
150. Silva E, Santos E, Júnior E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele : conceitos , utilizações e limitações. *Rev Bras Farm.* 2009;90(3):211–7.
151. Issa M, Azulay M. Photodynamic therapy : a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol.* 2010;85(4):501–11.
152. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nov.* 2002;25(5):801–07.
153. Duarte I, Buense R, Kobata C. Fototerapia. *An Bras Dermatol.* 2006;81(1):74–82.
154. Israel CB, Santos DF, Maués T, Queiroz GB De, Costa FB, Silva J, et al. Uso da terapia fotodinâmica empregando azul de metileno a 2 % como agente fotossensibilizante para o controle de crescimento tumoral em calopsita (*Nymphicus hollandicus*) portador de sarcoma. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária.* 2014;21(2):86–89.
155. Duarte I. Fototerapia na psoríase. In: *Consenso Brasileiro de Psoríase.* 2009. p. 55–61. Acesso em 28/12/2016. Disponível em:

- <http://docplayer.com.br/6782695-Capitulo7-fototerapia-na-psoriase-ida-duarte-1-colaboradores-roberta-buense-bedrikow-2-clarice-kobata-3-santa-casa-de-misericordia-de-sao-paulo.html>.
156. Ministério do Meio Ambiente (Brasil). A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB. In: Decreto Legislativo nº 2, de 5 de junho de 1992 [Internet]. Brasília; 2000. p. 32. Acesso em 17/06/2016. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_chm\\_rbbio/\\_arquivos/cdbport\\_72.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/cdbport_72.pdf)
  157. Kostova I, Ojala T, Lacy A, O'Kennedy R, Widelski J, Melliou E, et al. Natural Product Chemistry For Drug Discovery. *J Nat Prod*. 2010;5(8):440.
  158. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (Brasil). Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal. 2013;187:2–8. Acesso em 02/08/2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=1&pagina=5&data=26/09/2013&captchafield=firistAccess>.
  159. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659–61.
  160. Shrivastav S, Sindhu RK, Kumar S, Kumar P. Anti-psoriatic and phytochemical evaluation of *Thespesia populnea* bark extracts. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2009;1:176–85.
  161. Vijayalakshmi A, Ravichandiran V, Velraj M, Nirmala S, Jayakumari S. Screening of flavonoid “quercetin” from the rhizome of *Smilax china* Linn. for anti-psoriatic activity. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(4):269–75.
  162. Fang JY, Shen KL, Huang YB, Wu PC, Tsai YH. Evaluation of Topical Application of Clobetasol 17-Propionate from Various Cream Bases. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999;25(1):7–14.
  163. Goel MK, Khanna P, Kishore J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int J Ayurveda Res [Internet]*. 2010;1(4):274–8.
  164. Felipe KB, Kwiecinski MR, Silva FO, Bucker NF, Farias MS, Castro LSEPW, et al. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *J Ethnopharmacol*. 2014;155(3):1492–9.
  165. Choleris E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed

- magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25(3):235–60.
166. Bobinski F, Alarcón Ferreira TA, Córdova MM, Dombrowski PA, da Cunha C, Santo CC do E, et al. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain following sciatic nerve injury in mice. *Pain.* 2015;156(November):1.
  167. Fernández I, Peña A, Del Teso N, Pérez V, Rodríguez-Cuesta J. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(2):202–6.
  168. Han BG, Hao C-M, Tchekneva EE, Wang Y-Y, Lee CA, Ebrahim B, et al. Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(4):E981-86.
  169. Rowley PT. *Williams Hematology. American journal of human genetics.* 1995. p. 514. Acesso em 06/12/2016. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/ajhg00034-0320a.pdf>.
  170. Dyer SM, Cervasio EL. An Overview of Restraint and Blood Collection Techniques in Exotic Pet Practice. *Veterinary Clinics of North America-Exotic Animal Practice.* 2008;11(3):423–43.
  171. Failace R. *Hemograma: Manual de Interpretação.* 5th ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.
  172. Kessler MJ, Rawlins RG. The hemogram, serum biochemistry, and electrolyte profile of the free-ranging cayo santiago rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology.* 1983;4(2):107–207.
  173. Horobin RW, Horobin R. How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem.* 2011;86(1):36–51.
  174. Bain BJ. *Células sanguíneas: um guia prático.* 4th ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
  175. Sox Jr. HC, Liang MD. The Erythrocyte Sedimentation Rate. *Ann Intern Med.* 86AD;(4):515.
  176. Snieszko SF. Microhematocrit values in rainbow trout, brown trout, and brook trout. *The Progress Fish-Culturist.* 1961;114–9.

177. Bearhop S, Griffiths R, Orr K, Furness RW. Mean corpuscular volume (MCV) as a measure of condition in birds. *Ecol Lett*. 1999;2(6):352–6.
178. Mueller T, Haidinger D, Luft C, Horvath W, Poelz W, Haltmayer M. Association between erythrocyte mean corpuscular volume and peripheral arterial disease in male subjects: a case control study. *Angiology*. 2001;52(9):605–13.
179. Boudon SM, Plappert-Helbig U, Odermatt A, Bauer D. Characterization of Vemurafenib Phototoxicity in a Mouse Model. *Toxicol Sci*. 2014;137(1):259–67.
180. Mayne JT, Johnson NJ, Kluwe WM, Lencoski DL, Polzer RJ. A study of the phototoxic potential of trovafloxacin in BALB/c mice. *J Antimicrob Chemother*. 1997;39 Suppl B:67–73.
181. Matsumoto N, Akimoto A, Kawashima H, Kim S. Comparative study of skin phototoxicity with three drugs by an in vivo mouse model. *J Toxicol Sci*. 2010;35(1):97–100.
182. Renkielska A, Kaczmarek M, Nowakowski A, Grudziński J, Czapiewski P, Krajewski A, et al. Active dynamic infrared thermal imaging in burn depth evaluation. *J Burn Care Res*. 2014;35(5):e294-303.
183. Rajapakse C, Grennan DM, Jones C, Wilkinson L, Jayson M. Thermography in the assessment of peripheral joint inflammation-a re-evaluation. *Rheumatology*. 1981;20(2):81–87.
184. Faurchou AMD, Wulf HC. Phototesting [Internet]. *European Dermatology Forum: Guidelines on Photodermatoses*. 2009. Acesso em 04/08/2016. Disponível em: <http://www.euroderm.org/index.php/edf-guidelines>
185. Fits LVD, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009;182(9):5836–45.
186. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (Brasil). Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica DBCA [Internet]. 2016. Acesso em 05/05/2016. Disponível em: [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0238/238684.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf)
187. World Health Organization. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems [Internet]. *World Heal Organ Geneva*. 2004;82. Acesso em 29/12/2016. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s7148e/s7148e.pdf>

188. World Health Organization. The Importance of Pharmacovigilance - Safety Monitoring of medicinal products [Internet]. Who. 2002. Acesso em 30/12/2016. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4893e/s4893e.pdf>
189. Carvalho AC, Viana A, Rosa BC, Valerim K, Remor T. Ensaio de irritação primária de pele - avaliação da toxicidade dérmica aguda do extrato bruto hidroalcoólico da planta *Dillenia Indica* em ratos. Jornada Unisul de Iniciação Científica - Unisul. 2015. p. 3–5. Acesso em 28/12/2016. Disponível em: [http://www.rexlab.unisul.br/junic/2015/arquivo\\_sistema/resumo\\_expandido\\_2015\\_26\\_08\\_00\\_\\_55dd3055523dd.pdf](http://www.rexlab.unisul.br/junic/2015/arquivo_sistema/resumo_expandido_2015_26_08_00__55dd3055523dd.pdf).
190. Rodrigues D, Rebouças D, Teles A, Filho JN da C, Guimarães C, Santana O, et al. Apostila de Toxicologia Básica [Internet]. CIAVE - Centro de Informações Antiveneno da Bahia. Salvador – Bahia; 2009. p. 1–73. Acesso em 03/01/2017. Disponível em: [http://www.saude.ba.gov.br/pdf/Apostila\\_CIAVE\\_Ago\\_2009\\_A4.pdf](http://www.saude.ba.gov.br/pdf/Apostila_CIAVE_Ago_2009_A4.pdf)
191. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2003. Acesso em 03/01/2017. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia\\_cosmeticos\\_final\\_2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf)
192. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2012;74. Acesso em 03/01/2017. Disponível em: [http://www.saocamilo-sp.br/biblioteca/ebooks/Guia\\_cosmeticos\\_grafica\\_final.pdf](http://www.saocamilo-sp.br/biblioteca/ebooks/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf)
193. Parasuraman S. Toxicological screening. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011;2(2):74–9.
194. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mendes LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; 2001.
195. VASCONCELOS J. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. *Rev Científica da UFPA*. 2009;7(1):1–10.
196. Organização Mundial da Saúde. Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente. Rio de Janeiro; 2008. Acesso em 03/01/2017. Disponível em: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/subs\\_quimicas%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/subs_quimicas%20(4).pdf).
197. Andris DA. Semiologia: Bases para a pratica assistencial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

198. Aggarwal M, Khan IA. Hypertensive crisis: hypertensive emergencies and urgencies. *Cardiology Clinics*. 2006;24(1):135–46.
199. Heaton EB, Brust JC, Feinfeld DA, Thomson GE. Hypertensive encephalopathy and the neurologic manifestations of malignant hypertension. *Neurology*. 1982;32(2):127–32.
200. Chou WH, Messing RO. Hypertensive encephalopathy and the blood-brain barrier: is deltaPKC a gatekeeper? *J Clin Invest*. 2008;118(1):17–20.
201. Giammanco M, Tabacchi G, Giammanco S, Di Majo D, La Guardia M. Testosterone and aggressiveness. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):RA136-45.
202. Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(4):495–506.
203. Nilsson M, Åström R, Theorell T, Schéele B V, Nilsson M. Musical Piloerection. *Music Med*. 2012;4(2):82–89.
204. Ho MS, Glass RI, Pinsky PF, Young-Okoh N, Sappenfield WM, Buehler JW, et al. Diarrheal Deaths in American Children Are They Preventable? *JAMA*. 1998;260(22):3281–85.
205. Cohen ML. The epidemiology of diarrheal disease in the United States. *Infect Dis Clin North Am*. 1988;2:557–70.
206. DuPont HL. Guidelines on acute infectious diarrhea in adults. *Am J Clin Gastroenterol*. 1997;92(11):1962–75.
207. Costa MJC. *Interpretação de exames bioquímicos para o nutricionista.*, São Paulo: ATHENEU; 2008.
208. Craig EA, Yan Z, Zhao QJ. The relationship between chemical-induced kidney weight increases and kidney histopathology in rats. *J Appl Toxicol*. 2015;35(7):729–36.
209. Imai S, Sugiura M, Mizuno F, Ohigashi H, Koshimizu K, Chiba S, et al. African Burkitt's lymphoma: a plant, *euphorbia tirucalli* reduces epstein-barr virus-specific cellular immunity. *Anticancer Res*. 1994;14(3 A):933–6.
210. Aregheore EM, Becker K, Makkar HPS. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. *South Pacific J Nat Sci*. 2003;21:50–6.
211. Costa JP, Lourenço NV, Santos CCMP, Tomé AR, Sousa GF, Sousa DP, et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em

- camundongos tratados com fitol. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2012;33(3):421–28.
212. Valcarenghi D. Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana ferro III solúvel. [dissertação]. Universidade do Vale do Itajaí; 2004. Acesso em 04/01/2017. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp003037.pdf>.
213. Jahn A, Günzel P. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol.* 1997;11(2–3):171–78.
214. Pesonen M, Celandier M, Förlin L, Andersson T. Comparison of xenobiotic biotransformation enzymes in kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987;91(1):75–84.
215. Lock EA, Reed CJ. Xenobiotic metabolizing enzymes of the kidney. *Toxicol Pathol.* 1998;26(1):18–25.
216. Gagné F. Xenobiotic biotransformation. In: Gagné F. *Biochemical ecotoxicology: principles and methods.* 2014. p. 117–30.
217. Parkinson A, Klaasen CD, Watkins JB. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaasen CD, Watkins JB. *Casarett and doull's essentials of toxicology.* 2001. p. 133-144.
218. Panqueva RPL. Morphological issues of drug induced liver disease. *Rev Col Gastroenterol.* 2014;29(4):439–50.
219. Sellers RS, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, et al. Society of toxicologic pathology position paper: Organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol.* 2007;35(5):751–5.
220. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18(11):1639–45.
221. Brown NF, Marks DJB, Smith PJ, Bloom SL. Splenomegaly. *Br J Hosp Med (Lond).* 2011;72:M166-9.
222. Bednarczuk VO, Verdam MCS, Miguel MD, Miguel OG. Testes In vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica.* 2011;11(2):43–50.
223. Bordin D, Monedeiro F, Campos E, Alves M, Bueno L, Martinis B. Técnicas de

- preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Sci Chromatogr.* 2015;7(2):125–43.
224. Hoffbrand A, Moss P, Pettit J. Fundamentos em hematologia. *Revista de Biología Tropical.* 2008;59:226-240.
225. Kummer N, Lambert WEE, Samyn N, Stove CP. Alternative sampling strategies for the assessment of alcohol intake of living persons. *Clin Biochem.* 2016;49(13–14):1078–91.
226. Meyer G, Maurer H, Meyer M. Multiple stage MS in analysis of plasma, serum, urine and in vitro samples relevant to clinical and forensic toxicology. *Bioanalysis.* 2016;8(5):457–81.
227. Gupta RC. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles.* The Canadian Veterinary Journal. 2007.
228. Bloom J, Brandt JT. Respostas tóxicas do sangue. In: Klaassen CD, Watkins III JB. *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull.* São Paulo: Artmed; 2012. p. 149–60.
229. Oliveira R. *Hemograma: como fazer e interpretar.* 2th ed. São Paulo: Red Publicações; 2016.
230. Zohra M, Fawzia A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. 2014;5(8):495–500.
231. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscip Toxicol.* 2012;5(2):47–58.
232. Pisetsky D. Laboratory testing in the rheumatic diseases. In: Goldman L, Schafer A, editors. *Goldman’s cecil medicine.* 25th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2016.
233. Bloom J, Brandt JT. Respostas Tóxicas do sangue. In: Klaassen C, Watkins J, editors. *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull.* São Paulo: Artmed; 2012. p. 149–60.
234. Simabuku EMG, Catanheide ID, Biella C de A, Rabelo RB, Santos VCC, Petramale CA. Comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS e a judicialização do acesso à saúde. *Rev Eletrônica Gestão Saúde.* 2015;6(Supl. 4):3024–42.
235. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 1982;79(January):630–34.
236. Boyle J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D. Cox, M. Biochem Mol Biol Educ. 2005;33(1):74–75.
237. Matos L, Martins B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. Rev Da Soc Port Med Interna. 2005;12(4):239–58.
238. Baynes JW, Domiczak MH. Bioquímica Médica. 4th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
239. Schossler D, Alievi M, Emanuelli MP, Schossler J. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e ketoprofen durante o trans e pós-operatório. Acta Cir Bras. 2001;16(1):46–51.
240. Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. J Ethnopharmacol. 2000;69(1):9–15.
241. Hayes RB, Zhang L, Swenberg JA, Yin SN, Xi L, Wiencke J, et al. Markers for carcinogenicity among butadiene-polymer workers in China. Chem Biol Interact. 2001;135–136:455–64.
242. Chaves TVS. Estudo das alterações hematológicas, bioquímicas e genotóxicas induzidas por agrotóxicos em agricultores do sul do Piauí. [tese]. Universidade Federal do Ceará; 2011.
243. Souza PA, Silva CG, Machado BRP, Lucas NC, Leitão GG, Eleutherio ECA, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e fototóxica dos extratos e compostos isolados de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. Brazilian J Pharmacogn. 2010;20(6):922–28.
244. Maibach H, Marzulli F. Photoirritation (phototoxicity) from topical agents. Dermatol Clin. 1986;4(2):217–22.
245. Jaworski K, Walecka I, Rudnicka L, Gnatowski M, Kosior DA. Cutaneous adverse reactions of amiodarone. Med Sci Monit. 2014;20:2369–72.

## ANEXO

### ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 30 de maio de 2016  
Registro na CEUA (código): 15.041.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Maicon Roberto Kwiecinski

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Estudo da toxicidade pré-clínica do extrato padronizado acetato de etila do fruto de *Dillenia Indica*", registrada com o nº 15.041.4.01.IV, sob a responsabilidade de Maicon Roberto Kwiecinski - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 24/05/2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

---

Prof. Sandra Melim Sgratt  
Coordenador da Comissão