

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA E
SUBAGUDA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA
CASCA DA *Scutia buxifolia* Reissk EM
CAMUNDONGOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andreia Regina Haas da Silva

Santa Maria, Brasil

2014

**EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA E
SUBAGUDA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA
CASCA DA *Scutia buxifolia* Reissk EM
CAMUNDONGOS.**

Andreia Regina Haas da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Brandão

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA E
SUBAGUDA À FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA
CASCA DO CAULE DE *Scutia buxifolia* Reissek
EM CAMUNDONGOS.**

elaborado por
Andreia Regina Haas da Silva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA


Ricardo Brandão
(Presidente/Orientador)


Kristiane Mariotti, Dr^a. (UFRGS)


Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFMS)

Santa Maria, 07 de março de 2014.

Dedico esta dissertação a meus pais, Auri e Noeli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus. Sem ele, a minha vida não teria sentido e eu não teria a força de vontade necessária para desenvolver este trabalho e seguir em frente na certeza de que esta é mais uma etapa vencida e que outras virão em seguida.

Aos meus pais Auri e Noeli, e na pessoa deles todos os meus familiares, que não me deixaram desistir em nenhum momento, me apoiaram ao longo da caminhada, ajudando nos momentos difíceis e me incentivando a sempre buscar o que almejo, pelo amor, carinho e, acima de tudo, por terem acreditado no meu potencial.

Ao meu namorado Marshaw pela paciência e apoio psico/técnico-científico/amoroso, o qual foi indispensável para a elaboração desse trabalho.

Aos meus amigos Nessana e José Adriano, Carlise e Emerson, Silvana e Lucian, Suzana e Rafael, Marla e Mathias, Raquel, Michele, Liana, pela compreensão dos momentos em que não pude estar com eles, pois havia experimentos a realizar e aos funcionários da Casa Andreia e do AR Bebidas por muitas vezes escutarem meus “causos” de experimentos realizados.

As colegas de laboratório de toxicologia Laís, Evelyne, Mayara, Taiane, Michelli, Paula, Lia, Laíza, Lilian, Helena que compartilharam comigo momentos inesquecíveis, ao apoio, incentivo e amizade construída.

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia Experimental, na pessoa da professora Liliane de Freitas Bauermann, que receberam com muito carinho e fizeram deste laboratório minha 2ª casa.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida, em ser aluno de mestrado do PPG de Ciências Farmacêuticas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Ao secretário do PPG de Ciências Farmacêuticas, Paulo, por ter sido sempre solícito e aos professores da UFSM por todos os ensinamentos, dedicação e carinho ao longo do curso.

Ao meu orientador Ricardo pela oportunidade, pelo seu auxílio e estímulo, compreensão, dedicação, ensinamentos repassados e paciência em todos os momentos, meu sincero agradecimento.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem à vida e muda todas as perguntas”.

Luis Fernando Veríssimo

“O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu a contornar os obstáculos”

André Luis

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.

Fernando Pessoa

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBAGUDA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA *Scutia buxifolia* Reissk EM CAMUNDONGOS.

AUTORA: ANDREIA REGINA HAAS DA SILVA

ORIENTADOR: RICARDO BRANDÃO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de março de 2014.

Planta pertencente à família Rhamnaceae, a *Scutia buxifolia* é uma árvore de pequeno porte. No Brasil ocorre no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e, nestes locais, é conhecida popularmente como coronilha. Através da infusão em água da casca do tronco e das folhas, a *S. buxifolia* é utilizada com propriedades hipotensora, diurética e cardiotônica. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e subaguda da fração acetato de etila da casca do caule de *S. buxifolia* em camundongos machos e fêmeas. Como metodologia foi utilizada as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE diretrizes 423 e 407). Na análise da toxicidade aguda, uma única dose de 2000 mg/kg de *S. buxifolia* foi administrada oralmente a camundongos de ambos os sexos. Mortalidade, parâmetros bioquímicos e hematológicos foram avaliados. No estudo de toxicidade subaguda, a fração da planta foi administrada oralmente aos animais, machos e fêmeas, em doses de 100, 200 e 400 mg/kg/dia durante 28 dias. Alterações comportamentais, ganho de peso corporal, consumo alimentar e parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos foram analisados. Na exposição aguda, não foram encontradas alterações comportamentais. Entretanto, causou diminuição nos níveis de plaquetas nos camundongos machos e fêmeas e redução nos níveis de leucócitos, somente nas fêmeas. No estudo de toxicidade subaguda, não foi observada alteração comportamental, no ganho de peso corporal e na ingestão alimentar em camundongos de ambos os sexos. Houve redução nos níveis de glicose nos camundongos machos tratados com 200 e 400 mg/kg de *S. buxifolia* e a atividade de aspartato aminotransferase (AST) foi aumentada nos camundongos machos tratados com *S. buxifolia* na dose mais alta. Em relação aos parâmetros hematológicos, os camundongos machos apresentaram uma redução nos níveis de hemoglobina (HGB) e do hematócrito (HCT), quando tratados com 400 mg/kg da fração da planta. As fêmeas não mostraram mudança nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. O exame histopatológico do tecido hepático mostrou pequenas alterações que foram consistentes com as variações bioquímicas observadas. Alterações histopatológicas também foram observadas no rim de animais tratados com 400 mg/kg da fração da planta. Conforme avaliação da toxicidade aguda, a administração por via oral da fração acetato de etila da casca do caule de *S. buxifolia* pode ser classificada como segura (categoria 5), de acordo com o guia da OCDE. No entanto, as alterações observadas após a administração subaguda com altas doses de extrato, fração acetato de etila, da casca do caule da *S. buxifolia*, sugerem que a administração repetida da fração dessa planta pode causar efeitos adversos hepáticos, renais e hematológicos.

Palavras chave: Toxicidade. Plantas medicinais. *Scutia buxifolia*. Camundongos.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduante Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

EFFECTS TOXIC OF EXPOSURE TO ACUTE AND SUBACUTE ETHYL ACETATE FRACTION FROM THE BARK OF *Scutia buxifolia* Reissk IN MICE.

AUTHORA: ANDREIA REGINA HAAS DA SILVA

ADVISOR: RICARDO BRANDÃO

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 7, 2014.

Plant belonging to the family Rhamnaceae, the *Scutia buxifolia* is a small tree. In Brazil occurs in Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul and in these places, is popularly known as "coronilha". By infusing water in the bark and leaves, *S. buxifolia* it is used as a cardiotoxic, antihypertensive and diuretic substance. This study aimed to evaluate the acute and subacute toxicity of the ethyl acetate fraction of the stem bark of *S. buxifolia* in male and female mice. As methodology guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD-guidelines 423 and 407). In the analysis of acute toxicity, a single dose of 2000 mg/kg of *S. buxifolia* was administered orally to both sexes mice. Mortality, biochemical and hematological parameters were evaluated. The study of subacute toxicity, the plant was administered orally to the animals, males and females, at doses of 100, 200 and 400 mg/kg/day for 28 days. Behavioral changes, body weight gain, food intake, biochemical, hematological and histological parameters were analyzed. In acute exposure, no behavioral changes were found. However, caused a decrease in platelet levels in mice and male and female reduction in leukocyte levels only in females. In subacute toxicity study, no behavioral changes were observed in body weight gain and food intake in mice of both sexes. There was a reduction in glucose levels in male mice treated with 200 and 400 mg/kg *S. buxifolia* and activity of aspartate aminotransferase (AST) was increased in treated male mice with *S. buxifolia* at the highest dose. In relation hematological parameters, male mice showed a reduction in hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT), when treated with 400 mg/kg of plant fraction. The females showed no change in biochemical and hematological parameters. Histopathological examination of liver tissue showed small changes that were consistent with the biochemical changes observed. Histopathological changes were also observed in the kidneys of animals treated with 400 mg/kg of plant fraction. As the evaluation of acute toxicity by oral administration ethyl acetate fraction from the bark of *S. buxifolia* of can be classified as safe (category 5), according to the OECD guide. However, the changes observed after subacute administration with high doses of extract, ethyl acetate fraction of the stem bark of *S. buxifolia* suggest that repeated administration of the plant fraction can cause liver, kidney and hematologic adverse effects.

Key words: Toxicity. Medicinal plants. *Scutia buxifolia*. Mice.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas..... 19

Figura 2 – Número de municípios por unidade federativa que oferecem plantas medicinais e/ou fitoterápicos 19

Figura 3 – Procedimento de teste com uma dose inicial de 2000 mg/kg de peso corporal 24

Figura 4 – Exemplares de *S. buxifolia* fotografados em Santana da Boa Vista, RS, em 2008 pelo fotógrafo Martin Molz. Disponível na página do Flora RS (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1384), acessada em 12/11/2013 28

Figura 5 - Exemplar das folhas de *S. buxifolia* fotografados em Santana da Boa Vista, RS, em 2011 pelo fotógrafo Martin Molz. Disponível na página do Flora RS (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7540), acessada em 12/11/2013 28

MANUSCRITO

Figure 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *S. buxifolia*, detection UV was at 327nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercitrin (peak 9), quercetin (peak 10) and kaempferol (peak 11) 52

Figure 2. Photomicrography of segment of the hepatic lobe of male mice with a detail the right (A,B) of an animal control. Note the hepatocyte strings, the centrilobular vein and sinusoid capillaries with normal aspect. (C,D) of an animal treated with at dose of

200 mg/kg. Note inflammatory cells infiltration surrounding the centrilobular vein (*). See cytoplasmic vacuolization (arrow). (E,F) of an animal treated with a dose of 400 mg/mg showed intense inflammatory cell infiltration (*) around the hepatocyte strings of a normal aspect and centrilobular vein (D). Hepatocyte strings (arrow); centrilobular vein (cv); sinusoid capillaries (sc). Hematoxylin and Eosin. 100x and 250x, respectively.....53

Figure 3. Photomicrography of a segment of the kidney of male mice with a detail on the right of: (A,B) Control kidney of an animal control, showing the architecture of normal structures. Note the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules. (C,D) 200 mg/kg-treated group showed the morphology of proximal tubules cells with normal appearance. Observe that there are some areas with tubular dilation (*) and glomerular alteration (arrow). (E,F) 400 mg/kg-treated group present tissue disintegration in the proximal and distal tubules (arrowhead) and glomerular alteration (arrow). pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Hematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively54

Figure 4. Photomicrography of segment of the hepatic lobe of female mice with a detail the right (A,B) of an animal control. Note the hepatocyte strings, the centrilobular vein and sinusoid capillaries with normal aspect. (C,D) of an animal treated with at dose of 400mg/kg of normal aspect. Hepatocyte strings (arrow); centrilobular vein (vc); sinusoid capillaries (sc). Hematoxylin and eosin. 10x and 25x, respectively55

Figure 5. Photomicrography of segment of kidney of female mice with a detail on the right of: A,B) Control kidney showing architecture normal glomeruli. Note the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules. C,D) 400mg/kg-treated group showed morphology of proximal tubules cells and glomerulus with normal appearance. pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Hematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively56

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 – Composition of <i>Scutia buxifolia</i> ethyl acetate fraction.....	57
Table 2: Effects of the acute administration of <i>S. buxifolia</i> (ethyl acetate extract) on the food intake of male and female mice.....	58
Table 3: Effects of sub-acute administration of <i>S. buxifolia</i> (ethyl acetate extract) for 28 days on biochemical parameters in mice.....	59
Table 4: Effects of the sub-acute administration of <i>S. buxifolia</i> (ethyl acetate extract) for 28 days on erythrocytic parameters and platelets levels in mice.....	60
Table 5: Effects of the sub-acute administration of <i>S. buxifolia</i> (ethyl acetate extract) for 28 days on white cells and differential leukocytes count in mice.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a. C.	– Antes de Cristo
ABIFISA	– Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde.
AcOEt	– Acetato de Etila
ALAT	– Alanine aminotransferase
ALT	– Alanina aminotransferase
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASAT	– Aspartate aminotransferase
AST	– Aspartato aminotransferase
ATCC	– American Type Culture Collection
BUN	– Blood urea nitrogen levels
CAT	– Catalase
CH ₂ Cl ₂	– Diclorometano
CHOL	– Total cholesterol
CIT	– Centro de Informação Toxicológica
DL ₅₀	– Dose Letal Média
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DPPH	– 2,2-difenil,1-picrihidrazila
EDTA	– Ethylenediamine–tetraacetate
FDA	– Food and Drugs Administration
GLU	– Glucose
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
HCT	– Hematocrit
HGB	– Hemoglobin
HPLC	– Cromatografia Líquida de Alta Performace
Kg	– Quilograma
LD ₅₀	– Median lethal dose
MCH	– Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	– Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	– Mean corpuscular volume

MDA – Malondealdído
mg – Miligrama
MS – Ministério da Saúde
n-BuOH – Butanol
NPSH – Tióis não proteicos
OECD – Organization for Economic Cooperation and Development
OECD – Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento;
OMS – Organização Mundial da Saúde
PLT – Platelet
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RBC – Erythrocytes
RDW – Red cells distribution width
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SOD – Superóxido dismutase
SUS – Sistema Único de Saúde
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
WBC – Leukocytes

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	14
1.1 O uso de plantas medicinais	14
1.2 Plantas medicinais no Brasil	16
1.3 Avaliação da toxicidade <i>ex vivo</i>	21
1.3.1 Estudo da toxicidade aguda	22
1.3.1.1 OECD 423	23
1.3.2 Estudo da toxicidade subaguda	25
1.3.2.1 OECD 407	25
1.4 Considerações gerais sobre <i>Scutia buxifolia</i>	27
II OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
III MANUSCRITO	33
3.1 Manuscrito - Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate extract from the stem bark <i>Scutia buxifolia</i> Rissek in mice.	34
Abstract	37
1. Introduction	38
2. Materials and methods	38
3. Results	42
4. Discussion	43
5. Conclusion	46
References	47
IV PERSPECTIVAS FUTURAS	62
REFERÊNCIAS	63

I INTRODUÇÃO

1.1 O uso de plantas medicinais

Desde os antepassados, o homem aproveita a imensa diversidade de plantas existentes no mundo para desenvolver medicamentos de origem natural ou derivados sintéticos de plantas medicinais para o tratamento das mais variadas doenças que afligem a humanidade, principalmente pela facilidade de obtenção e pelo baixo custo, quando utilizadas *in natura* (DI STASI, 1995; MACIEL et al., 2002). Bem antes da criação da escrita, o homem já utilizava ervas para fins alimentares e medicinais. Um tratado médico datado de 3.700 a. C., escrito pelo imperador chinês Shen Nung, é um dos mais antigos documentos conhecidos sobre as propriedades medicinais das plantas (CUNHA; RIBEIRO; ROQUE, 2007).

A prática da utilização das plantas através do conhecimento popular é repassada por grupamentos culturais que possuem um contato direto com a natureza e exploram suas potencialidades, passando os seus conhecimentos de geração em geração (ELISABETSKY, 1997; REZENDE; COCCO, 2002). O seu uso durante anos foi recurso obrigatório, tendo em vista que os medicamentos quimicamente sintetizados tiveram seu desenvolvimento impulsionado a partir do século XX (MARQUES, 2009). Apesar dessa grande evolução da medicina alopática, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso ao centro de atendimentos hospitalares à obtenção de exames e medicamentos, a carência de recursos dos órgãos públicos de saúde e incessantes aumentos de preço dos medicamentos alopáticos. Esses motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, bem como os efeitos colaterais apresentados por alguns medicamentos, contribuem para o crescente interesse na fitoterapia (PARENTE; ROSA, 2001; VEIGA JR et al., 2008; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; OUEDRAOGO et al., 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2003), planta medicinal é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos, sendo planta fresca aquela coletada no momento de uso e planta seca

aquela que foi precedida de secagem, equivalendo à droga vegetal (OMS, 2003). Já um fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

A eficácia, segurança e qualidade dos fitoterápicos são validadas através da etnofarmacologia, documentações científicas publicadas e por ensaios clínicos, devidamente fiscalizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Todos os fitoterápicos industrializados devem ser registrados neste órgão sanitário antes de serem comercializados (BRASIL, 2004; 2010).

As plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos toxicológicos, seja por seus próprios componentes ou pela presença de contaminantes e/ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Segundo a OMS (WHO 1993; 2011), aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento no mundo tem nas plantas a fonte de cura e prevenção de doenças. A biodiversidade dos vegetais constitui uma vasta fonte de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças. Através da análise da medicina de civilizações tradicionais, pesquisadores iniciaram estudos clínicos, farmacológicos e químicos na tentativa de descobrirem os princípios ativos das plantas medicinais por elas utilizadas (RATES, 2001). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente das plantas medicinais, sendo 121 compostos ativos de uso corrente. Dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo é de fármacos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais, tais como morfina e codeína de *Papaver somniferum*. No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, essa porcentagem pode ser maior que 60% (RATES 2001; WHO, 2011).

Os estudos sobre a medicina popular têm demonstrado que as plantas medicinais são utilizadas na forma bruta (não processadas), como infusões,

decocção e tinturas ou como fitoterápicos (extratos padronizados e formulados de plantas), geralmente como alternativa aos produtos medicinais alopáticos (GURIP-FAKIM, 2006; VALE, 2002). Ainda, as plantas medicinais e seus derivados são usados como medicação prescrita ou sem receita, automedicação ou autocuidado, remédio caseiro, ou como suplemento dietético, alimentos para saúde, alimentos funcionais, fitoprotetores dentre outros (WHO, 2011).

1.2 Plantas medicinais no Brasil

Há um crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade e, nesse aspecto, o Brasil é privilegiado, sendo detentor de grande diversidade biológica, contando com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal (BRASIL, 2012). No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (SIMÕES; SCHENKEL, 2001; FOGGIO et al., 2006).

O comércio de ervas medicinais teve início com as comunidades indígenas, sendo o conhecimento tradicional repassado ao longo do tempo por especialistas populares (curandeiros, benzedeiros). No entanto, nem todas as práticas e receitas populares são eficazes, ao contrário, muitas podem ser altamente danosas à saúde (MACIEL, 2002; FRANCA, 2008). Na maioria dos casos, as espécies são utilizadas de acordo com a tradição popular, transmitida entre gerações, na forma de automedicação e sem qualquer preocupação quanto à colheita, dos cuidados tomados durante os processos de armazenamento, secagem e moagem, da ausência de contaminação por fungos e outros microrganismos, se é tóxica ou não (RATES, 2001; REZENDE; COCCO, 2002; SIMÕES; SCHENKEL, 2002; RODRIGUES; SANTOS; DE SIMONI, 2011). Dentro da biodiversidade brasileira, alguns exemplos importantes de plantas medicinais utilizadas tradicionalmente são: *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Psidium guajava* (guava), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) e *Copaifera* sp. (copaíba) (GURIP-FAKIM, 2006).

De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde - ABIFISA (2009), que se apresenta como a principal associação do setor, o mercado brasileiro de fitoterápicos é dimensionado a partir de um faturamento de R\$ 660,5 milhões, em 2007, e uma quantidade vendida de 37,3 milhões de unidades. Esses valores correspondem a cerca de 3% do mercado farmacêutico. O mercado de fitoterápicos, com o crescimento acelerado, teve um faturamento de quase 11%, em relação a 2005, e de mais de 18% em relação a 2006. As quantidades vendidas, também tiveram uma aceleração significativa, passando de 1,8% para 8,5%. (ABIFISA, 2009). Entretanto, o país importa cerca de 100% da matéria prima utilizada na produção dos produtos sendo que a maioria dos extratos vegetais que originam os fitoterápicos consumidos é proveniente da Europa e da Ásia e os princípios ativos mais comercializados, *Ginko biloba*, valeriana, castanha da Índia, entre outros, hoje são de origem estrangeira (RODRIGUES; NOGUEIRA, 2008; HASENCLEVER, 2009; BRASIL, 2012). Logo, mesmo possuindo vários fitoterápicos registrados na ANVISA, apenas uma pequena parte é oriunda de espécies nativas brasileiras, sendo extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos para fornecer a comunidade dados científicos sobre segurança ou toxicidade das plantas (BRASIL 2006b; MIOTO, 2010).

Diante dos desafios e dificuldades que a saúde pública vem enfrentando em nosso país, muitos gestores procuram alternativas que minimizem os gastos, sendo o uso de terapias complementares, com utilização de plantas medicinais, uma opção a ser considerada. O uso de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde é considerado um recurso viável e barato, uma vez que o Brasil dispõe da maior biodiversidade de plantas do mundo e, em consonância, uma rica diversidade cultural e étnica em suas regiões (VEIGA JR, 2008; DUTRA, 2009).

As políticas relacionadas ao uso de fitoterápicos e plantas medicinais não indicam seu uso com objetivo de substituir medicamentos registrados e comercializados por laboratórios, mas atuar como uma forma terapêutica opcional, considerando ser um tratamento de menor custo e os benefícios se somar-se-ão à terapia convencional (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2006c).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) foram publicadas pelo Ministério da Saúde (MS) para fazerem parte das políticas públicas de saúde no

setor de plantas medicinais e fitoterápicos, levando em conta a necessidade do reconhecimento da medicina tradicional como parte integrante dos sistemas de saúde (BRASIL 2006a; 2006b). Em 2008, foi criado um banco de dados da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) que é constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). A ideia é que a relação sirva de base para uma ampliação do número de fitoterápicos que hoje são financiados com verba federal (BRASIL, 2008). Atualmente, o Caderno de Atenção Básica nº 31 do MS intitulado "Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica" busca estimular a implantação de novos programas no SUS, com melhoria do acesso da população a produtos e serviços seguros e de qualidade; sensibilizar e orientar gestores e profissionais de saúde na formulação e implantação de políticas, programas e projetos; e estruturar e fortalecer a atenção em fitoterapia, com ênfase na Atenção Básica/Saúde da Família (BRASIL, 2012).

A resolução nº 14 de 31 de março de 2010 estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Atualmente, 12 medicamentos fitoterápicos são oferecidos pelo SUS, dentre eles a *Aloe vera* (Babosa) para o tratamento de psoríase e queimaduras, o *Salix alba* (Salgueiro) contra dores lombares, apresentando atividade anti-inflamatória e a *Mikania glomerata* (Guaco) com ação expectorante e broncodilatadora (ALARCON, 2012). Em função destas proporções atingidas pelos fitoterápicos, existem muitos estudos que procuram analisar compostos vegetais hábeis a dar origem a novos fármacos.

Em 2008, as ações e serviços fitoterápicos fornecidos pelo SUS eram ofertados em 350 municípios/Estados, distribuídos em todas as regiões do País (Figuras 1 e 2). Nesses, os serviços disponibilizam plantas medicinais em 1 ou mais das seguintes formas: planta *in natura*, planta seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado (BRASIL, 2012).

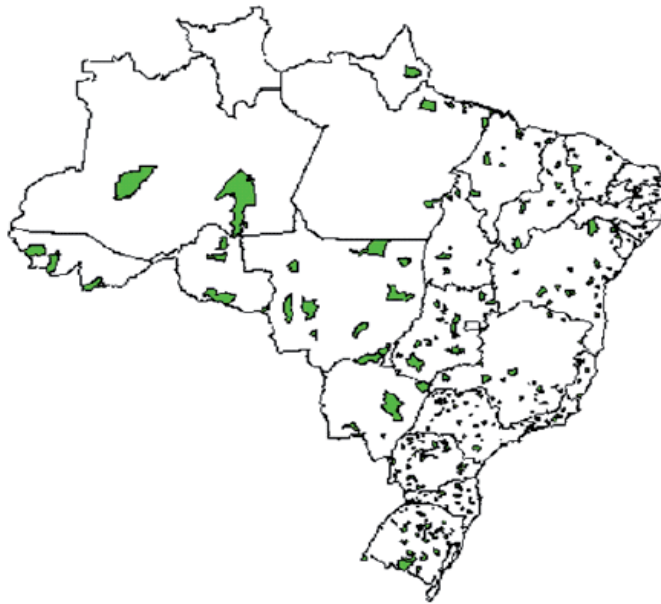


Figura 1 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas.

Fonte: adaptado de BRASIL, 2012.

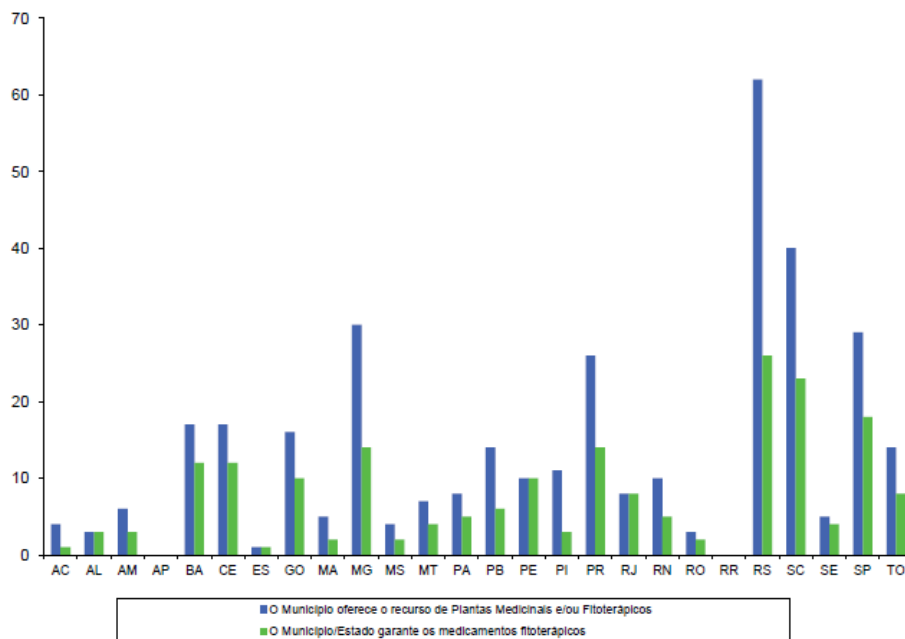


Figura 2 – Número de municípios por unidade federativa que oferecem plantas medicinais e/ou fitoterápicos.

Fonte: adaptado de BRASIL, 2012.

A Portaria GM/MS nº 886, de 20 de abril de 2010, institui, no âmbito do SUS, a Farmácia Viva, que, no contexto da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, realizará todas as etapas, desde o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, seu uso é difundido por ervanários e pela própria população como seguros, por se tratar de fonte natural. Efeitos adversos, interações medicamentosas e a má qualidade do produto são frequentes (ONYEKA et al., 2012; EFFERRT; KAINA, 2011). A falsa ideia de que, por se tratar de produto natural não existe risco algum, faz também com que essas medicações sejam utilizadas de forma inadequada (VEIGA JR, 2008). Diante de tantos incentivos legais em promover uma política voltada à saúde e à adoção de plantas medicinais e fitoterápicos na assistência farmacêutica, cada vez mais as pessoas estão interessadas em conhecer e fazer uso destas estratégias de tratamento, na procura de uma vida “natural” e “saudável” e/ou por dificuldades financeiras frente aos altos preços dos medicamentos em geral. No entanto, mesmo com o incentivo de uma Política Nacional, parece ainda haver carência de informação e de ações no sentido da efetiva implementação dessa prática terapêutica no SUS (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005; VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005; KLEIN et al., 2009; VEIGA JR, 2008; OUEDRAOGO et al., 2012).

O perfil da população que faz uso de plantas medicinais inclui, principalmente, pessoas de baixa renda e escolaridade, com acesso dificultado aos medicamentos alopáticos. A maioria dos usuários envolvidos nos estudos relata ter aprendido sobre plantas com seus ascendentes e demais familiares ou pessoas do convívio social. Assim, a preservação da sabedoria popular é importante como uma forma de proteger o conhecimento das comunidades (SCHULTES, 1988; VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005). A maior parte das plantas medicinais referidas nas pesquisas é cultivada nas moradias, em quintais e jardins, e em menor frequência adquirida na forma de chás industrializados e comercializados em farmácias, drogarias e supermercados (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005; TAUFNER; FERRAÇO; RIBEIRO, 2006). Nesse sentido, a maioria das sociedades rurais brasileiras, quintais e pomares próximos à moradia desempenham importante função na manutenção de muitas espécies medicinais (AMOROZO, 2004).

Em relação à forma de utilização das plantas, 50% das espécies medicinais são consumidas como chás para beber, seguido de xaropes e alcoolaturas. Os chás das folhas são preparados por infusão ou decocção, revelando que algumas vezes a planta é utilizada de forma errônea já que só as partes duras (raiz, caule e casca) devem ser cozidas (SCHENKEL, 1995; REZENDE; COCCO, 2002). Também, no estado do Rio Grande do Sul, muitas plantas são colocadas no chimarrão e tomadas diariamente. Os xaropes, preparados no inverno, são usados principalmente para tosse, gripe e bronquite. Já dentre as alcoolaturas, se destaca uma mistura de cachaça com grande quantidade de ervas que é preparado para uso tópico e usado em machucados, contusões, dores musculares, inflamações, dores reumáticas e outras enfermidades (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005). Muitas vezes as plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

1.3 Avaliação da toxicidade *ex vivo*

A produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (BRASIL, 2004). É essa fundamentação científica necessária para o desenvolvimento de um produto fitoterápico o que o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et al., 2007).

Os produtos fitoterápicos são utilizados com uma ideia errada, na qual se acredita que por ser um produto natural, não causam efeitos tóxicos ou adversos e que o uso popular das plantas, por muitas comunidades e grupos étnicos, serve como validação da eficácia destes medicamentos. Entretanto, os estudos toxicológicos, em alguns casos, mostram que as plantas, quando usadas de forma exacerbada, podem sim ser nocivas ou até, em doses elevadas, letais. Uma mesma planta pode conter partes medicinais e terapêuticas e também partes com

substâncias tóxicas prejudiciais ao organismo humano e animal (LAPA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2008).

Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais (OGA, 2008). Os efeitos tóxicos observados no homem encontram-se, geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Soma-se ainda o fato de que a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; OGA, 2008).

No relatório de 2011 do Centro de Informação Toxicológica (CIT) do Rio Grande do Sul, constam nove ocorrências de intoxicação por plantas medicinais. Destas, duas foram ocasionadas pela administração de árvore-avenca (*Ginkgo biloba*), três pela babosa (*Aloe vera*) e quatro por valeriana (*Valeriana officinalis*) (NICOLELLA; FERREIRA; LESSA, 2012).

No Brasil, a resolução 1/78 (D.O. 17/10/78) do Conselho Nacional de Saúde, estabelece como tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda (subcrônica), crônica, teratogenia e embriotoxicidade e estudos especiais, carcinogênicos, mutagênicos e neutotóxicos (VASCONCELOS, 2002; OGA, 2008).

1.3.1 Estudos da toxicidade aguda

A toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após administração de dose única, ou doses múltiplas, administradas em 24 horas (BARROS; DAVINO; OGA, 1996). A toxicidade aguda é expressa pela quantidade necessária, em mg/kg de peso corpóreo, para provocar a morte de 50% dos animais estudados, sendo representada pela dose letal média (DL₅₀) (EATON; KLAASSEN, 1995; BARROS; DAVINO; OGA, 1996; VALADARES, 2006; OGA, 2008).

Além da letalidade, os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda servem também para identificação do potencial tóxico em órgãos específicos, conhecimento do mecanismo de ação da substância; fornecimento de informações

para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe, identificação da toxicocinética e a relação-dose resposta. (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; VALADARES, 2006).

Como descrito por Valadares (2006), para a realização do teste da DL_{50} eram empregados mais de 100 animais (normalmente ratos e camundongos) para cada espécie estudada e para cada substância testada. O teste da DL_{50} foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de 1970, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Avaliação da LD_{50} tornou-se gradativamente um pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (VALADARES, 2006).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) incorporou o Teste da DL_{50} em suas diretrizes, fornecendo ensaios com estimativas aproximadas de DL_{50} , utilizando um número mais reduzido de animais.

1.3.1.1 OECD 423

O método de classificação de toxicidade aguda (OECD 423; 2001), estabelecido na presente orientação, é um procedimento gradual e reprodutível, com o uso de poucos animais do mesmo sexo por etapa ($n=3$). Dependendo da mortalidade e/ou estado moribundo dos animais, em média 2-4 etapas já são suficientes para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Os animais moribundos, com dor ou mostrando sinais de sofrimento grave e continuado devem ser eutanasiados e são considerados na interpretação dos resultados do teste da mesma forma que os animais que morreram durante o ensaio (OECD 423; 2001).

Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo de um valor exato de DL₅₀, mas permite a determinação de uma faixa de exposição definidas nas quais a letalidade é esperada uma vez que a morte de uma proporção dos animais é ainda o ponto principal de extremidade do presente ensaio (VALADARES, 2006).

O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionada a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corporal. A dose inicial deve ser a que tem maior probabilidade de induzir mortalidade em alguns dos animais tratados (OECD 423; 2001). A figura 3 descreve o procedimento que deve ser seguido para a dose inicial de 2000mg/Kg.

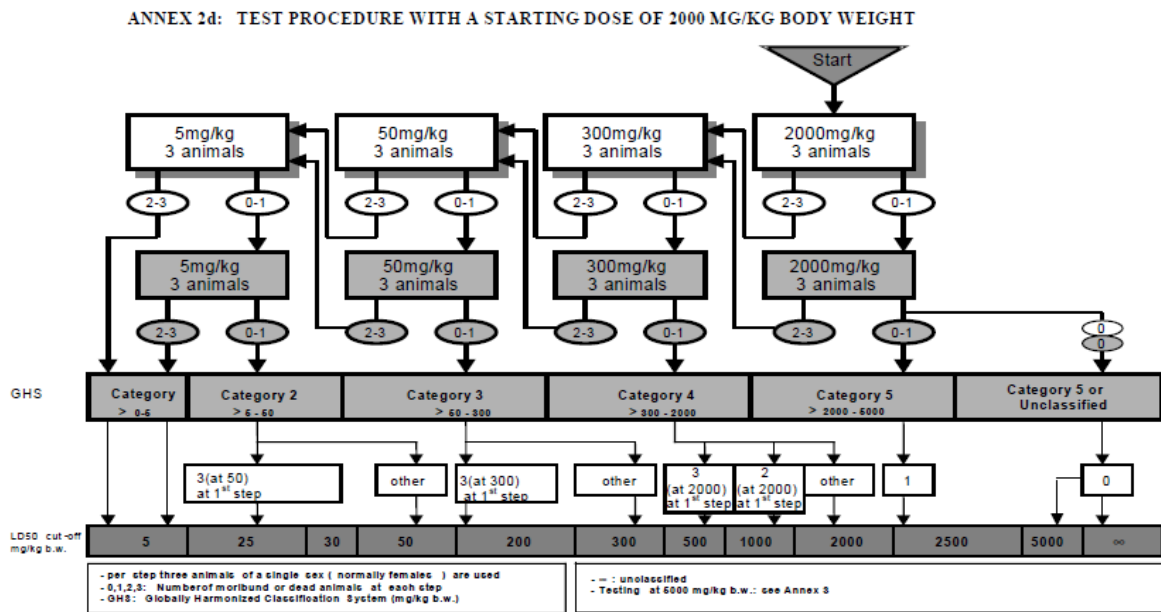


Figura 3 – Procedimento de teste com uma dose inicial de 2000 mg/kg de peso corporal.

Fonte: OECD 423; 2001.

Sendo a dose escolhida a de 2000 mg/kg, como demonstrado na figura acima, e ocorrendo de 2 a 3 mortes ou a observação de sinais clínicos alterados, o protocolo da OECD 423 descreve doses decrescentes a serem administradas em um novo experimento, sendo a dose de 300 mg/kg a próxima a ser selecionada. Não

ocorrendo mortes ou sinais de toxicidade na dose de 2000mg/kg, a substância é classificada como de toxicidade baixa, pertencendo à categoria 5 com LD₅₀ estimada de 2500mg/Kg.

Os animais são observados individualmente após a administração da substância, pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas, e diariamente a partir daí, por um total de 14 dias. As observações incluem alterações na pele e pelos, olhos e mucosas, alterações no aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central e alterações na atividade somatomotora e do comportamento. Atenção especial deve ser dirigida à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia e letargia.

1.3.2 Estudo da toxicidade subaguda

A toxicidade subaguda refere-se aos efeitos nocivos, cumulativos, decorrentes de uma exposição repetida, de preferência oral, em um período limitado de exposição ao longo do tempo (1 a 3 meses) (RHIOUANI et al., 2008; OGA, 2008; BETTI et al., 2012). São usadas, no mínimo, 3 doses experimentais (mínima, intermediária e máxima), sendo que a dose máxima não deve produzir um índice de letalidade acima de 10% (para que não inviabilize as avaliações histopatológicas e bioquímicas).

Os principais objetivos deste estudo são: determinar a dose máxima na qual não se observa efeitos adversos; estudar mais efetivamente órgãos alvos e determinar aqueles com mais suscetibilidade e prover dados sobre dosagens seletivas para estudo de toxicidade crônica (OGA, 2008).

1.3.2.1 OECD 407

O estudo de toxicidade subaguda, utilizando o guia da OECD 407, fornece informações sobre os possíveis riscos à saúde que podem surgir após uma

exposição repetida ao longo de um período, relativamente em um tempo pequeno. O método compreende o estudo de toxicidade de dose repetida de base que podem ser utilizados para produtos químicos em que um estudo de 90 dias não se justifica (por exemplo, quando o volume de produção não exceda certos limites) ou como uma fase preliminar de um estudo de longo prazo. A duração da exposição deve, normalmente, ser de 28 dias, embora um estudo de 14 dias possa ser adequado em certas circunstâncias, devendo ser apresentada uma justificativa para a utilização deste período de exposição (OECD 407, 1995).

A substância é administrada por via oral uma vez por dia em doses crescentes, uma dose por grupo, durante um período de 28 dias, utilizando-se um número limitado de animais (5 machos e 5 fêmeas por dose). Os animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio são submetidos à autópsia e no fim do ensaio os animais sobreviventes são eutanasiados para análise (OECD 407, 1995).

Pelo menos três grupos teste e um grupo controle devem ser utilizados durante o experimento. A dose mais elevada do grupo teste deve ser escolhida com o objetivo de induzir efeitos tóxicos, mas não a morte ou sofrimento grave. A partir daí, uma sequência decrescente de doses devem ser selecionadas com objetivo de evidenciar uma dose-resposta e a menor dose não deve apresentar quaisquer efeitos tóxicos (OECD 407, 1995).

A observação e a administração da dose aos animais devem ser feitas pelo menos uma vez por dia, no mesmo horário, sendo registrada qualquer alteração de comportamento, sinais de toxicidade, morbidade e mortalidade causados pela administração da substância. Os sinais anotados devem incluir alterações na pele, olhos, mucosas, ocorrência de secreções, excreções ou atividade autônoma (por exemplo, lacrimação, ereção pilosa, alterações nas pupilas e respiração anormal). Alterações da atitude, postura e reação à manipulação, além da ocorrência de movimentos tônicos ou clônicos, estereotípias (por exemplo, de higiene excessiva) ou estranhos (automutilação, andar para trás) também devem ser registrados (OECD 407, 1995).

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. As medições do consumo de alimentos devem ser realizadas pelo menos semanalmente. Se a substância for administrada através da água de beber, o consumo de água também deve ser medido pelo menos semanalmente (OECD 407, 1995).

Além disso, no final do período de ensaio, vários parâmetros devem ser analisados, dentre eles parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas. Análises bioquímicas como glicose, colesterol total, ureia, creatinina, pelo menos, duas enzimas indicativas dos efeitos hepatocelulares (tais como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina) entre outros. Determinações destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, especificamente, os efeitos sobre rins e fígado, devem ser realizados em amostras de sangue (OECD 407, 1995).

Exame histopatológico deve ser feito sobre os órgãos e tecidos de todos os animais do grupo controle e da dose mais alta. Estes exames devem ser realizados em todos os outros animais dos grupos que receberam doses menores se as mudanças relacionadas ao tratamento são observadas no grupo que recebeu a dose mais elevada (OECD 407, 1995).

1.4 Considerações gerais sobre a *Scutia buxifolia* Reissk

A *Scutia buxifolia* é representante da família Rhamnaceae. Esta planta é conhecida popularmente como “coronilha” ou “espinho de touro”, ocorrendo no sul do Brasil, Argentina e Uruguai (WASICKY; WASICKY; JOACHIMOVITS, 1964). No Rio Grande do Sul, é encontrada em florestas com araucárias, florestas ribeirinhas, na serra do sudeste e do litoral sul (Figura 4) (BACKES; IRGANG, 1998; SOBRAL et al., 2006). Ocorre também ocasionalmente na depressão central e é frequente em certas regiões elevadas da serra do sudeste. Seus arbustos podem atingir a altura máxima de 6 metros. Possuem folhas opostas e alternadas, inteiras ou com poucos dentes e medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura. As inflorescências são em fascículos axilares com flores pequenas e verdes (Figura 5). Floresce entre outubro e janeiro e dá frutos no mês de março. É usada na medicina popular devido a suas propriedades cardiotônicas, diuréticas e depurativas (WASICKY; WASICKY; JOACHIMOVITS, 1964).



Figura 4 – Exemplos de *S. buxifolia* fotografados em Santana da Boa Vista, RS, em 2008 pelo fotógrafo Martin Molz.

Disponível na página da Flora RS (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1384), acessada em 12/11/2013.



Figura 5 – Exemplo das folhas de *S. buxifolia* fotografados em Santana da Boa Vista, RS, em 2011 pelo fotógrafo Martin Molz.

Disponível na página da Flora RS (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7540), acessada em 12/11/2013.

A quantificação de compostos presentes na casca do caule e das folhas de *S. buxifolia* foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), indicando a presença de quercetina, isoquercitina, rutina, ácido gálico, ácido cafeico,

ácido clorogênico e kaempferol, sendo a quercitrina o flavonóide encontrado em maior concentração (BOLIGON et al., 2009b, 2012a, 2012b, 2012d). A análise fitoquímica das folhas de *S. buxifolia* revela que a fração acetato de etila (AcOEt) é a que apresenta o maior conteúdo de alcaloides totais (BOLIGON et al., 2012a).

Com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante das folhas e da casca do caule de *S. buxifolia*, seu extrato metanólico bruto e suas frações diclorometano (CH_2Cl_2), AcOEt e n-butanol (n-BuOH) foram avaliadas quanto aos ensaios de 2,2-difenil,1-picrihidrazila (DPPH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual é um marcador de peroxidação lipídica. Os resultados obtidos indicam que a *S. buxifolia* inibiu a peroxidação lipídica e foi efetiva em atuar como *scavenger* de radicais DPPH, mostrando ter um grande potencial para prevenir o dano oxidativo, podendo ser utilizada como uma potencial fonte de agentes antioxidantes naturais (BOLIGON et al., 2009b). A fração AcOEt apresentou melhor atividade antioxidante em comparação com o extrato bruto, frações n-BuOH e CH_2Cl_2 e, o extrato obtido a partir da casca do caule apresentou melhores propriedades antioxidantes do que o extrato obtido a partir de folhas (BOLIGON et al., 2009b).

Uma das mais importantes causas de mortes prematuras em todo o mundo é a hipertensão arterial sistêmica (MOLINA et al., 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006). Através do uso popular da *S. buxifolia* para o tratamento da hipertensão, Silva e colaboradores (2012) analisaram a possível atividade cardiovascular dos extratos brutos hidroalcoólico da casca do caule e das folhas e frações CH_2Cl_2 , AcOEt e n-BuOH obtidas da planta. Todas as frações avaliadas apresentaram atividade vasorrelaxante em anéis de aorta isolada de rato, pré-contraídas por fenilefrina, tanto na presença quanto na ausência de endotélio funcional. A fração n-BuOH da casca do tronco da *S. buxifolia* possui um ou mais componentes capazes de causar vasodilatação *in vitro* e *in vivo*, ambos por mecanismos que envolvem a ativação da enzima óxido nítrico sintase e a estimulação da enzima guanilato ciclase (SILVA et al., 2012).

O consumo de produtos vegetais está associado com a redução do número de doenças crônicas, incluindo aterosclerose e cancro. Neste contexto, foi realizado um estudo referente aos efeitos protetores do extrato bruto, fração AcOEt e flavonóides (quercetina, quercitrina, isoquercitrina e rutina), isolados das folhas de *S. buxifolia*, contra danos cromossômicos induzidos por peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

em linfócitos humanos, através da análise de taxa de crescimento, viabilidade celular, índice mitótico e instabilidade cromossômica. A fração AcOEt da *S. buxifolia* protege o DNA de linfócitos humanos do dano causado por H₂O₂, possivelmente diminuindo o estresse oxidativo devido à natureza antioxidante dos compostos presentes nesta planta (BOLIGON et al., 2012b).

Morel e colaboradores (2005) isolaram do extrato metanólico das cascas das raízes de *S. buxifolia*, alcaloides ciclopeptídios denominados scutianinas. A atividade antimicrobiana destes alcaloides foi avaliada através do método da autobiografia. O composto com maior espectro de atividade foi a scutianina E e esta foi efetiva contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25792 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

Bactérias do gênero *Paenibacillus* são responsáveis por causarem infecções em abelhas, levando a diminuição na produção de mel. O extrato bruto hidroalcoólico da *S. buxifolia* e suas frações CH₂Cl₂, AcOEt e n-BuOH, tiveram suas atividades antimicrobianas testadas frente às bactérias *P. larvae*, *P. borealis*, *P. validus*, *P. pabuli* e *P. azotofixans* pelos métodos da difusão em disco e concentração mínima inibitória. Todas as espécies de *Paenibacillus* testadas foram susceptíveis aos preparados a base das cascas das raízes de *S. buxifolia*. A planta não apresenta toxicidade para abelhas da espécie *Apis mellifera* quando o seu extrato foi borrifado uma vez ao dia durante 15 dias em uma placa de Petri modificada, contendo 6 exemplares adultos da espécie. Boligon e colaboradores (2013) concluíram que a planta testada não causa mortalidade na população de abelhas, sendo possível o uso de extratos da *S. buxifolia* no controle de infecções causadas por *Paenibacillus spp* (BOLIGON et al., 2013).

Atividades antimicrobiana e citotóxica das frações de CH₂Cl₂, AcOEt e n-BuOH das folhas, galhos e cascas do caule de *S. buxifolia* foram avaliadas usando o método de diluição em caldo e o método de letalidade com *Artemia salina*, respectivamente. Todas as frações de folhas, galhos e cascas do caule de *S. buxifolia* foram considerados tóxicos após ensaio de citotoxicidade e mostrou atividade *in vitro*, antimicrobiana e antimicobacteriano, contra cepas de microrganismos como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2792, *Candida*

albicans ATCC 44373, *Candida glabrata* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 e *Prototheca zopfii* (BOLIGON et al., 2012c).

Muitos produtos vegetais quando consumidos de forma inadequada podem estar relacionado com etiologia de injurias hepáticas, renais e cardíacas. Em um estudo de toxicidade realizado por Freitas e colaboradores, foi avaliada a atividade sérica das enzimas ALT, AST, o conteúdo de malondealdído (MDA), de tióis não proteicos (NPSH) e atividade antioxidante das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) após a administração do extrato aquoso liofilizado da casca do caule de *S. buxifolia* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg em ratos, durante 30 dias consecutivos. O tratamento consecutivo com o extrato aquoso liofilizado da casca do caule de *S. buxifolia* preserva as defesas antioxidantes e revelou não ser tóxico para o fígado (FREITAS et al., 2013).

Com relação a fração acetato de etila da casca do caule da *S. buxifolia*, o mais interessante farmacologicamente devido a sua atividade antioxidante, não existem estudos de toxicidade relatados na literatura até o presente momento. Assim, torna-se interessante avaliar a toxicidade aguda e subaguda desta fração da planta, em um modelo que utilize animais.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade da fração acetato de etila, da casca do caule da *S. buxifolia*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil fitoquímico da fração de acetato de etila da casca do caule da *S. buxifolia*;
- Determinar os possíveis efeitos tóxicos *ex vivo* da administração aguda da fração da casca do caule da *S. buxifolia* em camundongos, segundo o Guia OECD 423;
- Verificar a toxicidade subaguda *ex vivo* da fração da casca do caule da *S. buxifolia* em camundongos, segundo o Guia OECD 407.

III MANUSCRITO

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está disposto da mesma forma que foi submetido para avaliação.

3.1 Manuscrito

Andreia R. H. da Silva¹, Laís da R. Moreira¹, Evelyne da S. Brum¹, Mayara L. de Freitas¹, Aline A. Boligon², Margareth L. Athayde², Silvane S. Roman³, Cinthia M. Mazzanti⁴, Ricardo Brandão^{1*}.

O presente manuscrito foi aceito para publicação no periódico *Journal of Ethnopharmacology*.

Ref.: Ms. No. JEP-D-13-02874R2

Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice.

Journal of Ethnopharmacology

Dear Dr. Brandão,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Ethnopharmacology.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Guillermo Schmeda-Hirschmann, Dr.rer.nat.

Associate Editor

Journal of Ethnopharmacology

Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice.

Andreia R. H. da Silva¹, Laís da R. Moreira¹, Evelyne da S. Brum¹, Mayara L. de Freitas¹, Aline A. Boligon², Margareth L. Athayde², Silvane S. Roman³, Cinthia M. Mazzanti⁴, Ricardo Brandão^{1*}.

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Departamento de Farmácia Industrial, Laboratório de Pesquisa Fitoquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim, Erechim, RS, Brazil.

⁴Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Address all correspondence to:

Ricardo Brandão

Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

Tel.: 55-55-3220-8000

Extension number: 2494

E-mail: ricardo_br79@yahoo.com.br

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Scutia buxifolia* is a native tree of Southern Brazil, Uruguay, and Argentina, which is popularly known as “coronilha” and it is used as a cardiostimulant, antihypertensive and diuretic substance. The aim of this study was to assess the acute and sub-acute toxicity of the ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia* in male and female mice. **Materials and methods:** The toxicity studies were based on the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD-guidelines 423 and 407). In an acute study, a single dose of 2000 mg/kg of *S. buxifolia* was administered orally to male and female mice. Mortality, behavioral changes, and biochemical and hematological parameters were evaluated. In the sub-acute study, *S. buxifolia* was administered orally to male and female mice at doses of 100, 200, and 400 mg/kg/day for 28 days. Behavioral changes and biochemical, hematological, and histological analysis were evaluated. **Results:** The acute administration of *S. buxifolia* did not cause changes in behavior or mortality. Male and female mice presented decreased levels of platelets. Female mice presented decreased levels of leukocytes. On the other hand, in a sub-acute toxicity study, we observed no behavioral changes in male or female mice. Our results demonstrated a reduction in glucose levels in male mice treated to 200 and 400 mg/kg of *S. buxifolia*. Aspartate aminotransferase (ASAT) activity was increased by *S. buxifolia* at 400 mg/kg in male mice. In relation to the hematological parameters, male mice presented a reduction in hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT) when treated to 400 mg/kg of plant fraction. Female mice showed no change in these parameters. Histopathological examination of liver tissue showed slight abnormalities that were consistent with the biochemical variations observed. **Conclusion:** *S. buxifolia*, after acute administration, may be classified as safe (category 5), according to the OECD guide. However, the alterations observed, after sub-acute administration with high doses of ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia*, suggest that repeated administration of this fraction plant can cause adverse hepatic, renal, and hematological effects.

Chemical compounds studied in this article

Gallic acid (PubChem CID: 370); Catechin (PubChem CID: 9064); Chlorogenic acid (PubChem CID: 1794427); Caffeic acid (PubChem CID: 689043); Ellagic acid (PubChem CID: 5281855); Epicatechin (PubChem CID: 72276); Rutin (PubChem CID: 5280805); Isoquercitrin (PubChem CID: 5280804); Quercitrin (PubChem CID: 5280459); Quercetin (PubChem CID: 5280343); Kaempferol (PubChem CID: 5280863)

Keywords: *Scutia buxifolia*; Rhamnaceae; stem bark; acute toxicity; sub-acute toxicity; mice.

1. Introduction

Since the ancient times, humans have used the huge diversity of plants in the world to develop drugs of natural origin or synthetic derivatives of medicinal plants for the treatment of many different diseases that afflict humanity (Ouedraogo et al., 2012).

Medicinal plants are often used as a therapeutic resource because of their easy availability and low cost, when they are used fresh. However, products derived from plants are used with a misconception that if it is a natural product it would not cause toxic or adverse effects, being the popular use of the medicinal plants by several communities and ethnic groups a way to make valid the efficacy of these medicines. However, toxicological studies, in some cases, show that plants when used in exaggerated form may be harmful or even lethal at high doses (Lapa et al., 2008; Silveira et al., 2008).

Scutia buxifolia Reissek belongs to the Rhamnaceae family. This tree is native to Southern Brazil, Uruguay and Northern Argentina and it is popularly known as "coronilha". The root bark infusion is popularly used as cardiogenic, antihypertensive, and diuretic substance (Wasicky et al., 1964). The fractions of *S. buxifolia* present active components that are capable of promoting *in vitro* relaxation of the aortic rings of rats in which, being an important step in validating the use of popular *S. buxifolia* as a phytomedicine in the treatment of hypertension (Silva et al., 2012). Phytochemical screening reported the presence of polyphenols and flavonoids in the bark of *S. buxifolia* (Boligon et al., 2009a, 2009b, 2012a, 2012b), which were related to the antioxidant and antimicrobial activity of this plant (Boligon et al., 2009b, 2012a, 2012c; Maldaner et al., 2011; Morel et al., 2005). According to Boligon et al. (2009b), the ethyl acetate fraction presented a better antioxidant activity when compared with the crude fraction, butanolic and dichloromethane fractions. In addition, the same study showed that the fraction obtained from stem bark present better antioxidant properties than the one obtained from leaves. So, it was also better than the ascorbic acid, a well-known antioxidant which is used as a reference in the experiments (Boligon et al., 2009b).

As described above, the *S. buxifolia* fraction that was obtained from stem bark may present several pharmacological properties. However, toxicological studies are important to offer a standardized composition and security for the use by the population. In this way, no study about the toxic effects of the ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia* has been reported. Thus, the aim of this study was to investigate the acute and sub-acute toxicity of the ethyl acetate fraction of the stem bark *S. buxifolia* Reissek in mice through hematological, biochemical, histopathological, and neurobehavioral parameters.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The stem bark of *S. buxifolia* for our study was collected in Dom Pedrito (Rio Grande do Sul, State of Brazil) in February 2011 (coordinates 30°59'09"S and 54°27'44"W). Exsiccate was identified by Prof. N.C.B. Záchia and, after, it was archived, as a dried voucher specimen, and preserved in the herbarium of the Department of Biology at *Universidade Federal de Santa Maria* under the registration number SMD 10919.

2.2. Fraction preparation

The stem bark of the plant was dried at the room temperature and, then, powdered in a knife mill. The powder of the stem bark was macerated at room temperature with 70% ethanol for a week using a daily shake-up. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure in order to remove the ethanol. The extract hydroethanolic was suspended in water and partitioned successively with ethyl acetate.

2.3 Chemical, apparatus and general procedures

All chemical were of analytical grade. Acetonitrile, formic acid, gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid and caffeic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin, catechin, epicatechin and kaempferol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

2.4 Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions by using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles. The mobile phase was water containing 1% formic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was: 13% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min, respectively (Kamdem et al., 2013) with minor modifications. *S. buxifolia* ethyl acetate fraction was analyzed in a dissolved way with ethanol at a concentration of 20 mg/mL.

The presence of eleven antioxidants compounds was investigated, to be exact: gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, catechin, epicatechin, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin and kaempferol. The identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those ones with commercial standards. The flow rate was 0.6 ml/min, injection volume 40 µL and the wavelength was 257 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for caffeic, ellagic and chlorogenic acids and 366 nm for quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin and kaempferol.

All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and, then, degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030 – 0.250 mg/ml for kaempferol, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, catechin, epicatechin and rutin; and 0.028 – 0.300 mg/ml for gallic, caffeic, ellagic and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing the retention time with those ones with reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 11974x + 1263.7$ ($r = 0.9998$); catechin: $Y = 12831x + 1305.3$ ($r = 0.9997$); epicatechin: $Y = 12625x + 1193.7$ ($r = 0.9994$); caffeic acid: $Y = 13248x + 1279.8$ ($r = 0.9994$); chlorogenic acid: $Y = 13067x + 1256.2$ ($r = 0.9993$); ellagic acid: $Y = 11983x + 1265.9$ ($r = 0.9996$); rutin: $Y = 12806 + 1365.1$ ($r = 0.9999$); quercitrin: $Y = 13584 + 1198.7$ ($r = 0.9991$); quercetin: $Y = 13471x + 1195.3$ ($r = 0.9995$), isoquercitrin: $Y = 12673x + 1275.4$ ($r = 0.9998$) and kaempferol: $Y = 13258x + 1235.9$ ($r = 0.9997$). All chromatography operations were

carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, being σ the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve (Boligon et al., 2013).

2.5. Animals

Adult Swiss mice (25–35 g) of either sexual category were obtained from *Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria* (UFSM) and they were arbitrarily distributed into different experimental groups. The animals were housed in polypropylene cages at an ambient temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 45–55% relative humidity, with a 12:12 h light/dark cycle and they were also adapted to local conditions for at least 72 h before the experiment. Animals were provided with commercial food pellets and water *ad libitum* unless otherwise stated. All experimental protocols were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of *Universidade Federal de Santa Maria* (CEUA UFSM; Protocol 079/2012).

2.6. Acute toxicity study

Acute oral toxicity of *S. buxifolia* was evaluated in mice of either sexual category, as preconized by the OECD guideline (Organization for Economic Co-operation and Development, Guideline-423, adopted on December 17, 2001) with minor modifications.

According to Guidance OECD 423, these procedures were performed twice with the use of 3 animals of each sexual category per step. In a first moment, the method does not have the purpose of enabling the calculation of a precise median lethal dose (LD_{50}), but rather allow for an assessment concerning the ranking of the test substance to one of a series of classes defined by toxicity LD_{50} values fixed cutting (OECD, 423). Animals of the test group received a single dose of 2000 mg/kg of *S. buxifolia*, dissolved in water, by gavage. The control group treated was with water by gavage. The dose used in the experiment of acute toxicity was selected from one of four fixed levels, 5, 50, 300, or 2000 mg/kg, as described in the OECD guide.

After that, animals were observed 6 and 12 h after the treatment and every day for 14 days. Death, occurrence of tremors, convulsions, abdominal contortions, locomotion, salivation, diarrhea and lethargy were considered. The body weight of the animals and the food consumption were monitored daily throughout the study period. After 14 days, all the animals were subjected to a short fasting period of 8 h and then were sacrificed. The blood was collected from the cardiac puncture in two tubes: one with the anticoagulant, ethylenediamine–tetraacetate (EDTA) and the other without any additive. The blood without the anticoagulant was allowed to clot before centrifugation (4000rpm for 10 min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of glucose (GLU), total cholesterol (Chol), blood urea nitrogen (BUN) levels, aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) activities, by using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000). The anticoagulated blood was analyzed immediately for hematological parameters: leukocytes (WBC), erythrocytes (RBC), hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cells distribution width

(RDW) and platelet (PLT) counts were determined with the use of an automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

2.7. Sub-acute toxicity study

The sub-acute toxicity study was developed following the guidelines of OECD 407 (adopted on July 17, 1995) with minor modifications. The fraction was dissolved in water and administered by gavage daily once a day for 28 days. Four groups were evaluated (6 animals per group):

Group I: control group treated with water;

Group II: treated with *S. buxifolia* 100 mg/kg;

Group III: treated with *S. buxifolia* 200 mg/kg;

Group IV: treated with *S. buxifolia* 400 mg/kg.

The body weight of the animals and the food consumption were monitored daily throughout the study period. On day 29 of the study, all the animals were subjected to a short fasting period of 8 h and, after this period, the blood samples were collected in two tubes: one with anticoagulant, EDTA, and the other without anticoagulant, through cardiac puncture from the left ventricle of the heart in anesthetized animals. Afterwards, the mice were euthanized and the kidney and liver were removed, dissected, and fixed in a 10% formalin solution.

2.7.1. Biochemical and hematological parameters

The blood without anticoagulant was allowed to clot before centrifugation (4000rpm for 10 min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of GLU, Chol, BUN levels, and ASAT and ALAT activities, using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000).

The anticoagulated blood was analyzed immediately for hematological parameters: WBC, RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW, lymphocyte, neutrophils, monocytes, eosinophils, basophils and PLT counts were determined, by using an automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

2.7.2. Histopathology

Two animals from groups control, 200mg/kg and 400mg/kg were randomly chosen for histological analysis. The kidney and liver fixed were processed routinely, and then they were embedded in paraffin, sectioned at 4 μ m thickness, deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin (H.E) with the use of the standard techniques. For light microscopy examination, the magnification power used was 10x and 25x.

2.7.3. Open-field test

Spontaneous exploratory behavior was assessed in the open-field test, one day before the animals were sacrificed, with the aim of investigating any kind of motor disturbance related to the administration of *S. buxifolia*. The open field was prepared of plywood and surrounded by walls 30 cm in height. The floor of the open field, 45 cm in length and 45 cm in width, was divided by masking tape markers into nine squares (three rows of three). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 5 min in the twenty-ninth after treatment with the different dosages of the plant (100-400 mg/kg) to record the number of segments crossed with the four paws and the number of rears on the hind limbs (Walsh & Cummins, 1976).

2.8. Statistical analysis

The data are expressed as means \pm S.D. All the results were analyzed by one-way ANOVA, and Tukey test were used in order to compare any significant differences between the control group and the therapeutic group. The differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 HPLC analysis

HPLC fingerprinting of *S. buxifolia* ethyl acetate fraction revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 9.95$ min; peak 1), catechin ($t_R = 16.07$ min; peak 2); chlorogenic acid ($t_R = 20.56$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.83$ min; peak 4), ellagic acid ($t_R = 30.11$ min; peak 5), epicatechin ($t_R = 37.12$ min; peak 6), rutin ($t_R = 42.53$ min; peak 7), isoquercitrin ($t_R = 44.79$ min; peak 8), quercitrin ($t_R = 47.26$ min; peak 9), quercetin ($t_R = 61.23$ min; peak 10) and kaempferol ($t_R = 57.85$ min; peak 11) (Fig. 1 and Table 1). The HPLC analysis revealed that flavonoids (quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin and kaempferol), tannins (catechin and epicatechin) and phenolics acids (gallic, chlorogenic, ellagic and caffeic acids) are present in the fraction of *S. buxifolia*.

3.2 Acute toxicity study

The assessment of acute toxicity in male and female mice, after the administration of 2000 mg/kg *S. buxifolia* showed no signs of morbidity and mortality. In agreement with the determination of OECD 423, the ethyl acetate fraction from the stem bark of *S. buxifolia* should be included in category 5 and with LD_{50} estimated between 2000-5000 mg/kg (low toxicity).

Furthermore, no toxicity signal was observed, such as behavioral changes, alterations in food intake and modifications in body weight gain, in both genders (Table 2). All animals survived until their scheduled euthanasia.

The biochemical markers were not modified in male or female mice. The values of GLU, Chol, BUN, ASAT and ALAT remained unaltered in the animals treated with the plant compared to the control group (data not shown).

After 14 days of the administration of *S. buxifolia*, the hematological parameters in male and female mice were evaluated. The values of RBC, HGB, HCT and RDW showed no significant changes, when compared to the control group, in both sexes (data not shown). The WBC levels were not modified in male mice treated with *S. buxifolia*, when compared to the control group (data not shown). In female mice, a reduction (~40%) in the leucocytes levels was observed. PLT levels were reduced in male (~18%) and female (~26%) mice, when compared to the control group.

3.3 Sub-acute toxicity study

The consumption of food and body weight gain in both sexual categories, were not altered by *S. buxifolia* administration, when compared to the control group (data now show). In addition, the treatment with *S. buxifolia* (100–400 mg/kg,) did not cause any significant change in the number of crossings or rearings in the open-field test in male and female mice (data now show).

Our results also showed that male mice presented some alterations in the biochemical parameters (Table 3). The serum ASAT activity was increased (~73%) in male mice treated with 400 mg/kg of the plant fraction. The glucose levels were reduced (~34 and 32%) in male mice that received 200 and 400 mg/kg of plant

fraction, respectively, when compared to the control group. The other biochemical parameters were not modified in male mice. In female mice, modifications in the biochemical measurements were not observed (Table 3).

In relation to the hematological parameters, male mice presented more pronounced changes when treated with 400 mg/kg of plant fraction, in which a decrease in the HGB and HCT of approximately 21 and 22%, respectively, was observed (Table 4). The difference in the RDW increased by approximately 13% in male mice treated with 400 mg/kg of *S. buxifolia*. At a dose of 200 mg/kg, the MCV decreased approximately 7% when compared to the control group. The other parameters, such as the calculation of PLT, RBC, MCH, MCHC and WBC were not modified by *S. buxifolia* administration in male mice. However, in the differential leukocytes count, neutrophils percentage was increased (~13%) in male mice treated with 400 mg/kg of the plant fraction (Table 4 and 5), whereas that the percentage of the other leucocitary cells (lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils) was not altered. In female mice, alterations in the hematological parameters were not observed (Table 4 and 5).

The results of the hepatic histological analysis showed that, in the control group, male mice presented hepatocyte strings, centrilobular vein and sinusoid capillaries with normal aspects (Fig. 2A and 2B). In contrast, male mice treated with a dose of 200 mg/kg of plant fraction, presented moderate inflammatory cells infiltration and cytoplasmic vacuolization (Fig. 2C and 2D). Treatment with 400 mg/kg of plant fraction promoted intense inflammatory cells in this tissue (Fig. 2E and 2F). In relation to the renal histological analysis of male mice, the control group shows normal glomerular architecture with the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules (Fig. 3A and 3B). The group treated with 200 mg/kg of *S. buxifolia* fraction presented normal aspects with slight renal morphological changes in some areas, with tubular dilation and glomerular alteration (Fig. 3C and 3D). Treatment with 400 mg/kg causes tissue disintegration in the proximal and distal tubules and glomerular alteration in the kidney of male mice (Fig. 3E and 3F).

With regard to female mice, the results of the hepatic histological analysis showed that, in the control group, hepatocytes presented normal aspect (Fig. 4A and 4B). Female mice treated with a dose of 400 mg/kg of plant fraction, presented in liver the hepatocyte strings, the centrilobular vein and sinusoid capillaries with normal aspect (Fig. 4C and 4D). Besides, the female mice of control group presented renal glomeruli with architecture normal (Fig. 5A and 5B). Female mice treated with a dose of 400 mg/kg of plant fraction presented organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules similar to the control group (Fig. 5C and 5D).

4. Discussion

The expansion of the use of plants for medicinal purposes has caused renewed interest in understanding the characteristics of the drugs that originated them, including their pharmacological and toxicological properties (Mabona & Van Vuuren, 2013). In fact, a toxicological evaluation should be performed in various experimental animals to determine the potential adverse effects and provide guidelines for the selection of a dose that is "safe" for humans (Rhiouania et al., 2008). Although most plants have low toxicity, the inadequate use of medicinal plants can generate serious problems associated with other risk factors, such as contraindications or concomitant use of other drugs (Silveira et al., 2008).

The ethyl acetate fraction from the stem bark of *S. buxifolia* leaves was analyzed by HPLC. The result indicates that the *S. buxifolia* contains several

constituents and the three main compounds were quercitrin (49.35 ± 0.05), rutin (32.17 ± 0.02) and gallic acid (31.72 ± 0.02). The HPLC profile of *S. buxifolia* was also quantified by Boligon et al. (2009b, 2012a) in the ethyl acetate fraction from the stem bark of *S. buxifolia*, using the similar chromatographic conditions, which confirmed the presence of these same compounds.

Important beneficial effects have been noticed in relation to *S. buxifolia* and its compounds, such as antioxidant (Boligon et al., 2009b), antimicrobial (Morel et al., 2005) and the *in vitro* capacity to relaxation of the aortic rings of rats (Silva et al., 2012). Although there are studies demonstrating pharmacological properties of *S. buxifolia*, previous studies *in vitro* have demonstrated that the ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia* presented significant toxicity, in the *Artemia salina* lethality test (Boligon et al., 2012c). However, *in vivo* studies about toxicological effects of ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia* are not found in literature. In this way, we assessed, in this study, the acute and sub-acute toxicity of *S. buxifolia*, ethyl acetate fraction, from the stem bark. This research is important once *S. buxifolia* is a product with good potential for the development of a new drug.

In acute toxicity study, *S. buxifolia* at 2000 mg/kg was administered orally as recommended by the OECD 423 guide, once the plant fractions are more frequently administered orally in humans (Bafor & Igbinuwen, 2009). The oral administration of a single dose of the fraction of *S. buxifolia* not caused any toxic symptoms, behavioral changes, and/or other symptoms associated with the administration of this fraction. Additionally, no mortality was observed after 14 days of treatment. The food consumption and body weight gain of all groups treated with plant were similar when compared to the control group. No death was recorded and, therefore, the oral toxicity of this fraction can be classified in category 5 (the lethal acute toxicity is greater than 2000 mg/kg) according to the Globally Harmonized Classification System of OECD.

As cited previously, the OECD 423 guide did not enable the calculation of a precise median lethal dose (LD_{50}), however this protocol is a stepwise procedure with the use of few animals of each sexual category per step ($n=3$). Depending on the mortality and/or moribund status of the animals, on average 2-4 steps may be necessary to allow judgment on the acute toxicity of the test substance. In contrast, for the test of the LD_{50} , usually a great number of animals are used (Valadares, 2006). The absence of signs of morbidity and mortality after acute administration to *S. buxifolia* is a possible indication of the relative safety of short-term administration of the plant (Bafor & Igbinuwen, 2009).

The oral acute administration of the plant, in both sexes, caused no significant change in blood biochemistry. The levels of GLU, Chol, and BUN, as well as the activities of ASAT and ALAT were unchanged in treated mice, which indicate the lack of toxic effects in some organs, such as liver and kidney.

The hematological evaluation showed a significant reduction in the PLT levels of both sexes. These results could indicate a deficiency in production, migration and aggregation of platelets (Failace, 2009; Sabetghadam, et al., 2013), and may be related with presence of flavonoids (rutin, isoquercitrin, quercitrin, quercetin) in ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia*. In according, Barreca et al., (2009) reported that the consumption of flavonoid-rich foods and beverages can be associated with a reduction in platelet aggregation. The reduction in the WBC levels, after the acute administration of the fraction in female mice, may be related with the toxicity selective of compounds from the plant in the immune and hematopoietic systems (Joshi et al., 2002). However, the erythrocyte parameters were not altered

after acute administration of the plant in both sexes. Our results indicate that the acute administration of the fraction of *S. buxifolia* should be carried out carefully, since some hematological changes were produced.

The sub-acute toxicity refers to the cumulative detrimental effects resulting from a substance administration, preferably oral, in a limited period of time (15-30 days) (Steuer et al., 2013). In our study, the administration of the ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia* during 28 days, in both sexes, caused no mortality and/or behavioral changes in animals. In addition, body weight gain and food intake were not modified by sub-acute fraction administration.

The transaminases, ALAT and ASAT, have a large distribution in animal tissues, but its activity is higher in the liver. Our results demonstrated that the sub-acute administration of fraction of *S. buxifolia*, at 400 mg/kg, causes an increase in serum ASAT activity in male mice, indicating injury to the hepatic tissue. The increase in the activity of serum liver enzymes may be understood as a sign of hepatocellular membrane damage (Celik & Suzek, 2008; Atsamo et al., 2011). This increase in serum ASAT activity may be related to the action of the components of the *S. buxifolia*. In accordance, toxic effects of phenolic acids and catechins in hepatic tissue were demonstrated in *in vitro* and *in vivo* studies. These effects seem to be related to mitochondrial membrane potential collapse and reactive oxygen species (ROS) formation (Galati et al., 2006). In contrast to our study, the administration of lyophilized aqueous fraction of *S. buxifolia* at the doses 100, 200, and 400 mg/kg in rats, for 30 days, revealed to be non-toxic to the liver (Freitas et al., 2013).

Mice male treated with a dose of 200 mg/kg of plant fraction, presented a few renal and hepatic morphological changes. We believe that these histological changes are not considered to be an indicative of significant toxicity. The hepatic damage induced by *S. buxifolia* in male mice treated with 400 mg/kg, which was observed by ASAT activity evaluation, was confirmed by hepatic histopathological evaluation, which demonstrated intense inflammatory cell infiltration. Although the BUN levels were not changed, histopathological changes were also observed in the kidney of animals treated with 400 mg/kg of plant fraction. We believe that the changes observed in the renal histology analysis were not sufficient to alter the function of this tissue and, therefore, modify the BUN levels.

In our study, in male mice treated with 200 and 400 mg/kg of *S. buxifolia*, we observed a decrease in glucose levels. A significant decrease in serum glucose levels, in normoglycemic mice, revealed the hypoglycemic activity of the plant in elevated doses after a sub-acute administration. Since that the liver is important to glucose metabolism pathway (for example gluconeogenesis and glycogenolysis), is possible that the hepatic damage can be related with the hypoglycemic effect observed in animals treated with *S. buxifolia* (Constantin et al., 2014). Moreover, we suggests that this plant can keep the blood glucose levels through its insulinomimetic activity, a characteristic of natural compounds present in plants as terpenoids, alkaloids and flavonoids (Patel et al., 2012). In this way, the presence of compounds, such as flavonoids (gallic acid, ellagic acid, rutin, isoquercitrin, quercitrin, quercetin), in the fraction of ethyl acetate of stem bark of *S. buxifolia*, can be related with the reduction on glucose levels observed in this experiment.

In addition to biochemical assays, we evaluated the hematological parameters in mice treated with the fraction of *S. buxifolia*. We verified that male mice, which received the fraction at 400 mg/kg, presented alterations that are indicators of anemia, such as reduction in HGB and HCT. These hematological changes may be due to hemolysis, as consequence of any compound present in this fraction. In fact,

in vitro hemolysis measurement has demonstrated a hemolytic effect of flavonoid compounds, such as kaempferol and quercetin, when used in high concentrations (Chen et al., 2002). In addition, we cannot exclude the reduction of erythropoietin levels, a hormone responsible to production of red cells (Nunia et al., 2007), since the kidney, in particular the peritubular interstitial cells, is the main production site of erythropoietin (Nunia et al., 2007; Oyedemi et al., 2011). In this way, the renal damage observed in the histology may be related to the reduction of erythropoietin, which was not assessed in our study.

Another parameter recommended by OECD 407 guide, in a sub-acute study of toxicity, is the evaluation of behavioral alterations. In this way, the open-field test serves to evaluate the locomotor activity of animals (Geerse et al., 2006). No change in these behavioral parameters was observed in our experiment after the administration of this fraction in both sexes.

Our results demonstrated that the male mice are more susceptible than female mice after sub-acute administration with ethyl acetate fraction from the stem bark *S. buxifolia*. The guideline OECD 423 described that the difference of sensitivity between the sexes is minimal. However, Antonelli-Ushirobira et al. (2010) indicate a possible greater biological susceptibility of males, corroborating the results found in our study. Furthermore, sex differences including sex hormone levels are one crucial factor that modulates susceptibility and immune responses (Kovats, 2012).

5. Conclusion

The present study showed that *S. buxifolia* did not show significant toxicity when a single acute dose was administered, thus it is considered safe by the OECD and classified as category 5. However, when administered different doses for 28 days, we observed biochemical, hematological, and histological alterations, indicating that the plant does not present high safety when used on successive days. The results also indicate a greater biological susceptibility of males if they are compared to females in the administration of *S. buxifolia*. To elucidate the mechanisms of toxicity, more studies are necessary.

Acknowledgements: The financial support provided by FAPERGS, CAPES, CNPQ, and Bioclin/Quibasa is gratefully acknowledged.

References

- Antonelli-Ushirobira, T. M., Kaneshima, E. N., Gabriel, M., Audi, E. A., Marques, L. C., Mello, J. C. P., 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 1817–1820.
- Atsamo, A. D., Nguenefack, T. B., Datté, J. Y., Kamanyi, A., 2011. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 134, 697–702.
- Bafor, E. E., Igbinuwen, O., 2009. Acute toxicity studies of the leaf extract of *Ficus exasperata* on haematological parameters, body weight and body temperature. *Journal of Ethnopharmacology*. 123, 302–307.
- Barreca, D., Laganà, G., Tellone, E., Ficarra, S., Leuzzi, U., Galtieri, A., Bellocco, E., 2009. Influences of flavonoids on erythrocyte membrane and metabolic implication through anionic exchange modulation. *Journal of Membrane Biology*. 230, 163-171.
- Boligon, A. A., Feltrin, A. C., Machado, M. M., Janovik, V., Athayde, M. L., 2009a. HPLC analysis and phytoconstituents isolated from ethyl acetate fraction of *Scutia buxifolia* reiss leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*. 28, 121-124.
- Boligon, A. A., Pereira, R. P., Feltrin, A. C., Machado, M. M., Janovik, V., Rocha, J. B. T., Athayde, M. L., 2009b. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*. 100, 6592–6598.
- Boligon, A. A., Agertt, V., Janovik, V., Cruz, R. C., Campos, M. M. A., Guillaume, D., Athayde, M. L., dos Santos, A. R. S., 2012a. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22, 45–52.
- Boligon, A. A., Sagrillo, M. R., Machado, L. F., Filho, O. S., Machado, M. M., Cruz, I. B. M., Athayde, M. L., 2012b. Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. *Molecules*. 14, 5757-5769.
- Boligon, A. A., Janovik, V., Frohlich, J. K., Spader, T. B., Forbrig Froeder, A. L., Alves, S. H., Athayde, M. L., 2012c. Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Natural Product Research*. 26, 1–6.
- Boligon, A. A., Kubiça, T. F., Mario, D. N., Brum, T. F., Piana, M., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S. H., Santos, R. C. V., Alves, C. F. S., Athayde, M. L., 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35, 2229-2239.
- Celik, I., Suzek, H., 2008. The hematological effects of methyl parathion in rats. *Journal of Hazardous Materials*. 153, 1117–1121.

- Chen, G., Lu, H., Wang, C., Yamashita, k., Manabe, M., Meng, Z., Xu, S., Kodama, H., 2002. Effect of five flavonoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clinica Chimica Acta*. 326, 169–175.
- Constantin, R. P., Constantin, R. P., Bracht, A., Yamamoto, N. S., Ishii-Iwamoto, E. L., Constantin, J., 2014. Molecular mechanisms of citrus flavanones on hepatic gluconeogenesis. *Fitoterapia*. 92, 148–162.
- Failace, R., 2009. Hemograma: manual de interpretação. 5ª edição. Artmed.
- Freitas, R. B., Rovani, B. T., Boligon, A. A., Brum, T. F., Piana, M., Jesus, R. S., Veloso, C. F., Kober, H., Moresco, R. N., Araldi, I. C. C., Bauermann, L. F., Athayde, M. L., 2013. Hepatotoxicity evaluation of aqueous extract from *Scutia buxifolia*. *Molecules*. 18, 7570-7583.
- Galati, G. L., A., Sultan, A. M., O'brien, P. J., 2006. Cellular and *in vivo* hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radical Biology & Medicine*. 40, 570 – 580.
- Geerse, G., Gulp, L. C. A., Wiegant, V. M., Stam, R., 2006. Individual reactivity to the open-field predicts the expression of Stress-induced behavioural and somatic pain sensitization. *Behavioural Brain Research*. 174, 112–118.
- Joshi, P. K., Bose, M., Harish, D., 2002. Changes in certain hematological parameters in a siluroid catfish *Clarias batrachus* (Linn) exposed to cadmium chloride. *Pollution Resources*. 21,129–131.
- Kamdem, J. P., Olalekan, E. O., Hassan, W., Kade, I. J., Yetunde, O., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Souza, D. O., Rocha, J. B. T., 2013. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection againstoxidative stress induced by different neurotoxic agents in rathippocampal slices. *Industrial Crops and Products*. 50, 625-632.
- Kovats, S., 2012. Estrogen receptors regulate an inflammatory pathway of dendritic cell differentiation: Mechanisms and implications for immunity. *Hormones and Behavior*. 62, 254–262.
- Lapa, A. J., Souccar, C., Lima-Landman, M. T. R., Castro, M. S. A., De Lima, T. C. M., 2008. Plantas Mediciniais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais. 144p.
- Mabona, U., Van Vuuren, S. F., 2013. Southern African medicinal plants used to treat skin diseases. *South African Journal of Botany*. 87, 175–193.
- Maldaner, G., Marangon, P., Ilha, V., Caro, M. S. B., Burrow, R. A., Dalcol, I. I., Morel, A. F., 2011. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss. *Phytochemistry*. 72, 804–809.

Morel, A. F., Maldaner, G., Ilha, V., Missau, F., Silva, U. F., Dalcol, I. I., 2005. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. *Phytochemistry*. 66, 2571–2576.

Nunia, V., Sancheti, G., Goyal, P. K., 2007. Protection of Swiss albino mice against whole-body gamma irradiation by diltiazem. *The British Journal of Radiology*. 80, 77–84.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Guideline 407. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 468 Adopted by the Council on 27th, July 1995.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 470 Adopted by the Council on 17th, Dec 2001.

Ouedraogo, M., Baudoux, T., Stévigny, C., Nortier, J., Colet, J. M., Efferth, T., Qu, F., Zhou, J., Chan, K., Shaw, D., Pelkonen, O., Duez, P., 2012. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *Journal of Ethnopharmacology*. 140, 492–512.

Oyedemi, S. O., Adewusi, E. A., Aiyegoro, O. A., Akinpelu, D. A., 2011. Antidiabetic and haematological effect of aqueous extract of stem bark of *Azela africana* (Smith) on streptozotocin-induced diabetic *Wistar* rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1, 353-358.

Patel, D. K., Prasa, S. K., Kumar, R., Hemalatha, S., 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2, 320-330.

Rhiouania, H., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., Lyoussi, B., 2008. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 118, 378–386.

Sabetghadam, A. Ramanathan, S., Sasidharan S., Mansor, S. M., 2013. Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of *Mitragyn speciosa*, in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 146, 815–823.

Steuer, J., Björck, M., Mayer, D., Wanhainen, A., Pfammatter T., Lachat, M., 2013. Distinction between acute and chronic type B aortic dissection: is there a sub-acute phase? *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 45, 627-631.

Silva, R. C. M. V. A. F., Crestania, S., Souza, P., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Santos, A. R. S., Marques, M. C. A., Kassuya, C. A. L., Santos, J. E. S., 2012. Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by an n-butanolic fraction of bark of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamanaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 997–1004.

Silveira, P. F., Bandeira, M. A. M., Arrais, P. S. D., 2008. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 18, 618-626.

Valadares, M. C., 2006. Acute toxicity evaluation: strategies post "DL₅₀ test era". *Electronic Journal of Pharmaceutics*. 3, 93-98.

Walsh, R. N., Cummins, R. A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull.* 83, 482-504.

Wasicky, R., Wasicky, M., Joachimovits, R., 1964. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. *Planta Medica*. 12, 13-25.

Legends

Figure 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *S. buxifolia*, detection UV was at 327nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercitrin (peak 9), quercetin (peak 10) and kaempferol (peak 11).

Figure 2. Photomicrography of segment of the hepatic lobe of male mice with a detail the right (**A,B**) of an animal control. Note the hepatocyte strings, the centrilobular vein and sinusoid capillaries with normal aspect. (**C,D**) of an animal treated with at dose of 200 mg/kg. Note inflammatory cells infiltration surrounding the centrilobular vein (*). See cytoplasmic vacuolization (arrow). (**E,F**) of an animal treated with a dose of 400 mg/mg showed intense inflammatory cell infiltration (*) around the hepatocyte strings of a normal aspect and centrilobular vein (**D**). Hepatocyte strings (arrow); centrilobular vein (cv); sinusoid capillaries (sc). Size bar for comparison 10µm. Hematoxylin and Eosin. 100x and 250x, respectively.

Figure 3. Photomicrography of a segment of the kidney of male mice with a detail on the right of: (A,B) Control kidney of an animal control, showing the architecture of normal structures. Note the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules. (C,D) 200 mg/kg-treated group showed the morphology of proximal tubules cells with normal appearance. Observe that there are some areas with tubular dilation (*) and glomerular alteration (arrow). (E,F) 400 mg/kg-treated group present tissue disintegration in the proximal and distal tubules (arrowhead) and glomerular alteration (arrow). pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Hematoxylin and eosin (H.E). Size bar for comparison 10µm. 10x and 25x, respectively.

Figure 4 - Photomicrography of segment of the hepatic lobe of female mice with a detail the right (A,B) of an animal control. Note the hepatocyte strings, the centrilobular vein and sinusoid capillaries with normal aspect. (C,D) of an animal treated with at dose of 400mg/kg of normal aspect. Hepatocyte strings (arrow); centrilobular vein (vc); sinusoid capillaries (sc). Hematoxylin and eosin. Size bar for comparison 10µm. 10x and 25x, respectively.

Figure 5. Photomicrography of segment of kidney of female mice with a detail on the right of: A,B) Control kidney showing architecture normal glomeruli. Note the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules. C,D) 400mg/kg-treated group showed morphology of proximal tubules cells and glomerulus with normal appearance. pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Size bar for comparison 10µm. Hematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively.

Figure 1

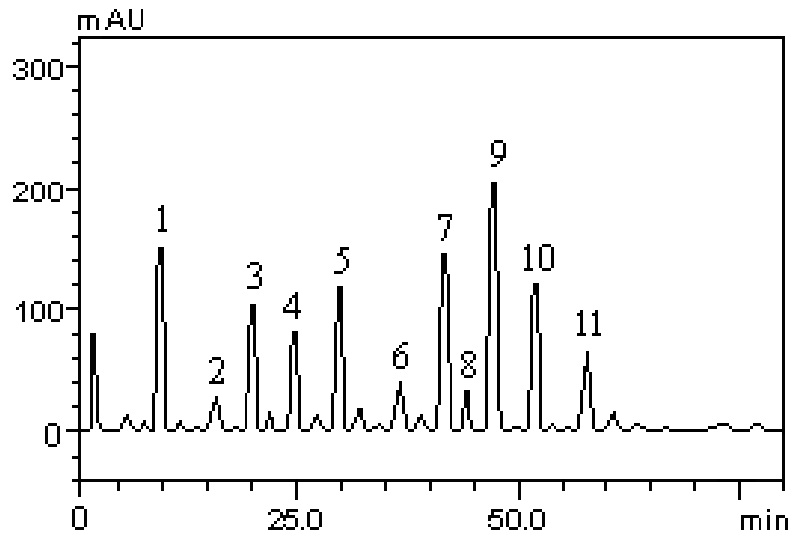


Figure 2

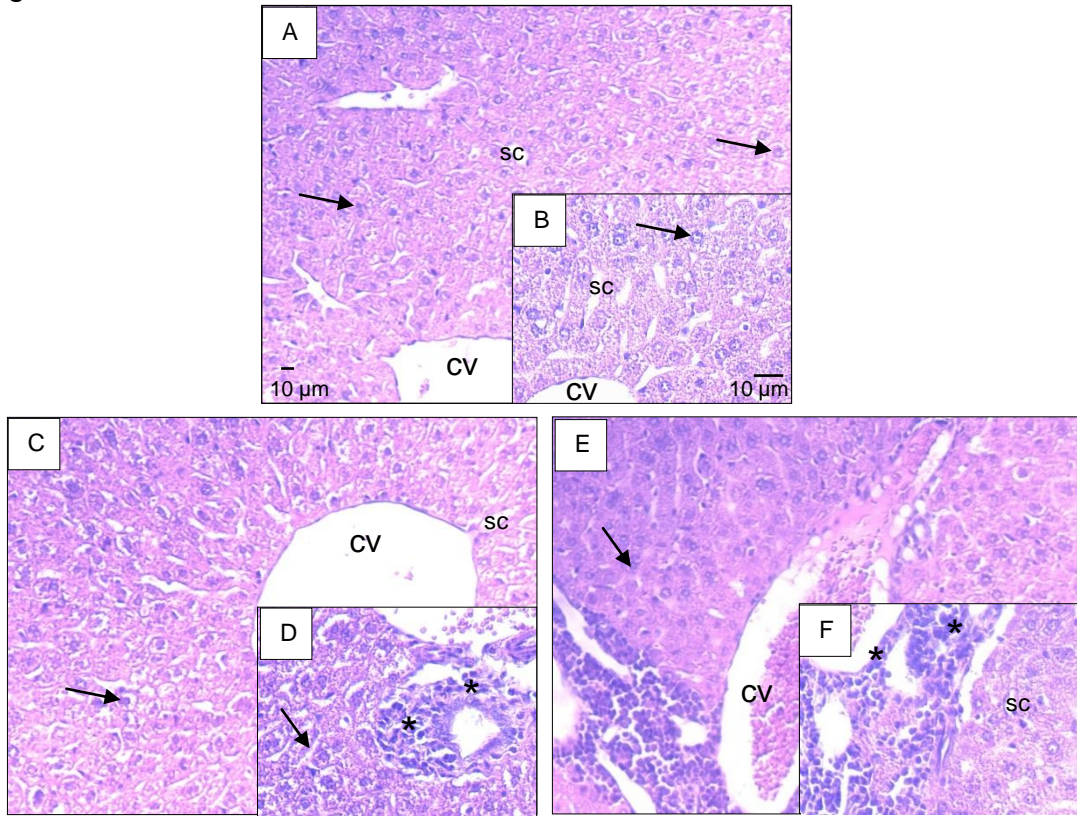


Figure 3

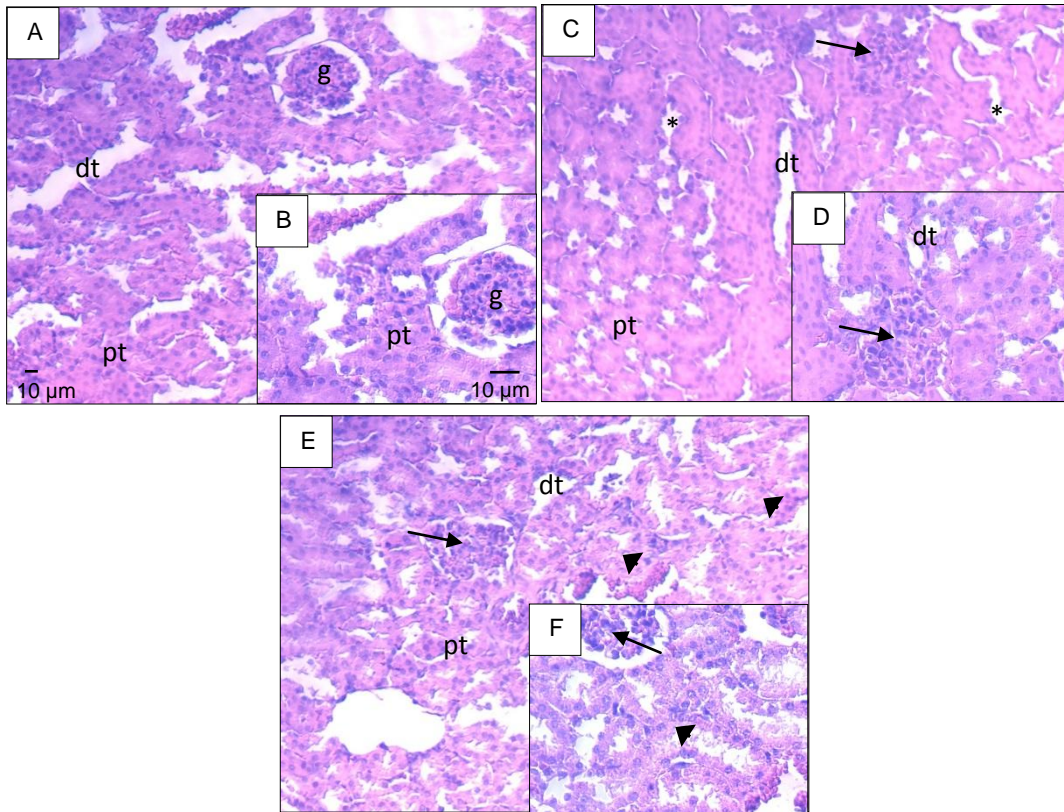


Figure 4

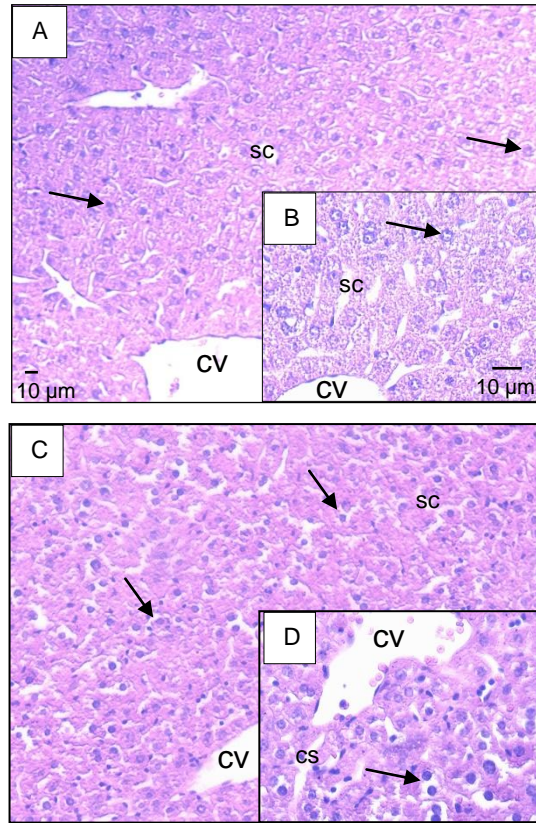


Figure 5

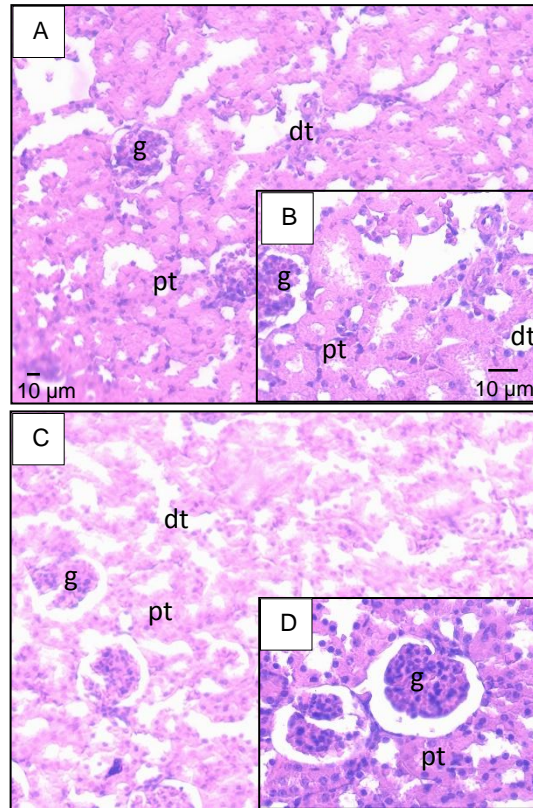


Table 1 – Composition of *Scutia buxifolia* ethyl acetate fraction.

Compounds	Stem bark	LOD	LOQ
	mg/g	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	31.72 ± 0.02 a	0.024	0.079
Catechin	6.25 ± 0.01 b	0.019	0.063
Chlorogenic acid	23.86 ± 0.01 c	0.007	0.023
Caffeic acid	18.94 ± 0.03 d	0.035	0.115
Ellagic acid	27.53 ± 0.01 e	0.042	0.138
Epicatechin	9.06 ± 0.01 f	0.021	0.070
Rutin	32.17 ± 0.02 a	0.015	0.049
Isoquercitrin	6.19 ± 0.03 b	0.010	0.032
Quercitrin	49.35 ± 0.05 g	0.028	0.091
Quercetin	26.83 ± 0.01 e	0.032	0.108
Kaempferol	15.97 ± 0.03 h	0.013	0.042

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations.

Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.01$.

Table 2: Effects of the acute administration of *S. buxifolia* (ethyl acetate extract) on the food intake of male and female mice.

Sex	Parameters	Control	2000 mg/kg
Male	Food intake	73.00 ± 1.41	69.00 ± 2.82
	Body weight	7.66 ± 1.97	3.50 ± 1.87
Female	Food intake	64.50 ± 2.12	59.50 ± 3.53
	Body weight	3.50 ± 1.87	5.40 ± 2.60

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test when appropriate (n = 6).

Table 3: Effects of sub-acute administration of *S. buxifolia* (ethyl acetate extract) for 28 days on biochemical parameters in mice.

Sex	Biochemical parameters	Study group			
		Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Male	GLU (mg/dL)	152.85 ± 31.42	120.40 ± 31.00	99.83 ± 44.21 ^a	103.66 ± 35.50 ^a
	Chol (mg/dL)	75.14 ± 14.32	64.40 ± 10.80	79.16 ± 19.40	84.16 ± 22.78
	BUN (mg/dL)	63.80 ± 9.25	60.33 ± 7.23	61.00 ± 14.28	58.75 ± 4.57
	ASAT (U/L)	161.80 ± 35.36	219.50 ± 180.30	101.30 ± 51.05	280.33 ± 47.37 ^a
	ALAT (U/L)	140.83 ± 24.55	151.00 ± 64.36	121.90 ± 41.86	116.75 ± 45.79
Female	GLU (mg/dL)	124.60 ± 36.69	109.60 ± 18.72	113.60 ± 60.17	113.80 ± 27.09
	Chol (mg/dL)	65.00 ± 13.26	85.80 ± 26.05	82.40 ± 23.26	89.60 ± 15.44
	BUN (mg/dL)	50.20 ± 6.26	72.60 ± 22.69	69.20 ± 17.19	47.40 ± 20.73
	ASAT (U/L)	125.71 ± 20.86	124.57 ± 36.03	137.60 ± 38.14	112.00 ± 16.00
	ALAT (U/L)	153.33 ± 16.94	198.71 ± 86.26	154.83 ± 44.82	123.33 ± 17.50

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n = 6). Blood sugar levels (GLU), total cholesterol (Chol), blood urea nitrogen (BUN), aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT). Differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$. (a) Different from the control.

Table 4: Effects of the sub-acute administration of *S. buxifolia* (ethyl acetate extract) for 28 days on erythrocytic parameters and platelets levels in mice.

Sex	Hematological parameters	Study group			
		Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Male	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.64 \pm 0.03	7.76 \pm 2.21	7.48 \pm 1.46	7.01 \pm 1.59
	HGB (g/dL)	13.62 \pm 1.16	12.45 \pm 3.51	11.18 \pm 1.99	10.71 \pm 2.14 ^a
	HCT (%)	46.38 \pm 3.00	40.25 \pm 11.70	37.55 \pm 7.88	36.23 \pm 8.79 ^a
	MCV (fL)	53.71 \pm 2.69	51.92 \pm 2.29	50.12 \pm 2.23 ^a	51.58 \pm 3.77
	MCH (pg)	15.71 \pm 1.28	16.05 \pm 0.75	14.98 \pm 1.02	15.37 \pm 1.35
	MCHC (g/dL)	29.37 \pm 2.55	31.01 \pm 2.41	30.06 \pm 2.47	29.88 \pm 2.66
	RDW (%)	14.47 \pm 1.22	13.56 \pm 0.65	15.20 \pm 1.30	16.35 \pm 1.85 ^a
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	504.00 \pm 43.85	476.60 \pm 58.03	488.00 \pm 47.97	460.14 \pm 68.17
Female	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.95 \pm 1.59	7.78 \pm 1.16	7.65 \pm 1.68	7.34 \pm 1.28
	HGB (g/dL)	11.53 \pm 2.50	12.63 \pm 1.41	12.40 \pm 2.60	12.23 \pm 2.14
	HCT (%)	37.23 \pm 8.62	42.27 \pm 6.55	41.39 \pm 9.50	39.47 \pm 7.38
	MCV (fL)	53.63 \pm 2.34	54.32 \pm 1.96	54.07 \pm 2.65	53.66 \pm 2.43
	MCH (pg)	16.61 \pm 0.94	16.28 \pm 0.81	16.24 \pm 0.57	16.61 \pm 0.81
	MCHC (g/dL)	31.09 \pm 1.52	30.10 \pm 1.93	30.21 \pm 2.16	31.09 \pm 1.93
	RDW (%)	13.63 \pm 0.74	13.42 \pm 0.55	14.00 \pm 0.65	13.76 \pm 0.56
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	396.25 \pm 65.96	496.71 \pm 50.24	497.71 \pm 24.98	475.62 \pm 54.15

Data are expressed as mean \pm S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n = 6). Red Blood Cells counts (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Mean Cell Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Red cells Distribution Width (RDW) and Platelet (PLT). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$. (a) Different from the control.

Table 5: Effects of the sub-acute administration of *S. buxifolia* (ethyl acetate extract) for 28 days on white cells and differential leukocytes count in mice.

Sex	Hematological parameters	Study group			
		Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Male	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	15.71 \pm 1.28	16.05 \pm 0.75	14.98 \pm 1.02	15.37 \pm 1.35
	Lymphocytes (%)	29.37 \pm 2.55	31.01 \pm 2.41	30.06 \pm 2.47	29.88 \pm 2.66
	Neutrophils (%)	14.47 \pm 1.22	13.56 \pm 0.65	15.20 \pm 1.30	16.35 \pm 1.85 ^a
	Monocytes (%)	8.33 \pm 2.42	7.75 \pm 1.70	7.28 \pm 2.63	7.80 \pm 0.84
	Eosinophils (%)	0.16 \pm 0.40	0.10 \pm 0.10	0.28 \pm 0.75	0.20 \pm 0.45
	Basophils (%)	0.17 \pm 0.40	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Female	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.95 \pm 1.59	7.78 \pm 1.16	7.65 \pm 1.68	7.34 \pm 1.28
	Lymphocytes (%)	71.62 \pm 7.29	71.25 \pm 8.17	71.60 \pm 4.93	74.40 \pm 5.32
	Neutrophils (%)	15.25 \pm 3.49	17.12 \pm 3.94	21.60 \pm 6.10	18.60 \pm 3.78
	Monocytes (%)	6.75 \pm 4.20	7.62 \pm 4.03	4.60 \pm 2.30	5.60 \pm 2.07
	Eosinophils (%)	0.12 \pm 0.35	0.28 \pm 0.48	0.10 \pm 0.10	0.20 \pm 0.44
	Basophils (%)	0.12 \pm 0.35	0 \pm 0	0.20 \pm 0.44	0 \pm 0

Data are expressed as mean \pm S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate ($n = 6$). Leukocytes (WBC). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$. (a) Different from the control.

IV PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho, uma variedade de novos estudos podem ser realizados:

- Efeito protetor da *S. buxifolia* contra Diabetes Mellitus induzida por streptozotocina em camundongos.
- Determinar marcadores hormonais e de estresse oxidativo após a administração de diferentes concentrações de *S. buxifolia* durante 28 dias;
- Ação antiinflamatória do extrato de acetato de etila da *S. buxifolia* em camundongos.

REFERÊNCIAS

ALARCON, T. Fitoterápicos são alternativa de tratamento no SUS. **Portal da Saúde**. 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8061/162/fitoterapicos-sao-alternativa-de-tratamento-no-sus.html>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde - ABIFISA. **Informações sobre os fitoterápicos brasileiros**, 2009. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

AMOROZO, M. C. M. Pluralistic medicinal settings and medicinal plant use in rural communities, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnobiology**, v. 24, n. 1, p. 139-161, 2004.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário medicinal. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6. 2005.

BACKES, A.; IRGANG, B. **Árvores, arbustos e algumas lianas nativas do Rio Grande do Sul**. Ed. Unisinos. 202p. 1998.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C.; OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Ed. Atheneu, São Paulo. p. 61-70. 1996.

BETTI, A. H.; STEIN, A. C.; DALLEGRAVE, E.; WOUTERS, A. T. B.; WATANABE, T. T. N.; DRIEMEIER, D.; BUFFON, A.; RATES, S. M. K. Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2349 - 2355. 2012.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v. 31, n. 3, p. 277-281. 2003.

BOLIGON, A. A.; BRUM, T. F.; ZADRA, M.; PIANA, M.; ALVES, C. F. S.; FAUSTO, V. P.; BARBOZA, V. S. J.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; ATHAYDE, M. L. Antimicrobial activity os *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 105-107. 2013.

BOLIGON, A. A.; BRUM, T. F.; PIANA, M.; ZADRA, M.; FREITAS, R.; FROEDER, A. L. F.; ATHAYDE, M. L. Determination of phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek leaves. **International Journal of Medicinal Plants**, v.1, p. 01-05, 2012a.

BOLIGON, A. A.; SAGRILLO, M. R.; MACHADO, L. F.; FILHO, O. S.; MACHADO, M. M.; CRUZ, I. B. M.; ATHAYDE, M. L. Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 5757-69. 2012b.

BOLIGON, A. A.; JANOVIK, V.; FROHLICH, J. K.; SPADER, T. B.; FROEDER, A. L. F.; ALVES, S. H.; ATHAYDE, M. L. Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek. **Natural Product Research (Print)**, v. 26, p. 939-944. 2012c.

BOLIGON, A. A.; DE BRUM, T. F.; FROHLICH, J. K.; FROEDER, A. L. F.; ATHAYDE, M. L. HPLC/DAD Profile and Determination of Total Phenolics, Flavonoids, Tannins and Alkaloids Contents of *Scutia buxifolia* Reissek Stem Bark. **Research Journal of Phytochemistry**, 6, 84-91. 2012d.

BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ATHAYDE, M. L. HPLC analysis and phytoconstituents isolated from ethyl acetate fraction of *Scutia buxifolia* Reiss leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28, 121-124. 2009a.

BOLIGON, A. A.; PEREIRA, R. P.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J. B. T.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6592–6598. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. 2012. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31)

BRASIL, RENISUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, DF, 6 mar. 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780. Acesso em 13 de novembro de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 886/GM, de 20 de abril de 2010.** Institui a Farmácia Viva no SUS. Disponível em: <<http://brasilsus.com.br/legislacoes/gm/103778-886?q=>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial Nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Nº 240, Brasília, 10 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Ministerial nº 971, de 03 de maio de 2006a. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Nº 84, Brasília, 4 de maio de 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006c. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Poder Executivo, Brasília, 23 de junho de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília, p. 148, 2006c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004.** Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. V. The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu – Paraná: the viewpoint of health professional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n. 10, p. 2675-2685. 2012.

CUNHA, A. P.; RIBEIRO, J. A.; ROQUE, O. R. **O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente.** Ed. Fundação Calouste Gulbenkian – Lisboa, 2007. Disponível em: <www.antoniopcunha.com.sapo.pt>. Acesso em 10 de novembro de 2013.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, p. 9-21. 1995.

DUTRA, M. G. Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás. **Anápolis: Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica**. 2009.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. **Principles of toxicology**. In: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 5^a ed. McGraw-hill, New York. 1995.

EFFERT, T.; KAINA, B.. Toxicities by herbal medicines with emphasis to traditional Chinese medicine. **Current Drug Metabolism**, v.12. n. 10, p. 989-996. 2011.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, D. (Ed.) **Suma etnológica brasileira**. Petrópolis, RJ: Vozes, v.1. Etnobiologia. 1997.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, 2006.

FRANCA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.2. 2008.

FREITAS, R. B.; ROVANI, B. T.; BOLIGON, A. A.; BRUM, T. C.; PIANA, M.; JESUS, R. S.; VELOSO, C. F.; KOBER, H. MORESCO, R. N.; ARALDI, I. C. C.; BAUERMANN, L. F.; ATHAYDE, M. L. Hepatotoxicity evaluation of aqueous extract from *Scutia buxifolia*. **Molecules**, v. 18, p. 7570-7583. 2013.

HASENCLEVER, L.. **Diagnóstico dos desafios e oportunidades no mercado de plantas medicinais e fitoterápicos brasileiro**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE. Rio de Janeiro. 2009.

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11^o ed. 2006.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

LAPA, A. J. S.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In:

SIMÕES, C. M. O. et al. (org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC. p 247-262. 2004.

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

MARQUES, F. C. Agrobiodiversidade e criatividade: contra a tendência, produzindo plantas medicinais no Sul do Brasil. In: Simon Fernández, X.; Copena Rodríguez, D. **Construindo um rural agroecológico**. Vigo: Universidade de Vigo, Servizo de Publicacións, Colección Congresos, n. 62, p. 239-255. 2009.

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. **Folha de São Paulo**. Publicada em 7 jul. 2010. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-paisdeixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterpicos.shtml>>. Acesso em: 12 de novembro de 2013.

MOLINA, M. C. B.; CUNHA, R. S.; HERKENHOFF, L. F.; MILL, J. G. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 37, n. 6, p. 743-749. 2003.

MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F. SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2571–2576. 2005.

NICOLELLA, A.; FERREIRA, E. M.; LESSA, C. A. S. Relatório Anual 2012: Dados de Atendimento. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), **Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul** (SES/RS), Porto Alegre, RS.

OGA, S. (Ed.) - **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu. 2008.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Directrices de la OMS sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra, 2003.

ONYEKA, T. C.; EZIKE, H. A.; NWOKE, O. M.; ONYIA, E. A.; ONUORAH, E. C.; ANYA, S. U.; NNACHETA, T. E. Herbal medicine: a survey of use in Nigerian presurgical patients booked for ambulatory anaesthesia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 20. 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline 407. Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 468 Adopted by the Council on 27th July 1995.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 470 Adopted by the Council on 17th, Dec 2001.

OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STÉVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J. M.; EFFERTH, T.; QU, F.; ZHOU, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN, O.; DUEZ, P. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 492– 512. 2012.

PARENTE, C. E. T.; ROSE, M. M. T. Plantas comercializadas como medicinal no Município de Barra do Piraí, RJ. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 47-59. 2001.

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

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v, 39, p. 603-613. 2001.

REZENDE H. A.; COCCO M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem**., USP, v. 36, n. 3, p. 282-288. 2002.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; DE SIMONI, C. Fitoterapia na Saúde da Família, In: Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade (Org.) **Programa de Atualização em Medicina de Família e Comunidade (PROMEF)**. Porto Alegre/Panamericana, p. 31-65. 2011.

RODRIGUES, W.; NOGUEIRA, J. M. Competitividade da Cadeia Produtiva de Plantas Medicinais no Brasil: uma perspectiva a partir do comércio exterior. **Informe Gepec**, v. 12, n. 2. 2008.

RHIOUANI, H.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378–386. 2008.

SCHENKEL, E. P. Cuidado com os medicamentos. As plantas medicinais, os chás e os fitoterápicos. **Porto Alegre: Saga, Deluzzata. 1995.**

SCHULTES, R. E. Ethnopharmacological conservation: a key to progress in medicine. **Acta botânica**, v. 18, n. ½, p.393-406. 1988.

SILVA, R. C. M. V. A. F.; CRESTANI, S.; DE SOUZA, P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L.; SILVA-SANTOS, J. E. Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by an n-butanolic fraction of bark of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 997–1004. 2012.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 618-626. 2008.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária integração da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40. 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. 2001.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R. S. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: Novo Ambiente. 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arquivos brasileiros de cardiologia: 1–48. 2006.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C.P; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2007.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza on line**, v. 4, n. 1, p. 30-39. 2006.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-309. 2006.

VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL₅₀ test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98. 2006.

VALE, N. B. A farmacobotânica ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-380. 2002.

VASCONCELOS, A. L. F. C. **Estudo farmacológico e toxicológico do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* Linn em animais de laboratório**. 2002. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2002.

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

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

WASICKY, R.; WASICKY, M.; JOACHIMOVITS, R. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. **Planta Médica**, v. 12, p. 13-25, 1964.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Regional office for the Western Pacific. Manila: WHO, p, 86, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The World Medicines Situation 2011: Tradicional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges**. Geneva, p. 12, 2011.