

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

**ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO
EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE *Luehea divaricata*
Mart. EM RATOS *Wistar***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Letícia Teixeira Nunes

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO
EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE *Luehea divaricata* Mart.
EM RATOS *Wistar***

Letícia Teixeira Nunes

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Teixeira Nunes, Leticia
ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO
BRUTO DAS CASCAS DE Luehea divaricata Mart. EM RATOS
Wistar / Leticia Teixeira Nunes.-2015.
63 p.; 30cm

Orientador: Liliane de Freitas Bauermann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Luehea divaricata 2. Plantas Medicinais 3.
Toxicidade I. de Freitas Bauermann, Liliane II. Título.

**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

**ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO
BRUTO DAS CASCAS DE *Luehea divaricata* Mart. EM RATOS *Wistar***

elaborada por
Letícia Teixeira Nunes

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

COMISSÃO EXAMINADORA

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)**

Aline Augusti Boligon, Dr^a. (UFSM)

Michel Mansur Machado, Dr. (Unipampa)

Santa Maria, 14 de dezembro de 2015

*Dedico esta dissertação à Prof^a. Dr^a.
Margareth Linde Athayde (in Memoriam) pelo
exemplo de ser humano que foi para todos nós.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por estar sempre comigo iluminando-me em minhas escolhas e nos momentos mais difíceis.

A Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades oferecidas e por minha formação profissional.

À minha orientadora Liliane de Freitas Bauermann pelo acolhimento, atenção e carinho que dedicou a mim durante o trabalho.

Aos meus pais, Luiz e Solange, pelo apoio e, sobretudo, pelo amor que dedicam por mim, estando sempre ao meu lado. Vocês me ensinaram a ser responsável, justa e prestativa. Obrigada por estarem comigo mais uma vez.

À minha irmã Caren por torcer por mim sempre e meu sobrinho Arthur por me ensinar a ser mais zelosa.

Ao meu esposo Mauricio pela paciência, pelo carinho, amor e amizade. Tu me ensinaste a ser mais comunicativa e corajosa. Obrigada por acreditar nos meus sonhos.

Aos meus colegas de laboratório, pelo aprendizado, auxílio e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos subsídios ofertados durante o curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que me acompanharam e contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE *Luehea divaricata* Martius EM RATOS Wistar

AUTORA: LETÍCIA TEIXEIRA NUNES

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

Santa Maria, 14 de dezembro de 2015

A espécie *Luehea divaricata* Martius pertence à família Malvaceae e é conhecida popularmente como “açoita-cavalo”. Ocorre de forma natural no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no norte do Uruguai. No Brasil, predomina nas regiões Sul e Sudeste do país. As cascas e partes aéreas são utilizadas popularmente para cura de feridas na pele, acne e lavagens vaginais. O presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar compostos fenólicos presentes na planta e avaliar possíveis efeitos toxicológicos durante a administração aguda (14 dias) e subaguda (28 dias) do extrato bruto das cascas em ratos *Wistar*. As cascas foram secas, trituradas e maceradas com etanol 70% por sete dias, com agitação diária. O material foi filtrado e concentrado, obtendo-se assim o extrato bruto. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada por HPLC e nove compostos fenólicos foram evidenciados pela primeira vez na espécie, dentre eles quercetina (2.69%), ácido rosmarínico (1.23%) e vitexina (1.01%). Os estudos de toxicidade foram desenvolvidos conforme preconizado pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) 423 e 407. Na avaliação da toxicidade aguda, foi administrada dose única de 2000 mg/kg em ratos *Wistar* machos e fêmeas. Os animais foram acompanhados durante 14 dias e não ocorreu morte ou mudança no comportamento. Houve diminuição da glicose sérica e aumento da AST nos machos tratados com o extrato da planta. As fêmeas tratadas também apresentaram aumento da AST em relação ao grupo controle. Além disso, também ocorreu aumento significativo das plaquetas nos dois gêneros tratados. O extrato foi classificado na categoria 5, segundo a OECD 423, com LD₅₀ entre 2000-5000 mg/kg. No teste de toxicidade subaguda ou aguda de dose repetida ratos machos e fêmeas foram divididos em quatro grupos: controle, 100, 200 e 400 mg/kg. Os animais foram tratados por 28 dias e não houve mortalidade ou mudanças no comportamento. Fatores bioquímicos, parâmetros oxidativos e histológicos foram alterados, especialmente nas doses de 200 e 400 mg/kg nas fêmeas. As alterações histológicas indicaram leve lesão hepática e renal, porém discretas. O aumento da glicose sérica pode ter sido pela alteração da função renal e a redução da AST e ALT não indicam toxicidade. A genotoxicidade do extrato foi avaliada através das técnicas de Frequência de Micronúcleos e Ensaio Cometa. Os resultados obtidos não demonstraram indícios de dano no DNA e unidos aos demais efeitos corroboram com a não toxicidade do extrato. Os resultados obtidos neste trabalho colaboram na investigação dos efeitos farmacológicos da planta, visto que estabelece o intervalo de dose segura para administração do extrato.

Palavras-chave: *Luehea divaricata*; Malvaceae; toxicidade.

ABSTRACT

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

ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY STUDY OF CRUDE EXTRACT FROM *Luehea divaricata* Martius STEM BARK IN WISTAR RATS

AUTHOR: LETÍCIA TEIXEIRA NUNES

ADVISER: LILIANE DE FREITAS BAUERMAN

Santa Maria, December 14th, 2015

The species *Luehea divaricata* Martius belongs to the Malvaceae family and is popularly known as "açoita-cavalo." It occurs naturally in northeastern Argentina, eastern Paraguay and northern Uruguay. In Brazil, predominates in the South and Southeast. The stem bark and aerial parts are popularly used for healing wounds in the skin, acne and vaginal washes. This study aimed to identify and quantify phenolic compounds present in the plant and evaluate possible toxicological effects during the acute administration (14 days) and repeated dose 28-day of crude extract of bark in rats. The stems barks were dried, crushed and macerated with 70% ethanol for seven days and shaken daily. The material was filtered and concentrated, thereby yielding the crude extract. The quantification of the phenolic compounds was performed by HPLC and nine phenolic compounds were disclosed the first time in the species, including quercetin (2.69%), rosmarinic acid (1.23%) and vitexin (1.01%). Toxicity studies have been developed as recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 423 and 407. In the assessment of acute toxicity, was administered a single dose of 2000 mg / kg in *Wistar* male and female rats. The animals were followed for 14 days and there was no death or change in behavior. There was a reduction in serum glucose and increased AST in males treated with the extract of the plant. Treated females also increased AST compared to the control group. In addition, there was also significant increase in platelets treated in the two sexes. The extract was classified in category 5, according to the OECD 423, with LD₅₀ between 2000-5000 mg / kg. In subacute or acute dose toxicity test repeated male and female rats were divided into four groups: control, 100, 200 and 400 mg / kg. The animals were treated for 28 days and no mortality or changes in behavior. Biochemical, histological and oxidative factors have been changed, especially in the doses of 200 and 400 mg / kg in females. Histological changes indicated mild liver and kidney damage, however slight. The increase in serum glucose may have been the changes in renal function and reduced AST and ALT do not indicate toxicity. The genotoxicity of the extract was evaluated through micronuclei frequency technique and comet assay. The results showed no indications of damage in DNA and attached to other effects corroborate the statement toxicity. The results of this work collaborate in the investigation of pharmacological effects of the plant, as establishing the safe dose range to extract administration.

Keywords: *Luehea divaricata*; Malvaceae; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química dos principais tipos de flavonoides. Fonte: Março et al. (2008) .15	
Figura 2- Reações em cadeia da LPO (adaptado de Gutteridge e Halliwell, 1994).....21	
Figura 3- <i>Luehea divaricata</i> (açoita-cavalo), foto de João Augusto Bagatini, FloraRS23	

MANUSCRITO

Figure 1- HPLC profile of LDM stem's barks. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), epicatechin (peak 4), vitexin (peak 5), rosmarinic acid (peak 6), rutin (peak 7), quercetin (peak 8) and luteolin (peak 9).....37	
---	--

Figure 2- Effects oxidatives of 28-day oral administration of stem's bark crude extract of LDM. LPO effects in male (A) and female (B) kidney. Effects on carbonyl protein kidney of males (C) and females (D) rats. a-b Means with the difference.....43	
---	--

Figure 3 - Photomicrography of segment of kidney of female rats 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) 100mg/kg-treated group showed morphology of proximal tubules cells with normal appearance. E,F) 200mg/kg-treated group. Observe there are in some areas with tubular (*) and glomerular (arrow) dilation. E,F) 400mg/kg-treated group present tissue disintegration in the proximal and distal tubules (arrowhead) and glomerular dilation (arrow). pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Haematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively.44	
---	--

Figure 4- Photomicrography of segment of kidney of female rats 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) 100mg/kg-treated group showed morphology of proximal tubules cells with normal appearance. (E,F) 200mg/kg-treated group. Observe there are in some areas with tubular (*) and glomerular (arrow) dilation. (G,H) 400mg/kg-treated group present tissue disintegration in the proximal and distal tubules (arrowhead) and glomerular dilation (arrow). pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Haematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively.45	
--	--

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 - Phenolic composition of stem's bark crude extract from LDM.	37
Table 2 - Effects of the acute administration of stem's bark crude extract of LDM on the food intake of male and female rats.	39
Table 3- Biochemical parameters analized in males and females rats after acute administration of crude extract from stem's bark of LDM.	40
Table 4- Effects of the acute treatment of LDM on erythrocytic parameters, platelets levels, white cells and differential leukocytes count in rats.	41
Table 5- Effects of oral sub-acute treatment with crude stem's bark extract of LDM in rats on biochemical parameters.	42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Metabólitos secundários.....	15
3.2 Toxicidade de plantas medicinais.....	16
3.3 Biomarcadores de toxicidade.....	18
3.4 Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes.....	19
3.5 Genotoxicidade	22
3.6 Descrição da família Malvaceae	22
3.7 Descrição da espécie <i>Luehea divaricata</i>	23
3.8 Etnofarmacologia	24
4 MANUSCRITO: ACUTE AND REPEATED DOSE 28-DAY ORAL TOXICITY OF <i>Luehea divaricata</i> STEM'S BARK IN <i>Wistar</i> RATS	27
Abstract	28
Introduction	29
Materials and methods	30
Plant collection, preparation of material and extraction.....	30
Chemical, apparatus and general procedures	30
Quantification of compounds by HPLC-DAD	31
Experimental Animals	32
Acute toxicity study	32
Sub-acute toxicity study	33
Statistical analysis	37
Results	37
HPLC qualitative and quantitative analysis.....	37
Acute toxicity study.....	38
Sub-acute toxicity study	42
Discussion	46
Conclusion	48
References	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO A	63

INTRODUÇÃO

A medicina popular é a soma dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas. Tais artifícios são usados para manter a saúde, bem como para prevenir, diagnosticar, melhorar ou tratar doenças físicas e mentais (OMS, 2008).

No Brasil, o uso de plantas medicinais foi introduzido na cultura através dos índios, com contribuições de negros e europeus. O processo de miscigenação contribuiu para a diversificação do uso das plantas e seus aspectos medicinais (REZENDE; COCCO, 2002). O país abriga a maior biodiversidade do mundo, avaliada em aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2000). Mais de 55.000 espécies já foram catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (BRASIL, 2006), entretanto, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES et al., 2004).

Os vegetais podem dar origem a diversos recursos terapêuticos, podendo ser utilizados na forma *in natura*, sob a forma de drogas pulverizadas, extratos brutos, tinturas, ou podem ser submetidos a processos de extração e purificação para isolamento de substâncias de interesse (RATES, 2001). Cerca de 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende de medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados com a saúde e essa prática é vista como parte integrante da cultura dessas comunidades (EKOR, 2014).

Lamentavelmente, grande parte dos fitoterápicos utilizados para automedicação e ainda os prescritos, não possuem perfil toxicológico conhecido e essa prática pode induzir graves problemas, visto que, mesmo sendo de baixa toxicidade, podem interagir com outros medicamentos. O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado na crença popular da “naturalidade inócua”, fez com que muitas plantas fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, com objetivo de constatar sua eficácia e segurança, já que o conhecimento a respeito dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica ainda é escasso (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; FIRMO et al., 2011).

Diante desses fatos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou a seus Estados membros formular e desenvolver políticas para o uso da medicina complementar e alternativa nos seus programas nacionais de saúde (BIESKI et al., 2012). Assim, em 2006, o

Ministério da Saúde desenvolveu uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos, levando em conta a necessidade de reconhecimento da medicina tradicional como parte integrante dos sistemas de saúde e visando garantir o acesso e o uso racional de plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade, contribuindo para o desenvolvimento deste setor no país (BRASIL, 2006).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular brasileira, sem comprovação farmacológica, está a *Luehea divaricata* Martius (LDM), popularmente conhecida como açoita-cavalo, estriveira, ivitinga, pau-de-canga e salta-cavalo. As folhas e cascas da planta são empregadas pelos populares na forma de chás, infusões ou xaropes para tratamento de reumatismo, leucorreia, blenorragia, disenteria, bronquite (TANAKA; VIDOTTI; SILVA, 2003), controle do nível de ácido úrico, cura de feridas na pele e acne. Nas folhas foi evidenciada presença de flavonoides, saponinas, taninos e mucilagem e do extrato bruto metanólico das cascas do caule já foi isolado o flavonoide (-) epicatequina (TANAKA et al., 2005).

O hábito de utilizar plantas sem comprovação farmacológica elucidada é arriscado, tornando, assim, importante a investigação de possíveis efeitos toxicológicos provocados pelo uso desses vegetais.

Tendo em vista a variedade de indicações terapêuticas e seu uso popular, é relevante o estudo fitoquímico e farmacológico de LDM para uma melhor distribuição de conhecimentos dos efeitos provocados pela planta, bem como a segurança no uso da mesma como recurso terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo identificar e quantificar metabólitos secundários presentes na planta e avaliar possíveis efeitos toxicológicos durante a administração aguda e subaguda do extrato bruto das cascas de LDM em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos específicos

- Delinear o perfil cromatográfico da planta por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do extrato bruto das cascas de LDM de acordo com o Guia OECD 423, assim como a toxicidade subaguda conforme o Guia OECD 407;
- Investigar possíveis alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos após administração do extrato da planta;
- Avaliar os produtos de lipoperoxidação através dos métodos: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonil e atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), após administração prolongada do extrato bruto das cascas de LDM;
- Averiguar a genotoxicidade do extrato da planta através do método DNA cometa e frequência de micronúcleos;
- Observar alterações histológicas no tecido hepático e renal dos animais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metabólitos secundários

As plantas produzem uma vasta ordem de componentes orgânicos, os quais são divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários desempenham função plástica, estrutural e de armazenamento de energia, enquanto os secundários não são essenciais ao organismo produtor, não possuindo relação com o desenvolvimento da planta e conferindo vantagens para sua sobrevivência (SIMÕES et al., 2010; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os metabólitos secundários estão divididos em classes, cujas principais são os polifenóis, flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides. Os polifenóis compreendem uma grande classe e estão amplamente distribuídos em alimentos e bebidas de origem vegetal. Possuem característica antioxidante e o principal mecanismo dessa ação se dá através do sequestro de espécies reativas de oxigênio, além de possuírem capacidade de quelar íons metálicos (PORT'S, 2013). Os principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos como ácido clorogênico; os estilbenos, como o resveratrol presente nas uvas e vinhos; cumarinas; ligninas; taninos e flavonoides (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010; FALLER; FIALHO, 2009).

Os flavonoides desempenham um importante papel como antioxidantes, fungicidas, inseticidas, corantes, protetores de raios UV. Possuem propriedade anti-inflamatória, antiviral, citotóxica, antimicrobiana e também podem atuar na prevenção do câncer (SZULTKA et al., 2013; SIMÕES et al., 2010; MASULLO, 2015). Esses compostos são classificados com base na sua hidroxilação padrão e grau de insaturação no anel C (Figura 1).

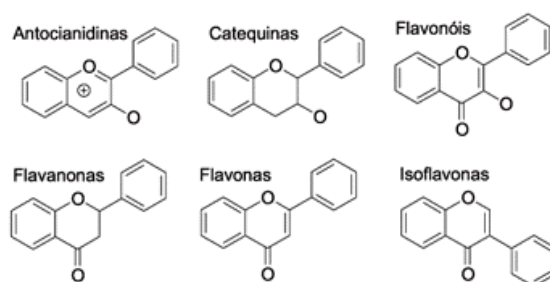


Figura 1 Estrutura química dos principais tipos de flavonoides. Fonte: Março et al. (2008)

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e seus metabólitos secundários é objeto de contínuas pesquisas (CECHINEL; YUNES, 1998). Em análise fitoquímica das folhas de LDM foi evidenciada presença de flavonoides, saponinas, taninos catéquicos e mucilagem. Além disso, alcaloides, óleos fixos, antocianinas, carotenoides e polissacarídeos estão presentes em menor quantidade (BORTOLUZZI et al., 2002; ALICE, 1995).

Alguns metabólitos secundários podem produzir efeitos nocivos. Os alcaloides, por exemplo, presentes na maioria das plantas do gênero *Solanum*, podem causar náusea, cefaléia e alguns podem ser cancerígenos (CASTRO, 2006). Plantas que apresentam elevados níveis de cumarinas podem aumentar o tempo de coagulação sanguínea quando consumidas em doses elevadas (ANDERSON, 1985; ARGENTA, 2011; D'ARCY, 1993). Taninos, por se ligarem a proteínas e outras macromoléculas também apresentam atividades tóxicas como a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados evidenciada por Ayres e colaboradores (1997). Além disso, por serem capazes de se complexar com íons metálicos, alguns sistemas biológicos podem ser prejudicados, visto que utilizam tais íons como cofatores enzimáticos (MONTEIRO et. al., 2005).

3.2 Toxicidade de plantas medicinais

A maioria das plantas consumidas no Brasil apresentam pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tornando arriscado o uso desses vegetais, já que podem conter substâncias tóxicas ao organismo (CASTRO, 2006). De acordo com Veiga Júnior e colaboradores (2005), a toxicidade das plantas medicinais é um problema de saúde pública, visto que há escassez de pesquisas e fragilidade nas normas brasileiras para o comércio de plantas medicinais.

Diversos fatores influenciam na toxicidade da planta, como sua contaminação por microorganismos, pesticidas, contaminação por metais pesados, a estação do ano que foi colhida, diferentes processos de extração e até mesmo identificação botânica errônea (LIMA, 2009).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006, apresenta em suas diretrizes o incentivo ao desenvolvimento

e à pesquisa no que se refere ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com eficácia, segurança e qualidade à população, dando prioridade à biodiversidade do país (BRASIL, 2006; CARVALHO et al., 2007). Uma vez implementada a política, tornam-se necessários estudos toxicológicos pré-clínicos para oferecer aos pesquisadores segurança em relação às doses em que aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório (CASTRO, 2006).

Em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou um guia para orientação de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. No guia estão inclusos estudos de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e outros estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (BRASIL, 2010).

A avaliação da toxicidade é realizada com a finalidade de determinar o potencial de substâncias em causar danos frente ao organismo. Através de alguns testes, é possível avaliar e classificar substâncias de acordo com a letalidade ou toxicidade, além de evidenciar o potencial tóxico em órgãos específicos, a toxicocinética e a relação dose-resposta. O teste da dose letal aguda (DL_{50}) foi muito utilizado anteriormente com o objetivo de encontrar a dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo testado, contudo eram utilizados mais de 100 animais para cada espécie estudada e, atualmente, novos protocolos são utilizados. O protocolo OECD 423, por exemplo, utiliza apenas 3 fêmeas a cada etapa. Dessa forma, é possível classificar, quanto à toxicidade, uma substância e ainda diminuir consideravelmente o número de animais utilizados nos experimentos de avaliação da toxicidade (MORAIS, 2014).

A toxicidade aguda é aquela em que os efeitos tóxicos em animais são produzidos a partir de uma dose única ou múltiplas doses do agente tóxico em um período de 24h. A observação dos efeitos se dá até 14 dias após administração do agente tóxico. São avaliados, parâmetros comportamentais, mortalidade, variações de peso corporal e ingestão de ração, análises hematológicas e bioquímicas. De acordo com o Guia OECD 423, as doses fixas administradas devem estar entre 5 e 2000 mg/kg/dia e devem ser utilizados 3 animais por dose. Nesse caso, não é exigido o cálculo da DL_{50} , já que o método possui grande precisão estatística. (BRASIL, 2010; VALADARES, 2006).

Já em ensaios de toxicidade subaguda ou de doses repetidas, que podem durar de 28 a 90 dias, estabelecem-se níveis os quais não são observados efeitos tóxicos, identificam-se e caracterizam-se órgãos afetados, severidade após exposição repetida e reversão dos efeitos

tóxicos (OGA; CAMARGO; BASTIUZZO, 2008). Normalmente são utilizadas três doses, onde a mais alta é eleita com a expectativa de produzir efeitos observáveis, porém não pode acarretar morte ou sofrimento (BRASIL, 2010). Os animais utilizados devem ser divididos em grupos de acordo com a dose, além do grupo controle, sendo constituídos por 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) cada.

3.3 Biomarcadores de toxicidade

Biomarcador é um parâmetro biológico o qual indica mudanças mensuráveis em níveis bioquímicos, moleculares, celulares, fisiológicos, patológicos ou comportamentais dos processos biológicos normais ou respostas farmacológicas à uma intervenção terapêutica. Os biomarcadores são excelentes ferramentas para indicar lesão, especialmente no fígado e rins (GUPTA et al., 2014; GAD, 2014; LOCK & BONVENTRE, 2008).

O fígado é o principal órgão responsável por metabolizar xenobióticos, portanto torna-se alvo de diversas patologias relacionadas às drogas. As plantas também são potenciais causadoras de efeitos hepáticos, visto que algumas ervas já foram identificadas como responsáveis por causar hepatite crônica e aguda, colestase, insuficiência hepática e cirrose (STICKEL; PATSENKER; SCHUPPAN, 2005).

As transaminases são marcadores indiretos e funcionam como provas simples de função hepática. Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são encontradas no soro quando originárias da ruptura de membranas celulares, como do hepatócito. Além de estarem presentes no fígado podem ser encontradas também em outros órgãos como coração, eritrócitos e tecido muscular. Embora as duas enzimas sejam capazes de refletir o dano, a ALT é melhor indicador que a AST e os resultados precisam ser combinados a outros fatores para designar efetivo dano hepático (HUANG et al., 2006; CEQUERA; MÉNDEZ, 2014; ZHU et al., 2014).

Os rins assumem a função de filtração, reabsorção, funções endocrinológicas e metabólicas e, sobretudo, manutenção da homeostasia. Dessa forma, a diminuição da função renal provoca o comprometimento de outros órgãos.

A ureia é o principal produto nitrogenado que deriva da degradação das proteínas no organismo. Não é produzida constantemente durante o dia, tornando sua concentração sanguínea variável (BASTOS, 2011).

A creatinina sérica (CRE) provém da transformação da creatina no tecido muscular e é livremente filtrada no glomérulo, sendo ativamente secretada em pequenas parcelas. A função renal pode ser avaliada através da CRE, a qual é utilizada como parâmetro para estimar a taxa de filtração glomerular, mesmo que dependa de outros fatores, como massa muscular do indivíduo. Em geral, valores aumentados indicam perda da função renal e o nível sérico de CRE relaciona-se proporcionalmente à gravidade da doença renal (SODRÉ et al., 2007; KIRSZTAJN, 2007). Em conjunto, ureia e creatinina podem ser úteis na avaliação da taxa de filtração glomerular.

3.4 Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes

O termo radical livre reporta-se a um átomo ou molécula altamente reativo, o qual existe de forma independente e possui um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. Este elétron desemparelhado é que confere instabilidade e alta reatividade ao átomo ou molécula. Os radicais livres podem ser produzidos no citoplasma, na membrana ou nas mitocôndrias e atacam todos os tipos de moléculas do organismo, dentre elas as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. A expressão radical livre não é ideal para denominar agentes reativos patogênicos, visto que alguns deles não possuem elétrons desemparelhados na última camada. Sendo assim, como a maioria deriva do metabolismo do O₂ é correto utilizar o termo “espécies reativas de oxigênio” (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; LOBO et al., 2010).

As espécies reativas de oxigênio estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças relacionadas a idade e até mesmo processo de envelhecimento causado pelo estresse oxidativo ou dano oxidativo, dentre elas o câncer, aterosclerose, diabetes, Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O dano ou estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre as espécies reativas e as defesas do organismo, havendo maior produção dessas espécies reativas do que da proteção. Para isso o organismo se utiliza de defesas antioxidantes.

Conforme denominação utilizada por Halliwell e Gutteridge (2008), antioxidante é qualquer substância capaz de retardar, impedir ou eliminar danos oxidativos para a molécula alvo. Para se proteger, a célula possui um sistema que atua de duas formas: detoxificando o agente antes que aconteça a lesão através da SOD, catalase e glutathione peroxidase ou reparando a lesão ocorrida, por meio do ácido ascórbico e glutathione reductase, por exemplo.

O consumo de antioxidantes naturais, como flavonoides e compostos fenólicos presentes em diversos vegetais está associado à baixa incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BEHERA et al, 2008; BOLIGON et al., 2009; PAPETTI et al., 2006). É possível investigar estresse oxidativo por meio das enzimas SOD e CAT que integram o sistema de defesa antioxidante enzimático. A SOD atua na remoção específica do radical superóxido, através da dismutação, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A catalase encontra-se, principalmente, no fígado, rins e eritrócitos, embora esteja presente em outros órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético. Essa enzima atua na eliminação do H_2O_2 , favorecendo a sua catálise até água. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; SCHINEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A membrana celular é um dos componentes celulares mais atingidos pelas espécies reativas de oxigênio em virtude da lipoperoxidação (LPO) que provoca alterações estruturais e na permeabilidade da membrana. A LPO é uma reação em cadeia (Fig. 2), ocorrendo em várias etapas e o radical hidroxila, com frequência, promove este fenômeno. Dessa forma, ocorre perda de seletividade na troca de íons e há liberação das organelas, formando produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas excitadas. Logo, é possível adotar o MDA e as proteínas como marcadores de estresse oxidativo, visto que pode ser quantificado indiretamente através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no caso do produto MDA (BARBOSA et al., 2010).

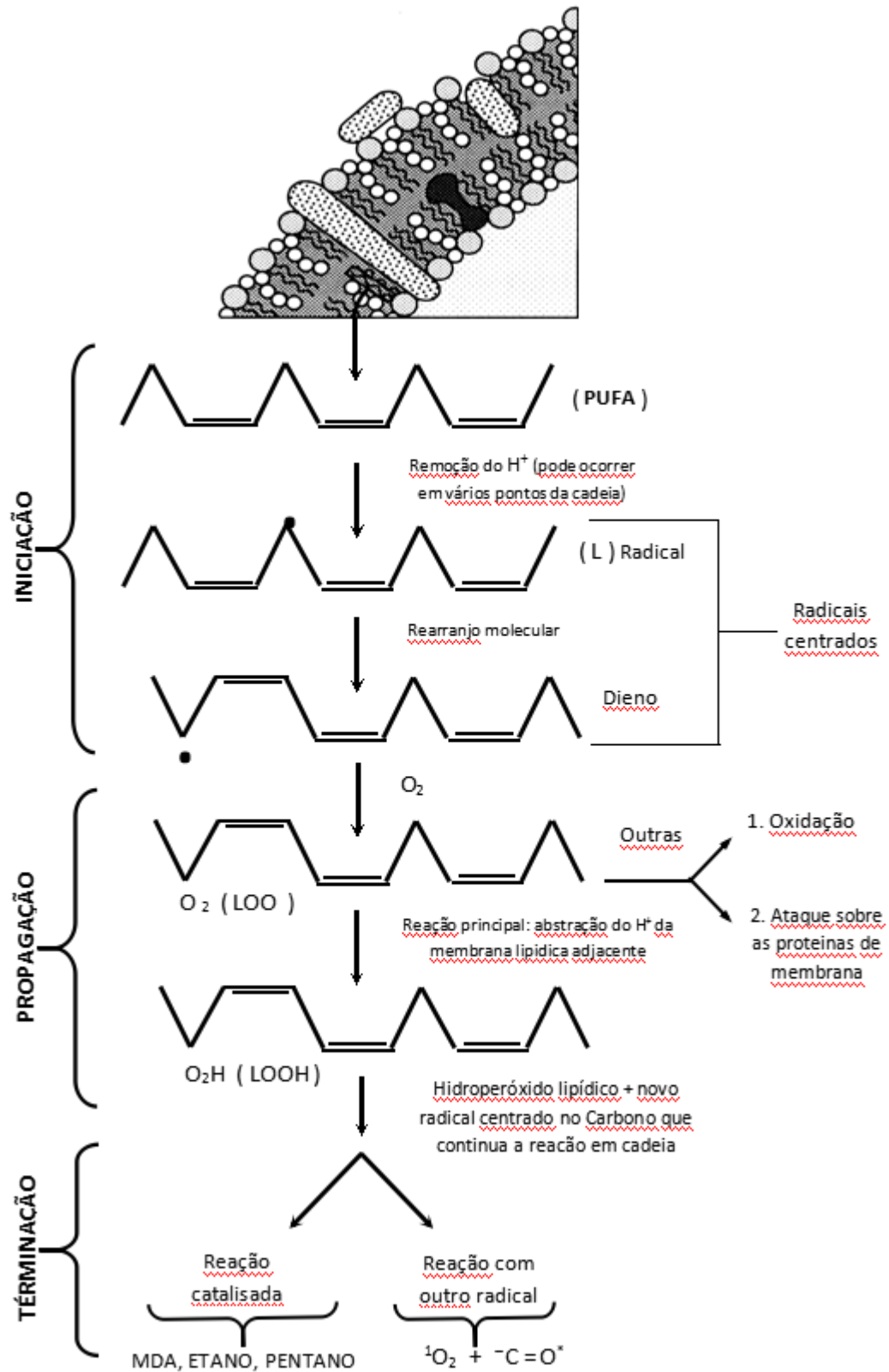


Figura 2 Reações em cadeia da LPO (adaptado de Gutteridge e Halliwell, 1994)

3.5 Genotoxicidade

O DNA é uma molécula estável que pode sofrer alterações durante o ciclo de replicação. Caso não haja reparo nessas alterações, definidas como mutações, as mesmas podem se consolidar e constituir mudanças que passam de geração a geração. Um grande número de agentes físicos, químicos e biológicos são capazes de alterar o material genético, dentre eles antibióticos, pesticidas e conservantes alimentícios. A identificação de danos no DNA pode ser realizada através de testes citogenéticos, como o ensaio cometa e o teste do micronúcleo (MN) (KOHATSU et al., 2007).

O ensaio cometa é um método sensível para quantificação de danos no DNA. É utilizado para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem culminar na mutação. O ensaio cometa alcalino, descrito por Singh e colaboradores (1988), possibilita mensurar a ocorrência de quebra de fita simples e dupla, lesões de sítios álcali-lábeis e *cross-links* do DNA (PRÁ et al., 2006; BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

O teste de micronúcleos (MN) detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando assim a distribuição proporcional dos cromossomos durante a divisão celular (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

3.6 Descrição da família Malvaceae

A Família Malvaceae é representada por cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies distribuídas em regiões temperadas. Como sugerido por Bayer e colaboradores e pelo APG I (Angiosperm Phylogeny Group) (1998), APG II (2003) e APG III (2009), Bombacaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae foram incluídas na Família Malvaceae, mantendo cada uma em nível de subfamília (ALVES et al, 2011).

As plantas pertencentes a esta família são herbáceas ou lenhosas, arbustivas ou arbóreas, folhas alternadas, inteiras e palminérvias. As flores apresentam numerosos estames, com o ovário súpero, e os frutos são geralmente capsulares (AZEVEDO et al, 2005).

3.7 Descrição da espécie *Luehea divaricata*

A espécie LDM (Figura 3), conhecida popularmente no Rio Grande do Sul como açoita-cavalo ou açoita-cavalo-vermelho, ocorre de forma natural no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no norte do Uruguai. No Brasil, predomina nas regiões Sul e Sudeste do país. LDM é arbórea, de caráter decíduo e heliófita, ou seja, vegeta em locais com muita luz (REITZ; KLEIN; REIS, 1988). O gênero *Luehea* compreende diversas espécies, entre elas *L. grandiflora*, *L. speciosa* e *L. candidans*, também estudadas quanto suas possíveis atividades farmacológicas.

Na idade adulta, as árvores podem atingir até 30 metros de altura e seu tronco é tortuoso, nodoso e com reentrâncias. Sua ramificação é irregular e simpódica, com copa larga e densa. A casca mede até 25 mm de espessura, levemente fissurada com escamas retangulares e pequenas e tem como característica a aspereza e a cor pardo-cinzentada-escuro. As folhas são simples, dísticas, alternadas, irregularmente serradas, com nervuras longitudinais típicas, discolores, ásperas na face ventral e tomentosas na face dorsal, pecíolo ferruginoso, com até 1 cm de comprimento (CARVALHO, 2008).



Figura 3 *Luehea divaricata* (açoita-cavalo), foto de João Augusto Bagatini, FloraRS

3.8 Etnofarmacologia

A etnofarmacologia é uma ciência multidisciplinar que estuda a diversidade cultural e biológica, principalmente o uso pela comunidade de espécies vegetais para fins terapêuticos (FERNANDES, 2005).

O uso medicinal de açoita-cavalo é relatado por diversos autores. As cascas e partes aéreas são utilizadas para cura de feridas na pele, espinhas e lavagens vaginais. As folhas são utilizadas contra disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia, tumores, feridas e úlceras gástricas. A infusão das flores é usada contra bronquite e a raiz é depurativa (BALBACH, 1993; BIESKI et al. 2012; CARVALHO, 2007; LORENZI, 1988; TANAKA et al., 2005). Propriedade anti-inflamatória, diurética, antianêmica, antiespasmódica e antisséptica bucal também são citadas (PIO, 1984; ALICE et al. 1995; SILVEIRA e SILVEIRA, 2002).

Em análises fitoquímicas, foi isolado do extrato metanólico das cascas o flavonoide (-)-epicatequina, pertencente à classe flavan-3-ol. Além disso, foi evidenciada presença de epicatequina, estigmasterol, lupeol e α,β - amirina por cromatografia em camada delgada (TANAKA et al., 2005; ROSA et al., 2014).

Vargas e colaboradores (1991) realizaram estudo de genotoxicidade em extratos aquosos de sete espécies vegetais através do teste de Ames (*Salmonella*/ microssoma). LDM apresentou resultado positivo, com ativação microssomal. O resultado do ensaio foi relacionado à presença de flavonoides e taninos nos vegetais.

A DL₅₀ e o efeito toxicológico subcrônico do extrato bruto hidroalcoólico das cascas de LDM foram investigados por Bighetti e colaboradores (2004) em camundongos *swiss* e ratos *wistar*, por via oral e intraperitoneal. Por via oral, o extrato foi administrado na dose de 5,0 mg/kg de peso do animal e não mostrou-se tóxico por 14 dias. Por via intraperitoneal, foram administradas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, sendo que os animais começaram a apresentar sinais de toxicidade a partir da dose de 100 mg/kg de peso corporal do animal. A DL₅₀ calculada foi igual a 123,55 mg/kg, o que classifica o extrato em moderadamente tóxico de acordo com referências utilizadas pelos autores.

Em análise de 8 espécies de plantas da flora argentina, Zacchino e colaboradores (1998) referiram que o extrato diclorometano das cascas de LDM inibiu todos os dermatófitos testados neste estudo, dentre eles o *Trichophyton rubrum*, micro-organismo frequentemente isolado em

lesões por dermatófitos e o *Microsporium gypseum*, causador das chamadas tinhas de pele e couro cabeludo.

A cerca da atividade antimicrobiana, Tanaka e colaboradores (2005) descreveram que o extrato bruto metanólico das cascas e suas frações aquosa e acetato de etila demonstraram-se moderadamente ativos contra *Staphylococcus aureus*. O extrato bruto das cascas apresentou efeito citostático na concentração de 25 µg/mL, com pequena seletividade entre as linhagens de células de câncer de rim, pulmão, leucemia e ovário e na concentração de 250 µg/mL também com pequena seletividade para linhagens de células de adenocarcinoma, câncer de mama, próstata, rim e pulmão. Além disso, apresentou efeito citocida na concentração de 250 µg/mL, com pequena seletividade para linhagens de células de câncer no ovário, melanoma e leucemia.

A atividade antiulcerogênica e determinação de possíveis mecanismos de ação do extrato bruto das cascas de LDM nesta atividade foi avaliada por Siqueira (2006). Neste estudo, o extrato bruto da planta reduziu o índice de lesões ulcerativas produzido por indometacina e etanol. Sugeriu-se que o mecanismo envolvido estaria parcialmente relacionado com a atividade de radicais sulfidríla e pela precipitação de proteínas produzida pela presença de polifenóis.

A respeito da atividade antioxidante, Arantes (2012) inferiu que o extrato hidroalcoólico das folhas da espécie foi capaz de proteger o cérebro contra LPO induzida, diminuindo níveis basais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e demonstrando atividade antioxidante *in vitro* em baixas concentrações. O extrato bruto e as frações das folhas de LDM apresentaram atividade antioxidante em comparação com a quercetina, pelos métodos da 2,2-difenil, 1-picrilhidrazila (DPPH) e β – caroteno – linolenato (BCB) (MÜLLER, 2006).

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta seus resultados na forma de manuscrito, constituído por introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e conclusão. Pretende-se submeter o manuscrito à revista apropriada.

Além disso, a dissertação contempla os itens considerações finais, no qual os resultados são interpretados em conjunto, conclusões e referências bibliográficas, as quais são relativas às seções introdução, revisão bibliográfica e considerações finais.

4 MANUSCRITO: ACUTE AND REPEATED DOSE 28-DAY ORAL TOXICITY OF *Luehea divaricata* STEM'S BARK IN *Wistar* RATS

L. T. Nunes¹, A. H. Silva¹, F. R. Ziegler¹, L. Pappis¹, T. F. Brum¹, M. Piana¹, R. O. Souza², L. F. S. Oliveira², S. S. Roman³, L. F. Bauermann^{4*}

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Camobi, Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

² Universidade Federal do Pampa, Laboratório de Imunologia Clínica e Toxicologia, Uruguaiana, RS, Brasil

³ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Campus Erechim

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Camobi, Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author:

Liliane de Freitas Bauermann

Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCS – Universidade Federal de Santa Maria

97105-900 – Santa Maria – RS – Brazil

Phone: +55-55-3220-9380

E-mail: lgfbauermann@gmail.com

Abstract

The species *Luehea divaricata* Martius (LDM) popularly known as “açoita-cavalo” is a native tree of South and Southeast of Brazil. In folk medicine the stem barks and aerial parts are commonly used for healing wounds on the skin, acne and vaginal washes. The aim of this study was to evaluate the acute and sub-acute toxicity of the crude extract from stem bark of LDM in male and female rats. Presence of nine phenolic compounds was investigated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The toxicity study followed the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 423 and 407. To evaluate acute toxicity a single dose of 2000 mg/kg of crude extract from LDM was administered orally to male and female *Wistar* rats. The animals were observed for 14 days and evaluated for behavior change, mortality, haematological and biochemical parameters. In the sub-acute study the rats were divided into four groups: control, 100, 200 and 400 mg / kg and the extract was orally administered for 28 days in these concentrations. They were evaluated about the behavioral changes, mortality, biochemical and hematological parameters, genotoxicity, oxidative stress and histological analysis. The HPLC results reveal that the plant contains many compounds and the three main compounds were quercetin, rosmarinic acid and vitexin. The acute administration of crude extract did not cause changes in behavior and deaths were not observed. Decreased food intake was observed in both genders and decreased glucose (GLU) in male rats. Platelets (PLT) and aspartate aminotransferase (AST) activity were increased in males and females. In a sub-acute toxicity study no behavioral changes or mortality was observed. The results showed increased GLU in male rats treated with higher doses (200 and 400 mg/kg) while AST and ALT decreased. Similar to males, in females there was an increase in GLU levels and decreased AST and ALT activity in females who received higher doses. There were no changes in haematological parameters. Histological analysis of liver and kidney tissue showed reasonable changes which were consistent with the biochemical changes observed. After the oral administration of crude extract from LDM stem's bark, the plant can be considered of low toxicity, classified in Category 5 according to OECD 423, with LD₅₀ estimated between 2000-5000 mg/kg. The variations observed in sub-acute study showed that daily administration can cause adverse effects in haematological and biochemical parameters as well as in hepatic and renal tissue when given in high doses.

Keywords: *Luehea divaricata*; Medicinal plants; Stem bark; Acute; Sub-acute; Toxicity, Rats

Introduction

Traditional medicine is the sum total of the knowledge, skills and practices based on the theories, beliefs and experiences indigenous to different cultures (WHO, 2008). Currently, it is growing the number of people that use medicinal plants as a complementary or alternative treatment (Wojcikowski; Johnson; Gobé, 2004). A rich flora with numerous plants brings with it a potential risk of human poisoning (Ndhlala et al., 2013). The growth of the use of plants for medicinal purposes should not only be by poverty or lack of access to conventional medicine, but also some assumptions that have not been tested, such as drug resistance and undesirable side effects of synthetic drugs and dissatisfaction with the usual treatment (Ateba et al., 2014). However, scientific research is needed to provide additional evidence of its safety and efficacy (WHO, 2008).

Brazil is the country with the greatest biodiversity on the planet besides having rich ethnic and cultural diversity, which contributes to the traditional knowledge of the use of medicinal plants and encourages the development of research related to the therapeutic properties of these plants. In the country, since 2006, have established The National Policy of Medicinal Plants and Herbal Medicines (PNPMF) establishing guidelines in order to promote improvements in the Brazilian population's quality of life extending treatment options offered to users of the Unified Health System (SUS), respecting the safety and efficacy principles (Brasil, 2006). In 2010, a guideline for conducting safety nonclinical studies necessary for the development of drugs was presented by National Health Surveillance Agency (ANVISA) in order to enable the safety nonclinical studies in a harmonized way and scientifically valid (Brasil, 2010). From this premise, a list was drawn up on 71 species of plants used in folk medicine to write prescriptions in SUS. However, there is little or no study regarding the safety or real pharmacological activity of these plants. Furthermore, the large biodiversity found in the country is not limited to this list and other plants should be investigated.

Among the herbal medicines that are part of the Brazilian flora is *Luehea divaricata* (LDM). It is popularly known as açoita-cavalo and belongs to the Malvaceae family. The plant is found commonly in northeastern Argentina, eastern Paraguay and northern Uruguay. In Brazil predominates in the South and Southeast. The bark and aerial parts are used in folk medicine for healing wounds on the skin, acne and vaginal washes. A flavonoid (-) epicatechin was isolated from the stem's bark (Tanaka et al., 2003; Tanaka et al., 2005). The

dichloromethane extract of stem's bark was able to inhibit some fungi dermatophytes (Zacchino et al., 1998). This study was conducted in order to classify the crude extract of stem's bark from LDM as their toxicity and assess the occurrence of changes in behavior or toxic effects on the animals when given high doses of the extract.

Materials and methods

Plant collection, preparation of material and extraction

The stem's bark of LDM collected in Itaara (Rio Grande do Sul, State of Brazil) in January 2013 (coordinates 29°36'31'' S e 53°45'55''W). Exsiccate was identified 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 SMBD 13.716. The stem's bark (1,272.68 g) were macerated at with 70% ethanol for a week with daily shaking and the solvent was renewed several times. After filtration, the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure at a temperature below 40 °C, in order to obtain the aqueous extract that was evaporated to dryness to furnish a crude extract.

Chemical, apparatus and general procedures

All chemical were of analytical grade. Acetonitrile, phosphoric acid, gallic acid, chlorogenic acid and rosmarinic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Catechin, epicatechin, vitexin, rutin, quercetin and luteolin were acquired 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.

Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles; the mobile phase was: (A) acetonitrile: water (95:5, v/v) and (B) water: phosphoric acid (98:2, v/v), and the composition gradient was: 5% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 40%, 60%, 70% and 100% B at 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively, following the method described by Colpo et al. (2014) with slight modifications. Crude extract of LDM stem's bark was analyzed at a concentration of 15 mg/mL. The presence of nine antioxidants compounds were investigated, namely, gallic acid, catechin, epicatechin, chlorogenic acid, rosmarinic acid, quercetin, vitexin, luteolin and rutin. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume 20 µl and the wavelength were 270 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for chlorogenic and rosmarinic acids, and 365 nm for luteolin, vitexin, quercetin and rutin. 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 0.025 – 0.300 mg/ml for catechin, epicatechin, quercetin, rutin, luteolin and vitexin, and 0.025 – 0.300 mg/ml for gallic, chlorogenic and rosmarinic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 11964x + 1205.8$ ($r = 0.9993$); catechin: $Y = 13079x + 1178.5$ ($r = 0.9999$); epicatechin: $Y = 13165x + 1348.1$ ($r = 0.9997$); chlorogenic acid: $Y = 12645x + 1187.5$ ($r = 0.9995$); rosmarinic acid: $Y = 11849x + 1156.9$ ($r = 0.9997$); vitexin: $Y = 12894x + 1168.4$ ($r = 0.9996$); luteolin: $Y = 11745x + 1279.1$ ($r = 0.9993$); rutin: $Y = 13265x + 1358.6$ ($r = 0.9995$) and quercetin: $Y = 12653x + 1184.5$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Boligon et al. (2013). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

Experimental Animals

Young adult male and female *Wistar* rats, 8- to 10-weeks old, were obtained from Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Animals were segregated according to gender and were allowed to adjust to the new environment for 7 days before the study started. All rats were housed in plastic 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 given free access to standard rat chow and water ad libitum. Animals were handled and experiments carried out in conformity with the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA UFSM; Protocol 010/2014).

Acute toxicity study

The oral acute toxicity test was performed using the acute toxicity class method in accordance with the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guideline 423 adoption (OECD, 2001). According to Guidance OECD 423, these procedures were performed twice with the use of 3 animals of each gender category per step. The first group received only distilled water while the second group received 2000 mg/kg body weight of LDM crude extract freshly prepared in distilled water by gavage. The dose of 2000 mg/kg b.w. corresponds to the maximum dose recommended by the international protocol adopted (OECD, 2001).

Immediately after dosing, animals were observed 6 and 12 h after the treatment and every day for 14 days. The animals were observed continuously for mortality, physiological changes in behavior, eyes, fur and somatomotor activity. On day 14, the animals were euthanized and their vital organs were individually observed for overt pathology. 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 euthanized. 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), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) 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.

Sub-acute toxicity study

The determination of repeated dose 28-day oral toxicity was carried out according to OECD guideline 407 (OECD, 2008). Twenty (20) males and twenty (20) females were distributed in 4 groups of 5 animals each and the fraction was dissolved in water and administered by gavage daily once a day for 28 days. The rats were treated as follows:

Group I: control group with water;

Group II: treated with LDM 100 mg/kg;

Group III: treated with LDM 200 mg/kg;

Group IV: treated with LDM 400 mg/kg.

Animals were weighed every 2 days during the whole treated period. After a short fasting period of 8 h on day 29 of the study the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture. The blood samples were collected in two tubes: one with anticoagulant, EDTA, and the other without anticoagulant. Afterwards, the rats were euthanized and the kidney and liver were removed, dissected, and fixed in a 10% formalin solution.

2.6.1. Measurement of hematological and biochemical parameters in rats

Hematological analysis the blood collected with EDTA was analyzed immediately was performed using an automatic counter veterinary Mindray BC 2800. The parameters included: WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, lymphocyte, monocyte, neutrophil, basophil and eosinophil counts. For biochemical analysis, blood were centrifuged at 3000rpm for 10 min. Serum was separated for determination of GLU, BUN, CRE, AST and ALT activities, using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000).

2.6.2. Parameters of oxidative stress

2.6.2.1 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid (TBA) reaction method (Berton et al., 1998). In brief, samples of liver and kidney were mixed with TBA reagent consisting of 0.375% TBA and 15% trichloroacetic acid in 0.25-N hydrochloric acid. The reaction mixtures were placed in a boiling water bath for 30 min and centrifuged at 1811g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 nm. MDA, a measure of lipid peroxidation, was calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5/\text{M cm}$. The results were expressed as μM of MDA/mg protein.

2.6.2.2 Inhibition of protein oxidation (carbonyl assay)

The increase of protein carbonyls is a distinct symbol when protein oxidation happened. Here, protein carbonyls in liver and kidney microsome were detected by spectrophotometric measurement of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives ($\epsilon_{370 \text{ nm}} = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as described by Levine et al. (1990); since nitrotyrosine and hemin also absorb at 370 nm, their

spectral contribution was determined in samples not treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine and this value was subtracted from samples treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine. Total protein contents were determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

2.6.3 Antioxidant markers

2.6.3.1 Determination of catalase

Catalase activity was measured according to the method of Aebi (1984). One unit of catalase was defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μM of H_2O_2 in 1 min. The reaction was initiated by the addition of 1.0 ml of freshly prepared 20 mM H_2O_2 . The rate of decomposition of H_2O_2 was measured spectrophotometrically at 240 nm for 1 min. The enzyme activity was expressed as U/mg protein.

2.6.3.2 Estimation of superoxide dismutase (SOD)

The activity of SOD was measured according to the method of McCord (1994). For the determination of SOD activity, xanthine and xanthine oxidase were used to generate superoxide radicals reacting with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride to form a red formazan dye. SOD activity was then measured at 505 nm.

2.6.4 Genotoxicity

2.6.4.1 Comet assay

This alkaline assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) in accordance with the general guidelines for use of the comet assay. Were identified, selected and analysed 100 cells from liver and kidney. The cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analysed by triplicate and the data are present as mean \pm stand error.

2.6.4.2 Micronucleus test (MN)

The cells were fixed with acetic acid and methanol (75:25, v/v), transferred onto clean microscope slides in duplicates, and then stained with 5% Giemsa. The criteria for scoring cells with MN were described in a previous report (Thomas *et al.*, 2008). One thousand cells were counted for each sample, and the results were expressed as the micronucleus frequency per 1000 cells.

2.6.2 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.

Statistical analysis

The data are expressed as means \pm Standard Deviation (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 $p < 0.05$.

Results

HPLC qualitative and quantitative analysis

HPLC fingerprinting of LDM stem's bark revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 13.07$ min; peak 1), catechin ($t_R = 18.25$ min, peak 2), chlorogenic acid ($t_R = 22.71$ min; peak 3), epicatechin ($t_R = 32.19$ min; peak 4), vitexin ($t_R = 45.86$ min; peak 5), rosmarinic acid ($t_R = 48.21$ min; peak 6), rutin ($t_R = 51.03$ min; peak 7), quercetin ($t_R = 57.82$ min; peak 8) and luteolin ($t_R = 61.79$ min; peak 9) (Fig. 1 and Tab. 1).

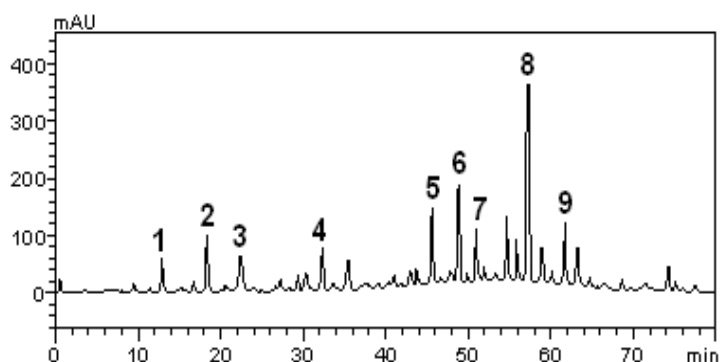


Figure 1- HPLC profile of LDM stem's barks. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), epicatechin (peak 4), vitexin (peak 5), rosmarinic acid (peak 6), rutin (peak 7), quercetin (peak 8) and luteolin (peak 9).

Table 1 - Phenolic composition of stem's bark crude extract from LDM.

Compounds	<i>Luehea divaricata</i>		LOD	LOQ
	mg/g	%	· g/mL	· g/mL
Gallic acid	4.71 ± 0.02 ^a	0.47	0.015	0.053
Catechin	7.62 ± 0.01 ^b	0.76	0.026	0.084
Chlorogenic acid	4.93 ± 0.01 ^a	0.49	0.009	0.031
Epicatechin	5.06 ± 0.02 ^a	0.50	0.018	0.059
Vitexin	10.17 ± 0.03 ^c	1.01	0.013	0.049
Rosmarinic acid	12.35 ± 0.01 ^d	1.23	0.032	0.105
Rutin	7.48 ± 0.02 ^b	0.74	0.010	0.034
Quercetin	23.91 ± 0.03 ^e	2.69	0.025	0.079
Luteolin	7.53 ± 0.01 ^b	0.75	0.007	0.023

Results are expressed as mean ± S.D. of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$. LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

Acute toxicity study

After the administration of 2000 mg/kg LDM in males and females rats, the crude extract showed no signs of morbidity and mortality throughout the test period. Was observed decreased food intake in both genders but without weight gain (Table 2). However, physiological changes in behavior, eyes, fur and somatomotor activity was not observed and all animal survived during the period of treatment. No death was recorded.

Table 2 - Effects of the acute administration of stem's bark crude extract of LDM on the food intake of male and female rats.

Sex	Parameters (g)	Control	2000 mg/kg
Male	Food intake	138.38 ± 14.67	123.69 ± 7.90 ^a
	Body weight	41.00 ± 14.42	36.25 ± 5.25
Female	Food intake	88.23 ± 5.54	61.07 ± 6.09 ^a
	Body weight	36.00 ± 10.95	25.66 ± 8.96

Data are expressed as mean ± S. D. One way ANOVA followed by Tukey test when appropriate. ^aDifferent from the control group.

In relation to the biochemical parameters was noted decreased GLU and increased AST in the male rats treated with the plant compared to the control group. In female rats, was observed increased AST in the treated animals (Table 3).

Hematological parameters that were evaluated, there was significant increase of PLT in both sexes (Table 4). The other values showed no significant change when compared to the control group in both sexes.

Table 3- Biochemical parameters analyzed in males and females rats after acute administration of crude extract from stem's bark of LDM

Sex	Biochemical Parameters	Study group	
		Control	2000 mg/kg
Male	GLU (mg/dL)	247.00 ± 4.35	214.13 ± 22.05 ^a
	BUN (mg/dL)	39.62 ± 5.66	39.33 ± 2.62
	CRE (mg/dL)	0.50 ± 0.08	0.42 ± 0.13
	AST (U/L)	71.00 ± 9.39	120.50 ± 21.63 ^a
	ALT (U/L)	25.18 ± 3.67	23.07 ± 2.83
Female	GLU (mg/dL)	194.33 ± 10.50	212.33 ± 18.45
	BUN (mg/dL)	39.97 ± 2.85	43.60 ± 3.79
	CRE (mg/dL)	0.54 ± 0.15	0.45 ± 0.13
	AST (U/L)	60.94 ± 5.65	77.60 ± 6.96 ^a
	ALT (U/L)	29.58 ± 7.63	33.95 ± 6.52

Data are expressed as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n=3). Blood sugar levels (GLU), blood urea nitrogen (BUN), blood creatinine levels (CRE), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0,05$.

Table 4- Effects of the acute treatment of LDM on erythrocytic parameters, platelets levels, white cells and differential leukocytes count in rats.

Sex	Hematological Parameters	Study group	
		Control	2000 mg/kg
Male	RBC (x10 ⁶ /uL)	8.33 ± 0.67	8.61 ± 0.49
	HBG (g/dL)	16.44 ± 1.40	17.05 ± 0.71
	HCT (%)	44.46 ± 3.94	47.02 ± 1.42
	MCV (fL)	53.64 ± 1.37	54.67 ± 2.12
	MCHC (g/dL)	36.78 ± 0.50	36.22 ± 0.70
	RDW (%)	12.32 ± 0.82	12.75 ± 0.48
	PLT (x10 ³ /uL)	1161.25 ± 65.27	1416.66 ± 114.45 ^a
	PT (g/dL)	8.08 ± 0.36	8.20 ± 0.36
	WBC (x10 ³ /uL)	11.20 ± 2.28	12.22 ± 2.71
	Lymphocytes (%)	74.75 ± 4.99	76.75 ± 5.19
	Neutrophils (%)	22.25 ± 4.64	17.00 ± 4.69
	Monocytes (%)	2.60 ± 1.94	4.00 ± 2.83
	Eosinophils (%)	0.60 ± 0.89	2.00 ± 1.82
	Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
Female	RBC (x10 ⁶ /uL)	8.24 ± 0.23	8.88 ± 0.51
	HBG (g/dL)	16.14 ± 0.36	16.90 ± 1.42
	HCT (%)	44.86 ± 3.94	48.10 ± 2.77
	MCV (fL)	54.46 ± 1.52	54.22 ± 1.38
	MCHC (g/dL)	35.94 ± 0.44	35.05 ± 0.84
	RDW (%)	13.78 ± 0.52	13.77 ± 1.18
	PLT (x10 ³ /uL)	1181.40 ± 82.94	1409.66 ± 116.10 ^a
	PT (g/dL)	8.92 ± 0.71	8.85 ± 0.19
	WBC (x10 ³ /uL)	11.02 ± 2.02	11.47 ± 1.52
	Lymphocytes (%)	76.80 ± 2.95	80.00 ± 4.32
	Neutrophils (%)	18.40 ± 4.98	15.25 ± 4.99
	Monocytes (%)	3.60 ± 2.40	3.75 ± 2.36
	Eosinophils (%)	1.00 ± 0.70	1.00 ± 1.41
	Basophils (%)	0.20 ± 0.44	0.25 ± 0.50

Data show as mean ± S.D. One way ANOVA followed by Tukey test (n=3). ^a Different from control group

Sub-acute toxicity study

When administered for 28 days, the stem's bark crude extract of LDM induce no significant changes in weight gain and food intake in both sexes compared to control. Results showed alteration in the biochemical parameters of males and females rats (Table 5). The glucose levels increased in males treated with 400mg/kg of the plant crude extract. The enzymes AST and ALT decreased ($p < 0.05$) in males treated with 200 and 400 mg/kg when compared with control group. Similarly, in females there was a increase of glucose levels and decrease AST activity in the groups treated with doses of 200 and 400 mg / kg of plant crude extract compared to the control. The ALT declined only in the group treated with highest dose. No change were noted in other biochemical parameters in both genres.

Table 5- Effects of oral sub-acute treatment with crude stem's bark extract of LDM in rats on biochemical parameters.

Sex	Biochemical parameters	Study group			
		Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Male	GLU (mg/dL)	294.00 ± 16.29	274.66 ± 15.75	285.87 ± 19.03	323.33 ± 11.03 ^a
	BUN (mg/dL)	40.17 ± 6.16	36.80 ± 5.64	40.46 ± 8.49	41.12 ± 7.65
	CRE (mg/dL)	0.98 ± 0.12	0.92 ± 0.19	0.95 ± 0.09	0.93 ± 0.11
	AST (U/L)	112.22 ± 13.83	97.12 ± 9.86	79.42 ± 10.43 ^a	85.20 ± 12.15 ^a
	ALT (U/L)	57.21 ± 10.30	56.20 ± 7.17	42.22 ± 5.76 ^a	46.14 ± 7.60 ^a
Female	GLU (mg/dL)	199.00 ± 10.14	201.50 ± 7.89	244.20 ± 12.19 ^a	242.50 ± 5.74 ^a
	BUN (mg/dL)	52.00 ± 2.94	51.25 ± 6.55	47.50 ± 1.29	46.25 ± 5.31
	CRE (mg/dL)	0.86 ± 0.11	0.78 ± 0.09	0.84 ± 0.12	0.79 ± 0.09
	AST (U/L)	110.66 ± 8.08	110.25 ± 6.70	91.00 ± 3.36 ^a	77.00 ± 5.71 ^a
	ALT (U/L)	46.25 ± 3.50	42.75 ± 3.50	47.80 ± 9.20	30.20 ± 7.12 ^a

Data are expressed as mean±S.D. One way ANOVA followed by Tukey test, when appropriate (n=5). Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$. ^aDifferent from the control.

No changes in hematological parameters of males and females rats were observed (data not shown).

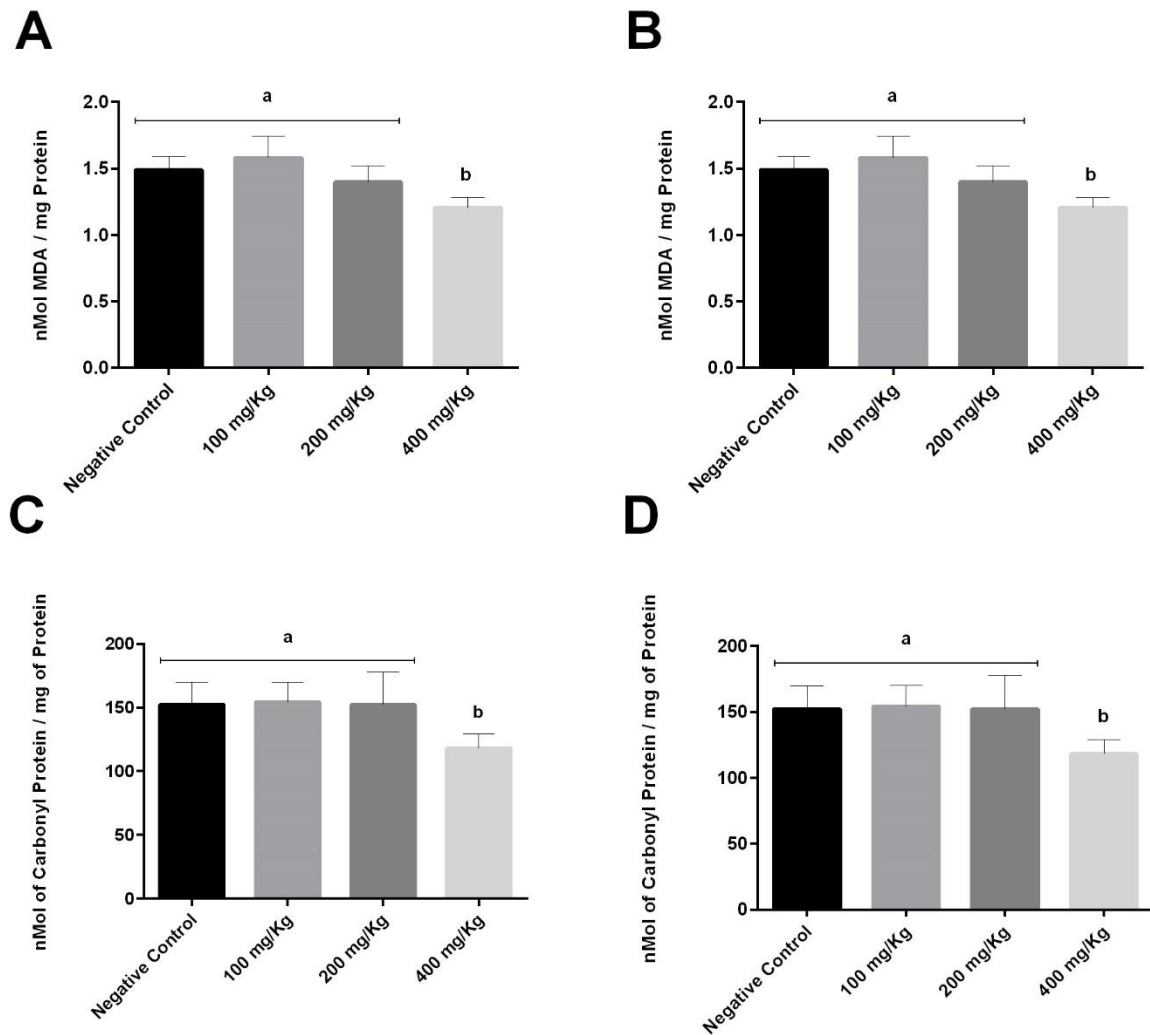


Figure 2- Effects oxidatives of 28-day oral administration of stem's bark crude extract of LDM. LPO effects in male (A) and female (B) kidney. Effects on carbonyl protein kidney of males (C) and females (D) rats. a-b Means with the difference

Lipid peroxidation and carbonyl assay in the kidney revealed significant differences between the group treated with the highest dose (400 mg/kg) of the extract in relation to other groups. These differences were observed in the kidneys of male and female rats (Fig.2).

Enzymes SOD and CAT activity remained unchanged in liver and kidney, with no significant difference between groups in males and females rats as well as the comet assay and micronucleus test (data not shown).

The hepatic histological analysis showed that in the control group, males presented the liver hepatocytes have well-organized and no vacuolation cords, that is normal. The groups

treated with 100 and 200 mg/kg of plant crude extract showed normal appearance, similar to the control. In males treated with 400 mg/kg was noted smaller and grouped hepatocytes when compared to the control. Moreover, it was noted expansion capillary sinusoids. In females, the group treated with 100 mg/kg showed normal appearance. The group treated with dose 200 mg/kg presented larger hepatocytes (megalocytosis) and the 400 mg/kg group showed increase in areas with foci of inflammatory cells around the centrelobular vein. Also it was seen disorganization hepatocyte cell swelling and intense (Fig. 3).

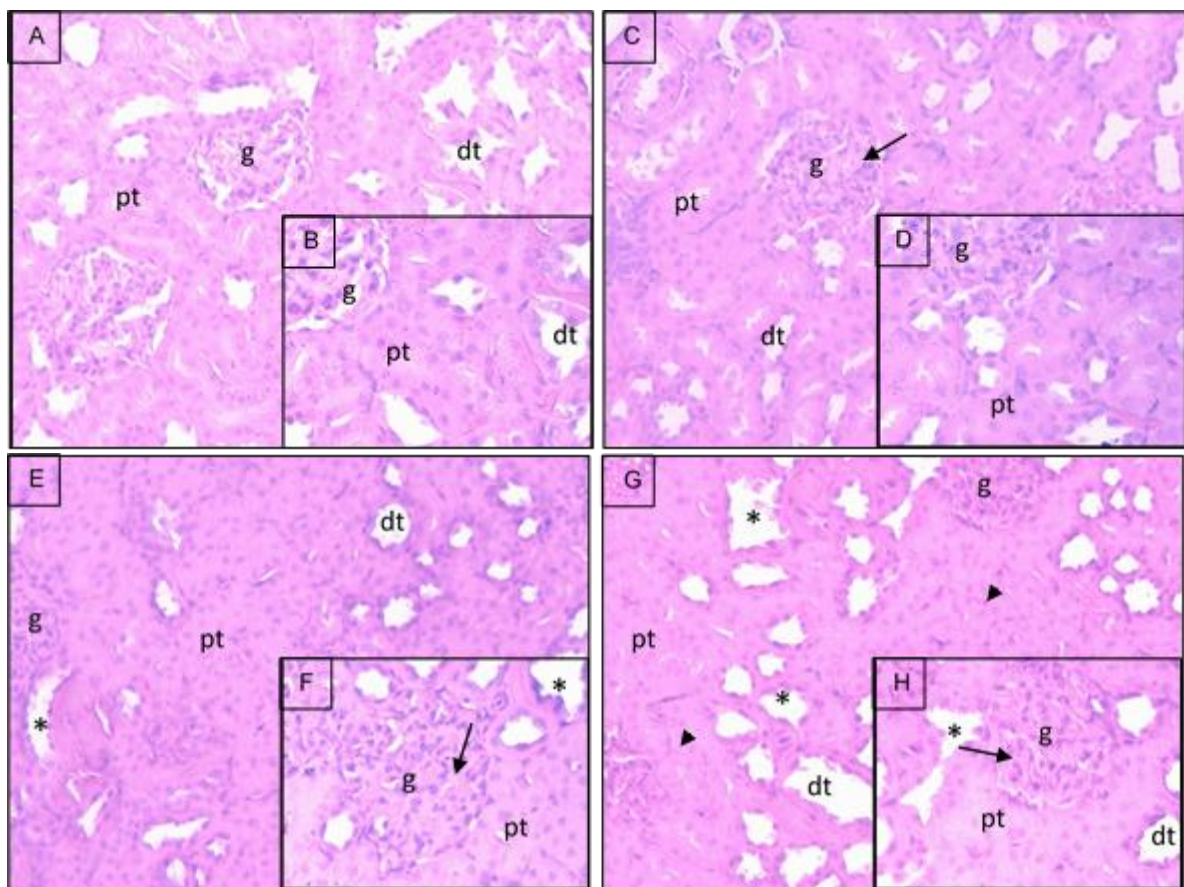


Figure 3 - Photomicrography of segment of kidney of female rats with a detail on the right of: A,B) Control kidney showing architecture normal glomeruli. Note the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules. C,D) 100mg/kg-treated group showed morphology of proximal tubules cells with normal appearance. E,F) 200mg/kg-treated group. Observe there are in some areas with tubular (*) and glomerular (arrow) dilation. E,F) 400mg/kg-treated group present tissue disintegration in the proximal and distal tubules (arrowhead) and glomerular dilation (arrow). pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Haematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively.

The males renal histological analysis showed normal aspect with large spaces and intense filtration glomerular vascularity and between the tubules in control group. Already in

the group treated with dose 100 mg/kg cell swelling was observed how in both the glomeruli and renal tubules in very interstitial vascularization. Presence of intense distal tubular dilatation. In male treated with dose 200 and 400 mg/kg presence of cell swelling in all regions of the cortical region of the kidney. The proximal and distal tubules shown to be united as well depending on the cell swelling. Intense dilation in the distal tubules and the glomeruli without distinction in the filtration space. Appearance worse than the dose of 100 mg/kg. In females renal histological analysis, the kidney presented normal aspect in control group. It was seen swelling and tubular glomerular filtration by the absence space and the distinction between the proximal and distal tubules in group treated with 100 mg/kg. Similarly it occurred in the group treated with dose 200 mg/kg, but more sharply. In 400 mg/kg group, renal morphology resembling the results of the dose 200 mg/kg, but higher in the distal tubules dilation, expansion in the glomerulus and tube swelling (Fig. 4).

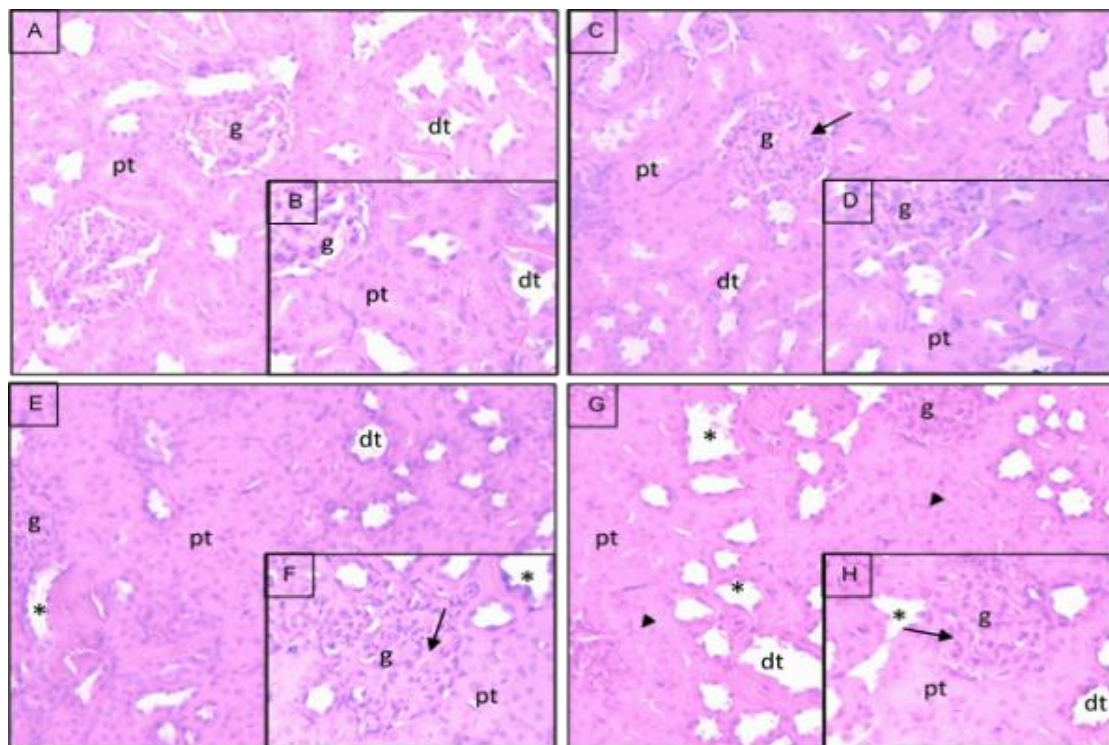


Figure 4- Photomicrography of segment of kidney of female rats with a detail on the right of: (A,B) Control kidney showing architecture normal glomeruli. Note the organization and morphology of the nucleus of the distal and proximal tubules. (C,D) 100mg/kg-treated group showed morphology of proximal tubules cells with normal appearance. (E,F) 200mg/kg-treated group. Observe there are in some areas with tubular (*) and glomerular (arrow) dilation. (G,H) 400mg/kg-treated group present tissue disintegration in the proximal and distal tubules (arrowhead) and glomerular dilation (arrow). pt, Proximal Tubule; dt, Distal Tubule; g, Glomerulus. Haematoxylin and eosin (H.E). 10x and 25x, respectively.

Discussion

It is false the concept that herbal drugs are safe and free from adverse effects. Although they are less frequent when compared with synthetic drugs, controlled studies confirm that these effects exist (Calixto, 2000). Based on this, acute and subacute toxicity studies assist in the investigation of effects and damage to the human body such plants.

In the present study, the crude extract of LDM stem's bark was analyzed by HPLC. The results reveal that the plant contains many compounds and the three main compound were quercetin (23.91 mg/g \pm 0.03), rosmarinic acid (12.35 mg/g \pm 0.01) and vitexin (10.17 mg/g \pm 0.03). These compounds have been found for the first time in the plant stem's bark. Quercetin is a flavonol present in most plants, fruits and vegetables. This compound has anti-inflammatory property, neuroprotective, anticarcinogenic, antioxidative, anti-aggregatory and vasodilating effects (Dajas, 2012; Erlund, 2004). Moreover, quercetin can inhibit the formation process of free-radical initiation when interacts with the superoxide ions, the formation of hydroxyl radicals by chelating iron ions and lipid peroxidation the peroxy radicals react with lipids (Behling et al., 2004). In addition to quercetin, this study showed the presence of vitexin in the extract. The presence of vitexin had already been evidenced by Tanaka et al. (2005) on plant leaves. Phenolic compounds have antioxidant activity and have been described to prevent cancer, heart and lung diseases (Scalbert et al., 2005). These compounds may be responsible for the antioxidant effects as reducing damage on the membrane and the proteins oxidation in the kidney.

Acute and subacute toxicity studies of a crude extract of the stem's barks from LDM was conducted to evaluate the safety of this widely used medicinal plant. In acute test, according to the oral acute class method used in this experiment, a single oral administration of 2000 mg/kg of the crude extract of LDM did not caused toxic symptoms, neither induced mortality. This suggests, according to the Globally Harmonisation System of Chemical Substances, that the LDM should be included in category 5 with LD₅₀ estimated between 2000-5000 mg/kg, and despite not be lethal to the rats it is considered moderately toxic. There were no differences in water consumption between the control group and the treatment group in males and females rats. However, there was decreased in food intake in both genres. This fact becomes relevant, since sporadic changes in food intake can happen (Xiang et al., 2015).

The biochemical evaluation showed significant reduction in GLU level of male rats group treated with a single oral dose of 2000 mg/kg. This effect may be related to the presence of compounds such as terpenoids, alkaloids and also flavonoids, such quercetin, gallic acid and rutin, which have activity insulinomimetic (Silva et al., 2014). Furthermore, the effect may be related to decreased food intake as decreasing the intake of carbohydrates, the blood glucose levels also decrease.

There are many enzymes, such as ALT and AST that are found in the serum, which originate from the cell fluid. Moreover, some of these enzymes can be found in serum originating from the rupture of cell membranes. Thus, the detection of such in serum biomolecules is a tool to assess toxicity (Huang, 2006). These transaminases are distributed by various organs, but have increased activity in the liver. The results showed increase in serum AST activity in males and females rats treated with 2000 mg/kg dose in relation of control group. This may be related to damage to liver tissue, but this result can not be interpreted in isolation since this enzyme is not present exclusively in the liver. (Silva et al., 2014).

Hematological evaluation, there was an increase in platelet counts in males and females. This result, although the average can not be considered a toxic effect, since the value is within the physiological range ($837-1455 \times 10^3/\text{mm}^3$) for *Wistar* rats (Oliveira et al., 2014).

In the sub-acute toxicity experiment, all groups of animals demonstrated normal behavior, no induced adverse effects or death during the treatment with different doses. No changes were observed in body weight and food intake between the groups. Relevant biochemical results were observed at the higher doses (200 and 400 mg/kg). Unlike what has been observed in the acute treatment, there was increase in the level of serum glucose in males and females treated with 200 and 400 mg/kg. This result may be related to changes observed in the kidney histology analysis, since glucose is filtered by glomeruli and it is reabsorbed fully active form by the renal tubules (Cersosimo, 2003). So, if the kidney is altered, filtration is impaired and blood sugar increases.

The transaminases AST and ALT are often used to reflect the degree hepatocyte damage, ALT is seen that the best indicator damage that AST (Zhu et al., 2014). ALT is restricted to cytoplasm, in the liver while AST is found in mitochondria and cytoplasm. Changes in these transaminases levels suggest liver disease (Ferreira et al., 2014). The repeated administration of the crude extract of stem bark of LDM for 28 days induced a significant decrease in AST and ALT in males than in females. A decrease of these transaminases activities

could suggest alteration of some hepatic biosynthesis functions, is compatible with the histological analysis of the liver. Besides, the difference in the profile of transaminases observed between males and females could be due to the hormonal variations, proposing that males are more susceptible than females (Florence et al., 2015).

The results of the comet assay and frequency of micronuclei showed no significant difference when compared to the control, which may enhance non-toxicity of the extract.

Joining the biochemical the histological results, the changes indicate mild liver and kidney damage, however slight. The liver of females is more inflammation compared to the control group and males, especially at a dose of 400 mg/kg. The kidneys of females presenting cell swelling and distal tubular dilatation discrete. Similarly, in males compared to the kidney, however in abnormal liver nothing was found. Suggests that the reduction of AST and ALT do not indicate toxicity. In addition, our study found changes in oxidative parameters that were similar in both sexes, which we suggest be standard.

Although the present histological changes in the liver and the kidney, no significant results in the investigation of genotoxicity, reduced AST and ALT enzymes and reduced proteins and membrane damage allows us to infer that the crude extract of LDM stem's bark is moderately toxic and has antioxidant capacity that can be justified by the presence of phenolic compound in its composition.

Conclusion

Our results showed that the LDM does not show significant toxicity when administered as a single dose can be conceptualized safe by the OECD and classified as category 5. However, when administered in different doses for 28 days showed effects on biochemical, histological and oxidative parameters, which need attention in long-term use of the plant as a medicament. Regardless of presenting these changes, the lack of significant results in other investigations as genotoxicity, antioxidants markers and oxidative stress markers shows that the crude extract of stem bark of LDM is moderately toxic and has good antioxidant capacity by the presence of quercetin, rosmarinic acid, vitexin and other phenolic compounds identified for the first time in its phytochemical composition. Further studies will be encouraged to clarify pharmacological and toxicological mechanisms.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro* L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 105 **Academic Press**, San Diego, pp. 121–126.
- Ateba, S. B., 2014. Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae) in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, 65, p. 27-32.
- Behling, E.B. et al., 2004. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v. 15, n.3, p. 285-292.
- Berton, T.R. et al., 1998. The effect of vitamin E acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis. **Mol. Carcinogen.**, 23 (1998), pp. 175–184 186 (1990), pp. 464–478.
- Boligon, A.A. et al., 2013 Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiol Plant**, 35, pp.2229-2239.
- Brasil, 2006. Ministry of health. The herbal medicine in the NHS and the Program of Medicinal Plants Research Drug Center. Brasília, DF.
- Brasil, 2010. ANVISA. Guide for the conduct of non-clinical safety studies required for drug development. Brasília, DF.
- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), **Braz J Med Biol Res** 33 (2).
- Cersosimo. E., 2004. A importância do rim na manutenção da omeostase da glucose: aspectos...**J. Bras. Nefrol.**, v. XXVI, n. 1, 2004.
- Colpo, E. et al., 2014. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, 30: 459-465.
- Dajas, F., 2012. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin, **Journal of Ethnopharmacology**, 143, p. 383-396.
- Erlund, I., 2004. Review of flavonoids quercetin, herperidin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, 24, p. 851-874.
- Florence et al., 2015. Acute and sub-acute toxicity of a lyophilised aqueous extract of the aerial part of *Spilanthes Africana* Delile in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 172, p. 145-154.
- Huang, X. J. et al., 2006. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and Alanine aminotransferase (ALT/GPT). Detection techniques. **Sensors**, 6, p. 756-782.
- Levine R.L. et al., 1990. Determination of carbonyl contents in oxidatively modified proteins **Methods Enzymol.**, 186, pp. 464-478.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193, p. 265–275.
- McCord, J.M., 1994. Mutant mice, Cu, Zn superoxide dismutase, and motor neuron degeneration. **Science**, 266, p. 1586–1587.
- Ndhkala, A.R et al., 2013. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. **Food and Chemical Toxicology**, 62, p. 609-621.

OECD, 2001. OECD Guidelines for testing of chemicals: Acute oral toxicity-Acute toxic class method. Test No. 423, adopted 22nd March 1996, and revised method adopted 17th December 2001. OECD, Paris.

OECD, 2008. Guideline for testing of chemicals: repeated dose 28-day oral toxicity in rodents. Test No. 407, adopted in 1981, and revised method adopted 3rd October 2008. OECD, Paris.

Oliveira, M. C. et al., 2014. Evaluation of toxicity of *Calophyllum brasiliense* stem bark extract by *in vivo* and *in vitro* assay. **Journal of Ethnopharmacology** 155, p. 30-38.

Scalbert, A. et al., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 45 (4), pp. 287-306.

Silva, A.R.H.; Moreira, L.R.; Brum, E.S.; Freitas, M.L.; Boligon, A.A.; Margareth, L.A., Roman, S.S.; Mazzanti, C.M.; Brandão, R., 2014 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** 153: 908-916.

Singh N.P. et al, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research** 175: 184-191.

Tanaka, J. C. A.; Vidotti, G. J.; Silva, C. C. da., 2003. A new tormentic acid derivate from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, n.3, p.475-478.

Tanaka, J. C. A.; Silva, C. C. da.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V.; Carvalho, J. E. de; Foglio, M. A., 2005. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Revista Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837.

Thomas P. et al., 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** 638: 37-47.

WHO, 2008. WHO Regional Publications, Western Pacific Series No. 23, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific Manila, 2008.

Wojcikowski, K., Johnson, D. W., Gobé, G., 2004. Medicinal herbal extracts - renal friend or foe? Part one: The toxicities of medicinal herbs, **Nephrology**, 9, 5, p.313-318.

Xiang, F. et al., 2015. Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of *Galla chinensis* solution. **Journal of Ethnopharmacology**, 162, p. 181-190.

Zacchino, S. et al., 1998 *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. **Phytomedicine**, v. 5, n. 5, p. 389-395.

Zhu, H. et al., 2014. Biochemical and histopathological effects of subchronic oral exposure of rats to a mixture of five toxic elements. **Food and Chemical Toxicology**, 71, pp. 166-175.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento acerca das plantas medicinais denota, na maioria das vezes, o único artifício terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Dessa maneira, a cultura medicinal estimula o interesse dos pesquisadores a fim de fomentar estudos na área fitoquímica e farmacológica (VEIGA, 2002)

Este estudo foi motivado devido à carência de relatos referentes à toxicidade oral de LDM e foi desenvolvido a fim de analisar e correlacionar componentes químicos presentes na planta à prováveis efeitos toxicológicos identificados. Visto que diversos estudos com a planta dão ênfase ao trabalho com as folhas, esta análise utilizou as cascas do caule para investigação da toxicidade.

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada no extrato bruto das cascas de LDM e apresentou três compostos presentes em boas quantidades: quercetina, vitexina e ácido rosmarínico. A quercetina é o principal flavonol presente na dieta e pode ser encontrada em frutas e vegetais. Atividades biológicas como antioxidante, anticarcinogênica, inibição da agregação plaquetária são atribuídas a este flavonoide (BEHLING et al., 2004; ERLUND, 2004). A vitexina, flavonoides C-heterosídeo, é encontrada principalmente nas folhas do maracujá (*Passiflora alata*). Atua no sistema nervoso central e possui atividades sedativas (EICH, 2011). Já o ácido rosmarínico é um éster dos ácidos caféico e 3,4-di-hidroxifenilático e é comumente encontrado no alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e na sálvia (*Salvia officinalis*). Apresenta atividade antisséptica, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (OLIVEIRA, 2010). É importante frisar que os metabólitos secundários atuam de forma sinérgica, o que faz com que o extrato bruto da planta possua maior efeito quando comparado com os compostos isolados.

Após quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nas cascas do caule da planta, iniciou-se a investigação da toxicidade oral do extrato bruto de LDM. Os estudos de toxicidade de plantas ainda são escassos e faz-se necessária apuração da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos pré-clínicos. Os estudos seguiram as diretrizes preconizadas pela OECD 423 e OECD 407 para avaliar a toxicidade aguda (14 dias) e aguda de dose repetida (28 dias).

O objetivo do estudo da toxicidade aguda foi examinar quais seriam os efeitos do extrato da planta no organismo por um curto intervalo de tempo, com administração de dose única e como o organismo se comportaria diante desses efeitos. Este estudo foi realizado com ratos *Wistar* machos e fêmeas, também com objetivo de verificar se há diferença nas respostas de ambos os sexos. Os grupos teste foram tratados com dose única de 2000 mg/kg de extrato, enquanto os grupos controle receberam somente água destilada. Os animais foram observados durante 14 dias quanto às mudanças comportamentais, ingestão de comida e peso corporal.

Ao longo do experimento não houve morte em nenhum grupo, sequer alterações comportamentais ou no peso corporal. Notou-se diminuição na ingestão de alimento em ambos os sexos, porém este dado não foi considerado relevante para o estudo, já que ocorreu em ambos os sexos e essas mudanças podem ocorrer de forma esporádica. A avaliação dos parâmetros bioquímicos revelou redução nos níveis de glicose no soro dos machos do grupo teste. Esse feito pode ser atribuído à presença de alguns compostos como os flavonoides, os quais possuem propriedades insulino-miméticas. A análise hematológica detectou aumento na concentração de plaquetas em ambos os sexos. Apesar do aumento demonstrar-se significativo, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014), está dentro do intervalo normal para ratos *Wistar*.

A inexistência de sinais de morbidade e mortalidade após tratamento oral agudo com o extrato bruto das cascas de LDM sugere segurança relativa da planta, quando administrada a curto prazo (BAFOR e IGBINUWEN, 2009).

Na toxicidade subaguda ou aguda de dose repetida, o extrato bruto das cascas da planta foi administrado em doses diferentes (100, 200 e 400 mg/kg) em machos e fêmeas, além do grupo controle, o qual foi tratado somente com água destilada. Cada grupo continha 5 animais de cada sexo, os quais receberam o extrato via oral por gavagem e foram acompanhados diariamente, por 28 dias. Nenhum sinal de mortalidade ou morbidade foi observado nos grupos, bem como alteração do peso ou ingestão de comida. Do contrário observado no tratamento agudo, machos e fêmeas tratados com a dose de 400 mg/kg apresentaram aumento significativo da glicose sérica em relação aos demais grupos, do mesmo modo que as fêmeas tratadas com 200 mg/kg. Além disso, as transaminases AST e ALT demonstraram diminuição significativa nos grupos teste de 400 mg/kg, em ambos os sexos. Particularmente, houve diminuição nos níveis da AST e ALT em machos e fêmeas do grupo 200 mg/kg e apenas a ALT diminuiu nas fêmeas tratadas com dose de 200 mg/kg.

Conectando esses resultados à análise histológica, pode-se inferir que maiores alterações ocorreram nas fêmeas, visto que apresentam processo inflamatório no fígado maior que nos machos e grupo controle, principalmente na dose de 400 mg/kg. Além disso, as fêmeas apresentaram tumefação celular e dilatação tubular distal discretas no rim, o mesmo aconteceu nos machos. Desta maneira, o aumento da glicose pode estar relacionado a alteração da função renal, visto que a absorção fica deficiente. As alterações nos níveis de AST e ALT provavelmente não indicam toxicidade e em conjunto com os resultados de genotoxicidade, estresse oxidativo e capacidade antioxidante corroboram a toxicidade moderada do extrato bruto das cascas da planta quando administrado na forma oral.

6 CONCLUSÃO

- O perfil cromatográfico de *Luehea divaricata* revelou presença dos compostos fenólicos vitexina, ácido rosmarínico e quercetina, encontrada em maior concentração;
- Na avaliação de toxicidade aguda do extrato bruto das cascas de *L. divaricata* não houve mortalidade ou mudanças comportamentais. Não houve alteração no peso dos animais e a diminuição na ingestão de comida foi considerada irrelevante. Assim, mesmo com alterações detectadas em alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos, o extrato foi classificado na categoria 5, com LD₅₀ entre 2000-5000 mg/kg, conforme o Guia OECD 423;
- No estudo de toxicidade subaguda, verificou-se aumento na glicemia de machos e fêmeas, relacionado à deficiência de absorção de glicose pelos rins. As enzimas AST e ALT diminuíram nos animais que foram tratados com as doses mais altas, sugerindo alterações na biossíntese hepática;
- Houve diminuição na lipoperoxidação e no dano nas proteínas, o que foi atribuído à presença de compostos fenólicos na composição fitoquímica da planta. Os marcadores antioxidantes SOD e catalase não foram alterados e não houve indícios de genotoxicidade nos ensaios realizados. Esses resultados unidos às análises histológicas o fígado e rins corroboram com não toxicidade da planta;

Assim, a partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que LDM pode ser segura, já que os resultados mostram alterações leves, não indicando toxicidade da planta para o organismo. Futuras investigações acerca da toxicidade crônica devem ser realizadas, a fim de traçar um perfil toxicológico de LDM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE, C.B. et al. **Plantas medicinais de uso popular**. Atlas farmacognóstico. Canoas, editora ULBRA – RS, 1995.

ALVES, I. M.; DANTAS, I. C; MELO, J. I. M. de; FELISMINO, D. C. A família Malvaceae *sensu lato* em uma área do agreste paraibano, nordeste do Brasil. **Revista de biologia e farmácia**, v. 06, n. 01, 2011.

ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. Herbal medicine education and the pharmacist. **Pharm. Journal**, n. 233, p. 303-305, 1985.

ARANTES, L. P. **Atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Luehea divaricata*** Mart. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, n. 12, p. 57-60, Mai. 2011.

AYRES, M. P.; CLAUSEN, T. P.; MACLEAN, S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P. B.; **Ecology**, 78, 1997.

AZEVEDO, M. A. M. de; VALENTE, M.C. Tilaceae da mata de encosta do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e arredores. **Arq. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, v.63, n.4, p.631-637, out./dez.2005.

BAFOR, E. E.; IGBNUWEN, O. Acute toxicity studies of the leaf extract of *Ficus exasperata* on haematological parameters, body weight and body temperature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 302-307, 2009.

BALBACH, A. As Plantas Curam. Editora Missionária, Itaquaquecetuba, 1993.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASTOS, M. G. **Biomarcadores de Função Renal na DRC**. E-Book Biomarcadores na nefrologia, 2011.

BEHERA, B. C. et al. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 776-784, 2008.

BEHLING, E. B. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres o os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIESKI, I. G. C. et al., Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

BIGHETTI, A. E. et al. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini. **Lecta**, v.22, n.1/2, p. 53-58, 2004.

BOLIGON, A. A. et al. Antioxidant activities of flavonol derivates from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6592 -6598, 2009.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiol Plant**. v. 35, p.2229-2239, 2013.

BORTOLUZZI, R.C.; WALKER, C.I.; MANFRON, M.P.; ZANETTI, G.D. Análise química qualitativa e morfo-histológica de *Luehea divaricata* Mart. **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Cuiabá – MG, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, DF, 2006.

BRASIL, ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, DF, 2010.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia Med.**, v. 45, n.4, p. 325-334, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agentes). **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 36, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, P. E. R. Circular técnica: Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*). **Embrapa Florestas**, Colombo, PR, out, 2008.

CARVALHO, J.E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Multiciência**, v. 7, p. 1-18, 2007.

CASTRO, D. L. L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil**: um enfoque qualitativo no Distrito Federal. 2006. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2006.

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

CEQUERA, A.; MENDÉZ M. C. G. L. Biomarcadores para fibrosis hepatica, avances, ventajas e desventajas. **Revista de Gastroenterologia de México**, v. 79, n.3, p. 187-199, 2014.

CERSOSIMO, E. A importância do rim na manutenção da omeostase da glucose: aspectos...**J. Bras. Nefrol.**, v. XXVI, nº 1, 2004.

COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, p.459-465, 2014.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 2. Drug interactions. **Adverse Drug react Toxicol Review**, V. 10, 147-162, 1993.

EICH, L. **Validação do doseamento do extrato seco de *Passiflora incarnata* 3,5% calculado como flavonoids totais expresso em vitexina por espectroscopia de absorção UV-Visível**. 2011. 42 f. Monografia. (Bacharelado em Química) – UNILASALLE, Canoas, 2011.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, n.177, 2014.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 854-874, 2004.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 43 (2): 211 – 8, 2009.

FERNANDES, P.C. **Etnofarmacologia como ferramenta para a educação ambiental**. Tese de doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas, São Paulo, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FIRMO et al., W. C. A. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.** v. 18, n. especial, 2011.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, U.M. Teste de Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 1, n. 3, p. 337-40, 2008.

GAD, S. C. Rodents model for toxicity testing and biomarkers. **Biomarkers in Toxicology**, Academic Press, p. 7-69, 2014.

GUPTA, S. Challenges and prospects for biomarker research: A current perspective from the developing world. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1844, p.899-908, 2014.

HALLIWELL, B. Use of desferrioxamine as a “probe” for iron-dependent formation of hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 229-233, 1985.

HALLIWELL, B.; WITHEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. Oxford, 2008.

HUANG, X. J. et al. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GLT) detection techniques. **Sensors**, v. 6, p. 756-782, 2006.

KIRSZTAKN, G.M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. **Jornal Brasileiro de Patologia Med.**, v.3, p.257-264, 2007.

KOHATZU, A.G.S; SHIMABUKURO, F.; GATTÁS, G.J.F. Utilização dos testes de mutagenicidade para avaliação da exposição ocupacional. **Rev. Saúde, Ética & Justiça**, v.12, n. ½, p. 15-21, 2007.

LIMA, A. P. **Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José dos Campos, 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacogn. Rev.**, v. 4, n. 8, p.118-126, 2010.

LOCK, E. A.; BONVENTRE, J. V. Biomarkes in translation: past, present and future. **Toxicology**, v. 245, p. 163-166, 2008.

LORENZI, H. E. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1988.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de anticianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, vol. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MASULLO, M. et al. Medicinal plants in the treatment of women's disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 189-211, 2015.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, vol. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAIS, J. A. **Toxicidade aguda e crônica do chá Ayahuasca (*Banisteriopsis caapi psycotria viridis*), por análise histológica em ratos *Wistar***. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MÜLLER, J. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas de *Luehea divaricata* Martius**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BASTIUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed., Atheneu: São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, K. B. **Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese**. 2010. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

OLIVEIRA, M. C. et al. **Evaluation of toxicity of *Calophyllum brasiliense* stem bark extract by *in vivo* and *in vitro* assays.** Journal of Ethnopharmacology, v. 155, p. 30-38, 2014.

OMS - WHO Regional Publications, Western Pacific Series No. 23, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific Manila, 2008.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, 1995.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 423. Acute oral toxicity – Acute toxic class method, 2001.

PAPETTI, A. Anti- and pro-oxidant activity of *Cichorium* genus vegetables and effect of thermal treatment in biological systems. **Food Chemistry**, v. 97, p. 157-165, 2006.

PIO, M. P. C. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Ministério da Agricultura: Desenvolvimento Florestal**, Rio de Janeiro, 1984.

PORT'S, P. S. et al., The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, p. 875-881, 2013.

PRÁ, D. et al. Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v.1, n.2, 2006.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul, 1988.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M., A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Ver. Esc. Enferm. USP** v.36, n.3, São Paulo, 2002.

ROSA, L.R. et al. Anti-inflammatory, analgesic and immunostimulatory effects of *Luehea divaricate* Mart. & Zucc (Malvaceae) bark. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 50, n.3, 2014.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n. 4, 2004.

SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2010.

SILVEIRA, L. M. S.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SILVEIRA, Y. L.; SILVEIRA, E. Plantas da medicina tradicional indígena Mbyá–Guarani utilizadas para patologias bucais. **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Resumos. Cuiabá, 2002.

SIQUEIRA, M. G. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini**. 2006. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica na área de Ciências Básicas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2006.

STICKEL, F., PATSENKER, E., SCHUPPAN, D. Herbal hepatotoxicity. **Journal of Hepatology**, v. 43, p. 901-910, 2005.

SODRÉ, F.L. et al. Avaliação da função e da lesão renal:um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia Med.**, v. 43, n.5, p.329-337, 2007.

SZULTKA, M. et al. Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 47, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed. 3. ed. São Paulo, 2006.

TANAKA, J. C. A.; VIDOTTI, G. J.; SILVA, C. C. da. A new tormentic acid derivate from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, n.3, p.475-478, 2003.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C. da.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E. de; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Revista Química Nova**, v.28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz. J. Pharm. Sci.** V. 42, n. 2, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação da toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VARGAS, V.M.F; GUIDOBONO, R.R.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of plants extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. 11, p. 67-70, 1991.

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

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa clima temperado**, Pelotas, 2010.

ZACCHINO, S. et al. *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. **Phytomedicine**, v.5, p. 389-395, 1998.

ANEXO A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade aguda e subaguda de *Luehea divaricata* Martius."

Número do Parecer: 010/2014

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dr.^a Liliane de Freitas Bauermann

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parciais ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 02/06/2014

Santa Maria, 02 de junho de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM