

Estudo toxicológico pré-clínico do produto fitoterápico Biotoss[®] em roedores

Pre-clinical toxicological study of phytomedicinal Biotoss[®] in rodents

Leandro Carraschi¹, Cristiane Zaupa¹, Joyce K. Tsuzuki², Maristela Gabriel², Tania M. A. Ushirobira¹, Edilson N. Kaneshima², José C. da Silva³, Luciene S. Akimoto² & Luis C. Marques^{1*}

RESUMO – Realizou-se o estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Biotoss[®] em camundongos e ratos. Os testes agudos não produziram mortalidade, com DL₅₀ acima de 5g/kg (oral) e 2,5g/kg (i.p.); encontrou-se diminuição significativa no peso dos rins dos camundongos tratados com a dose de 1,5g/kg (i.p.) e aumento do peso dos fígados na dose de 0,5g/kg (i.p.). No tratamento sub-agudo, não houve mortalidade nem alteração na evolução ponderal dos animais ou no peso dos seus órgãos. Os exames laboratoriais apontaram uma série de alterações, em geral não dose-dependentes e com valores dentro das faixas de normalidade. Na parte histopatológica, encontrou-se pequenas alterações, igualmente presentes em todos os grupos e sem relação estatística com o tratamento. Conclui-se que o produto Biotoss[®] apresenta baixa toxicidade em roedores.

PALAVRAS-CHAVE – toxicologia pré-clínica; Biotoss[®]; roedores.

SUMMARY – Biotoss[®] is a mixed phytomedicinal, with which took place the pré-clinical toxicological study. The acute tests didn't produce mortality, with DL₅₀ above 5g/kg (oral) and 2.5g/kg (i.p.); it was significant decrease in the kidneys weight of the mice treated with the dose of 1,5g/kg (i.p.) and increase of the livers weight in the dose of 0.5g/kg (i.p.). In the long-term treatment, there was not any case of death and any alteration in ponderal evolution of the animals nor in the organs weights. The laboratorial tests pointed a series of alterations, in general no dose-dependent and with values inside of the range of normality. In the histo-pathological part, it was small alterations, equally presents in all of the groups and without statistical relationship with the treatment. It is ended that the product Biotoss[®] presents low toxicity in mice and in rats.

KEYWORDS – Pré-clinical toxicology; Biotoss[®]; rodents.

INTRODUÇÃO

A edição das normas sobre medicamentos fitoterápicos (Portaria SVS nº 6 de 31.01.95; Resolução RDC nº 17 de 24.02.00 – Brasil, 1995; 2000) promoveu estímulos à pesquisa nacional com essa classe de produtos, muitos existentes há vários anos sem a necessária avaliação técnico-científica nos moldes aplicados a todos os tipos de medicamentos. Nesse contexto, alguns laboratórios nacionais de medicamentos fitoterápicos procuraram as Universidades mostrando-se interessados em se adequar às novas normas criadas para a comercialização deste tipo de medicamento. A empresa Bionatus Laboratório Botânico Ltda formalizou convênio de desenvolvimento científico e tecnológico com a Universidade Estadual de Maringá para estudos de alguns dos produtos fitoterápicos de sua linha (Resolução nº 036 de 14.01.1999 – CAD/UEM).

Este relatório apresenta os dados do estudo de toxicologia pré-clínica em roedores obtidos com o produto Biotoss[®]. Trata-se de um medicamento fitoterápico misto, composto de mel e tinturas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Bill), cumarú (*Torresea cearensis* Fr. All.), guaco (*Mikania glomerata* Spreng.), equinácea (*Echinacea angustifolia* DC), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), altéia (*Althaea officinalis* L.), malva (*Malva sylvestris* L.), agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.), óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) e extrato de própolis, apresentando-se como xarope e spray bucal. É indicado em

infecções das vias aéreas por apresentar em sua formulação plantas medicinais com atividade antisséptica, broncodilatadora, imunoestimulante e expectorante (Alonso, 1998); contém ainda própolis e mel, ingredientes que contribuem com as indicações terapêuticas atribuídas ao medicamento (Bankova et al., 1995; Bionatus, s.d.).

As atividades realizadas tiveram como objetivo o atendimento à Resolução ANVS nº 17/00 e obedeceram o roteiro de estudos toxicológicos expresso na Portaria SVS nº 116 (Brasil, 1996) e literatura científica da área.

MATERIAIS E MÉTODOS

O laboratório Bionatus preparou um lote de 50 litros do produto Biotoss[®] destinado à investigação toxicológica e as análises de controle de qualidade de cada matéria prima, preparação das formas extrativas intermediárias e a produção do lote seguiram os procedimentos operacionais e fórmula-padrão da empresa. O produto foi padronizado segundo técnicas farmacopêicas (Farmacopéia, 1988) nos seguintes aspectos: caracteres organolépticos; densidade (método do picnômetro); pH; graduação alcoólica (método da destilação); resíduo seco e determinação de açúcares totais (método Fenol-Sulfúrico - Dubois et al., 1956).

O produto foi concentrado em rotaevaporador, congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e acondicionado em frascos plásticos opacos em freezer.

Recebido em 26/1/2002

Universidade Estadual de Maringá (Pr) - ¹Departamento de Farmácia e Farmacologia - tels. (0xx44)261-4528/263-6245 - lmarques@teracom.com.br;

²Departamento de Análises Clínicas - tel. (0xx44) 261-4350 e 261-4490 - enkaneshima@uem.br; ³Departamento de Medicina - tel. (0xx44) 261-4401.

*Responsável pela publicação.

O liofilizado foi pesado e solubilizado toda manhã, imediatamente antes da administração, utilizando-se banho-maria com temperatura controlada a 40° Celsius.

Empregou-se camundongos albinos machos de linhagem Suíça (idade de 3-4 meses e pesando cerca de 30-35 gramas) para o teste agudo, e ratos machos e fêmeas Wistar (idade de 3-4 meses e pesando cerca de 200-300 gramas) para o teste subagudo, todos adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos em biotérios separados, em caixas de polipropileno com tampa metálica, em condições controladas de temperatura (22°C±2°), ciclo claro-escuro de 12 horas e disponibilizando-se ração e água (filtrada) à vontade.

A dose terapêutica do produto, sugerida pela empresa produtora, é de 110mg/kg (uma medida de 7,5mL, quatro vezes ao dia.). As doses escolhidas para o teste agudo partiram do valor máximo aceitável como representativo (2,5g/kg por via intraperitoneal e 5,0g/kg por via oral) para doses menores (Brito, 1997). Já as doses do teste subagudo foram estabelecidas na faixa de 5 e 15 vezes maior que a terapêutica, segundo recomendação do roteiro legal. Dessa forma, as doses definidas para os presentes experimentos foram as seguintes:

- a) para os testes agudos em camundongos:
 - doses de 5,0 e 2,5g/kg (via oral);
 - doses de 2,5; 1,5; 1,0 e 0,5g/kg (via i.p.)
- b) para o teste sub-agudo em ratos:
 - doses de 0,5 e 1,5g/kg administradas por via oral.

Teste agudo

Os camundongos machos de 3 meses de idade foram pesados, divididos em grupos e mantidos em caixas de polipropileno devidamente identificadas. Antes do tratamento, foram privados da alimentação por um período de 12 horas. No teste oral, dois grupos de animais receberam administração do medicamento e um grupo recebeu água, constituindo assim o grupo controle; o liofilizado foi solubilizado em água e administrado via oral através de cânulas de aço inoxidável (gavage). Para o teste intraperitoneal utilizou-se cinco grupos de 10 animais cada, sendo um deles o grupo controle, e a administração empregou agulhas descartáveis. Após a administração, os animais foram observados por algumas horas e então diariamente durante 14 dias. Determinou-se a evolução ponderal dos camundongos com pesagem no início, semanalmente e no final do experimento. Ao final desse período, todos os animais foram sacrificados com éter e os órgãos rins, coração e fígado foram retirados, pesados e avaliados quanto à anormalidades macroscópicas.

Teste sub-agudo

Os ratos machos e fêmeas foram divididos, por sexo, em um grupo controle e dois grupos experimentais com 15 animais cada, sendo mantidos em grupos de 5 em caixas de polipropileno identificadas. Cada animal recebeu diariamente administração de água ou do medicamento por via oral (gavage), usando-se uma cânula recurvada com ponta arredondada, nas doses de 0,5 e 1,5g/kg por 30 dias consecutivos. Os animais foram observados diariamente com relação ao seu comportamento geral nas caixas e pesados uma vez por semana. Pouco antes do final do tratamento, passou-se os animais no teste de campo aberto ("open-field") e realizou-

se a coleta de urina para exames físico, químico e de sedimentoscopia em gaiolas metabólicas de aço inoxidável. Ao final do período de tratamento, sacrificou-se os animais por decapitação, recolhendo-se imediatamente o sangue para análise hematológica e bioquímica. Coração, rins, fígado e pulmões foram removidos após o sacrifício, pesados e encaminhados para histopatologia.

O teste do campo aberto volta-se à avaliação de vários comportamentos usuais dos animais em ambiente estranho; interferências medicamentosas podem ser detectadas por alterações quali ou quantitativas desses comportamentos (Ghosal *et alii*, 1993). Empregou-se caixa de PVC com medidas de 60x45x35cm, no fundo da qual foram pintados 15 quadrados de 10x10cm. Ligou-se uma luz de 60 watts sobre a arena da caixa à altura de 50cm do piso. A sala ficou escura durante o experimento, onde cada animal era colocado centralmente no aparelho por 5 minutos cronometrados, anotando-se os vários comportamentos (ambulação, "rearing", auto-limpeza, número de bolos fecais e de micções).

Os procedimentos histopatológicos foram realizados conforme as técnicas de rotina descritas pela literatura (Beçak & Paulete, 1976; Schmitt, 1992; Volnei & Siqueira, 1979). Após a dissecação dos órgãos alvos, estes foram pesados, dissecados, seccionados e fixados em solução neutra de formalina a 10% (v/v) tamponada. Posteriormente, foram desidratados, diafanizados, emblocados em parafina para seção em micrótomo rotativo, corados através de coloração de rotina H.E. (hematoxilina e eosina) e avaliados em microscópio binocular. Ressalte-se que a coleta dos órgãos seguiu um protocolo numérico fechado, de modo que o preparo e observação das lâminas pelos patologistas ocorreu de forma cega, sem o conhecimento prévio de qual grupo estava sendo avaliado.

Os exames laboratoriais foram definidos pelo protocolo legal (Brasil, 1995): exames de urina (volume, cor, aspecto, depósito, pH, densidade, proteínas, cetonas, urobilinogênio, glicose, hemoglobina, nitrito, células epiteliais, leucócitos, hemácias, cristais, cilindros e filamentos de muco e bacterioscopia) e de sangue (hemograma, glicose, colesterol total, triglicérides, uréia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética, transaminase glutâmico pirúvica, proteínas totais, albumina, ácido úrico, amilase bilirrubinas direta, indireta e total e fosfatase alcalina). A coleta de sangue foi realizada em tubos com anticoagulante (para hemograma e glicose) e em tubos secos para separação do soro. O exame de urina parcial foi realizado através da utilização de tiras reativas (Multistix-Bayer Diagnósticos) e a bacterioscopia de urina através da coloração de Gram do sedimento obtido após centrifugação. As reações positivas nas tiras foram confirmadas com reações bioquímicas qualitativas. As dosagens bioquímicas foram realizadas com kits comerciais (Labtest; Bio-diagnóstica; Biosystems), através de reações enzimáticas-colorimétricas, colorimétricas ou cinéticas. O hemograma foi feito com contador automatizado (Cell Dyn-Abbott-Laboratories) e a contagem diferencial foi realizada após coloração do esfregaço com corante May Grunwald-Giemsa. Ressalte-se que, também no caso da coleta do sangue e realização dos testes laboratoriais, seguiu-se um protocolo numérico fechado de modo que o trabalho dos bioquímicos ocorreu de forma cega, sem o conhecimento

prévio de qual grupo estava sendo avaliado.

Em termos estatísticos, empregou-se a Análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias para os testes paramétricos com variáveis intervalares, seguida do teste de Duncan a posteriori. As frequências (dados não paramétricos) de ocorrências histopatológicas foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$ para todos os experimentos. Essas análises foram realizadas por software estatístico (Statistica⁶).

RESULTADOS

Padronização do medicamento

O fitoterápico Biotoss[®] apresenta as seguintes características organolépticas e físico-químicas: xarope castanho claro com forte odor de mel; pH de 3,88; densidade de 1,3474g/mL; teor alcoólico de 0,995g/mL; resíduo seco de 26% e teor em açúcares totais de 83,7g/100mL.

Teste agudo

O teste agudo em camundongos não produziu nenhuma mortalidade durante os 14 dias de observação. Dessa forma, não é possível determinar-se a DL_{50} , pois deve estar situada em doses superiores às utilizadas no presente experimento (5g/kg via oral e 2,5g/kg via i.p.). Nenhuma alteração comportamental foi observada durante o período e a evolução ponderal dos animais foi equivalente em todos os grupos, embora tenha sido verificado diminuição de peso dos grupos tratados via intra-peritoneal com Biotoss 1,5 e 2,5g/kg no período de 7 dias ($p=0,048$ e $0,051$ respectivamente). Essa diferença não mais se expressou na pesagem final em 14 dias ($p=0,067$ e $0,065$). Macroscopicamente, os órgãos avaliados observados após o sacrifício não apresentaram alterações.

Em relação ao peso dos órgãos, encontrou-se diminuição progressiva no peso dos rins dos camundongos, atingindo valor significativo no grupo tratado com a dose de 1,5g/kg pela via intra-peritoneal ($p=0,035$ – Fig. 1), embora a maior dose (2,5g/kg) não tenha promovido essa interferência. Outro ponto significativo foi o aumento do peso do fígado dos camundongos, embora apenas na dose de 0,5g/kg também da via intra-peritoneal ($p=0,057$). No teste de via oral, apenas encontrou-se tendência à diminuição do peso dos rins dos camundongos tratados com as duas doses do Biotoss[®] 2,5 e 5,0g/kg ($p=0,061$ e $0,072$). Todos esses dados constam da Tab. I.

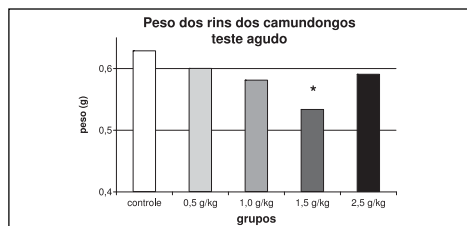


FIG. 1 - Diminuição progressiva no peso dos rins dos camundongos tratados agudamente (via i.p.) com água ou Biotoss[®].

TABELA I
Evolução ponderal e peso (em gramas) dos órgãos de camundongos tratados agudamente com água ou Biotoss

	Dose (g/kg)	N	Peso inicial	Peso 7 dias	Peso 14 dias	Coração	Rins	Fígado
	Controle	5	42,4 ± 2,9	NR	45,8 ± 5,2	0,28 ± 0,03	0,81 ± 0,09	3,09 ± 0,25
Via oral	2,5	10	41,0 ± 3,3	NR	42,6 ± 3,4	0,26 ± 0,03	0,71 ± 0,08	2,90 ± 0,39
	5,0	10	45,1 ± 3,6	NR	45,5 ± 3,7	0,27 ± 0,06	0,72 ± 0,14	2,95 ± 0,34
	Controle	10	35,9 ± 3,0	38,7 ± 4,0	40,1 ± 4,3	0,25 ± 0,07	0,64 ± 0,12	2,53 ± 0,39
	0,5	10	36,3 ± 3,6	38,0 ± 4,6	39,2 ± 4,7	0,26 ± 0,06	0,61 ± 0,09	2,83 ± 0,32*
Via i.p.	1,0	10	36,4 ± 3,7	38,0 ± 4,0	39,4 ± 3,8	0,25 ± 0,06	0,59 ± 0,11	2,62 ± 0,37
	1,5	10	33,5 ± 3,3	34,7 ± 3,5*	36,3 ± 3,6	0,25 ± 0,09	0,54 ± 0,08*	2,32 ± 0,27
	2,5	10	33,8 ± 2,0	34,9 ± 2,7*	36,2 ± 3,1	0,24 ± 0,05	0,60 ± 0,04	2,50 ± 0,26

*Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, $p \leq 0,05$ para o Teste de Duncan)
NR= não realizado

Teste sub-agudo

a) Mortalidade

Durante os trinta dias de administração a que foram submetidos os ratos machos e as fêmeas no tratamento sub-agudo com Biotoss[®] por via oral (doses de 0,5 e 1,5g/kg), não ocorreu nenhum caso de mortalidade dos animais, demonstrando-se a boa tolerância do produto nesse tempo de tratamento.

b) Evolução ponderal

A medição dos pesos dos ratos machos e fêmeas foi feita inicialmente e avaliada estatisticamente, de modo a que a montagem dos grupos não criasse diferenças nessa distribuição inicial (Anova não significativa). Novas medidas foram feitas com 7, 14 e 21 dias de tratamento e avaliadas em termos estatísticos, não tendo sido verificada nenhuma alteração na evolução ponderal dos animais nesse período (Tab. II).

c) Peso dos órgãos

A pesagem dos órgãos foi feita imediatamente após o sacrifício dos ratos machos e fêmeas, anotando-se os dados para o coração, rim direito e esquerdo, fígado e pulmões. A avaliação estatística não apontou nenhum dado discrepante em todos os pesos desses órgãos, apenas uma tendência ao aumento no peso dos pulmões das fêmeas tratadas com a dose de 0,5g/kg ($p=0,09$), que não se reproduziu na maior dose (1,5g/kg) e não ocorreu entre os ratos machos (Tab. III).

d) Dados do teste de Campo Aberto ("open-field")

No teste do "open-field" encontrou-se apenas alguma alteração na defecação, com diminuição no número de bolos fecais nas fêmeas tratadas com a

TABELA II
Evolução ponderal (em gramas) dos ratos machos e fêmeas tratados sub-agudamente com água ou Biotoss[®] (via oral)

	Dose (g/kg)	N	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
Machos	Controle	15	372,1 ± 49,7	390,7 ± 41,1	405,3 ± 38,4	413,1 ± 39,1
	0,5	15	362,0 ± 24,1	376,6 ± 33,8	393,2 ± 30,1	400,1 ± 30,5
	1,5	16	368,6 ± 42,8	366,9 ± 50,1	389,9 ± 49,3	396,7 ± 50,0
Fêmeas	Controle	16	239,3 ± 20,5	235,5 ± 18,8	243,2 ± 19,8	248,3 ± 19,8
	0,5	15	239,9 ± 13,4	238,1 ± 15,2	241,1 ± 15,0	245,8 ± 17,0
	1,5	15	242,7 ± 22,5	244,1 ± 19,8	247,4 ± 20,6	254,3 ± 21,7

Anova (duas vias): não significativa

dose de 0,5g/kg ($p=0,04$), diminuição que não ocorreu na maior dose e nem no grupo de ratos machos.

e) Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais realizados nos ratos machos e fêmeas apresentaram uma série de alterações estatísticas, principalmente nas fêmeas (14 ocorrências, contra 8 ocorrências nos ratos machos). Em geral, tais alterações não foram dose-dependentes e tampouco ocorreram de forma generalizada nos dois grupos de animais. Os resultados significativos constam das Tabs. IV e V.

f) Análise histopatológica

Realizou-se a avaliação histopatológica dos rins, fígado, coração e pulmões dos ratos machos e fêmeas controle e dos submetidos ao tratamento via oral por 30 dias com Biotoss® nas doses de 0,5 e 1,5g/kg. Encontrou-se uma série de pequenas alterações, as quais estão expressos na Tab. VI.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo faz parte do processo de revisão e adequação dos produtos fitoterápicos brasileiros, desencadeado pela edição das normas legais Portaria SVS nº 06 e Resolução RDC nº 17 (Brasil, 1995; 2000). Tal processo, bastante criticado por empresários e entidades do setor produtivo, faz-se necessário para que tenhamos medicamentos fitoterápicos efetivamente pesquisados e com total conhecimento da sua segurança e dos seus efeitos terapêuticos. O laboratório Bionatus, consciente dessa necessidade, financiou esta e outras pesquisas com produtos de sua linha, buscando trilhar o caminho completo da validação científica e demonstrando que tal processo é viável e acessível mesmo as pequenas indústrias nacionais.

A padronização farmacopéica realizada com o produto Biotoss® forneceu dados físico-químicos gerais, os quais podem ser úteis na verificação da reprodução das características dos lotes de produção.

O teste agudo com camundongos não promoveu mortalidade e não foi possível determinar-se a DL₅₀ com as doses máximas recomendadas pela literatura (Brito, 1997) e mesmo pela legislação (Brasil, 1995). O fitoterápico não promoveu alterações marcantes na evolução ponderal dos animais durante os 14 dias de teste e as duas modificações encontradas no peso dos órgãos (diminuição do peso dos rins – dose de 1,5g/kg; aumento do peso do fígado – dose 0,5g/kg), embora evidentes na interferência do desenvolvimento normal desses órgãos, ocorreram apenas na via intra-peritoneal e não tiveram reprodutibilidade nas outras doses.

Os dados obtidos com o teste sub-agudo também demonstraram ser o produto bastante tolerável ao organismo dos animais, pois durante os 30 dias de tratamento não ocorreu nenhum caso de mortalidade e nenhuma alteração na evolução ponderal dos ratos machos e fêmeas nem no peso dos seus órgãos após o sacrifício. O teste comportamental de campo aberto também demonstrou que o produto Biotoss não promove modificações naqueles comportamentos típicos dos animais. A única alteração (diminuição do número de bolos fecais nas fêmeas tratadas com a menor dose) é praticamente inex-

TABELA III
Peso dos órgãos (em gramas) dos ratos machos e fêmeas tratados sub-agudamente com água ou Biotoss® (via oral)

	Dose (g/kg)	N	Coração direito	Rim esquerdo	Rim	Fígado	Pulmões
Machos	Contr.	15	1,40 ± 0,11	1,28 ± 0,10	1,28 ± 0,10	14,3 ± 1,20	2,21 ± 0,41
	0,5	15	1,41 ± 0,13	1,23 ± 0,14	1,26 ± 0,14	14,6 ± 2,19	2,15 ± 0,24
	1,5	16	1,44 ± 0,16	1,28 ± 0,10	1,27 ± 0,10	14,6 ± 1,24	2,20 ± 0,34
Fêmeas	Contr.	16	0,98 ± 0,07	0,79 ± 0,09	0,78 ± 0,09	8,93 ± 1,25	1,66 ± 0,2
	0,5	15	1,00 ± 0,08	0,79 ± 0,07	0,78 ± 0,09	9,00 ± 0,87	1,80 ± 0,19
	1,5	15	1,00 ± 0,11	0,80 ± 0,12	0,77 ± 0,10	9,20 ± 1,09	1,76 ± 0,26

Anova (uma via): não significante

TABELA IV
Exames laboratoriais de urina e sangue com resultados significativos dos ratos machos tratados sub-agudamente com água ou Biotoss® via oral

Tipo de teste	Grupos		
	Contr. (N=15)	0,5g/kg (N=15)	1,5g/kg (N=16)
Volume urinário (mL)	3,2 ± 1,9 (N=4)	1,75 ± 0,96 (N=4)	6,8 ± 4,1* (N=4)
Glicemia (mg/dL)	50,8 ± 8,0	37,3 ± 15,4*	52,2 ± 10,7
Coolesterol total (mg/dL)	104,5 ± 13,4	136,5 ± 18,6*	120,2 ± 18,8*
Creatinina (mg/dL)	0,44 ± 0,12	0,51 ± 0,08*	0,46 ± 0,08
TGP (U/L)	71,5 ± 17,6	72,5 ± 15,9	86,1 ± 15,5*
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,38 ± 0,02	0,29 ± 0,10*	0,40 ± 0,02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,65 ± 0,06	0,74 ± 0,07*	0,76 ± 0,04*
Bilirrubina total (mg/dL)	1,04 ± 0,07	1,03 ± 0,10	1,16 ± 0,05*

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA $p<0,05$ – teste de Duncan)

TABELA V
Exames laboratoriais de sangue e resultados significativos dos ratos fêmeas tratados sub-agudamente com água ou Biotoss® via oral

Tipo de teste	Grupos		
	Contr. (N=16)	0,5g/kg (N=15)	1,5g/kg (N=16)
Eritrócitos (milhões/ml)	4,4 ± 0,4	5,9 ± 1,6*	4,7 ± 0,6
VGM (fL)	104,6 ± 11,0	84,0 ± 21,0*	92,7 ± 25,5
HGM (pg)	35,6 ± 3,2	28,5 ± 6,5*	34,7 ± 4,3
Linfócitos (%)	60,7 ± 5,5	68,7 ± 6,2*	66,0 ± 6,0*
Eosinófilos (%)	1,6 ± 0,6	1,5 ± 0,5	1,2 ± 0,4*
Segmentados (%)	35,7 ± 6,1	28,2 ± 6,3*	31,1 ± 6,3*
Coolesterol (mg/dL)	90,6 ± 14,9	97,4 ± 12,6	102,3 ± 15,0*
Ureia (mg/dL)	63,6 ± 4,1	58,9 ± 5,5*	59,6 ± 7,6
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,1	0,53 ± 0,07*	0,43 ± 0,1
Ácido úrico (mg/dL)	2,58 ± 0,41	2,75 ± 0,37	2,96 ± 0,52*
Fosfatase alcalina (U/L)	72,3 ± 14,1	59,8 ± 12,1*	69,5 ± 18,6
TGO (U/L)	105,1 ± 17,1	142,2 ± 47,2*	104,7 ± 31,9
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,40 ± 0,02*
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,66 ± 0,05	0,61 ± 0,03*	0,65 ± 0,0

*Estatisticamente diferente do grupo controle ($p<0,05$ – teste de Duncan)

TABELA VI
Resultados histopatológicos (frequência) dos órgãos rim, fígado, coração e pulmão de ratos machos e fêmeas tratados sub-agudamente com água ou Biotoss® via oral

Órgão	Grupos (g/kg)	N	Normal	Atrofia	Focos hemor.	Hemor. aguda	Autólise	Foco inflam.	
Machos	Rins	Controle	11	4	0	7	0	0	0
		0,5 g/kg	10	4	0	6	0	0	0
		1,5 g/kg	10	2	0	8	0	0	0
	Fígado	Controle	11	4	0	0	0	7	0
		0,5 g/kg	10	8	0	0	0	1*	1
		1,5 g/kg	10	6	0	0	0	3	1
	Coração	Controle	11	8	0	0	0	0	3
		0,5 g/kg	10	7	0	0	0	0	3
		1,5 g/kg	10	10	0	0	0	0	0
	Pulmão	Controle	3	0	0	0	3	0	0
		0,5 g/kg	3	0	0	0	3	0	0
		1,5 g/kg	3	0	0	0	3	0	0
Fêmeas	Rins	Controle	10	1	0	9	0	0	0
		0,5 g/kg	11	6	2	3*	0	0	0
		1,5 g/kg	10	8	0	2*	0	0	0
	Fígado	Controle	10	10	0	0	0	0	0
		0,5 g/kg	11	11	0	0	0	0	0
		1,5 g/kg	10	7	0	0	0	0	3
	Coração	Controle	10	10	0	0	0	0	0
		0,5 g/kg	11	10	0	0	0	0	1
		1,5 g/kg	10	9	0	0	0	0	1
	Pulmão	Controle	3	0	0	0	3	0	0
		0,5 g/kg	3	0	0	0	3	0	0
		1,5 g/kg	3	0	0	0	3	0	0

*Estatisticamente diferente do grupo controle ($p\leq 0,05$; Teste de Fisher)

pressiva, pois não se reproduziu na maior dose nem no grupo de ratos machos.

Quanto aos resultados dos exames laboratoriais, do conjunto de resultados com significância em termos estatísticos muito pouco parece relacionar-se com significância fisiológica. Essa avaliação decorre da falta de resultados dose-dependentes, da sua não reprodutibilidade em ambos os sexos e principalmente da contradição entre parâmetros bioquímicos relacionados à mesma função avaliada. Em outro aspecto, muitos dos valores destacados pela avaliação estatística encontram-se dentro de faixas de normalidade estabelecidas a animais (Lillie *et al.*, 1996; Wolford *et al.*, 1986).

Em termos da comparação entre parâmetros voltados à mesma função fisiológica, em termos renais há total falta de relação entre os parâmetros da uréia e creatinina. Enquanto ocorre aumento da creatinina nos machos e fêmeas tratados com a dose de 0,5g/kg, há ocorrência de valores normais de uréia nos machos e diminuição de uréia nas fêmeas tratadas com as duas doses de Biotoss. Já na função hepática, avaliada pelas transaminases, bilirrubinas e fosfatase alcalina, também encontram-se variações contraditórias. A TGO aumentou apenas nas fêmeas na dose menor, e a TGP aumentou apenas nos machos na dose maior; a bilirrubina direta diminuiu em machos e aumentou em fêmeas, a bilirrubina indireta mostrou-se da forma exatamente contrária (aumento em machos e diminuição em fêmeas) e a bilirrubina total apenas encontra-se aumentada estatisticamente em machos e apenas na maior dose. Também em termos de função hepática, os valores de albumina não tiveram alterações significativas em nenhum dos dois grupos de animais avaliados.

No aspecto de contradição entre dados estatísticos e faixas de normalidade, os dados significativos de aumento do colesterol total nos dois grupos de ratos (136,5 e 120,2 em machos e 102,3 em fêmeas) encontram-se dentro da esperada faixa de normalidade para roedores menores que 1 ano, cujos valores situam-se na faixa de $124 \pm 33,7$ e de $92 \pm 26,1$ para machos e fêmeas respectivamente (Wolford *et alii*, 1986). O mesmo pode ser relacionado aos valores obtidos com outros parâmetros, como fosfatase alcalina, uréia, creatinina e transaminases. Dessa forma, as variações encontradas parecem relacionar-se mais à variabilidade biológica dos animais de laboratório do que à manifestações toxicológicas do medicamento testado.

A ocorrência de aumento do número de eritrócitos acompanhado de alguns índices hematimétricos parece indicar um perfil de microcitose, porém ocorreu apenas na dose de 0,5g/kg, não se desenvolveu com a dose três vezes maior e igualmente não ocorreu com os ratos machos, indicando variabilidade biológica e não toxicológica. Os aumentos percentuais de linfócitos, eosinófilos e diminuição de neutrófilos encontram-se dentro de faixas normais de ocorrência desses parâmetros (Wolford *et alii*, 1986).

Em relação à avaliação histopatológica, boa parte das alterações encontradas provavelmente decorre do ato de sacrifício dos animais ou de problemas usuais de preparação histológica, visto que não apresentaram relação dose-resposta e ocorreram igualmente nos grupos tratados e controle. Os únicos valores com significância estatística encontram-se nos valores de ocorrência menor de focos hemorrá-

gicos nos rins das fêmeas tratadas com as duas doses de Biotoss® (p=0,02 e 0,006 respectivamente) e na menor ocorrência de autólise no fígado dos ratos machos tratados com a dose de 0,5g/kg (p=0,03). Esses dados podem indicar algum efeito positivo do medicamento, no sentido da promoção de uma maior proteção fisiológica contra alterações decorrentes de procedimentos agressivos a esses órgãos ou mesmo da atividade de sacrifício e coleta dos órgãos, que se manifestaram na ocorrência de manifestações histológicas nos grupos controle.

Segundo Beçak & Paulete (1976), a fixação é um processo que tem por finalidade conservar as células ou os tecidos no estado em que eles se encontravam *in vivo*. A boa fixação objetiva imobilizar a célula, conservando todas suas partes constituintes e não fazendo aparecer artificialmente novos detalhes de estrutura ou de relações entre os elementos que formam um tecido. Infelizmente, isso é impossível com as técnicas atuais. Em geral, uma atuação rápida e enérgica do fixador impede a produção de alterações espontâneas *post mortem* das células ou dos tecidos, mas modifica bastante as estruturas e relações. Os melhores fixadores de que se dispõe são aqueles que atuando rapidamente produzem menores modificações secundárias ou artificiais. Um fixador balanceado que cobre praticamente todas as necessidades para a histologia de rotina é o formol 10%, usado neste experimento. Apesar da utilização deste tipo de fixador, ainda assim ocorreu a formação da autólise, principalmente no fígado de vários animais. Esta autólise pode ter ocorrido devido ao fato do fígado ser um órgão rico em enzimas do tipo hidrolases que são responsáveis pelo processo de autólise (Pereira, 2000).

Já a hemorragia e os focos hemorrágicos encontrados em órgãos como pulmões e rins foram provavelmente decorrentes da ocorrência do tipo de sacrifício (decapitação) pois no momento da passagem da guilhotina pelo pescoço do animal cria-se uma força contrária ao fluxo sanguíneo causando uma congestão passiva que promove um aumento da pressão hidrostática no interior dos vasos, principalmente de capilares alveolares e glomerulares que se rompem com facilidade causando uma hemorragia do tipo aguda (Cotran *et al.*, 1996).

No caso dos focos inflamatórios encontrados nos fígados e corações, deve-se ressaltar que a estrutura histológica destes órgãos encontrava-se dentro do padrão de normalidade, tendo sido visualizados apenas um número reduzido de pequenos focos inflamatórios, provavelmente em função da homeostasia normal que visa a manutenção do equilíbrio do organismo frente a agentes agressores do meio ambiente (Pereira & Bogliolo, 2000). Dessa forma, a avaliação histopatológica não foi capaz de evidenciar alterações dose-resposta relacionadas ao tratamento dos animais com o produto Biotoss.

Portanto, com base no conjunto de dados anteriormente exposto, pode-se concluir que o medicamento Biotoss® apresenta baixa toxicidade em roedores tratados aguda e sub-agudamente por 30 dias pelas vias intra-peritoneal e oral, mesmo empregando-se doses cerca de 5 e 15 vezes maior do que a dose terapêutica empregada em humanos. Dessa forma, o produto qualifica-se para ser testado complementarmente em outras espécies animais não-roedores e posteriormente em humanos.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Laboratório Botânico Bionatus Ltda. pelo financiamento a esta pesquisa, bem como aos técnicos Admir Arantes, Nair Santa-rosa e Leucir Cassaro.

REFERÊNCIAS

1. Alonso, J.R. Tratado de fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas. Buenos Aires: Isis, 1998.
2. Bankova, V.; Christov, R.; Kujungiev, A.; Marcucci, M.C. & Popov, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. *Z. Naturforsch.*, v.50c: p.167-72, 1995.
3. Beçak, W.S. & Paulete, J. Técnicas de citologia e histopatologia. v1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
4. Bionatus Laboratório Botânico Ltda. Pesquisa, tecnologia: relatório técnico. São José do Rio Preto: s.ed., s.d.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 de 24.02.00. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 25.02.00.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 06 de 31.01.95. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, 06.02.95.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Vigilância Sanitária. Portaria nº 116 de 08.08.96. Publica proposta de norma para estudo da toxicidade e eficácia de produtos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 09.08.96.
8. Brito, A.S. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Unicamp, 1997.
9. Cotran, R.S.; Kumar, V. & Robbins, S.L. Robbins: patologia estrutural e funcional. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
10. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, 1956.
11. Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
12. Ghosal, S.; Lal, J.; Jaiswal, A.K. & Bhattacharya, S.K. Effects of shilajit and its active constituents on learning and memory in rats. *Phytotherapy Research*, v.7, n.1, p.29-34, 1993.
13. Lillie, L.E.; Temple, N.J. & Florence, L.Z. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Human & Experimental Toxicology*, v.15, nº 8, p612-6, 1996.
14. Pereira, F.E.L. Degenerações, morte celular e alterações do interstício. In: Brasileiro Filho, G.B. Patologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.38-69.
15. Pereira, F.E.L.; Bogliolo, L. Inflamações. In: Brasileiro Filho, G.B. Patologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.113-148.
16. Schmitt, F.C. Autópsias, biópsias e citopatologia: O que são e como são utilizadas. In: Montenegro, M.R. & Franco, M. Patologia: processos gerais. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 1992. p. 255-263.
17. Volnei, W.G. & Siqueira, W.C. Roteiro de I Curso Nacional de Histotecnologia. Brasília: Sociedade Brasileira de Histotecnologia, 1979.
18. Wolford, S. T.; Schroer, R. A.; Gohs, F. X.; Gallo, P.P.; Brodeck, M.; Falk, H. B. & Ruhren, R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v.18, p161-88, 1986.