



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SUZANA BARBOSA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA FARMACOLÓGICA NÃO-
CLÍNICA DAS GOTAS ARTHUR DE CARVALHO®: VALIDAÇÃO DO USO
MEDICINAL NOS DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS.**

FORTALEZA-CE

2015

SUZANA BARBOSA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA FARMACOLÓGICA NÃO-
CLÍNICA DAS GOTAS ARTHUR DE CARVALHO®: VALIDAÇÃO DO USO
MEDICINAL NOS DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal.

FORTALEZA

2015

SUZANA BARBOSA BEZERRA

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA FARMACOLÓGICA NÃO-
CLÍNICA DAS GOTAS ARTHUR DE CARVALHO®: VALIDAÇÃO DO USO
MEDICINAL NOS DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
(Universidade Federal do Ceará)

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
(Universidade Federal do Ceará)

Profa. Dra. Andrelina Noronha Coelho de Souza
(Universidade Estadual do Ceará)

Profa. Dra. Silvania Maria Mendes de Vasconcelos
(Universidade Federal do Ceará)

Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia
(Universidade Federal de Pernambuco)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- B469a Bezerra, Suzana Barbosa.
Avaliação da segurança e eficácia farmacológica não-clínica das gotas Arthur de Carvalho®: validação do uso medicinal nos distúrbios gastrintestinais./ Suzana Barbosa Bezerra. – 2015.
162 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Biologia para Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. Matricaria. 2. *Foeniculum vulgare*. 3. *Gentiana lutea*. 4. Fitoterapia. I. Título.

À Deus, minha família e amigos pelo
apoio em toda caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, pela acolhida em seu laboratório durante o doutorado, pela orientação, auxílio e apoio para a realização deste trabalho. Sua dedicação à pesquisa encanta e inspira todos que a procuram e que a tem como líder, e fazer parte do seu grupo é sempre de grande valia e aprendizado!

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos, pelo auxílio nos experimentos e por manter as portas abertas do LPN (com o auxílio do bolsista João Carlos Dantas) para que eu pudesse aprender os experimentos de atividade gastrointestinal.

À Profa Dra. Márcia Pitombeira, pela grande ajuda nas leituras das lâminas dos ensaios histopatológicos, além da recepção sempre com muita simpatia e alegria em poder ensinar.

À Profa Dra Romélia Pinheiro pelo auxílio nas análises hematológicas e à Profa Dra. Maria Goretti Queiroz pela ajuda nos ensaios bioquímicos, assim como a disponibilidade dos seus laboratórios e alunos que ajudaram na realização da avaliação toxicológica.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia (atualmente CEFAC): Natália Rocha, Elizama Silveira, Aline Holanda, Kalyane Ávila, Moisés Maia, Taiana Pierdoná, Raony Milet, por todos os anos de companheirismo. Momentos de trabalho, de estudo, de dedicação, de risadas, de finais de semana, de almoços, que com vocês, foi mais prazeroso. Tudo foi mais fácil por causa de vocês.

Àos amigos de Sobral: Patrícia Gomes, Patrícia Rodrigues, Carla Thisciane Pinto, Fernando Luiz, Tiago Melo, Francisco Artur, Kelly Sivocy, Rafaelly Pinheiro, Deuzilane Nunes, Ingrid Freire, Emanuelle Coelho por tanto amor, tanto crescimento e amadurecimento, pelo apoio e confiança sempre em mim depositados. Com vocês aprendi que trabalho e amizade se confundem sim e deixam a vida mais leve quando fazemos o que amamos todos os dias.

Aos amigos da Fametro: Rachel Pinho, Aline Albuquerque, Vanessa Fernandes, Taiana Pierdoná, Moisés Maia pela alegria do dia-a-dia e pela união e força no nosso trabalho, Amizades que também ultrapassam os dias da semana e que são fortalecidas a cada desafio e cada vitória.

À amiga Ticiano Praciano, a minha “dupla”, que desde a graduação participa ativamente da minha vida, tanto nos corredores da faculdade e do mundo! Obrigada por ser tão presente e tão importante para mim e que os nossos caminhos continuem se cruzando, com mais vitórias, conquistas e felicidades em todos os sentidos!

À amiga Andrea Bessa e Sandra Araruna, que também dividem as dificuldades de vida de doutorado e as alegrias da vida! Obrigada por serem tão boas ouvintes e conselheiras.

À amiga Elfie Figueiredo, que virou farmacêutica “de tabela”, com tantos farmacêuticos ao redor, aprendeu tudo sobre pós-graduação, doutorado, metodologias, qualificação, artigo, qualis... Brincadeiras à parte, sou muito grata pela sua presença na minha vida, assim como de toda sua família, porque ombro e colo sei que você sempre tem a oferecer nos momentos difíceis e que torce como ninguém pela minha felicidade. Obrigada!

Ào amigo Tiago Olinda, que desde a graduação me acompanha, me apoia e caminha do meu lado para a realização profissional. Não só esse trabalho é dedicado à você, mas todos os nossos momentos juntos (seja em Fortaleza, Sobral, Granada, ou qualquer lugar do mundo) fazem que eu seja feliz pela sua presença na minha vida.

Às amigas cocotas, especialmente Ana Michele, Milena Amaral, Rachel Melo que fizeram parte de grandes momentos da minha vida e que me ensinaram a importância dos chás para celebrar os grandes momentos de amor e amizade.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Raimundinha, que tanto auxiliou e zelou por nós, alunos do Doutorado, para que a estrada do título fosse cada vez mais leve.

À minha família: mãe, pai, irmã, irmão, cunhada e sobrinho. Agradecer a quem devo pelo que sou hoje é uma tarefa difícil e sempre faltarão palavras que sejam justas para alcançar

todo o sentimento. Essa conquista é de todos nós, assim como todas as nossas conquistas pessoais e profissionais que nos fazem família.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar).

RESUMO

O fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho® produzido a partir das tinturas de *Matricaria recutita* (camomila), *Gentiana lutea* (genciana) e *Foeniculum vulgare* (funcho), possui como indicação o uso como anti-espasmódico e estomáquico e, apesar de estar no mercado a mais de 70 anos, não possui ainda estudos científicos que comprovem a sua qualidade, estabilidade, segurança e eficácia terapêutica nas desordens gastrointestinais. O presente trabalho tem como principal objetivo validar o uso do fitoterápico nas desordens gastrintestinais, determinando a segurança e eficácia do produto padronizado, para atender as exigências da ANVISA e assim, contribuir para a renovação de registro do produto. Foram então realizados os testes de toxicidade pré-clínica (toxicidade aguda e de doses repetidas) em roedores, citotoxicidade em neutrófilos humano e células HepG2 e avaliação da atividade farmacológica do fitoterápico para desordens gastrintestinais. Inicialmente, fitoterápico foi padronizado quanto ao teor de marcadores ativos (apigenina 7-glucosídeo, gentiopicrosídeo e anetol) determinados pelo emprego de método analítico validado - RE 899 (BRASIL, 2003) com auxílio de sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD). Nas avaliações toxicológicas *in vitro* (cultura de neutrófilos e células HepG2) investigada pela determinação da atividade da lactato desidrogenase e/ou teste do MTT, o fitoterápico GAC (10-200 µg/mL) não mostrou-se citotóxico. Prosseguindo os estudos de toxicidade em roedores, a estimativa da DL50 do produto foi acima de 2g/kg, quando administrado por via oral. Ademais, estudo de toxicidade de dose repetida (250-1000 mg/Kg, v.o.) em ratos ratificou a baixa toxicidade do produto através de avaliações bioquímica, hematológica e histopatológica. Na avaliação farmacológica, o fitoterápico GAC (100 – 400 mg/Kg, v.o.) mostrou potencial antidispéptico, reduziu o trânsito intestinal induzido por betanecol, além do efeito laxativo. Ainda, o fitoterápico apresentou efeito antinociceptivo no modelo de dor visceral induzido pelo óleo de mostarda em camundongos, tanto nos sistemas opióide e adrenérgico, além dos canais de potássio, que parecem possuir um papel importante nessa ação, que não está relacionada a um possível efeito central, como sedação ou diminuição da atividade motora. Por fim, o fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho mostrou um padrão de segurança que ratifica o seu emprego como medicamento, além do seu potencial no tratamento de desordens gastrointestinal, destacando suas atividades anti-dispéptica e antinociceptiva/dor visceral. Contudo, estudos adicionais são ainda necessários relacionados especialmente à determinação mais

aprofundada do mecanismo de ação farmacológico, bem como a realização de estudos clínicos, vislumbrando seu registro como fitoterápico no país. Ainda, destaca-se a importância do presente estudo que envolveu parceria universidade-empresa/Indústria Farmacêutica, o que tornou o trabalho algo concretamente aplicada às necessidades sociais e econômicas da região.

Palavras-chave: *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare*, *Gentiana lutea*, toxicidade pré-clínica, desordens gastrintestinais.

ABSTRACT

The herbal medicine Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) produced from *Matricaria recutita* (chamomile), *Gentiana lutea* (gentian) and *Foeniculum vulgare* (fennel) tinctures, has indication use as antispasmodic and stomachic, and despite being on the market more than 70 years, does not have scientific studies proving its quality, stability, safety and therapeutic efficacy in gastrointestinal disorders. This study aims to validate the use of GAC in functional gastrointestinal disorders, determining the safety and efficacy of product, to meet the requirements of ANVISA and thus, contribute to the product registration renovation. First, were carried out the preclinical toxicity test (acute and repeated-doses toxicity) in rodents, cytotoxicity on human neutrophils and HepG2 cells and evaluation of the pharmacological activity of the herbal medicine to treat gastrointestinal disorders. Initially, the herbal medicine was standardized on the content of active markers (7-glucosídeo apigenin, gentiopicosídeo and anethole) determined by the use of validated analytical method - RE 899 (BRAZIL, 2003) with the aid of Liquid Chromatography System with High Efficiency array detector diiodo (HPLC-DAD). *In vitro* toxicological evaluations (culture neutrophils and HepG2 cells) was investigated the determination of lactate dehydrogenase activity and / or the MTT test, and GAC (10-200 ug / ml) was shown to be not cytotoxic. Continuing toxicity studies in rodents, the estimated LD50 of the product was above 2 g / kg when administered orally. Moreover, in repeated-doses toxicity study (250-1000 mg / kg, p.o.) in rats confirmed the low toxicity of the product through biochemical, haematological and histopathological evaluations. In pharmacological evaluation, the herbal GAC (100 - 400 mg / kg, p.o.) showed activity on dyspepsia, demonstrated by reduction of intestinal transit induced by bethanechol, besides the laxative effect. Moreover, the antinociceptive effect of GAC founded in visceral pain model induced by mustard oil in mice where both opioid and adrenergic systems, in addition to potassium channels appear to have an important role in action, which is not related to a possible central effect, because sedation or decreased motor activity was not observed. Finally, the herbal medicine Arthur de Carvalho showed a safety standard which confirms its use as medicine, in addition to its potential in the treatment of gastrointestinal disorders, proving its antinociceptive activities / visceral pain and role in dyspepsia. However, further studies are still needed, especially related to determine the pharmacological mechanism of action as well as clinical studies, seeking registration as herbal medicine in Brazil. Also, is important valorize the importance of

this study of university-industry partnership / Pharmaceutical Industry, which made work something concretely applied to social and economic needs of the region.

Key words: *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare*, *Gentiana lutea*, preclinical toxicity, gastrointestinais disorders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do eixo “cérebro-intestino”	23
Figura 2 -	Visão geral do circuito nociceptivo e local de ação das principais classes de fármacos analgésicos .	28
Figura 3 -	Anúncio de propaganda das Gotas Arthur de Carvalho® e embalagem original.	36
Figura 4 -	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	37
Figura 5 -	Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial da camomila	38
Figura 6 -	<i>Gentiana lutea</i>	41
Figura 7 -	<i>Foeniculum vulgare</i>	42
Figura 8 -	Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de <i>Foeniculum vulgare</i>	44
Figura 9 -	Cromatograma do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho obtido por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	56
Figura 10 -	Cromatogramas dos padrões APG (A), GTP (B) e ANT/EST (C) presentes no fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho obtido por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	57
Figura 11 -	Estrutura química dos marcadores do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho: Apigenina-7-glicosídeo (A), Gentiopicrosídeo (B) e Anetol (C).	58
Figura 12 -	Evolução ponderal de camundongos submetidos à avaliação da toxicidade aguda do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho (GAC).	73
Figura 13 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho na evolução ponderal de ratos submetidas ao tratamento diário com GAC durante 30 dias.	82
Figura 14 -	Fotomicrografias dos principais órgãos (coração, estômago) dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade oral de doses repetidas-30 dias de Gotas Arthur de Carvalho.	88
Figura 15 -	Fotomicrografias dos principais órgãos (rins e fígado) dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade oral de doses repetidas - 30 dias de Gotas Arthur de Carvalho.	89

Figura 16 - Fotomicrografias do fígado dos ratos submetidos ao ensaio de toxicidade oral de doses repetidas - 30 dias com as Gotas Arthur de Carvalho.	90
Figura 17 - Avaliação da toxicidade das GAC em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH).	92
Figura 18 - Efeito das GAC sobre a citotoxicidade em neutrófilos humano determinada através do teste de MTT.	93
Figura 19 - Efeito das GAC sobre a citotoxicidade em células Hep-G2 determinada através do teste de MTT.	95
Figura 20 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o trânsito intestinal normal em camundongos.	97
Figura 21- Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o trânsito intestinal induzindo por betanecol em camundongos.	99
Figura 22 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o volume e acidez gástrica em animais com ligadura pilórica.	101
Figura 23 - Efeito antinociceptivo das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.	103
Figura 24 - Efeito do envolvimento dos receptores opióides no mecanismo de ação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.	105
Figura 25 - Estudo do envolvimento dos receptores adrenérgicos no mecanismo de ação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.	107
Figura 26- Estudo do envolvimento dos canais de K ⁺ no mecanismo de ação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.	109
Figura 27 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o consumo de ração de caulim e ração padrão em ratos no modelo de dispepsia induzida por cisplatina.	113

Figura 28 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a variação de peso dos ratos no modelo de dispepsia induzida por cisplatina durante 5 semanas.	115
Figura 29 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o conteúdo gástrico em ratos no modelo de dispepsia induzida por cisplatina.	117
Figura 30 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a quantidade de fezes eliminadas pelos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.	1119
Figura 31 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a perda de peso corporal dos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.	120
Figura 32 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) sobre a quantidade de fezes eliminadas (g) por peso de quilo corpóreo dos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho.....	34
Tabela 2 -	Teor de marcadores químicos (apigenina-7-glicosídeo, gentiopicrosídeo e anetol/estragol no fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho por CLAE-DAD.	58
Tabela 3-	Sinais observados na toxicidade aguda em camundongos após a administração oral de Gotas Arthur de Carvalho.....	72
Tabela 4 -	Efeitos das Gotas Arthur de Carvalho sobre parâmetros bioquímicos de camundongos de ambos os sexos na toxicidade aguda com as Gotas Arthur de Carvalho®.	74
Tabela 5 -	Efeitos das Gotas Arthur de Carvalho sobre parâmetros hematológicos de camundongos de ambos os sexos na toxicidade aguda com as Gotas Arthur de Carvalho®.....	75
Tabela 6 -	Efeitos das Gotas Arthur de Carvalho sobre parâmetros bioquímicos de ratos após serem submetidos ao tratamento diário com as Gotas Arthur de Carvalho® durante 30 dias.....	80
Tabela 7 -	Efeitos das GAC® sobre parâmetros hematológicos de ratos após tratamento diário durante 30 dias.....	84
Tabela 8 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) sobre o trânsito intestinal normal de camundongos.....	96
Tabela 9 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) sobre o trânsito intestinal induzido por betanecol em camundongos.....	98
Tabela 10 -	Efeito das GAC sobre o volume secretório e acidez gástrica em ratos.	100
Tabela 11 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.....	102
Tabela 12 -	Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva das Gotas Arthur de Carvalho e morfina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.....	104
Tabela 13 -	Efeito da ioimbina na atividade antinociceptiva das Gotas Arthur de Carvalho e clonidina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.....	107

Tabela 14 -	Efeito da glibenclamida na atividade antinociceptiva das Gotas Arthur de Carvalho e diazóxido no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.....	108
Tabela 15 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho no comportamento dos camundongos no teste do campo aberto.....	110
Tabela 16 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a quantidade de ração padrão e caulim oferecidos aos animais no ensaio da dispepsia.	112
Tabela 17 -	Variação do peso dos animais na avaliação das Gotas Arthur de Carvalho na dispepsia induzida por cisplatina.....	114
Tabela 18 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® no conteúdo gástrico de ratos na avaliação da dispepsia.	116
Tabela 19 -	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Desordens gastrointestinais.....	20
1.2	Nociceção e dor visceral.....	24
1.3	Plantas medicinais como fonte de substâncias biologicamente ativas.....	29
1.4	Fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho®.....	32
1.4.1	Levantamento bibliográfico das espécies vegetais que compõem o fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho®.....	35
1.4.1.1	<i>Matricaria recutita</i> - Asteraceae.....	35
1.4.1.2	<i>Gentiana lutea</i> - Gentianaceae	40
1.4.1.3	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill- Umbelliferae (Apiaceae).....	41
1.5	Toxicidade não clínica.....	44
1.6	Legislação de Fitoterápicos.....	48
2	JUSTIFICATIVA.....	53
3	OBJETIVOS.....	54
3.1	Objetivo Geral.....	54
3.2	Objetivos Específicos	54
4	MATERAIS E MÉTODOS.....	55
4.1	Aspectos éticos.....	55
4.2	Material de estudo.....	55
4.2.1	Método dos sólidos totais.....	55
4.2.2	Perfil cromatográfico das Gotas Arthur de Carvalho por CLAE-DAD	56
4.3	Produtos químicos.....	59
4.4	Animais.....	59
4.5	Estudo toxicológico do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho®	59
4.5.1	Toxicidade aguda das GAC em camundongos.....	60
4.5.2.	Toxicidade de doses repetidas das GAC em ratos.....	60
4.5.3	Avaliação da citotoxicidade das GAC® em neutrófilo humano: teste do LDH e MTT.....	62
4.5.3.1	Obtenção dos neutrófilos humano.....	62
4.6	Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho no sistema gastrointestinal.....	64

4.6.1	Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® na motilidade gastrointestinal normal em camundongos.....	64
4.6.2	Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre o trânsito gastrointestinal induzido por betanecol em camundongos.....	65
4.6.3	Avaliações do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre o volume secretório e acidez gástrica total em ratos com ligadura pilórica.....	66
4.6.4	Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® no modelo animal de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda.....	66
4.6.4.1	Estudos do envolvimento do sistema opióide.....	67
4.6.4.2	Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico	67
4.6.4.3	Estudo do envolvimento dos canais de K+.....	67
4.6.5	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho na avaliação da atividade motora: teste do campo aberto	68
4.6.6	Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho no modelo animal de dispepsia.....	68
4.6.7	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a diarreia induzida por óleo de rícino	69
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS.....	71
5.1	Avaliação da toxicidade das Gotas Artur de Carvalho em roedores.....	71
5.1.1	Toxicidade aguda em camundongos.....	71
5.1.1.1	Observação clínica.....	71
5.1.1.2	Desenvolvimento ponderal dos animais	73
5.1.1.3	Parâmetros bioquímicos e hematológicos	74
5.1.2	Toxicidade de doses repetidas das Gotas Arthur de Carvalho em ratos	79
5.1.2.1	Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	79
5.1.3	Análise histopatológica.....	88
5.2	Avaliação citotóxica das Gotas Arthur de Carvalho.....	92
5.2.1	Teste do MTT e LDH em neutrófilo humano.....	92
5.2.2	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a avaliação da citotoxicidade em células HepG2: teste MTT.	95

5.3	Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho no sistema gastrointestinal.....	97
5.3.1	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o trânsito intestinal em camundongos.....	97
5.3.2	5.4.2. Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre motilidade gastrointestinal induzida por betanecol em camundongos.....	99
5.3.3	Efeito da Gotas Arthur de Carvalho sobre o volume secretório e acidez gástrica em ratos.....	101
5.3.4	Avaliação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda intracolônico em camundongos...	103
5.3.4.1	Estudo do envolvimento do sistema opióide.....	105
5.3.4.2	Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico.....	107
5.3.4.3	Estudo do envolvimento dos canais de K+.....	109
5.4	Avaliação das GAC sobre atividade atividade motora: campo aberto.....	111
5.5	Avaliação das Gotas Arthur de Carvalho sobre a dispepsia.....	112
5.6	Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre diarreia induzida por óleo de rícino.....	119
6	DISCUSSÃO.....	123
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
8	REFERÊNCIAS	144

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desordens gastrintestinais

O trato gastrintestinal desenvolve atividades como digestão, proteção e motilidade por meio da secreção de ácido, enzimas, bicarbonato e muco, como também o controle na absorção de água, eletrólitos e nutriente, reguladas pelo sistema nervoso simpático, parassimpático e entérico, mediadores parácrinos autócrinos e endócrinos. O sistema nervoso autônomo parassimpático atua por meio da liberação de acetilcolina, o simpático por meio da noradrenalina, e o sistema nervoso entérico libera neuropeptídeos que controlam a liberação de secreção e a motilidade gastrintestinal. Um fator importante para a defesa gastrintestinal é a motilidade. O trato gastrintestinal (TGI) apresenta uma camada muscular lisa composta de fibras dispostas de forma longitudinal e circular, responsáveis pelas contrações e peristalse para promover a mistura dos alimentos com as secreções e propulsão ao longo do trato gastrintestinal, respectivamente (FALCÃO, 2011). As células da musculatura lisa se contraem lentamente no repouso por meio de potenciais de ação intensos e normalmente desenvolvem o tônus. O tônus é importante para a atividade dos esfíncteres distribuídos ao longo do trato gastrintestinal. Dentre os esfíncteres, podemos citar o esofágico superior (controla a entrada do bolo alimentar no estômago), o pilórico (responsável pelo esvaziamento gástrico), o íleo-cecal (que regula a passagem do quimo para o cólon) e o anal interno (controla a defecação) (KOEPPEN ; STANTON, 2009).

Para que os processos de contração sejam evidenciados durante o desenvolvimento de atividades digestórias é necessária a ocorrência de estímulos que gerem potenciais de ação ao repouso e normalmente são reguladas pelas fibras nervosas extrínseca e intrínseca que atuam localmente ou de forma reflexiva, enterohormônios e mediadores locais do trato gastrintestinal. Entre eles, podem ser citados os estimuladores do processo contrátil, como a acetilcolina, substância P, serotonina e inibidores como a noradrenalina, colecistocinina, NO, prostaglandinas, dopamina e polipeptídeo intestinal vasoativo (KOEPPEN; STANTON, 2009, MATSUDA; DANTAS, 2008).

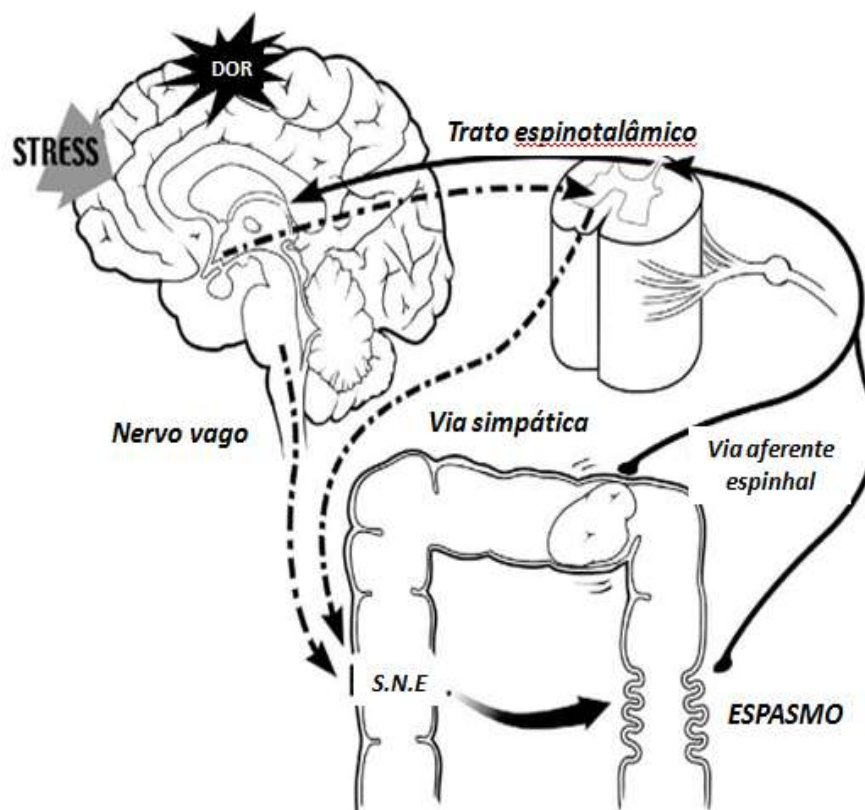
As desordens gastrintestinais funcionais (DGIFs) são exemplos típicos de como o sistema digestivo desempenha um papel crucial na vida normal dos seres humanos (FUKUDO, 2012).

Os múltiplos sintomas associados à DGIFs exercem considerável impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes (TALLEY *et al.*, 2001) e a sua patogênese é

multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais contribuem para as alterações na motilidade gastrointestinal e na percepção visceral, no crescimento bacteriano e nas alterações da regulação das conexões do sistema nervoso central (DROSSMAN, 2005). Dentre os distúrbios mais comuns, recebem destaque na prática clínica a dispepsia funcional, um problema atual e comum, caracterizada por sintomas relacionados ao aparelho digestório alto, caracterizada por epigastralgia, saciedade precoce, azia, regurgitação, eructação e aerofagia, náuseas, vômitos e desconforto abdominal, sintomas que podem representar um problema orgânico, quando existe alteração morfológica caracterizada, ou ser funcional, na ausência de lesões estruturais. Dentre as causas orgânicas mais comuns, é possível citar a doença do refluxo gastroesofágico, úlceras gástricas, gastrite e câncer gástrico (TALLEY *et al.*, 1999; SILVA, 2008).

Essas desordens estão associadas com disfunções motora e sensoriais do intestino. Além disso, estes distúrbios parecem estar suscetíveis à exacerbação de sintomas induzido pelo estresse, o que levou alguns estudiosos à conclusão de que as DGIFs são manifestações psicossomáticas. Tornou-se claro, no entanto, que as desordens não são puramente de cunho psicológico, por exemplo, pacientes com as desordens gastrointestinais funcionais apresentam um aumento de sintomas psicológicos, o que não é visto em pacientes que não apresentam os sintomas funcionais (DROSSMAN; McKEE; SANDLER, 1988). Existe uma teoria de que os distúrbios gastrointestinais são causados por alterações nas funções intestinais, já que controle do órgão ocorre tanto através da via intrínseca do sistema nervoso do intestino e centralmente pela medula espinhal, tronco cerebral e córtex, onde alterações pode produzir ou exacerbar os sintomas (Figura 1), gerando as chamadas disfunções do “eixo cérebro-intestino”, a causa mais comum das DGIFs.

Figura 1 - Esquema do eixo “cérebro-intestino”



Fonte: HOWARD; MERTZ (2003), adaptado.

A figura mostra um esquema do eixo cérebro-intestino. O controle motor do intestino é mediado pelo sistema nervoso entérico (S.N.E.), modulado pela via parassimpática (nervo vago) e pelos nervos simpáticos (linhas pontilhadas). O estímulo é levado através dos nervos aferentes espinhais para a parte dorsal da medula espinhal (linha cheia). O sistema límbico e outros centros de dor também são estimulados. O stress afeta o sistema límbico e cognitivo no cérebro, que pode modificar a sensibilidade à dor e gerar influência simpática e parassimpática no sistema nervoso entérico.

Para o diagnóstico da dispepsia, sugere-se que sejam considerados somente os sintomas de dor epigástrica (sensação subjetiva e desagradável quando está havendo lesão tecidual na região epigástrica), pirose epigástrica (sensação de queimação na região), plenitude pós-prandial (sensação de que o alimento permanece muito tempo no estômago) e a saciedade precoce (sensação de que o estômago fica cheio logo depois do início da refeição, desproporcional ao volume ingerido, sem ocorrer o término da

refeição). Estes sintomas parecem ter um significado fisiopatológico mais específico para a dispepsia, os tornando assim referência para o diagnóstico (SILVA, 2008).

Para critérios de diagnóstico, existem diferentes tipos de dispepsia que são classificadas dessa forma:

Dispepsia funcional: os sintomas não estão relacionados a doenças orgânicas e os achados de endoscopia são normais ou menores;

Dispepsia orgânica: os sintomas dispépticos estão relacionados a uma doença orgânica, como a úlcera péptica, e;

Dispepsia não diagnosticada: quando os sintomas ainda não foram diagnosticados.

A prevalência da síndrome dispéptica é em torno de 40% na população em geral, porém somente um quarto dos pacientes procura auxílio médico ao apresentar os sintomas. No Brasil, um estudo mostrou uma prevalência de 44% e nos Estados Unidos, a mais frequente causa de dispepsia é a dispepsia funcional, que atinge em torno de 31% da população (SILVA, 2008).

O tratamento da dispepsia é feito através do uso de agentes anti-secretórios, principalmente para os casos com sintomas de úlcera péptica, e agentes pró-cinéticos, para pacientes com alterações na motilidade gastrointestinal, assim como também pode ser uma combinação dos dois grupos de medicamentos para alívio dos sintomas (TRONCON, 2001).

O desenvolvimento de novas drogas e a caracterização da patogenia da dispepsia trazem novas perspectivas para o tratamento farmacológico de pacientes acometidos por essa síndrome. Atualmente, as terapias existentes para o tratamento dos múltiplos sintomas das DGIFs apresentam potencial terapêutico restrito e novos agentes, que possam melhorar os sintomas globais da Síndrome do Intestino Irritável (SII), ainda são pesquisados (TACK *et al.*, 2006a e 2006b). Uma grande variedade de tratamentos podem ser utilizados no manejo das DGIFs incluindo, erradicação do *H. pylori*, antiácidos, protetores da mucosa, agentes antsecretórios, pró-cinéticos, antidepressivos e analgésicos viscerais. Dentre as opções terapêuticas para os pacientes com distúrbios gastrointestinais funcionais temos o uso de fitoterapêuticos, que podem vir a serem utilizados como alternativa terapêutica dentre os fármacos utilizados atualmente.

Vários estudos mostram o papel das plantas medicinais no tratamento das patologias do TGI. A primeira droga efetivamente usada contra problemas gástricos, a carbenoxolona, foi descoberta através de pesquisas com a *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) (BROWN et al., 1959). O extrato das folhas e frutos de *Sapindus saponaria* L. apresentou atividade antiulcerogênica e antissecreção gástrica, diminuindo a concentração de ácido clorídrico e do pH gástrico, atividade gastroprotetora do guaraná (*Paulinia cupana* Mart), da resina bruta e da mistura de α e β -amirina isoladas de *Protium heptaphyllum*, do extrato seco de *Matricaria recutita* e do alfa-bisabolol, ação protetora do óleo de copaíba (*Copaifera Langsdorff*) em modelo de colite, ação protetora gástrica do ácido centipédico presente na macela (*E. viscosa*) (CAMPOS et al., 2003, PAIVA et al., 2004; MEYER et al., 2002; BEZERRA et al., 2009; GUEDES, 2010).

Diante do exposto, as plantas medicinais, incluindo produtos derivados e constituintes químicos, surgem como uma fonte em potencial para a farmacoterapia das DGIFs, como diarreia, gastrite, dor, entre outros, visando vantagens terapêuticas em relação à terapia utilizada atualmente.

1.2 Nociceção e dor visceral.

A terminologia sobre dor considerada a mais útil e portanto mais apropriada foi idealizada em 2008 pelo conselho da IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) que diz: a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em tais termos de lesão (IASP, 2008; PEREIRA, 2011).

A percepção corporal da dor é denominada nociceção, termo utilizado para descrever o processo neural de codificação e processamento de estímulos nervosos, sendo descrito como um processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados pelos nociceptores, um conjunto de fibras nervosas periféricas (PEREIRA, 2011). Sendo assim, a dor pode ser considerada como um processo perceptivo, cujo conceito de nociceção é utilizado para definir a resposta normal a estímulos lesivos ou potencialmente lesivos ao organismo (DRUMMOND, 2000).

A dor é um dos principais motivos de procura de atendimento médico, manifestando-se em torno de 70% dos pacientes do Brasil e é a principal causa de incapacitação para o trabalho, motivo que gera manifestações psicossociais e econômicas.

Devido à dor, cerca de 50 a 60% dos doentes se tornam parcial ou totalmente incapacitados, transitória ou permanentemente (MAIA, 2006; ARAÚJO, 2007).

Esta patologia pode ser classificada de diversas maneiras, dependendo do enfoque a qual ela vai ser analisada. A dor pode ser transitória (relacionada ao tempo de permanência da dor no organismo e os receptores são ativados mesmo sem dano tecidual), aguda (resposta normal causada pelo dano tecidual, com ativação de receptores, onde a dor pode ser revertida antes da total restauração fisiológica do local afetado) e crônica (onde a lesão ou a patologia gera a dor e supera a capacidade do organismo em restaurar o tecido afetado (ARAÚJO, 2007). Na sua classificação fisiopatológica, pode ser dividida em nociceptiva, neuropática ou neurogênica, explicadas dessa forma: a dor nociceptiva é originada pela estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; a dor neuropática é devida a uma lesão ou disfunção do SNC ou SNP, que pode persistir por muito tempo após o evento causador, podendo ser periódica, temporária ou crônica, podendo estar ou não associada a lesão detectável. Possui várias formas de manifestação, com sensação de peso, queimação, agulhadas, choques, acompanhado ou não de formigamento ou adormecimento de uma determinada parte do corpo. Já a dor neurogênica é identificada por diagnóstico de exclusão, ocorrendo de forma mais rara. Pode ser considerada uma dor virtual, já que mesmo patologias puramente psiquiátricas são manifestações de alterações orgânicas, mesmo que somente bioquímicas (MAIA, 2006).

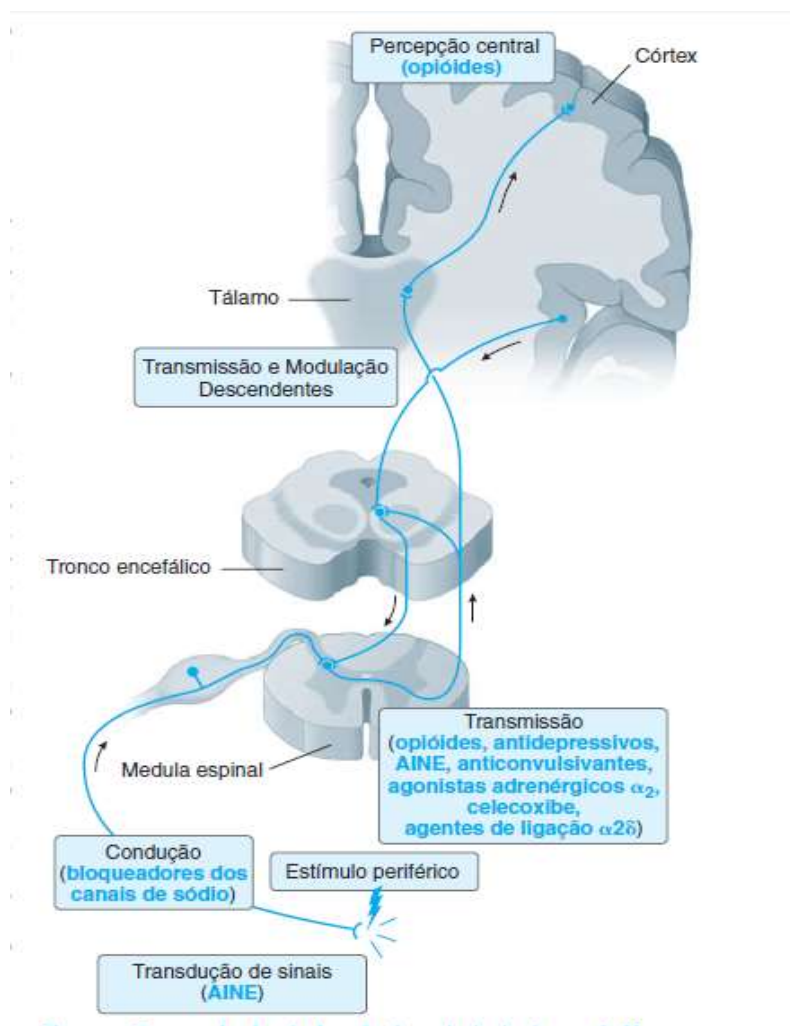
A dor nociceptiva é uma dor que pode surgir em todos os indivíduos normais, por conta de estímulos que produzem lesões ou danos nos órgãos viscerais ou somáticos. É resultado da ativação de nociceptores em tecidos cutâneos e profundos, que podem estar em um estado normal ou sensibilizado e os principais fatores que estimulam as fibras nociceptivas viscerais são: estiramento na parede muscular das vísceras ocas; processo inflamatório; isquemia e neoplasias. Começa simultaneamente ao início da atividade da causa, que pode ser usualmente identificado (MAIA, 2006; KRAYCHETE; GUIMARÃES, 2003).

A dor nociceptiva somática é descrita frequentemente como uma sensação dolorosa aguda e localizada. Pode estar associada a contratura muscular e pode aumentar com o movimento, aliviada pelo repouso e variável conforme a lesão. Dores ósseas, pós-operatórias, músculo-esqueléticas, e dores artríticas são exemplos de dores somáticas. A dor nociceptiva visceral ocorre quando a sensação de dor provém das vísceras. É causada por alterações internas dos órgãos ocos e vísceras, como estômago, rins, bexiga, vesícula

biliar e intestinos. Os principais fatores que estimulam as fibras nociceptivas viscerais são: estiramento ou tensão na parede vascular das vísceras, processo inflamatório de origem infecciosa ou química, isquemia e neoplasias, sendo considerada uma das formas de dor mais comum, resultando na procura pelo cuidado médico. Entretanto, a dor visceral é pouco estudada quando comparada a dor somática, mas, com o desenvolvimento e melhora da tecnologia para a detecção e mensuração da dor, esse quadro passou a ser modificado (MAIA, 2006).

A dor é a consequência perceptiva no fim do processamento neural de determinada informação sensorial. Em geral, o estímulo surge na periferia e é transferido através de transmissores sensoriais do sistema nervoso central até o córtex. Esse sistema pode ser convenientemente analisado em relação aos locais de ação onde os fármacos analgésicos atuam. Primeiro, a transdução de estímulos nocivos externos e intensos despolarizam as terminações nervosas periféricas de neurônios sensoriais primários de “alto limiar”, os nociceptores, uma vez que necessitam de um forte estímulo capaz de lesionar potencialmente o tecido para despolarização de suas terminações nervosas. Os potenciais de ação resultantes são conduzidos até o SNC pelos axônios dos neurônios sensoriais aferentes primários, seguindo o seu trajeto inicialmente nos nervos periféricos e, a seguir, nas raízes dorsais que, fazem sinapse em neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios de projeção secundários transmitem a informação ao tronco encefálico e ao tálamo que, a seguir, transmitem sinais ao córtex, hipotálamo e sistema límbico. A transmissão é modulada em todos os níveis do sistema nervoso por interneurônios inibitórios e excitatórios remotos e de circuito local (GOLAN et al., 2009).

Figura 2 - Visão geral do circuito nociceptivo e local de ação das principais classes de fármacos analgésicos



Fonte: GOLAN et al (2009).

O entendimento dos mecanismos de transmissão da dor tem levado ao desenvolvimento da descoberta de novos compostos utilizados no tratamento da dor. O processo nociceptivo envolve diversos receptores, enzimas e vias de sinalização. A identificação de novas classes de compostos naturais pode levar ao avanço do entendimento desses mecanismos farmacológicos, já que a descoberta desses novos compostos com seus perfis farmacológicos, fazem com que eles sejam a promessa no futuro no tratamento de dor (McCURDY, SCULLY, 2005).

Existe uma grande quantidade de mediadores periféricos (bradicinina, citocinas, prostaglandinas, 5-HT, ATP, prótons H^+) que agem diretamente nos receptores nociceptivos gastrintestinais e iniciam a transmissão dolorosa. Na sensibilização

periférica ocorre redução do limiar à despolarização neuronal e aumento do número ou da amplitude de descarga neuronal, em resposta a certos estímulos químicos ou mecânicos (BUENO; FIORAMONT; GARCIA-VILLAR, 2000; CERVEJO, 2000).

Mesmo não se conhecendo totalmente o mecanismo de sensibilização visceral, acredita-se que alguns mediadores como a substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, aspartato, glutamato, neurocininas, somatostatina e peptídeo intestinal vasoativo estejam envolvidos no desenvolvimento e manutenção da sensibilização central induzida pela inflamação. A ação desses neuromediadores em receptores específicos ativa segundos mensageiros para a abertura de canais de cálcio e entrada dessas substâncias para o interior das membranas celulares. Então ocorre a produção de outros mediadores, como NO e metabólitos do ácido araquidônico, que provavelmente alteram a transmissão do potencial de ação e estrutura dos nervos e sinapses, e causam sensibilização medular e fenômeno de *wind up* (aumento da duração da resposta de certos neurônios) (KRAYCHETE; GUIMARÃES, 2003).

O atual tratamento farmacológico da dor é composto, basicamente, por analgésicos opióides e os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Entretanto, o uso desses dois grupos de medicamentos está relacionado com o aparecimento de muitos efeitos adversos, como o aumento de riscos de eventos cardíacos (inibidores seletivos da COX-2), surgimento de tolerância ou hipersensibilidade (morfina e outros analgésicos opióides), sedação, redução de atividades físicas, depressão respiratória, constipação, entre outros. Por esses motivos, há uma significativa diminuição da qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela dor (SANTOS, 2011).

A dor visceral é a forma mais comum de dor em que os pacientes buscam auxílio médico. Mesmo com os avanços do conhecimento sobre os mecanismos da dor visceral e da hiperalgesia visceral, nenhum tratamento efetivo da dor abdominal foi descoberto. Um modelo alternativo de dor visceral em camundongos utiliza a instilação por via intracolônica de algumas substâncias algogênicas, como óleo de mostarda, capsaicina, ou formalina, que produz comportamentos relacionados a dor visceral, como lambar e coçar o abdômen, arraste contra o solo e retrações abdominais que podem ser numeradas e avaliadas (LEITE, 2011).

A utilização de produtos naturais para terapias de alívio da dor são bem reconhecidas desde os tempos remotos. Por exemplo, o uso do ópio extraído das flores de papoula (*Papaver somniferum* L.), que até hoje tem em seus compostos várias substâncias importantes para o alívio da dor. Também podemos citar o ácido acetilsalicílico, derivado

do ácido salicílico extraído da casca do salgueiro (*Salix alba* L.), que é um dos principais produtos utilizados no tratamento da dor inflamatória (ALVEZ, 2009). O extrato etanólico do tronco de *Amburana cearensis* demonstrou efeito analgésico devido à presença de flavonoides e cumarinas e seu mecanismo parece estar relacionado com a interação dos metabólitos do ácido araquidônico e biossíntese de prostaglandinas (LEAL et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009). O alfa-bisabolol, um sesquiterpeno presente no óleo essencial da camomila (*Matricaria recutita*) foi capaz de reduzir os comportamentos relacionados à dor em animais submetidos à exposição de substâncias algogênicas, como a capsaicina, óleo de mostarda, formalina e ácido acético (LEITE et al., 2012).

Nas últimas décadas, mais substâncias analgésicas foram purificadas a partir de produtos naturais, resultando em novas classes e mecanismos de ação de drogas analgésicas. As plantas e outros produtos naturais descritos a partir de dados etnobotânicos e etnofarmacológicos tem se tornado o alvo na descoberta de novas drogas (McCURDY, SCULLY, 2005).

Dessa forma, a investigação se o fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho é capaz de reduzir esses comportamentos de dor é um fator importante para sua validação como um medicamento para ser utilizado nas desordens gastrintestinais, gerando conhecimento sobre sua segurança e eficácia para garantir o uso seguro do fitoterápico pela população.

1.3 Plantas medicinais como fonte de substâncias biologicamente ativas

O emprego de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é umas das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), na década de 90, cerca de 65-70% da população mundial quem viviam em países em desenvolvimento dependiam essencialmente das plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde (VEIGAS-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Já no início dos anos 2000, 80% da população mundial utilizava medicamentos derivados de plantas (BHATTARAM *et al.*, 2002). Apesar da evolução da medicina alopática, existem alguns obstáculos na sua utilização pela população carente, desde o acesso aos centros de atendimento quanto a obtenção de medicamentos e exames. Somando isso à facilidade de obtenção e tradição de uso de plantas medicinais, há uma contribuição de utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGAS-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Muitos países da Europa utilizam amplamente plantas medicinais, onde a Alemanha e a França detêm a maior parte das vendas desses tipos de produtos em toda a União Europeia (VEIGAS- JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O Brasil, com cerca de 10% de toda a flora mundial, ainda é um país com menos de 1% das espécies vegetais estudadas do ponto de vista farmacológico e quando nos referimos a medicamentos fitoterápicos o número de estudos conclusivos (segurança e eficácia pré-clínica e clínica) são ainda menores (CUNHA, 2005; TRENTINI, 1997). Aqui, as plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de sua atividade farmacológica, com o uso propagado por usuários e comerciantes (VEIGAS- JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). A segurança e a eficácia dos fitoterápicos dependem de diversos fatores, como por exemplo, a qualidade do produto comercializado. Segundo Farias (2001), a eficácia é dada pela comprovação, por meio de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, os efeitos biológicos preconizados por este recurso terapêutico, e a segurança é determinada pelos ensaios que comprovem a ausência de efeitos tóxicos.

Mesmo com o desenvolvimento de fármacos sintéticos, o uso de plantas medicinais como alternativa para o tratamento de diversas doenças permanece, sendo observado nas últimas décadas o aumento de preparações a base de plantas para fins terapêuticos (BADKE *et al.*, 2012).

A OMS constatou que práticas não convencionais de saúde, tais como acupuntura, fitoterapia e técnicas manuais estão em desenvolvimento, ganhando espaço de modo complementar às terapias medicamentosas alopáticas. Para grande parte da população o uso de plantas medicinais é visto como uma integrativa histórica à utilização de medicamentos sintéticos, visto que os últimos são considerados mais caros e agressivos ao organismo. A disseminação do uso de plantas medicinais, assim como a automedicação deve-se principalmente ao baixo custo e fácil acesso à grande parcela da população (WHO, 2008).

A legitimação de abordagens de atenção à saúde da medicina tradicional no Brasil teve início da década de 80, após a criação do SUS. Em 2006, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas (PNPIC), cujo objetivo é ampliar as opções terapêuticas aos usuários do Sistema único de Saúde, como as plantas medicinais, com garantia de acesso aos fitoterápicos e serviços relacionados a fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade. Justamente a essa proposta, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, de 2007, visa “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da

biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BADKE *et al.*, 2012). Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), no qual estão presentes 71 espécies vegetais usadas através do conhecimento etnofarmacológico e confirmadas cientificamente (BADKE *et al.*, 2012; BRASIL, MS, 2009).

Como produto de uma série de sugestões apresentadas por vários segmentos da sociedade, foi estabelecida uma legislação para a área de fitoterápicos (Portaria 6/SVS de 31//1995), que definiu fitoterápico como um medicamento com componentes ativos exclusivamente de origem vegetal, e que deve apresentar comprovação de segurança, eficácia e qualidade. Também determinou prazos para a realização de estudos de eficácia e segurança para os produtos já existentes no mercado, estabelecendo bases para uma maior aceitação desses produtos. Essa legislação foi reformulada, mantendo suas características essenciais, sendo colocada em vigor a Resolução RDC nº 14 de 31/03/2010. Também foi estabelecida no Ministério da Saúde e depois na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), uma divisão específica para medicamentos fitoterápicos, medida favorável para assegurar a melhoria da qualidade dos produtos fitoterápicos no mercado brasileiro (SIMÕES E SCHENKEL, 2002; BRASIL, 2010.).

Frequentemente, as plantas medicinais são apresentadas como fontes principais ou modelos para a origem de novos fármacos. É sabido que inúmeras substâncias bioativas, utilizadas atualmente, são derivadas de plantas. A vantagem do uso dessas espécies vegetais como ponto de partida para a busca de novas substâncias terapêuticas é o fato de que a identificação dessas plantas com um potencial de uso não se basear em seu mecanismo de ação. Além de aumentar as chances de descobrir novos mecanismos, a pesquisa com plantas também pode reduzir a ocorrência de fármacos “me too”, que são considerados supostamente como uma novidade farmacológica, entretanto, são modificações em estruturas já conhecidas e que atuam pelas mesmas vias que os fármacos de origem (FAUSTINO *et al.*, 2010).

Na área farmacêutica, as plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a sua utilização como modelo para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos ou como para a obtenção de adjuvantes farmacêuticos (produtos utilizados na produção de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente a base de extratos vegetais: os fitoterápicos (SCHENKEL *et al.*, 2001). Na indústria, é notável o surgimento de interesse em produtos naturais como fonte de

modelos de novos fármacos ou mesmo como matéria-prima de fitoterápicos (SIMÕES E SCHENKEL, 2002).

Na história do desenvolvimento de medicamentos, mais especificamente dos preparados a partir de plantas medicinais, podemos citar a “pílula de Mattos” ou mais popularmente conhecida como “pílula do mato”, desenvolvidas pelo médico cearense Francisco José de Matos. Este medicamento foi registrado em 1888 na Inspeção Federal de Saúde, órgão precursor da atual ANVISA, utilizado como purgativo. Foi por muitos anos o fitoterápico de maior preferência no meio rural do Norte e Nordeste do Brasil, composto pelas espécies *Luffa operculata* e *Convolvulus operculata*, vulgarmente conhecidas como cabacinha e batata-de-purga, respectivamente (MENON-MIYAKE et al., 2005; MEDEIROS, 2011).

Outro exemplo que podemos citar, a Aguardente Alemã®, presente no mercado nacional há mais de 60 anos, é um fitoterápico inscrito na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira, composto pelos extratos da jalapa (*Operculina macrocarpa*, *Exogonium purga*, *Ipomoea jalapa*, *Ipomoea purga*, *Ipomoea scheldana*, *Convolvulus jalapa*, *Convolvulus purga*) e Escamônio (*Convolvulus scammonia*) indicada no tratamento de constipação intestinal e utilizada para outras diversas patologias, como problemas circulatórios (FONTELES et al., 2008; CUNHA, 2009).

Outro fitoterápico reconhecido por suas propriedades medicinais é a Água Inglesa®, solução oral composta pelas tinturas de quina amarela (*Cinchona calisaya* Wedd-Rubiaceae), calumba (*Jateorhiza palmata*-Menispermaceae), losna (*Artemisium absinthium* –Asteraceae), camomila (*Matricaria recutita*- Asteraceae), carqueja amarga (*Baccharis trimera* – Asteraceae), centaurea menor (*Centaureum erythrae* Rafn – Gentianaceae), canela da China (*Cinnamomum cassia* Blume – Lauraceae), utilizada para problemas digestivos e estimulantes do apetite, devidos aos princípios ativos amargos presentes nas plantas utilizadas no preparo do medicamento (AMARAL, 2014).

O fitoterápico Sanativo®, composto pela associação de extratos hidroalcoólicos de angico (*Piptadenia colunbrina* Benth), aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), camapu (*Physalis angulata*, Linné) e mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller) é um produto tradicional, produzido desde 1888 pela empresa Laperli (Laboratório Pernambucano Ltda) e devido às propriedades medicinais dessas espécies vegetais, é utilizada no tratamento de feridas, queimaduras, inflamações de garganta e de tecidos epiteliais lesionados (LIMA, 2006).

Nesse contexto, podemos citar também o fitoterápico Gotas Artur de

Carvalho[®], um produto composto pelas tinturas de *Matricaria recutita* (camomila), *Gentiana lutea* (genciana) e *Foeniculum vulgare* (funcho), produzido pelo Laboratório Ravick Ltda, que possui como indicação o uso como anti-espasmódico e estomáquico. Apesar de estar no mercado a mais de 70 anos, não possui ainda estudos científicos que comprovem a sua qualidade, estabilidade, segurança e eficácia terapêutica, o que nos leva ao objetivo principal do trabalho, a comprovação de uso e segurança do medicamento.

1.4 Fitoterápico Gotas Artur de Carvalho[®]

De acordo com as informações obtidas na bula do produto cedido pelo Laboratório Ravick, vemos que originalmente, fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho (solução oral, apresentado em um frasco conta-gotas com 30 mL) possuía em sua formulação inicial as seguintes tinturas como seus componentes, descritos abaixo:

Tabela 1 - Composição do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho

COMPOSIÇÃO	Quantidades
Tintura de <i>Matricaria recutita</i>	0,35 mL
Tintura de <i>Gentiana lutea</i>	0,20 mL
Tintura de <i>Foeniculum vulgare</i>	0,15 mL
Tintura de <i>Jateorhiza palmata.</i>	0,15 mL
Veículo*	q.s.p 1,00 mL

* solução aquosa a 50% etanol.

Anteriormente, a fórmula das Gotas Artur de Carvalho[®] possuía também a tintura de *Strychnos nux vômica*, que foi excluída após amplo levantamento bibliográfico em literatura especializada (MCKAY *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2003; MS/ANVISA - RDC N°89, 2004; ALEXANDROVICH *et al.*, 2003; LORENZI e MATOS, 2002; EVANS, 1996; BLUMENTHAL, 1998; SCHRIPEMA *et al.*, 1999). No passado, extratos de *Strychnos nux vomica* (noz-vômica) foram utilizados para diversos distúrbios, incluindo os gastrointestinais e debilidade física (HOEHNE, 1939). Contudo, atualmente o uso terapêutico de noz-vômica, não é justificável devido aos seus riscos e seu interesse reside na obtenção da estricnina (alcalóide indólico) utilizada em estudos de laboratório

da excitabilidade muscular e para o ensaio biológico de anticonvulsivantes e relaxantes musculares de ação central (SCHRIPEMA *et al.*, 1999; EVANS, 1996).

Posteriormente, também ocorreu a alteração do fitoterápico através da exclusão da tintura de *Jateorhiza palmata*, em função da ausência de dados científicos que justifiquem o seu uso como matéria-prima ativa. Assim, a nova fórmula das Gotas Arthur de Carvalho, submetida aos estudos desse trabalho possui como matérias-primas ativas as tinturas de camomila (50 %), funcho (25 %) e genciana (25 %).

O fitoterápico é produzido pelo Laboratório Ravick, localizado na cidade de Fortaleza, Ce, desde 1941, e possui como principais indicações de uso nas desordens gastrintestinais, como antiespasmódico, estomáquico, tratamento de enterocolites, dispepsia, dores estomacais e aerofagia. Atualmente, o produto está registrado no Ministério da Saúde (Nº 1.0913.0003.001-4), entretanto, com a legislação atual de registro de fitoterápicos (RDC 26/ 2014), que exige estudos que comprovem a segurança e eficácia do fitoterápico, o produto está com a produção e comercialização suspensas.

O presente trabalho tem como principal objetivo validar o uso do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho® nas desordens gastrintestinais, determinando a segurança e eficácia do produto padronizado, para atender as exigências da ANVISA e assim, contribuir para a renovação de registro do produto.

Alguns parâmetros do fitoterápico em estudo já foram desenvolvidos e analisados pelo nosso grupo, no Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC), onde Leal (2003) realizou a padronização do produto por CLAE-DAD, com identificação e quantificação dos marcadores/princípios ativos (apigenina 7-glicosídeo, gentiopicrosídeo e anetol para as tinturas de camomila, genciana e funcho, respectivamente). Silveira (2011) avaliou a estabilidade físico-química do produto farmacêutico, além de demonstrar que as GAC possuem efeito antiespasmódico e miorelaxante em intestino de rato, corroborando com a indicação de uso deste produto.

Mesmo com a determinação da atividade miorelaxante e antiespasmódica, são necessários outros estudos para investigação mais completa sobre o uso das Gotas Arthur de Carvalho em desordens gastrintestinais, além da avaliação de um possível efeito tóxico pelo uso do fitoterápico, colaborando assim com dados que são necessários para a continuação sua da produção e comercialização.

Figura 3 - Anúncio de propaganda das Gotas Arthur de Carvalho® e embalagem original.



Fonte: <http://www.ceara.pro.br>

1.4.1. Levantamento bibliográfico das espécies vegetais que compõem o fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho®

1.4.1.1. *Matricaria recutita* – Asteraceae

A camomila, planta da família Asteraceae, é uma das plantas medicinais mais utilizadas e bem documentadas, citadas em documentos oficiais de 26 países, como as farmacopeias alemã, americana e brasileira, entre outras. (LUCCA *et al.*, 2010; BLUMENTHAL, 1998; SALAMON, 1992). Diversas espécies vegetais de uso medicinal são conhecidas como camomila, entretanto, a camomila verdadeira é definida como as inflorescências de *Matricaria recutita* Linn, (sin.: *Chamomilla recutita* L. e *Matricaria chamomilla* L.) e comumente conhecida como camomila-alemã, camomila-verdadeira, maçanilha, camomila-comum, camomila-vulgar e camomila dos alemães (SIQUEIRA, 2011; BORSATO, 2006). Sua utilização é encontrada em registros da antiguidade, mencionada em trabalhos renascentistas e reconhecida pelos romanos a partir do século XVI.

A camomila é uma planta herbácea, anual, aromática, nativa dos campos da Europa e aclimatada em algumas regiões da Ásia e de países latino-americanos, inclusive na região sul do Brasil, atualmente pode ser encontrada em todos os continentes, sendo amplamente utilizada para fins medicinais, cosméticos e alimentícios, sendo uma das plantas mais cultivada no mundo (BORSATO, 2006; LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 4 - *Matricaria chamomilla* L.

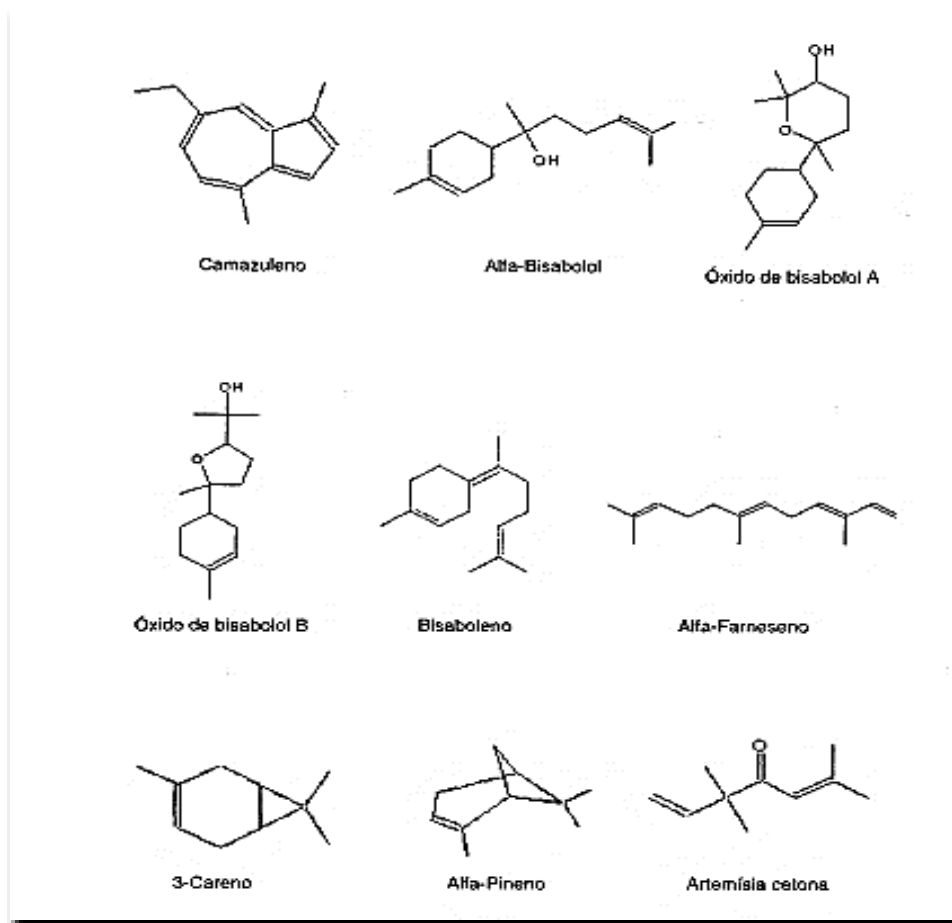


Fonte: BEIER; EHLERT (2014)

Tradicionalmente, a camomila é usada como tônico amargo, digestivo, sedativo, para facilitar a eliminação de gases, combater cólicas e estimular o apetite (SIMÕES *et al.*, 1998; VIOLA *et al.*, 1995). A parte da planta utilizada para fins terapêuticos são os capítulos florais, de onde é obtido o óleo essencial, caracterizado pela cor azul, onde seus principais componentes são: alfa-bisabolol, camazuleno, óxidos de bisabolol, espatulenol, matricina e outras substâncias de reconhecida atividade terapêutica (BEZERRA, 2009; TOMIC *et al.*, 2013; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; LORENZI e MATOS, 2002; TIRILLINI *et al.*, 2003). Tanto a infusão como o óleo essencial das flores da camomila contém agentes corantes e flavorizantes, utilizado na produção de alimentos, bebidas e também na área de cosméticos, como perfumes (MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Devido à presença de componentes bioativos (sesquiterpenos, flavonóides, cumarinas e poliacetilenos) é uma planta de grande interesse por possuir propriedades farmacológicas conhecidas (AMARAL, 2011).

Figura 5 - Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial da camomila



Fonte: BORSATO (2006)

Estudos pré-clínicos (MILLER *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 2005; MCKAY; BLUMBERG, 2006) demonstraram a atividade anti-inflamatória potente da camomila, além das atividades antimutagênica, hipocolesterolêmica, antiprurido, antiespasmódica e ansiolítica. Estudo com o extrato padronizado de *M. recutita*, *Foeniculum vulgare* e *Melissa officinale* (ColiMil®) mostrou que o produto reduziu a motilidade intestinal em camundongos, sendo as espécies *M. recutita* e *M. officinale* as principais responsáveis por esse efeito (CAPASSO *et al.*, 2007). Solução bucal de camomila (Kamillosan®) é utilizada em vários países para tratamento de mucosites bucais induzidas por quimioterápicos (BRAGA, 2011; BLUMENTHAL, 2000; CARL; EMRICH, 1991). O fitoterápico STW5 (Iberogast®), que possui em sua composição o extrato de camomila, é utilizado com sucesso em pacientes com dispepsia funcional associada a dismotilidade, com relato de que esse efeito seja resultado da ação sinérgica

dos componentes sobre o músculo liso gástrico (ROSCH *et al.*, 2002). Em modelos animais foi demonstrado que em camundongos tratados com extrato de *Matricaria chamomilla* tiveram uma redução significativa de dor induzida por cisplatina e o extrato hidroalcolólico da planta foi capaz de reduzir a dor induzida por cisplatina e inflamação melhor do que a morfina (SCHRODER *et al.*, 2013).

Diversos estudos sobre os efeitos gastrintestinais com o extrato da camomila e o alfa-bisabolol, um sesquiterpeno encontrado no óleo essencial da planta, foram realizados e demonstraram uma potencial alternativa no tratamento dessas patologias, já que podemos relatar o efeito do extrato aquoso e do óleo essencial da camomila no relaxamento de espasmos gastrintestinais, redução de danos na mucosa gástrica em úlcera induzida por etanol pelo extrato de camomila e alfa-bisabolol, inibição de úlceras gástricas induzidas por indometacina, estresse e álcool e proteção gástrica em úlceras induzidas por ácido acetilsalicílico (McKAY; BLUMBERG, 2006; TORRADO *et al.*, 1995; BEZERRA *et al.*, 2009). Abad *et al.* (2011) demonstraram que o extrato hidroalcolólico de *Matricaria chamomilla* possui efeito analgésico no ensaio da formalina em camundongos, cujo provável mecanismo seria a inibição da síntese de prostaglandinas e decréscimo da inflamação induzida pela formalina. Já em estudos de Mahady *et al.* (2005) mostraram que o extrato das flores da camomila tem MIC > 100 µg/mL frente a culturas de *Helicobacter pilory*. A administração oral de alfa-bisabolol nas doses de 50 e 100 mg/kg foi capaz de prevenir o surgimento de lesões ulcerosas na mucosa gástrica e o extrato seco das flores de camomila também demonstrou essa mesma atividade, reduzindo em 78, 68 e 89% as lesões nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente, quando comparados com o grupo controle (BEZERRA, 2009).

Segundo IN N° 5, de 11 de dezembro de 2008 (ANVISA), a camomila é indicada como antiespasmódico e anti-inflamatório tópico, bem como para distúrbios digestivos e insônia leve. A padronização de produtos derivados (extrato e tintura) é realizada pela determinação do teor de apigenina-7-glucosídeo. A droga vegetal deve apresentar um teor mínimo de óleo essencial azulado de 4 mL/kg e de apigenina -7-glucosídeo no mínimo 0,25 % (EUR. PHARM. 2004). A apigenina possui atividades antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica, anticarcinogênica e relaxamento do músculo gástrico (LIU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011; SILVAN *et al.*, 2011; GULLUCE *et al.*, 2013). A apigenina também apresentou atividade de inibição da proliferação e supressão da progressão do ciclo celular em diversos tipos de câncer gastrintestinais (WALLE; WEN; WALLE, 2007; WU *et al.*, 2005; LEFORT & BAY, 2013).

Segundo Di Carlo *et al.* (1993), a apigenina é capaz de reduzir o trânsito intestinal e o acúmulo de fluido intraluminal, além de possuir atividade antidiarréica em ratos. Esses efeitos envolvem a atuação da apigenina em receptores α_2 –adrenérgicos e canais de cálcio. Min *et al* (2005) avaliaram o efeito da apigenina e seu glucosídeo sobre o refluxo esofágico e a gastrite em ratos, e verificaram que o glucosídeo foi mais potente do que a apigenina e a droga de referência (omeprazol) em inibir o refluxo esofágico e a gastrite, além de que apenas o glucosídeo apresentou atividade antioxidante. Considerando que as espécies reativas de oxigênio são um dos mediadores na geração do refluxo esofágico, a combinação dos efeitos antissecretório e antioxidante do glucosídeo da apigenina, o torna um instrumento terapêutico em potencial ideal na prevenção e no tratamento dessa patologia cuja farmacoterapia adotada tem sido apenas o uso de fármacos anti-secretório.

Mesmo com o uso tradicional da camomila pelas suas propriedades anti-inflamatórias, o potencial do óleo essencial da camomila de atenuar a dor e o edema, duas manifestações clínicas importantes da inflamação, não foi totalmente elucidado. O alfa-bisabolol apresenta atividade antinociceptiva em modelos de inflamação em camundongos e diminui a hiperalgesia na inflamação (LEITE *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2011).

Geralmente a camomila é segura para uso, entretanto, existem recomendações para pacientes hipersensíveis utilizarem com cautela. É uma planta utilizada por mulheres grávidas, como diurético e sedativo, entretanto, não existem estudos conclusivos sobre sua segurança, e o uso excessivo de camomila pode ser considerado um risco na gravidez devido as suas propriedades de indução de contração (AL-RAMAHI *et al.*, 2013).

O Ministério da Saúde incluiu a *Matricaria recutita* como parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse aos SUS (RENISUS), uma lista com 71 espécies vegetais com potencial terapêutico para a orientação de pesquisa de plantas medicinais (BRASIL, 2009), orientando a investigação da espécie sobre o potencial terapêutico do uso da camomila no tratamento de diversas patologias.

1.4.1.2. *Gentiana lutea* – Gentianaceae

Gentiana lutea L. (Gentianaceae), popularmente conhecida como *genciana*, é uma planta comum nas áreas montanhosas da área central e sul da Europa (SINGH, 2008). É uma espécie presente em diversas farmacopéias e comercializada na forma de rizomas e raízes secas, usada há muito tempo na medicina tradicional devido às suas propriedades digestivas, estomáquicas e também no tratamento da anorexia (BLUMENTHAL *et al.*, 1998; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005; NASTASIJEVIC, 2012).

Figura 6 - *Gentiana lutea*



Fonte: RADANOVIC *et al* (2014)

As plantas pertencentes ao gênero *Gentiana* são bem conhecidas pelas suas propriedades organolépticas, como o sabor amargo característico, o que o torna útil no tratamento de doenças do sistema digestivo (SINGH, 2008). O seu efeito como estimulante gástrico deve-se principalmente a presença de glicosídeos secoiridóides de sabor amargo como a swertiamarina, gentiopicrosídeo, amarogencina, e swerosídeo, além destes, os efeitos biológicos da genciana são devidos também a outros constituintes, como o ácido logânico (iridóide com atividade antiinflamatória), glicosídeos de xantonas (genciosídeo e seu isômero) e xantonas (gencisina e a isogencisina) (RECIO *et al.*, 1994; NEWALL *et al.*, 1996).

Estudos com extratos das raízes de *G. lutea* em ratos mostram que sua administração intraduodenal e intragástrica estimula a secreção de bile e foi demonstrado que a tintura de genciana aumenta a secreção gástrica, o que corrobora para seu uso nas doenças do sistema digestivo (LANS *et al.*, 2007; LIAN *et al.*, 2002).

O extrato de *G. lutea* e seus constituintes (isogentisina e isoviexina) demonstram efeitos inibitórios das enzimas monoamina oxidase (tipo A e B) e da xantina oxidase (HARAGUCHI et al., 2004). Em um estudo de Nastasivejic et al. (2012), foi demonstrado que o extrato etanólico da planta a 50% inibe a atividade da enzima mieloperoxidase, com maior atividade antioxidante com IC₅₀ igual a 20,6 g/mL, onde é sabido que a inibição da mieloperoxidase está associada ao efeito anti-inflamatório relacionado a planta. O extrato aquoso de *G. lutea* pode ser usado no tratamento da aterosclerose ao bloquear o PDGF (platelet-derived growth factor) em células aórticas de ratos, reduz a atividade citotóxica de radiação raios-X em células humanas normais em pacientes sadios (KESAVAN et al., 2013; MENKOVIC et al., 2010).

1.4.1.3 *Foeniculum vulgare* Mill. – Umbelliferae (Apiaceae)

Foeniculum vulgare Mill. – Umbelliferae (Apiaceae), conhecida popularmente como erva-doce, erva-doce-brasileira, erva-doce-de-cabeça, falso-anis, funcho, etc., é uma erva perene ou bianual, entouceirada, aromática, de 40-90 cm de altura, tradicionalmente utilizada na Europa e China, sendo uma espécie nativa do sul da Europa e da região do Mediterrâneo (LORENZI; MATOS, 2002; COSTA, 1978).

Figura 7 - *Foeniculum vulgare*



Fonte: STEFANELO et al (2006)

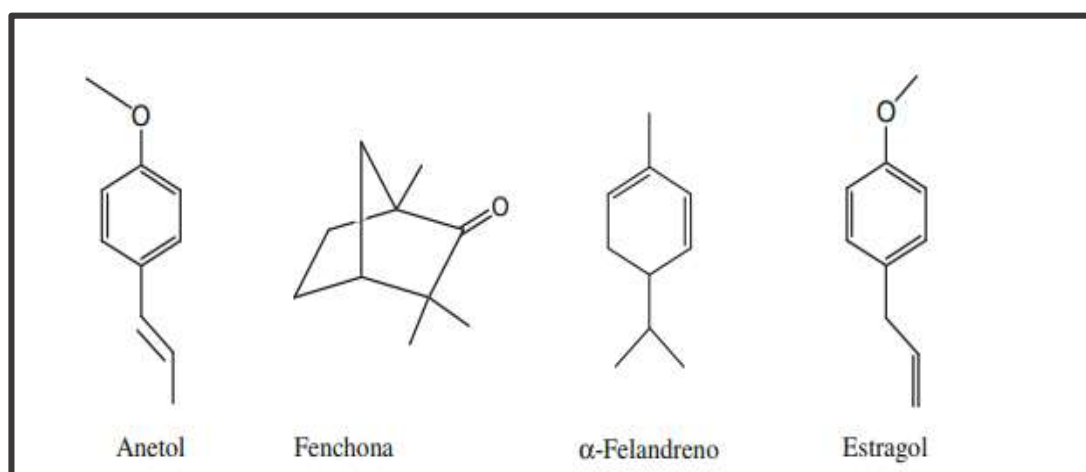
Suas hastes são utilizadas na culinária como legume, enquanto os frutos, vulgarmente chamados de sementes, têm sido empregados desde a mais remota antiguidade na forma de chá medicamentoso no caso de problemas digestivos, como estimulante das funções digestivas, carminativo, antiespasmódico, estimulante da

lactação, além de emenagogo e galactagogo (SIMÕES *et al.*, 1998; BIRDANE *et al.*, 2007; SAVINO, 2005). Em sua constituição química destaca-se o óleo essencial constituído principalmente de anetol (90 – 95%), o que lhe confere o sabor e odor característico do anis, acompanhado de menores quantidades de metilchavil, anisaldeído, linalol e outros derivados terpênicos oxigenados (GUENTHER, 1974; COSTA, 1978; CRAVEIRO, *et al.*, 1981). O óleo essencial extraído dos frutos da planta possui em sua composição o trans-anetol, fenchona e estragol. Também possui compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e taninos (Figura 8) (RAHIMI; ARDEKANI, 2013).

Atividade antimicrobiana e estrogênica estão relacionadas ao anetol, assim como também seu uso como agente antitrombótico devido a sua atividade antiplaquetária e ação vasorelaxante. A infusão das folhas de *Foeniculum vulgare* são usadas tradicionalmente no tratamento da diarreia, bronquite e no tratamento da impotência (SENATORE *et al.*, 2013), também possui atividade antioxidante e hepatoprotetora (GHANEM *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012), é inibidor da genotoxicidade e do estresse oxidativo por ciclofosfamida em ratos (TRIPATHI *et al.*, 2013) e possui efeito antitumoral pela modulação da peroxidação lipídica e aumentando o sistema de defesa em ratos (MOHAMAD *et al.*, 2011).

O uso tradicional do funcho é relatado através da atividade laxante no tratamento de distúrbios digestivos, por aumentar a estimulação da motilidade e em altas concentrações, por sua ação antiespasmódica (KLEIN *et al.*, 2003). Efeito justificado no trabalho de Alexandrovich *et al.* (2003), que realizaram um estudo clínico randomizado em crianças e mostraram que o óleo do funcho se mostrou superior ao placebo na redução de cólicas infantis.

Figura 8 - Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de *Foeniculum vulgare*



Fonte: TINOCO et al (2007)

Diversas atividades biológicas de *F. vulgare* estão relacionadas às substâncias que a compõem, como exemplo, a comprovação da eficácia do anetol. Ensaios de laboratório mostraram a sua atividade inseticida e antifúngica, que além de ser estimulante das funções digestivas, carminativo e espasmolítico; em uso concomitante com substâncias anticancerígenas evitou o aparecimento das reações secundárias próprias da quimioterapia. (SIMÕES *et al.*, 1998). Em um estudo de Coelho-de-Souza *et al.* (2012), o anetol apresentou efeito gastroprotetor em úlceras induzidas por etanol e indometacina, além de aumentar a produção de muco pela mucosa gástrica, o que sugere o seu uso no tratamento de úlceras gástricas. Bokaie et al (2013) realizaram um estudo clínico em mulheres que sofriam de dismenorreia, comparando o uso de uma solução de funcho a 2% e o ácido mefenâmico 250 mg, um anti-inflamatório não estereoidal (AINES), fármaco de referência no tratamento dessas pacientes e foi demonstrada a eficácia do funcho no alívio da dor nessas mulheres.

Assim como a espécie *Matricaria recutita* que faz parte da composição das Gotas Arthur de Carvalho®, o *Foeniculum vulgare* também faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse aos SUS (RENISUS), demonstrando a importâncias dessas espécies vegetais como opções terapêuticas a serem utilizadas pela população, confirmando um potencial efeito terapêutico do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho nas desordens gastrintestinais.

Apesar da comprovação de várias atividades farmacológicas que corroboram para sua indicação de uso, em um estudo de Branco (2001), o extrato hidroalcoólico de *Foeniculum vulgare*, que apresentou significativa toxicidade em ratos em um estudo de 90 dias, o que sugere uma avaliação toxicológica do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho® para garantia de sua segurança como um fitomedicamento.

1.5 Toxicidade não-clínica

Para a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e via pela qual é administrada (LARINI, 1993). A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar algum desequilíbrio, dano grave ou morte (GRAFF, 2006).

Com o intuito de obter dos fitoterápicos o mesmo tratamento dado aos medicamentos alopáticos, deve-se conhecer os problemas relacionados à sua origem, como a complexidade de sua composição e a variabilidade da qualidade das drogas obtidas a partir de uma mesma espécie vegetal, que está relacionada às condições de plantio, processo de coleta, manuseio e processamento da matéria-prima. Assim, as drogas vegetais podem apresentar variações que justificam a necessidade de padronização dos fitoterápicos, para a garantia de eficácia e qualidade dos produtos (KLEIN et al., 2009).

Os fitoterápicos podem ser tão eficazes quanto os medicamentos produzidos com ativos oriundos de síntese química, por isso, a obtenção de um medicamento a partir de uma planta deve preservar a integridade dos princípios ativos, para a garantia do efeito farmacológico da planta, garantindo a constância da ação biológica do fitomedicamento. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos necessita alguns estudos prévios, como aspectos agrônômicos, botânicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e desenvolvimento de metodologias analíticas (KLEIN et al., 2009).

Devemos observar que as plantas medicinais utilizadas em medicamentos contém xenobióticos e as suas biotransformações podem ser potencialmente tóxicas. Em adição aos efeitos imediatos que são correlacionados a ingestão da planta, efeitos em longo prazo podem ser assintomáticos, mas que podem levar a um quadro clínico severo, podendo ser fatal. É possível identificar dois tipos de reações adversas relacionados ao uso de plantas medicinais. A primeira é considerada intrínseca a plantas, cuja toxicidade

pode ser relacionada a uma overdose e/ou interação com outras drogas; a outra pode ser extrínseca, associada ao processo produtivo da droga vegetal, como a identificação incorreta da planta, contaminação, adulteração e outros (LAPA et al., 2007; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os medicamentos fitoterápicos são definidos como produtos com fins medicinais que contém derivado ativo obtido de partes aéreas ou subterrâneas de vegetais ou outro material vegetal. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos ainda são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância da sua qualidade (BRASIL, 2010). A preocupação com a segurança no uso de plantas medicinais tem se transformado em medidas legais que normatizam os estudos toxicológicos para o registro desses produtos. No Brasil, a resolução – RDC 14/2010, dispõe sobre o registro de fitoterápicos, onde para um fitoterápico ser registrado para comercialização no Brasil, ele deve possuir um relatório de eficácia e segurança, um documento técnico onde deve conter todas as informações sobre a segurança e eficácia do produto, comprovados por uma das opções:

- I- Pontuação em literatura técnico-científica;
- II- Ensaios pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia;
- III- Tradicionalidade de uso; ou
- IV- Presença na “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado”, publicada pela ANVISA na IN 5, de 11 de dezembro de 2008, ou suas atualizações (BRASIL, 2010).

Os estudos científicos envolvendo espécies vegetais, suas indicações e contraindicações, podem proporcionar aos fitoterápicos maiores níveis de aceitação, respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica, segurança e qualidade (QUEIROZ, 2008).

A segurança de um medicamento, independentemente de ser um alopático ou fitoterápico, é fundamental para a promoção da saúde, sendo necessária a avaliação toxicológica dos medicamentos para melhor conhecimento dos seus efeitos e evitar as reações adversas aos produtos. Uma etapa do processo de validação de um medicamento antes de ser colocado no mercado são os estudos pré-clínicos, que objetiva comprovar os efeitos adversos, relação dose-resposta e mecanismos de ação em animais. Os estudos de toxicologia pré-clínica são utilizados para indicar previamente a toxicidade ou não de um

fitoterápico antes de ser administrado aos humanos. Logo, a avaliação da toxicidade de um medicamento tem como objetivo conhecer os efeitos nocivos decorrentes das interações das substâncias químicas com o organismo para o estabelecimento de formas seguras para a sua utilização, onde a identificação destes efeitos sejam provenientes de estudos pré-clínicos, clínicos ou epidemiológicos (KLEIN et al., 2009, LAPA et al., 2007; CORREA; ZAMBRONE, 2009).

O registro de fitoterápicos pela ANVISA devem ser realizados de acordo com o “GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE SEGURANÇA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS” que exige que sejam conduzidos os testes de toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas, genotoxicidade para os medicamentos de uso oral e os testes de sensibilização dérmica, irritação cutânea e ocular para medicamentos de uso tópico (BRASIL, 2013).

Nos estudos de toxicidade aguda são utilizados mamíferos roedores em idade adulta, ambos os sexos, com no mínimo 6 animais em cada grupo/sexo. O produto a ser avaliado deve ser administrado por via oral ou parenteral uma única vez e se for necessário, em doses divididas em período não superior a 24 horas e obedecendo a via proposta para o uso em humanos. Os animais são observados em tempos pré-determinados (0, 15 30 e 60 minutos) durante as primeiras 24 horas após a administração e uma vez ao dia, durante 14 dias, observando variação de peso e sinais clínicos, como alterações de comportamento, pele, mucosas, sistemas respiratórios, nervoso central e periférico, entre outros. Os animais que morrem durante o período devem ser necropsiados e os que sobrevivem ao 14 dias, após o período de observação são sacrificados e necropsiados para confirmação de alguma evidência patológica de intoxicação. Nessa etapa, é possível avaliar o risco de uma intoxicação aguda, a DL50 e informações sobre as escolhas das doses sobre o demais ensaios de toxicidade (LAPA et al., 2007, BRASIL, 2004).

O estudo de toxicidade subcrônica (doses repetidas) é realizado antes de um estudo crônico, se for indicação de uso do produto a ser estudado. Neste ensaio, o fitoterápico é administrado diariamente, durante 30 dias, pela mesma via de administração preconizada para seres humanos, com vários grupos de doses diferentes do produto e um grupo controle. São utilizadas duas espécies de mamíferos, de ambos os sexos, com 10 animais em cada grupo. As doses são estabelecidas em pelo menos três etapas: a menor dose que produz efeito terapêutico, maior dose que produza efeito adverso detectável e uma dose intermediária (média geométrica entre a dose maior e

menor). Durante a administração, os animais são observados em relação ao peso corporal e após os 30 dias, exames bioquímicos e hematológicos são realizados, como também um exame macroscópico de todos os órgãos de todos os animais e obrigatoriamente, histopatológico dos animais dos grupos de maior dose e controle. Nessa etapa, é possível determinar os efeitos tóxicos produzidos pelo maior tempo de exposição do produto, permitindo medir a latência para a instalação de efeitos tóxicos, o acúmulo de droga no organismo e modificação dos parâmetros normais dos animais antes da exposição ao produto (LAPA et al., 2007, BRASIL, 2004).

O conhecimento sobre a toxicidade das plantas medicinais é importante para melhor condução do tratamento dos pacientes em causar nenhum risco. Alguns fatos são conhecidos sobre os efeitos tóxicos que as plantas medicinais podem oferecer, como o comprometimento do fígado e danos hepáticos agudos como hepatites causadas por plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos, principalmente envolvendo plantas como a cavalinha (*Teucrium chamaedrys* L.), confrei (*Symphytum officinale* L.), valeriana (*Valeriana officinalis* L.), escuteária chinesa (*Scutellaria ser baicalensis* Georgi), aloe vera (*Aloe barbadensis* Mill.). Há também relato de caso de transplante hepático em uma mulher jovem americana que utilizava suplemento contendo kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst.) (WOOLTORTON, 2002). Há também relatos de nefropatias seguidos de rápida falência renal pela ingestão de plantas chinesas (SILVEIRA et al., 2008).

Podemos observar que vários produtos fitoterápicos que são comercializados no Brasil já dispõem de informações sobre o seu perfil toxicológico. A preparação fitoterápica que contém extrato fluido de *Gossypium herbaceum*, comercializada sob o nome de Tintura de Algodoeiro Cangeri® não provocou sinais de toxicidade quando administradas por via oral durante 30 dias em ratos de ambos os sexos (ETGES, 2007). Gotas preciosas® (formulação que contém *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Peumus boldo* e *Baccharis trimera*) não causou nenhum efeito tóxico em ratos durante 30 dias de tratamento, considerando o fitoterápico um produto inócuo (MELLO et al., 2008).

Amaral (2011) avaliou a toxicidade do fitoterápico “Água Inglesa”, composto das tinturas de *Cinchona calisaya*, *Jateorhiza palmata*, *Centarium erythraea*, *Baccharis trimera*, *Artemisia absinthium*, *Matricaria recutita*, *Cinnamomum cassia*. Esse estudo demonstrou que o fitoterápico não possui toxicidade em camundongos e não possui efeito mutagênico e citotóxico avaliado através do ensaio de micronúcleo.

Outro produto avaliado foi o Cassaú composto®, cuja formulação contém extratos fluidos de *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major* L., *Luehea grandiflora* Mart., *Myrocarpus frondosus* Allemão, *Piptadenia colunbrina* Benth também foi considerado seguro em tratamento subcrônico em ratos de ambos os sexos em até 10 vezes a dose terapêutica indicada pelo fabricante, sem desencadear sinais de toxicidade sistêmica ou alteração de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos (RAUBER, 2006). O mesmo resultado foi encontrado na avaliação toxicológica do fitoterápico Sanativo® (associação dos extratos hidroalcoólicos de angico, aroeira, camapu e mandacaru), sendo considerado seguro com baixo grau de toxicidade por via oral (LIMA, 2006).

Dentre todos os estudos com fitoterápicos que foram citados, é importante salientar que essas informações são necessárias para a comprovação de segurança desses produtos, para que assim, possam ser utilizados pela população, a partir da obtenção de seus registros de comercialização, que devem ser obtidos de acordo com a legislação vigente.

1.6 Legislação de fitoterápicos

A toxicidade de fitoterápicos pode parecer um assunto desnecessário, quando comparada com os medicamentos convencionais, entretanto, sabe-se que este é um grave problema de saúde pública. As plantas medicinais podem levar ao surgimento de reações adversas por interação com alimentos ou outros medicamentos, pelos seus próprios constituintes químicos ou devido a alguns fatores relacionados ao paciente (sexo, idade, características genéticas e outros), como também o uso de fitoterápicos pode comprometer a eficácia de tratamentos com medicamentos convencionais, reduzindo ou aumentando seu efeito (BALBINO; DIAS, 2010). Uma das principais características dos fitoterápicos é a presença de diversos princípios ativos e outras substâncias em uma mesma planta, cujos efeitos terapêuticos estão associados ao efeito sinérgico das substâncias ativas e não isoladamente (AMENI, 2011).

As pesquisas sobre o uso seguro de plantas medicinais no Brasil são desqualificadas, como também o controle de comercialização desses produtos em feiras livres, mercados ou lojas especializadas na área. Podem ocorrer adulterações não declaradas com outras substâncias, provocando o surgimento de efeitos adversos, que também podem vir de contaminações com agrotóxicos, metais pesados e micro-

organismos (BALBINO; DIAS, 2010). Para registrar essas ocorrências, inclusive aquelas reações muito raras, mas severas, um sistema de coleta de dados e a organização, avaliação e posterior divulgação das informações coletadas é de extrema importância (CAPASSO *et al.*, 2000).

Dependendo do país e sua legislação, os fitoterápicos utilizados para diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de doenças são normalmente registrados como drogas. Entretanto, em outros países, incluindo os Estados Unidos, esses produtos são classificados como suplementos dietéticos. Os países que tratam os fitoterápicos como drogas ao fazer o registro, esses produtos precisam provar sua segurança e eficácia. Mas, poucos regulamentos foram estabelecidos para estudar esses critérios, seguindo o proposto pela OMS (CALIXTO, 2000). Embora que os ensaios clínicos com fitoterápicos sejam possíveis de realizar, uma busca mais detalhada mostra que poucos ensaios foram realizados. Alguns fatores podem explicar essa ausência de dados, como a falta de padronização e controle de qualidade de fitoterápicos usados em ensaios clínicos; uso de diferentes doses de fitoterápicos; números de pacientes utilizados são insuficientes para a obtenção de significância estatística; dificuldades em estabelecer placebos apropriados, devido aos aromas e sabores relacionados aos fitoterápicos, alta variação na duração do tratamento utilizando plantas medicinais (CALIXTO, 2000).

Tendo em vista a importância da utilização de fitoterápicos, vários países da Europa estão intensificando esforços para regulamentação de uma legislação referente a essa área, já que os fitoterápicos são amplamente comercializados neste continente (França e Alemanha, principalmente). Já nos Estados Unidos, as preparações de plantas medicinais são classificadas como suplementos nutricionais, não sendo necessário submeter seus dados de eficácia e segurança para o *Food and Drug Administration* (FDA), para a sua comercialização (TUROLLA E NASCIMENTO, 2006).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria n. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a Resolução RDC n. 26 de 2014, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e a IN nº 5/2010, que apresenta a Lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos (BRASIL, 2013).

Com o objetivo de inserir a medicina tradicional no sistema de saúde oficial no Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu no ano de 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que fundamenta as diretrizes para o desenvolvimento de ações para garantir o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, desenvolvimento de tecnologias e inovações e fortalecimento das cadeias e arranjos produtivos, uso sustentável da biodiversidade brasileira e desenvolvimento do complexo produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

Já no ano de 2008, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), que indica as espécies vegetais de interesse do Sistema Público de Saúde e que possam ser utilizadas pela população assistida pelo SUS. A finalidade do RENISUS é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), subsidiar o desenvolvimento da cadeia produtiva das espécies, como regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de fitoterápicos, além de estimular o desenvolvimento e a inovação nessa área (RENISUS, 2009).

O registro de fitoterápicos segue o disposto na Lei nº 6.360/73 regulamentado pelo Decreto nº 79.094/77. Tem como regulamentos específicos a Resolução - RDC nº 48/04, complementada pelas seguintes: Resolução - RE nº 88/04 (Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia), Resolução - RE nº 89 (Lista de registro simplificado), Resolução - RE nº 90/04 (Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica) e Resolução - RE nº 91/04 (Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro).

Esta preocupação com a normatização dos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não faz mal, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos mais aprofundados, como as avaliações farmacológica e toxicológica pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar o uso dos fitoterápicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela

presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Muitas preparações com plantas medicinais ainda precisam de estudos detalhados, como padronização química, testes biológicos *in vitro* e *in vivo* e a avaliação clínica. Para esta última etapa, o controle de qualidade é um item indispensável. Métodos de controle de qualidade de algumas plantas medicinais já validados podem ser encontrados em algumas monografias, por exemplo, nas Farmacopéias Americana, Brasileira e Chinesa (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010).

O registro de medicamentos é o instrumento que determina a sua inscrição na ANVISA, através da avaliação do cumprimento dos parâmetros de eficácia, segurança e qualidade, para a sua introdução no mercado e consumo. O papel da ANVISA como um órgão regulatório dos produtos relacionados à saúde no Brasil, é essencial para evitar que medicamentos nocivos, de má qualidade e ineficazes possam entrar no mercado e trazer consequências graves para a população, como intoxicações, fracassos terapêuticos, agravamento de enfermidades e até mesmo a morte de pacientes. A legislação brasileira considera o registro de fitoterápicos da mesma forma como lida com a legislação dos medicamentos sintéticos, entretanto, há várias dificuldades para o controle de qualidade e comprovação de segurança e eficácia dos fitoterápicos devido à complexidade química das drogas vegetais (NETTO *et al.*, 2006).

Pela importância da avaliação dos aspectos toxicológicos que os fitoterápicos devem ser regidos, as Gotas Artur de Carvalho devem passar pelos testes de toxicidade pré-clínica, para posterior comprovação de segurança de uso. Além dos testes toxicológicos, sabe-se que os fitoterápicos devem também ter comprovação de eficácia, que para o nosso produto em estudo, a realização de ensaios farmacológicos a partir da indicação de uso das GAC.

Diante do exposto, percebe-se a importância da realização do presente trabalho que inclui a avaliação do perfil toxicológico e atividades farmacológicas do fitoterápico. Portanto, os resultados gerados pelo presente estudo certamente contribuirão para o processo de registro do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho junto ao órgão competente e posterior liberação para comercialização.

2 JUSTIFICATIVA

As Gotas Artur de Carvalho[®] é um produto fitoterápico produzido pelo Laboratório Ravick Produtos Químicos e Cosméticos Ltda desde 1941, indicado como anti-espasmódico e estomáquico. Possui como matéria-prima ativa as tinturas de *Matricaria recutita* (camomila), *Gentiana lutea* (genciana) e *Foeniculum vulgare* (funcho). As referidas espécies são aromáticas e amargas e tradicionalmente indicadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Vários estudos (MCKAY *et al.*, 2006; FARM. BRAS. IV Ed., 1996; EUR. FARM., 2004; BLUMENTHAL, 1999; CUNHA, 2005; LORENZI e MATOS, 2002), têm descrito o perfil botânico, químico e toxicológico, além das propriedades farmacológicas, principalmente pré-clínica, de cada espécie vegetal que compõe a fórmula das Gotas Artur de Carvalho[®]. Estudos clínicos, envolvendo preparações com monodrogas são limitados ou inexistentes (MCKAY *et al.*, 2006), sendo mais encontrado estudos clínicos com produtos constituídos pela associação de espécies (Ex.: *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare* e *Melissa officinale* – ColiMil[®]) indicados nas desordens gástricas (SAVINO *et al.*, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2014) orienta que para a possibilidade de registro de fitoterápico é necessário apresentar levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações técnico-científicas ou publicações) que comprove a segurança de uso e a indicação terapêutica. As Gotas Arthur de Carvalho[®] que esteve no mercado farmacêutico, não dispõe de estudos científicos suficientes para solicitar a renovação do seu registro (MS N° 1.0913.0003.001-4) como fitoterápico junto ao órgão competente.

Diante do exposto, percebe-se a importância da realização do presente trabalho que inclui a avaliação do perfil toxicológico e atividades farmacológicas do fitoterápico. Portanto, os resultados gerados pelo presente estudo certamente contribuirão para o processo de registro do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho junto ao órgão competente e posterior liberação para comercialização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança e eficácia farmacológico não clínica do Fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho® para o tratamento de distúrbios gastrintestinais.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar avaliação toxicológica aguda e de doses repetidas das Gotas Arthur de Carvalho® em roedores,
- Investigar a possível citotoxicidade das Gotas Arthur de Carvalho® em neutrófilo humano e células de linhagem HepG2 sobre a membrana plasmática e metabolismo celular,
- Avaliar o efeito do fitoterápico no trânsito intestinal, volume secretório e acidez gástrica em ratos Wistar;
- Investigar a eficácia das Gotas Arthur de Carvalho® em modelo experimental de dispepsia em ratos Wistar;
- Realizar estudo sobre o efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre a diarreia induzida por óleo de rícino em ratos Wistar.
- Determinar a eficácia das Gotas Arthur de Carvalho® em modelo animal de nocicepção visceral com investigação do possível mecanismo de ação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos do projeto de pesquisa foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o número de protocolo 019/08.

4.2. Caracterização do material de estudo

O fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho[®] é composto por tinturas de *Chamomilla recutita* (camomila), *Gentiana lutea* (genciana) e *Foeniculum vulgare* (funcho), fabricado pelo Laboratório Ravick Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda que em parceria entre empresa-Universidade, nos forneceu o material necessário para o nosso estudo.

4.2.1. Determinação dos sólidos totais:

Transfere-se 5 mL das Gotas Arthur de Carvalho após a evaporação do etanol em cadinho previamente tarado e secado em estufa com temperatura de 35° C com circulação de ar por pelo menos 4 horas até que não haja variação no peso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2000). O teor de sólidos totais é calculado em função do volume de líquido de acordo com a equação:

$$\text{Teor de resíduos sólidos (\%; mg/mL)} = \frac{M \text{ (g)}}{V \text{ (mL)}} \times 100$$

Onde,

M é a massa do resíduo;

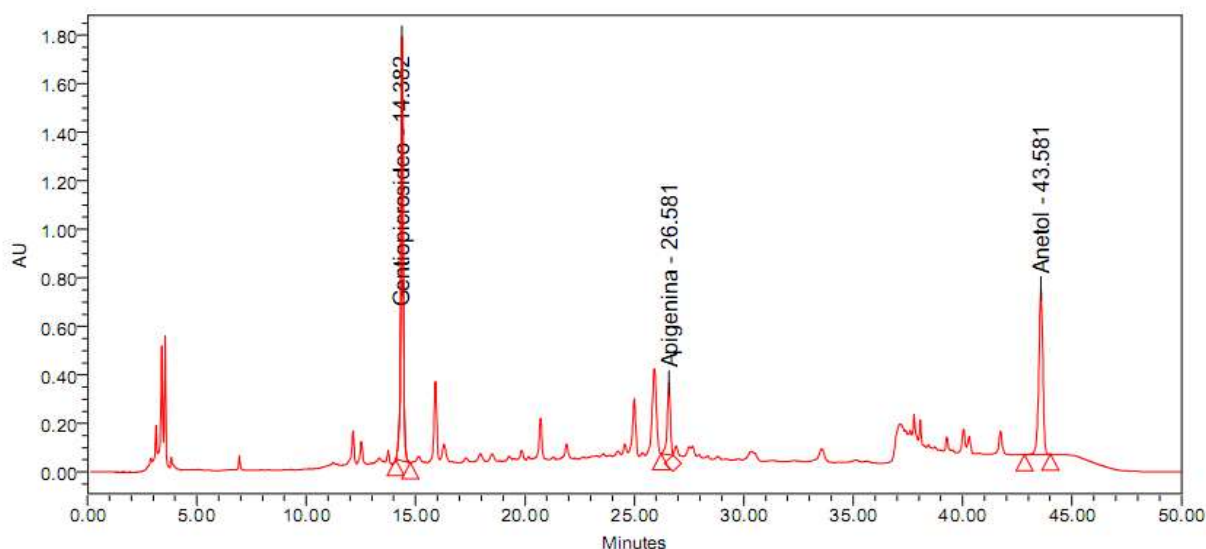
V é o volume do fitoterápico.

Esse método foi realizado em triplicata e o teor de resíduos sólidos calculado a partir da média dos resultados, onde a amostra teve 88mg/mL de sólidos totais, valor utilizado para a determinação das doses dos testes.

4.2.2. Caracterização com análise e determinação do teor Gotas Arthur de Carvalho por CLAE-DAD.

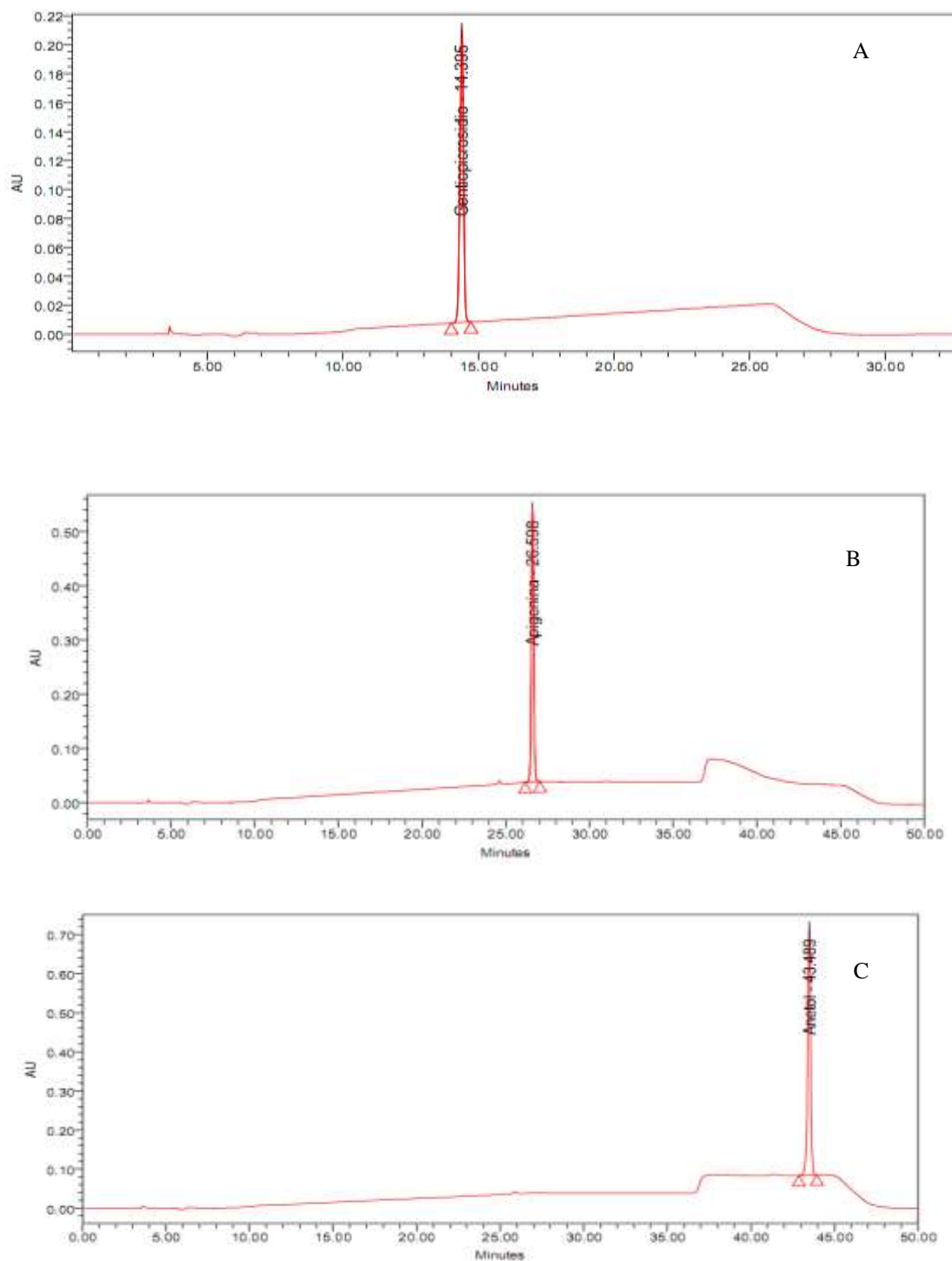
O fitoterápico foi previamente padronizado, através da análise do perfil cromatográfico das Gotas Arthur de Carvalho® foi realizado em triplicata, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Alliance Waters-2996, USA) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) com injetor automático. O método empregado foi validado anteriormente no Laboratório de Farmacognosia-UFC (LEAL *et al.*, 2009), segundo critérios propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE n°899 (BRASIL, 2005). Para a quantificação dos marcadores foram construídas curvas de calibração, empregando-se padrões externos (apigenina-APG, gentiopicrosídeo- GTP e anetol/estragol-ANT/EST), relacionados às respectivas matérias-primas ativas vegetais: tintura de *Matricaria recutita* (camomila), *Gentiana lutea* (gentiana) e *Foeniculum vulgare* (funcho).

Figura 9 - Cromatograma do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho obtido por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).



Condições: coluna RP C8 (250 x 4,6mm, 5 μ m), fase móvel incluindo o emprego de ácido trifluoroacético, acetonitrila e tetraidrofurano; eluição por gradiente, fluxo 1,0 mL/min comprimento de onda 310 nm.

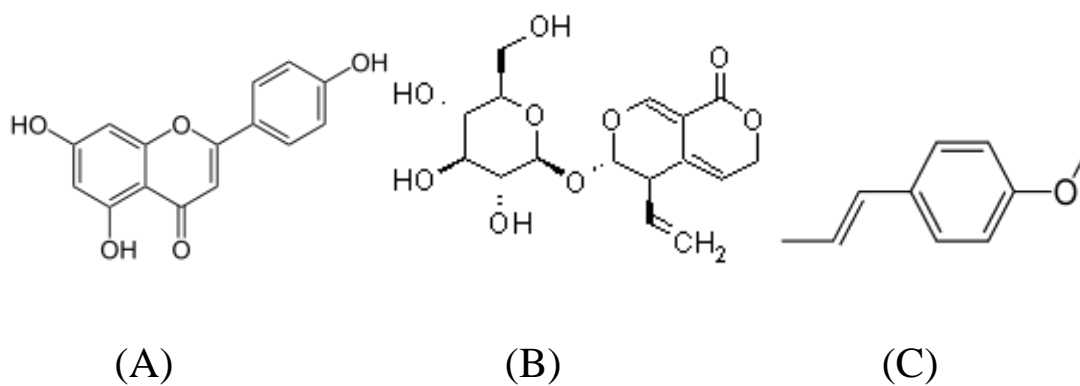
Figura 10 - Cromatogramas dos padrões APG (A), GTP (B) e ANT/EST (C) presentes no fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho obtido por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).



Condições: coluna RP C8 (250 x 4,6mm, 5 μ m), fase móvel incluindo o emprego de ácido trifluoroacético, acetonitrila e tetraidrifurano; eluição por gradiente, fluxo 1,0

mL/min e os comprimentos de onda empregados foram de acordo com a natureza química do marcador.

Figura 11- Estrutura química dos marcadores do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho: Apigenina-7-glicosídeo (A), Gentiopicrosído (B) e Anetol (C).



Fonte: LEAL, 2003.

Tabela 2 – Teor de marcadores químicos (apigenina-7-glicosídeo, gentiopicrosído e anetol/estragol no fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho por CLAE-DAD. Os resultados são expressos em média (DPR%).

Marcadores	Concentração (mg/mL)
Apigenina-7-glicosídeo	0,2225 (0,97%)
Gentiopicrosideo	1,5078 (0,39%)
Anetol/Estragol	0,0540 (2,35%)

4.3 Reagentes

Apigenina, gentiopicosídeo, anetol, L-arginina, brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), LDH, óleo de mostarda, glibenclamida, diazóxido, Triton-X 100 foram provenientes da Sigma-Aldrich (St Louis, MO,USA). A naloxona (cloridrato de naloxona 0,02 mg/mL) e morfina (Dimorf®) - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda; cisplatina (Tecnoplatin® 10mg/20 mL)- Eurofarma; betanecol (Liberan® 5mg) – Laboratórios Apsen; ioimbina- Fagron Ltda, clonidina (Atensina® 0,2 mg)- Boehringer Ingelheim; óleo de rícino- cimetidina- Prati Donaduzzi, ondansetrona (cloridrato de ondansetrona 2mg/mL)- Novafarma, loperamida (Imosec® 2mg)- Laboratório Janssen.

Os kits bioquímicos foram adquiridos da Labtest Diagnóstica (Brasil): Colesterol HDL, Colesterol, Glicose, Triglicérides, Uréia, Creatinina, ALT/TGP, AST/TGO, Lipase e Amilase. Os solventes químicos para CLAE, como acetonitrila, ácido trifluoroacético e tetrahidrofurano foram provenientes da Tedia (Brasil).

4.4 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos *Swiss* (25-30 g) ou ratos albinos *Wistar* (150-250 g) de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos de 8 animais e mantidos em caixas plásticas, onde receberam água e ração *ad libitum* em condições controladas (iluminação em ciclos de claro-escuro de 12 em 12 horas). A alimentação foi retirada 12 h antes dos experimentos, tendo os animais livre acesso à água. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA.

4.5 Estudo Toxicológico do Fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho® (GAC)

Os testes de toxicidade foram realizados segundo orientações da RDC N° 90 (BRASIL, 2004), mas também com observância ao Guia para Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (GESEF, ANVISA, 2010).

4.5.1 Toxicidade aguda das GAC em camundongos.

Camundongos Swiss albinos de ambos os sexos (n=8/grupo) foram tratados com o fitoterápico Gotas Artur de Carvalho®, via oral, nas doses 250, 500, 1000 e 2000 mg/Kg, em um volume de 10mL/Kg de peso. O grupo controle foi tratado com o volume equivalente de água destilada, veículo do produto. Todos os grupos foram observados durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 10, 15, 30, 60, 120, 240 minutos após a administração das drogas e a cada 24 horas durante 14 dias.

Foram investigados parâmetros comportamentais, como: motilidade, frequência respiratória, sedação, catatonía, analgesia, ptose palpebral, resposta ao tato, urina (aumentada, reduzida, coloração), diarreia, contorção, agressividade, grunidos, ereção da cauda, convulsão, coma e morte. Ao fim do período de observação de 14 dias, foi realizada coleta de sangue dos animais dos grupos veículo e GAC 1000 e 2000 mg/kg para avaliação hematológica e bioquímica (parâmetros renais e hepáticos) todos os animais sobreviventes foram sacrificados, os órgãos retirados e posteriormente submetidos à análise histopatológica.

4.5.2 Toxicidade dose repetidas das GAC em ratos.

Ratos Wistar de ambos os sexos (n=8/grupo) foram tratados via oral, durante 30 dias com GAC nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg. O grupo controle recebeu água (veículo). Os animais foram observados durante todo o período de tratamento quanto à ocorrência de algum sinal tóxico, inclusive com registro do seu peso corporal semanalmente no decorrer do tratamento. No início e no 30° dia de tratamento foram coletadas amostras de sangue do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, em

animais anestesiados. As amostras de sangue dos animais em estudo foram coletadas em tubos à vácuo com gel separador para obtenção do soro.

a) Parâmetros avaliados após o tratamento em doses repetidas com as Gotas

Arthur de Carvalho:

Animais em jejum tem seu sangue coletado no início (dia zero) e 31º dia de tratamento com o fitoterápico. As amostras de sangue são coletadas do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, com os animais anestesiados com éter e passaram por avaliações hematológicas e bioquímicas.

- **Parâmetros bioquímicos**

As amostras de sangue dos animais em estudo foram coletadas em tubos a vácuo com gel separador para obtenção do soro. Os exames bioquímicos são determinados através do aparelho analisador bioquímico semi-automático LABQUEST seguindo as orientações do fabricante. Kits de diagnóstico padrão da Labtest® utilizados para avaliação dos seguintes parâmetros: uréia, creatinina, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), amilase, lipase, colesterol total, HDL, triglicerídeos e glicose.

- **Parâmetros Hematológicos**

Para a determinação dos parâmetros hematológicos, o sangue foi coletado em tubos com *ácido etilendiaminoacético* (EDTA), tendo sido investigado os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), variação de tamanho de hemácias (RDW), leucócitos, neutrófilos, neutrófilos segmentados, linfócitos, basófilos, bastonetes, monócitos, eosinófilos e plaquetas. As análises foram realizadas em analisador hematológico.

- **Parâmetros histopatológicos**

Ao final do tratamento, no 31º dia, os animais de todos os grupos foram anestesiados e após a eutanásia dos animais, os mesmos foram necropsiados. Realizou-se

a coleta dos seguintes órgãos: rins, fígado, estômago, intestino grosso, intestino delgado, cérebro, coração e pulmão.

Estes órgãos são fixados em formol tamponado (10%), os fragmentos processados e incluídos em parafina, cortado e corado com hematoxilina-eosina para observação de possíveis alterações histopatológicas decorrentes do tratamento com as Gotas Arthur de Carvalho. A análise histopatológica foi realizada pela Profa. Dra. Márcia Pitombeira, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

4.5.3 Avaliação da citotoxicidade das GAC[®] em neutrófilo humano: teste do LDH e MTT

Polimorfonucleares (PMFs) obtidos do fracionamento de *buffy-coat*, predominantemente neutrófilos, (80-90%) foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará e isolados de acordo com Lucisano & Mantovani (1984). O sangue é centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com solução salina, utilizando solução de gelatina a 2,5% para separação dos componentes celulares sanguíneos.

A citotoxicidade das Gotas Arthur de Carvalho foi mensurada através de ensaios que avaliarão seu efeito sobre a integridade da membrana celular (LDH-lactato desidrogenase), atividade metabólica (MTT) e viabilidade celular (ensaio de exclusão de Azul de Tripán).

a) Teste de citotoxicidade por Azul de tripán (Renzi *et al.*, 1993)

A viabilidade celular será determinada através do ensaio de exclusão por Azul de Tripán onde neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ céls/ml) são incubados por 15 min a 37° C na presença de GAC (1,10,40,100 e 400µg/mL), veículo, Hanks e Triton X-100. A seguir, os tubos de reação são centrifugados a 755 x g, por 10 min a 4° C. Os sobrenadantes descartados e os sedimentos de células suspensos em 200 µL de solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina. Uma alíquota dessa suspensão é misturada com igual volume de Azul de Tripán preparado a 0,1% em NaCl 0,15 M e transferida pela câmara de Neubauer. O corante é incorporado apenas pelas células não-viáveis, com lesão na

membrana plasmática. A proporção de células viáveis é estimada pela contagem de 200 células em microscópio óptico.

b) Teste de citotoxicidade por LDH em neutrófilos humanos

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ céls/mL) foram incubados por 15 min a 37° C na presença de GAC (1, 10, 100, 600 e $1000\mu\text{g/mL}$, Veículo (água destilada), Hanks e Triton X-100 0,2%. A seguir os tubos são centrifugados a $755 \times g$ por 10 min a 4° C, os sobrenadantes transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, liberada quando as células sofrem lesão. Este ensaio é realizado utilizando o kit LDH (Liquiform®) e baseia-se na medida do decréscimo da absorbância em 340 nm. Alíquotas de 250 μL de substrato são pré-incubadas por 3 min a 37° C. Adiciona-se 25 μL da amostra de sobrenadante, homogeneiza e realiza a leitura da absorbância em 340 nm nos tempos de 1 e 3 min a 37° C no espectrofotômetro. A atividade do LDH é calculada seguindo as especificações do fabricante:

$$A = [(A1 - A2/2)] \times 1746,03$$

Onde:

A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1 = absorbância inicial (1 min) a 340 nm

A2 = absorbância final (3 min) a 340 nm;

1746,03 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostras de 25 μL .

A toxicidade das Gotas Arthur de Carvalho será avaliada em 3 experimentos independentes, realizados em triplicata.

c) Teste de citotoxicidade por MTT (Mosmann, 1983)

É um método colorimétrico para determinar a viabilidade celular e se baseia no fato do MTT, um sal de coloração amarela, ser reduzido pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase que forma parte da cadeia respiratória da mitocôndria, ao sal de Formazan, de cor roxa. A ausência do MTT indica uma diminuição da atividade metabólica celular, ou seja, na viabilidade celular.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ céls/mL) são incubados por 15 min a 37°C na presença de GAC (0,1, 1,6 e $10\mu\text{g/mL}$), veículo (água destilada), Hanks e Triton X-100 0,2% em placas de 96 poços e com atmosfera de CO_2 . Decorrido esse período, a placa é centrifugada a 2000 rpm por 15 min a 25°C e o sobrenadante descartado e incubado em uma nova solução contendo 10% de MTT (10mg/mL), incubado por mais 3 hs. Por fim, a placa é centrifugada novamente nas mesmas condições, o sobrenadante descartado e adicionado $150\ \mu\text{L}$ de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan. As placas são então agitadas durante 15 min com o auxílio de um agitador de placas e a absorbância medida em leitor de microplacas a 540 nm. Os experimentos são realizados em quintuplicata e repetidos em 3 dias diferentes.

d) Determinação da toxicidade pelo método do MTT em células HEPG-2. (PENG *et al.*, 2005)

A determinação da citotoxicidade na presença das Gotas Arthur de Carvalho foi realizado através do método de MTT que se baseia no uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium). Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas. Células de fígado humano, linhagem HEPG2, cultivadas em cultura de monocamada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Inicialmente, as células são removidas da incubadora, levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos (96 poços). As células são plaqueadas na concentração de $7,5 \times 10^4$ células/mL e as concentrações utilizadas do fármaco foram 400, 1000, 200, 4000 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por 24 h. Após esse período será retirado o meio com excesso de fármaco e adicionada uma solução de MTT na concentração de 5 mg/mL. A cultura é conduzida à incubadora por 4 horas. Após o período de incubação, as células foram removidas da estufa de CO_2 e os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos pela adição de isopropanol. A leitura das placas será determinada por um sistema espectrofotométrico de microplacas (ELISA) Synergy HT Biosystems no comprimento de onda (λ) 560 nm descontando-se a absorbância de fundo ($\lambda = 690\ \text{nm}$).

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS GOTAS ARTHUR DE CARVALHO NO SISTEMA GASTRINTESTINAL

4.6.1. Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® no trânsito intestinal normal em camundongos (Stickney&Northup, 1959).

Camundongos Swiss, machos, 25-30g, em jejum de sólidos de 12h, foram divididos em grupos de 8 animais cada e tratados, via oral, com veículo (água destilada) ou Gotas Arthur de Carvalho® (GAC), nas doses de 100, 200 ou 400mg/kg, em um volume de 10mL/kg. Morfina, agonista opióide, foi utilizado como controle positivo na dose de 2,5mg/kg, por via subcutânea. Após 60 minutos dos tratamentos orais (veículo ou GAC) e 30 minutos da administração da morfina, os animais receberam, por via oral, o marcador, uma mistura de 10% de carvão ativado e 5% de goma arábica em água destilada, em um volume de 10mL/kg. Decorridos 30 minutos da administração do marcador, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e removidos o estômago e o intestino até o reto. Realizou-se então a medida do comprimento total do intestino (da região gastropilórica até a junção ileocecal) e a distância percorrida pelo marcador que contivesse pelo menos 1 centímetro contínuo de marcador. A porcentagem de percurso do marcador foi calculada em função do comprimento total do intestino pela seguinte fórmula:

$$\text{Trânsito Intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo marcador}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

4.6.2. Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre o trânsito gastrointestinal induzido por betanecol em camundongos (Stickney&Northup, 1959).

Camundongos Swiss, machos, 25-30g, em jejum de sólidos de 12h, foram divididos em grupos de 8 animais cada e tratados, via oral, com água destilada, Gotas Arthur de Carvalho®, nas doses de 100, 200 ou 400mg/kg, ou atropina na dose de 5mg/kg, em um volume de 10mL/kg. Após 60 minutos dos tratamentos orais os animais receberam betanecol (10mg/kg, s.c.), um agonista muscarínico de ação direta, e após 60 minutos todos os animais receberam, por via oral, o marcador do trânsito intestinal, uma mistura de 10% de carvão ativado e 5% de goma arábica em água destilada, em um volume de 10mL/kg (Baggio et al., 2009). Decorridos 30 minutos da administração do marcador, os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, e removidos o estômago e o intestino até o reto. Realizou-se então a medida do comprimento total do intestino (da

região gastropilórica até a junção ileocecal) e a distância percorrida pelo marcador que contivesse pelo menos 1 cm contínuo de marcador. A percentagem de percurso do marcador foi calculada em função do comprimento total do intestino pela seguinte fórmula:

$$\text{Trânsito Intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo marcador}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

4.6.3. Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre o volume secretório e acidez gástrica total em ratos com ligadura pilórica (Shay et al., 1954).

Ratos Wistar, machos, pesando entre 200-250g, em jejum de sólidos de 12 horas, foram divididos em grupos de 6 animais cada e anestesiados com xilazina (10mg/kg, i.p.) e ketamina (90mg/kg, i.p.). Após a anestesia, a cavidade abdominal foi aberta cirurgicamente e realizada a ligadura pilórica com fio de algodão. Imediatamente após a ligadura pilórica, foi administrado, por via intraduodenal, veículo (água destilada), Gotas Arthur de Carvalho® (100, 200 e 400mg/kg) ou cimetidina (2mg/kg). Foi realizada sutura para o fechamento da cavidade abdominal, os animais foram alocados em gaiolas e após 4 horas da ligadura pilórica, os animais foram sacrificados. A cavidade abdominal foi aberta, a cárdia foi amarrada, com auxílio de fio de algodão, para evitar a perda do conteúdo gástrico, e o estômago retirado, lavado externamente com salina, e aberto pela grande curvatura e coletado o conteúdo gástrico em tubo de ensaio. O volume obtido foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante do suco gástrico foi coletado e transferido para a proveta para determinação do volume de suco gástrico (mL). A acidez gástrica total foi determinada através da titulação de todo o conteúdo de suco gástrico com NaOH 0,1 N utilizando-se fenolftaleína como indicador ácido-base.

4.6.4. Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho no modelo animal de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda (KIMBALL et al., 2005; LAIRD et al., 2001).

Camundongos *Swiss* machos (n=8/grupo) foram tratados com veículo (água, 10ml/kg, v.o.), Gotas Arthur de Carvalho (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.) 30 min antes do óleo de mostarda intracolônico (0,75% em salina 0,9%; 50 µL/animal). O número de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen,

piloereção, arrastar o abdômen contra o solo, contorção e retração abdominais) foram contados por 20 minutos imediatamente após a instilação de óleo de mostarda. Um grupo controle normal que recebe apenas salina por via intracolônica foi incluído no estudo.

4.6.4.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (água destilada; 10ml/kg, v.o.), Gotas Arthur de Carvalho (400 mg/kg,v.o.) ou morfina (5mg/kg, s.c.) 1 hora antes de receberem óleo de mostrada intracolônica (0,75% em salina 0,9%, 50µL/animal) através de uma cânula fina com ponta arredondada, com 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula via intracolônica para a injeção do óleo de mostarda e utilizada vaselina sólida no local para evitar a estimulação da região perianal pela administração. O papel do sistema opióide foi avaliado pela administração de naloxona (2mg/kg, i.p.) 30 min., antes da morfina ou concomitantemente com as GAC.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retrações abdominais) foi contado por 20 minutos após a administração intracolônica do óleo de mostarda.

4.6.4.2. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (água destilada; 10ml/kg, v.o.), Gotas Arthur de Carvalho (400 mg/kg,v.o.) ou clonidina (0,1mg/kg, i.p.) 1 h antes de receberem óleo de mostrada intracolônica (0,75% em salina 0,9%, 50µL/animal) através de uma cânula fina com ponta arredondada, com 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula via intracolônica para a injeção do óleo de mostarda e utilizada vaselina sólida no local para evitar a estimulação da região perianal pela administração. O papel do sistema adrenérgico foi avaliado pela administração de ioimbina (2mg/kg, i.p.) 30 min. antes da clonidina ou concomitantemente com as GAC.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retrações abdominais) foi contado por 20 minutos após a administração intracolônica do óleo de mostarda.

4.6.4.3. Estudo do envolvimento dos canais de K⁺

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (água destilada; 10ml/kg, v.o.), Gotas Arthur de Carvalho (400 mg/kg,v.o.) ou diazóxido (10mg/kg, i.p.) 1 h ou 30 min. antes de receberem óleo de mostarda intracolônica (0,75% em salina 0,9%, 50µL/animal) através de uma cânula fina com ponta arredondada, com 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula via intracolônica para a injeção do óleo de mostarda e utilizada vaselina sólida no local para evitar a estimulação da região perianal pela administração. O papel dos canais de K⁺ foi avaliado pela administração de glibenclamida (2mg/kg, i.p.) 30 minutos., antes do diazóxido ou concomitantemente com as GAC.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retrações abdominais) foi contado por 20 minutos após a administração intracolônica do óleo de mostarda.

4.6.5 Efeito das Gotas Arthur de Carvalho na avaliação da atividade motora: teste do campo aberto (CAPAZ et al., 1981)

A atividade motora espontânea dos animais foi determinada através no ensaio do campo aberto, para determinar a atividade sedativa/depressora no Sistema Nervoso Central, utilizando um campo aberto quadrangular, de 30 cm de lado, com demarcações de 9 quadrados iguais de 10 cm.

Camundongos foram separados em 5 grupos de 8 animais, distribuídos:

Grupo I - veículo (água destilada, 10mg/kg, v.o.),

Grupo II - salina (solução 0,9%, 50 µL, v.o.),

Grupo III -GAC (400 mg/kg, v.o.),

Grupo IV - GAC 400 mg/kg + óleo de mostarda (0,75%, 50 µL, i;c.)

Grupo V – veículo + óleo de mostarda (0,75%, 50 µL, i.c.).

Os animais foram levados ao campo aberto, ambientados por 1 min e em seguida observados durante 4 minutos quanto ao número de campos explorados, quantidades de bolos fecais e os fenômenos de *grooming* e *roaring* (coçar o focinho e levantar as duas patas dianteiras).

4.6.6 Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho no modelo animal de dispepsia (VERA *et al.*, 2006 modificado)

Para a avaliação do efeito das GAC sobre a dispepsia, animais foram experimentados sobre o parâmetro “*pica*” (em inglês, que significa o comportamento de ingestão de substâncias não-nutritivas), parâmetro observado em roedores com indução de êmese. Nessa etapa foi preparada um tipo de ração especial: ração de caolim (pellets-1% de goma arábica/água e caolim) para a mensuração desse comportamento.

Ratos *Wistar* machos, pesando entre 250-300g, foram divididos em grupos de 6 animais cada e acondicionados individualmente em gaiolas de polipropileno. Uma semana antes de começar o experimento, os animais foram habituados ao isolamento e à ração de caolim, assim como o ambiente e à manipulação. Após esse período de adaptação, os animais receberam no dia 1, às 9 horas da manhã, veículo (água 10 mg/kg, v.o.), Gotas Arthur de Carvalho® (GAC, 100, 200 e 400mg/kg, v.o.) ou ondansetrona – antagonista dos receptores 5-HT₃, utilizada clinicamente como agente antiemético - (1mg/kg, v.o.) e imediatamente após cisplatina – agente quimioterápico, que possui a êmese como principal efeito adverso - (1 mg/kg; i.p.). Aos animais foi oferecido ração padrão e ração de caolim previamente pesadas e colocadas separadamente nas gaiolas. Após o período de 7 dias, os animais receberam novamente a administração das drogas e veículo (cisplatina, GAC e ondansetrona), sendo repetido durante 5 semanas.

Diariamente foi registrado o consumo (em gramas) de ração padrão e de ração de caolim. A pesagem corporal dos animais foi realizada semanalmente. No final da 5ª semana, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, pesados e determinado o volume de conteúdo gástrico.

4.6.7. Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a diarreia induzida por óleo de rícino (IZZO *et al.*, 1992).

Camundongos Swiss, machos, mantidos em jejum de sólidos de 12 horas antes do início do experimento foram divididos em grupo de 8 animais. O controle (água destilada, 10ml/kg) e as Gotas Arthur de Carvalho (100, 200 e 400mg/kg) e loperamida – antidiarréico, que atua agonista opióide - (20mg/kg), usado como controle positivo do experimento, foram administrados por via oral e decorridos 60 minutos, os animais receberam óleo de rícino (0,2 ml/animal, v.o.). Os animais foram colocados em caixas

individuais e 2 horas após a administração de óleo de rícino foram registradas as quantidades de fezes, em mg, eliminadas de cada animal, bem como a perda de peso corpóreo. A quantidade de fezes eliminada foi registrada em termos da quantidade de fezes eliminada por quilo de peso corpóreo do animal.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 4.0 (USA). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student, comparação entre duas médias, ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey e Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade das Gotas Artur de Carvalho em roedores

5.1.1 Toxicidade aguda em camundongos

5.1.1.4 Observação clínica:

Na avaliação da toxicidade aguda do fitoterápico GAC (250 a 2000 mg/Kg, v.o.) em camundongos de ambos os sexos foi observado que o grupo tratado com a menor dose não apresentou a alteração de comportamento durante todo o período observação (14 dias) em relação ao controle (Tabela 3). Para os animais tratados com as GAC na dose de 500mg/kg, apenas um animal (16,7 %) apresentou letargia 30 minutos após o tratamento, sendo esse sinal não mais observado aproximadamente 120 minutos após o tratamento. Na mesma dose as fêmeas (33,3%) apresentaram diarreia 30 minutos após o tratamento, que manteve-se até 24 horas após o tratamento.

Diarreia, analgesia e piloereção foram sinais observados nas fêmeas tratadas com as GAC na dose de 500 e 1000 mg/kg. Contudo, foram revertidos 3 horas após o início do tratamento.

Na dose mais alta (2000 mg/kg), todos os camundongos machos apresentaram piloereção e comportamento letárgico. Enquanto, nessa mesma dose, as fêmeas apresentaram respiração ofegante, comportamento letárgico e sem resposta a estímulos externos. Entretanto, não foi observada morte de nenhum animal em nenhuma das doses testadas, o que nos leva a estimar que a DL_{50} das Gotas Arthur de Carvalho seja superior a 2000mg/kg, por via oral, em camundongos.

Tabela 3 - Sinais clínicos de toxicidade aguda observados em camundongos após a administração oral de Gotas Arthur de Carvalho.

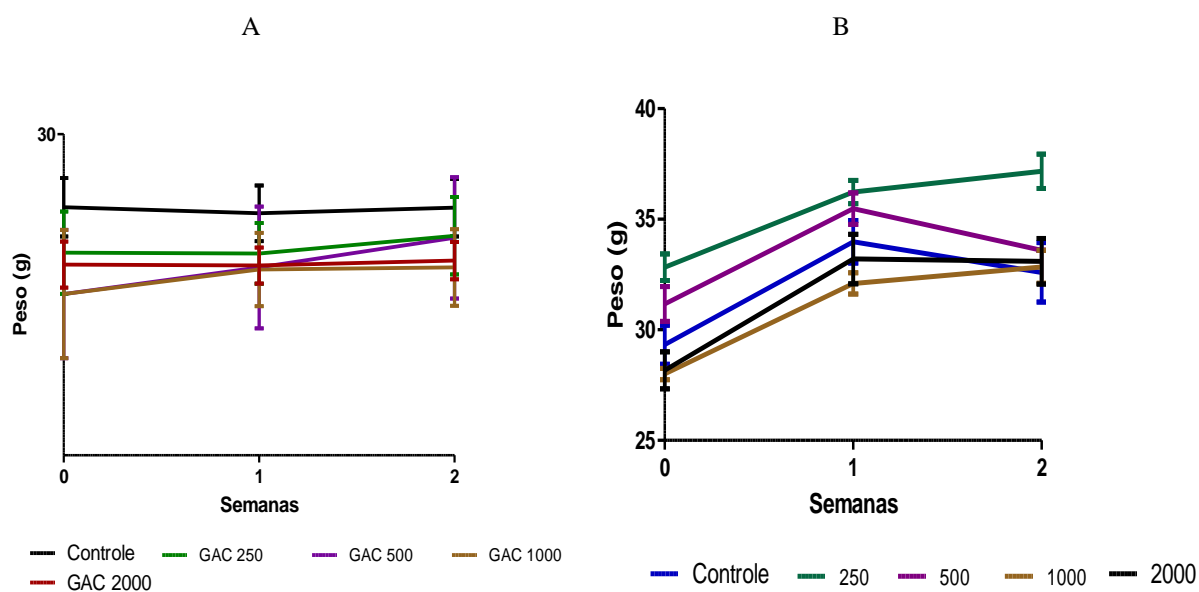
Dose (mg/kg)	Sexo	T/M	Sinais clínicos de toxicidade observados/ Duração: Início -término (min)
250	M	6/0	-
	F	6/0	-
500	M	6/0	Sonolência / 30-120
	F	6/0	Diarréia / 30
1000	M	6/0	Reflexo alterado, analgesia,diarreia / 30-180
	F	6/0	Piloereção e diarreia /15-180
2000	M	6/0	Piloereção, letargia, analgesia / 30-120
	F	6/0	Piloereção, letargia, analgesia / 30-120

M: camundongos machos. F: camundongos fêmeas. T/M: número de animais tratados/número de mortos. Número de animais: n=6. Os animais foram observados em vários instantes nas primeiras 24 horas após o tratamento e período total de 14 dias de observação.

5.1.1.5 Desenvolvimento ponderal dos animais:

A Figura 12 mostra a evolução de peso corpóreo dos camundongos de ambos os sexos tratados de forma aguda com as Gotas Arthur de Carvalho®. Observou-se que durante os 14 dias de observação após tratamento com o fitoterápico, os camundongos fêmeas não houve perda ou ganho de peso corpóreo significativos, em relação ao controle durante os 14 dias de observação após o tratamento com as GAC (250-2000 mg/kg, v.o.). Em relação aos camundongos machos, estes mostraram um perfil de ganho de peso comparável ao grupo controle, porém após a primeira semana apenas o grupo tratado com GAC – 2g/Kg manteve crescente o ganho de peso, enquanto os demais grupos decresceram à semelhança do controle, ou mantiveram-se praticamente com mesmo peso corporal ao final da segunda semana.

Figura 12 - Evolução ponderal de camundongos submetidos à avaliação da toxicidade aguda do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho (GAC).



Os animais foram pesados semanalmente. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da variação de peso em gramas após 14 dias de observação. A: fêmeas. B: machos

5.1.2.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Diante dos sinais clínicos observados pelo tratamento dos animais com as GAC (250-2000mg/kg, v.o.), os estudos de toxicidade aguda prosseguiram com a avaliação dos efeitos do fitoterápico administrados nas maiores doses sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais. Nesse contexto, não foram observadas alterações bioquímicas significativas dos grupos testados em relação ao grupo controle, com exceção para os níveis de glicose dos camundongos machos tratados com a maior dose, que mostraram um aumento na glicemia ($151,2 \pm 4,4$ mg/dL) em relação ao controle ($117,2 \pm 9,6$ mg/dL), com um incremento da ordem de 29% (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos das Gotas Arthur de Carvalho sobre parâmetros bioquímicos de camundongos de ambos os sexos na toxicidade aguda com as Gotas Arthur de Carvalho®.

PARÂMETROS	SEXO	CONTROLE	GAC 1000 mg/kg	GAC 2000 mg/kg
GLICOSE (mg/dl)	f	$94,33 \pm 1,80$	$97,00 \pm 4,20$	$95,83 \pm 12,31$
	m	$117,2 \pm 9,63$	$135,8 \pm 7,23$	$151,2 \pm 4,43^*$
URÉIA (mg/dl)	f	$39,50 \pm 2,02$	$39,50 \pm 3,67$	$36,00 \pm 3,09$
	m	$33,67 \pm 1,38$	$41,50 \pm 1,89$	$42,50 \pm 4,20$
CREATININA (U/L)	f	$0,4433 \pm 0,021$	$0,3733 \pm 0,023$	$0,3733 \pm 0,023$
	m	$0,3217 \pm 0,062$	$0,4083 \pm 0,064$	$0,3183 \pm 0,018$
AST / TGO (U/L)	f	$89,17 \pm 4,05$	$96,50 \pm 4,10$	$97,50 \pm 5,29$
	m	$93,33 \pm 4,91$	$88,83 \pm 3,00$	$97,17 \pm 6,77$
ALT/TGP (U/L)	f	$53,50 \pm 7,79$	$52,33 \pm 4,32$	$66,33 \pm 5,10$
	m	$38,17 \pm 4,11$	$27,00 \pm 2,03$	$28,83 \pm 3,06$

Valores expressos como média \pm E.P.M. dos grupos com 8 animais cada. Machos e fêmeas são representados como m e f, respectivamente. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, teste de Tukey).

Tabela 5 - Efeitos das Gotas Arthur de Carvalho sobre parâmetros hematológicos de camundongos de ambos os sexos na toxicidade aguda com as Gotas Arthur de Carvalho®.

PARÂMETROS	SEXO	CONTROLE	GAC	
			1000 mg/kg	2000 mg/kg
HEM (g/dL)	f	8,52 ± 0,136	8,71 ± 0,376	7,95 ± 0,42
	m	8,54 ± 0,17	8,75 ± 0,18	8,43 ± 0,23
HGB (g/dL)	f	13,92 ± 0,24	14,10 ± 0,89	13,28 ± 0,72
	m	13,77 ± 0,36	14,28 ± 0,41	13,68 ± 0,48
HTC (%)	f	46,40 ± 0,59	46,53 ± 0,59	43,65 ± 2,79
	m	48,12 ± 1,59	48,98 ± 1,52	46,32 ± 1,70
VCM (fL)	f	54,43 ± 0,31	53,30 ± 0,82	54,80 ± 1,22
	m	56,24 ± 0,98	55,90 ± 0,73	54,88 ± 0,82
HCM (g/dL)	f	16,32 ± 0,14	16,15 ± 0,36	16,70 ± 0,44
	m	16,10 ± 0,14	16,31 ± 0,20	16,22 ± 0,23
CHCM (g/dL)	f	30,35 ± 0,30	30,28 ± 0,34	30,48 ± 0,55
	m	28,64 ± 0,28	29,17 ± 0,17	29,55 ± 0,16*

PARÂMETROS	SEXO	CONTROLE	GAC	
			1000 mg/kg	2000 mg/kg
RDW (%)	f	11,92 ± 0,47	13,80 ± 1,13	12,90 ± 1,17
	m	11,27 ± 0,27	11,60 ± 0,04	12,13 ± 0,42
LEU (10 ³ /μL)	f	2600 ± 0,29	3075 ± 0,47	3600 ± 0,17
	m	3883 ± 673,5	3450 ± 520,7	2883 ± 199,0
NEU (10 ³ /μL)	f	16,67 ± 1,83	15,50 ± 2,21	18,25 ± 1,79
	m	24,17 ± 2,08	15,33 ± 1,20*	8,83 ± 1,01*
BST (10 ³ /μL)	f	0	0	0
	m	0	0	0
SEG (10 ³ /μL)	f	16,67 ± 1,83	15,50 ± 2,21*	18,25 ± 1,79*
	m	24,17 ± 2,08	15,33 ± 1,20	8,83 ± 1,01
LIN (10 ³ /μL)	f	81,17 ± 2,27	81,50 ± 2,39	77,75 ± 2,1
	m	66,00 ± 4,95	82,17 ± 1,30*	88,67 ± 0,98*

MON (10 ³ /μL)	f	1,83 ± 0,30	2,50 ± 0,64	2,75 ± 0,47
	m	3,66 ± 0,42	2,16 ± 0,40*	2,16 ± 0,30*
EOS (10 ³ /μL)	f	0,50 ± 0,22	0,50 ± 0,28	0,75 ± 0,25
	m	0,667 ± 0,33	0,334 ± 0,21	0,334 ± 0,21
BAS (10 ³ /μL)	f	0	0	0
	m	0	0	0
PLT (10 ³ /μL)	f	978,0 ± 87,19	910,0 ± 123,1	1162 ± 251,1
	m	1285 ± 143	1260 ± 80,1	1291 ± 96,81

Valores expressos como média ± E.P.M. dos grupos com 8 animais cada. Machos e fêmeas são representados como m e f, respectivamente. * p< 0,05 vs controle (ANOVA, teste de Tukey).

5.1.2 Toxicidade de doses repetidas das Gotas Arthur de Carvalho em ratos

5.1.2.1 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Com base nos resultados obtidos no estudo de toxicidade aguda e considerando os guias para estudos de toxicidade não-clínica (BRASIL, 2010), foi realizado o estudo de toxicidade de doses repetidas com o tratamento diário dos animais de ambos os sexos com as GAC, por via oral, nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg durante 30 dias. Durante este período, os ratos submetidos ao tratamento apresentaram aspecto sadio, bom estado geral, sem ocorrência de qualquer alteração do aspecto físico das mesmas. O tratamento dos animais (machos e fêmeas) com as Gotas Arthur de Carvalho® por via oral durante 30 dias, não alterou o desenvolvimento ponderal dos animais, pois não houveram diferenças significativas dos grupos tratados com o fitoterápico (250, 500 e 1000 mg/kg) em relação ao grupo controle como pode ser observado na Figura 13.

O tratamento subcrônico dos animais com as GAC (250 – 1000 mg/Kg) promoveu um maior número de alterações bioquímicas nas fêmeas em relação aos machos. As fêmeas tratadas principalmente com a maior dose de GAC, mostraram aumento significativo no nível de glicose ($97,38 \pm 4,88$) e redução de triglicérides ($30,13 \pm 2,99$) e de amilase ($556,7 \pm 34,3$) quando comparados ao grupo controle ($71,38 \pm 5,13$; $43,13 \pm 4,71$; $563,2 \pm 31,3$, respectivamente). Em relação aos machos, estes tratados com maior dose apresentaram um aumento na glicemia ($114,3 \pm 9,76$) em relação ao controle ($83,29 \pm 3,16$) (Tabela 6). Em algumas circunstâncias embora o tratamento com GAC tenha induzido alterações em parte dos parâmetros bioquímicos investigados, estas mantiveram-se dentro da faixa de normalidade (para fêmeas, valor de referência dos níveis de glicose 59,59 - 107,15 e para machos para o mesmo parâmetro: 75,57-126.65), baseado em valores de referência em estudo anterior do nosso laboratório (LEAL et al., 2003).

Tabela 6 - Efeitos das Gotas Arthur de Carvalho sobre parâmetros bioquímicos de ratos após serem submetidos ao tratamento diário com as Gotas Arthur de Carvalho® durante 30 dias.

PARÂMETROS	SEXO	CONTROLE	GAC 250 mg/kg	GAC 500 mg/kg	GAC 1000 mg/kg
GLICOSE (mg/dl)	f	71,38 ± 5,13	106,1 ± 4,17*	88,86 ± 4,69	97,38 ± 4,88*
	m	83,29 ± 3,16	80,63 ± 4,57	85,38 ± 5,71	114,3 ± 9,76*
URÉIA (mg/dl)	f	48,63 ± 2,07	52,38 ± 4,17	46,43 ± 1,25	46,50 ± 2,37
	m	59,00 ± 1,46	47,75 ± 1,63	60,88 ± 1,02	53,57 ± 2,19
CREATININA (U/L)	f	0,7275 ± 0,036	0,6725 ± 0,02	0,759 ± 0,31	0,7775 ± 0,04
	m	0,729 ± 0,047	0,7375 ± 0,02	0,800 ± 0,02	0,7571 ± 0,03
COLESTEROL (mg/dl)	f	41,75 ± 2,76	54,00 ± 4,47	48,57 ± 5,69	49,75 ± 4,12
	m	69,57 ± 2,61	73,38 ± 4,37	72,13 ± 3,21	65,71 ± 5,13
HDL (mg/dl)	f	57,88 ± 3,79	64,25 ± 3,57	56,71 ± 4,42	60,50 ± 3,41
	m	59,57 ± 2,24	62,38 ± 4,32	62,00 ± 2,63	55,29 ± 5,35
TRIGLICÉRIDES (mg/dl)	f	43,13 ± 4,71	37,38 ± 2,80	30,57 ± 2,33	30,13 ± 2,99*
	m	103,6 ± 5,56	103,4 ± 7,17	80,38 ± 6,50	83,71 ± 5,97
TGO (U/L)	f	70,00 ± 4,49	54,25 ± 2,73*	58,14 ± 3,18	53,00 ± 2,58*
	m	100,7 ± 4,69	93,88 ± 2,74	105,4 ± 4,98	92,43 ± 4,13
TGP (U/L)	f	19,88 ± 2,20	17,13 ± 1,09	21,29 ± 1,17	20,00 ± 1,85
	m	35,00 ± 1,83	31,50 ± 1,44	38,75 ± 1,20	33,57 ± 1,71
AMILASE (U/L)	f	563,2 ± 31,3	593,6 ± 31,57	480,6 ± 43,17	556,7 ± 34,36
	m	937,1 ± 33,86	893,9 ± 30,61	852,4 ± 21,31	964,1 ± 49,53

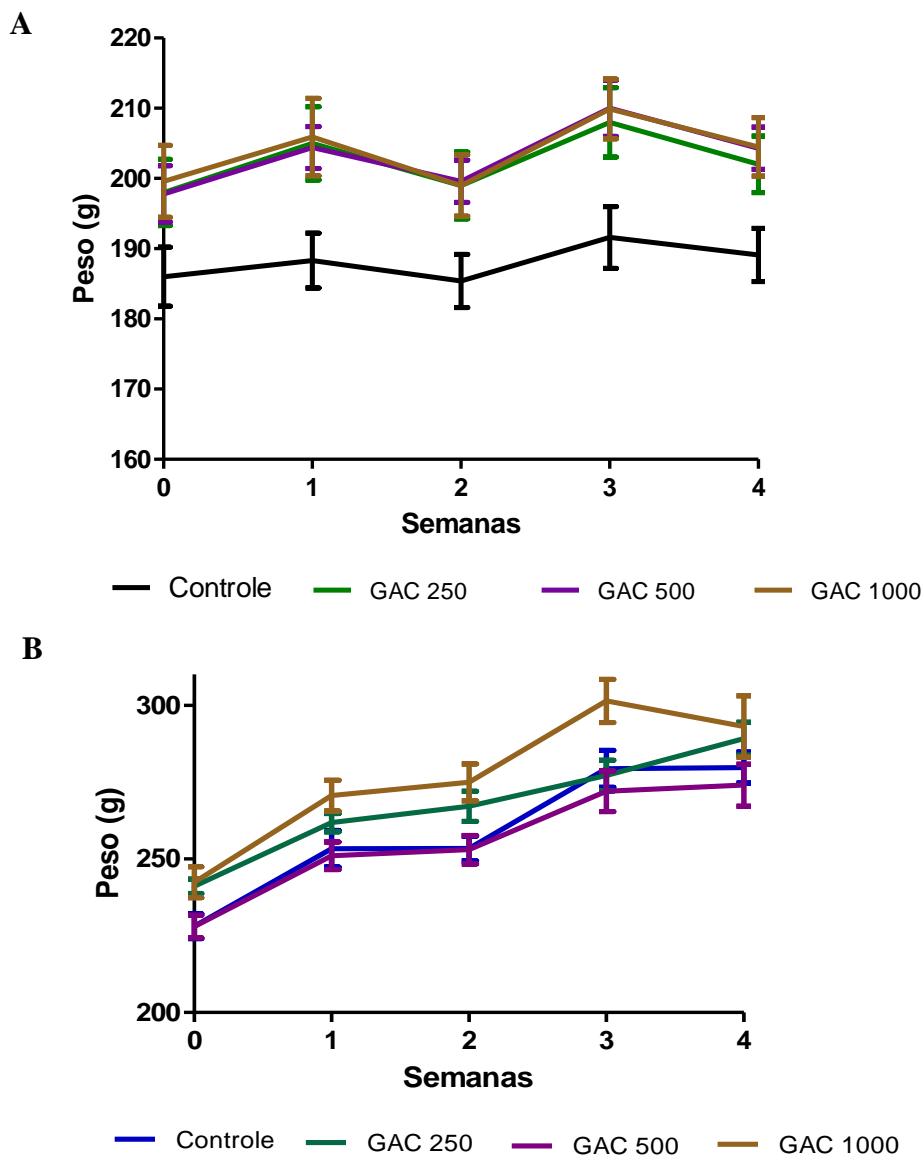
Valores expressos como média ± E.P.M. dos grupos com 8 animais cada. Machos e fêmeas são representados como m e f, respectivamente. * p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA, teste de Tukey).

Os parâmetros hematológicos (hemograma completo e contagem total e diferencial de leucócitos) foram avaliados após o término do tratamento com as GAC por via oral. Foram observadas algumas alterações significativas (machos e fêmeas), com maior incidência nas fêmeas. Alguns parâmetros sanguíneos que foram alterados pelo tratamento com GAC, principalmente com maior dose mantiveram-se dentro da faixa de normalidade (LEAL et al.,2003), exceto as plaquetas do grupo fêmeas tratadas (**Tabela 7**).

Os animais de ambos os sexos foram tratados com GAC por via oral, nas doses 250, 500 e 1000 mg/Kg, durante 30 dias. Durante este período, os ratos submetidos ao tratamento apresentaram aspecto sadio, bom estado geral, sem ocorrência de qualquer alteração física e comportamental.

Os registros da massa corporal dos animais tratados durante 30 dias com GAC (250 – 1000 mg/Kg, v.o.) estão descritos na Figura 13. As ratas mostraram uma perda de massa corpórea na segunda semana de tratamento, entretanto, o grupo controle também apresentou essa mesma variação. No restante do período de tratamento o peso foi normalizado em todos os grupos, tanto os tratados quanto o controle. Tanto os grupos controle quanto tratados apresentaram um crescimento na massa corporal durante as 4 semanas de tratamento, não sendo observado uma diferença significativa entre esses grupos.

Figura 13 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho na evolução ponderal de ratos submetidas ao tratamento diário com GAC durante 30 dias.



Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da variação de peso em gramas após 30 dias de observação. A: fêmeas. B: machos

Durante o estudo os animais foram avaliados no 15º e 30º dia após o tratamento com GAC (250, 500 e 1000 mg/Kg, v.o.) através da avaliação da bioquímica do plasmática e análise hematológica. Os resultados obtidos nas avaliações bioquímicas e hematológicas não diferiram. As alterações observadas foram mais frequentes nas ratas.

A **Tabela 6** mostra os parâmetros bioquímicos dos ratos (machos e fêmeas) tratados com GAC (250, 500 e 1000 mg/Kg) durante 30 dias. Os níveis de glicose das fêmeas tratadas com GAC 250 e 1000 mg/Kg ($106,1 \pm 4,17$ e $97,38 \pm 4,88$ mg/dL, respectivamente) aumentaram significativamente em relação ao grupo controle ($71,38 \pm 5,13$ mg/dL). Os ratos por sua vez apresentaram um aumento na glicemia somente quando tratados com a maior dose de GAC ($114,3 \pm 9,76$ mg/dL) em relação ao controle ($83,29 \pm 3,16$ mg/dL).

O tratamento das ratas com GAC (1000 mg/Kg, v.o.) reduziu os níveis de triglicérides ($30,13 \pm 2,99$ U/L) quando comparado ao grupo controle ($43,13 \pm 4,71$ U/L). Ainda, os níveis de AST e de amilase foram significativamente reduzidos nas fêmeas tratadas com a maior dose de GAC (AST: $53,00 \pm 2,58$ U/L; amilase: $556,7 \pm 34,36$ U/L) em relação ao grupo controle (AST: $70,00 \pm 4,45$ U/L; amilase: $563,2 \pm 31,3$ U/L).

A **Tabela 7** mostra a avaliação dos parâmetros hematológicos de ratos de ambos os sexos tratados com as GAC (250, 500 e 1000 mg/Kg, v.o.) diariamente por 30 dias. Ao contrário dos ratos as ratas tratadas com GAC principalmente na maior dose apresentaram um maior número de alterações hematológicas, mostrando aumento significativo no número de hemácias (GAC: $7,46 \pm 0,11$ milhões/ mm^3 ; controle: $5,34 \pm 0,35$ milhões/ mm^3), hematócrito (GAC: $45,65 \pm 0,50$ %; controle: $41,08 \pm 1,72$ %) e plaquetas (GAC $2177 \pm 11,73$ mm^3 ; controle: $913,3 \pm 48,96$ mm^3), com um incremento de cerca de 2 vezes em relação ao controle. Por outro lado, foi verificado que o tratamento das ratas com GAC 1000 mg/Kg reduziu significativamente o valor de RDW ($15,41 \pm 0,50$ %) em relação ao controle ($18,36 \pm 0,79$ %).

O tratamento dos ratos com GAC (250 mg/Kg, v.o.) causou um aumento significativo no número de segmentados ($20,25 \pm 1,57$ %) em relação ao controle ($12,43 \pm 2,03$ %). Na mesma dose os ratos apresentaram também uma diminuição significativa no número de linfócitos ($76,75 \pm 1,77$ %; controle: $83,86 \pm 2,32$ %).

Tabela 7- Efeitos das GAC® sobre parâmetros hematológicos de ratos após tratamento diário durante 30 dias.

PARÂMETROS	SEXO	CONTROLE	GAC 250	GAC 500	GAC 1000
HEM (10 ⁶ /mm ³)	f	6,34 ± 0,35	7,0 ± 0,11	7,51 ± 0,14*	7,46 ± 0,11*
	m	8,16 ± 0,08	8,03 ± 0,13	7,88 ± 0,15	8,01 ± 0,09
HGB (g/dL)	f	13,88 ± 0,62	14,71 ± 0,16	15,43 ± 0,17	14,96 ± 0,48
	m	15,87 ± 0,21	15,78 ± 0,17	15,56 ± 0,21	15,99 ± 0,28
HTC (%)	f	41,08 ± 1,72	42,76 ± 0,50	45,74 ± 0,51*	45,65 ± 0,50*
	m	49,21 ± 0,48	48,49 ± 0,71	47,29 ± 0,84	48,33 ± 0,81
VCM (fL)	f	63,23 ± 0,95	61,16 ± 0,97	60,97 ± 0,83	61,18 ± 0,58
	m	60,30 ± 0,61	60,39 ± 0,39	60,05 ± 0,56	60,29 ± 0,44
HCM (pg)	f	21,33 ± 0,35	21,08 ± 0,35	20,57 ± 0,37	20,09 ± 0,43

	m	$19,46 \pm 0,22$	$19,66 \pm 0,21$	$19,81 \pm 0,27$	$19,96 \pm 0,23$
CHCM (%)	f	$33,75 \pm 0,37$	$34,41 \pm 0,27$	$34,00 \pm 0,32$	$35,23 \pm 1,78$
	m	$32,26 \pm 0,21$	$32,55 \pm 0,19$	$32,99 \pm 0,29$	$33,07 \pm 0,24$
RDW (%)	f	$18,36 \pm 0,79$	$16,96 \pm 0,38$	$16,69 \pm 0,61$	$15,41 \pm 0,50^*$
	m	$15,66 \pm 0,41$	$16,06 \pm 0,30$	$15,43 \pm 0,28$	$15,63 \pm 0,42$
NEU (%)	f	$17,25 \pm 2,13$	$20,50 \pm 2,15$	$20,14 \pm 3,38$	$20,75 \pm 2,95$
	m	$12,43 \pm 2,03$	$20,25 \pm 1,57^*$	$17,88 \pm 1,72$	$15,43 \pm 1,37$
LEU	f	$4,57 \pm 0,48$	$5,25 \pm 0,65$	$4,60 \pm 0,70$	$5,61 \pm 1,02$
	m	$6,58 \pm 0,37$	$6,52 \pm 0,65$	$6,72 \pm 0,73$	$7,58 \pm 0,62$
BST (%)	f	0	0	0	0
	m	0	0	0	0

SEG (%)	f	17,25 ± 2,13	20,50 ± 2,15	20,14 ± 3,38	20,75 ± 2,95
	m	12,43 ± 2,03	20,25 ± 1,57*	17,88 ± 1,72	15,43 ± 1,37
LIN (%)	f	80,75 ± 2,19	77,63 ± 2,27	77,43 ± 3,23	78,13 ± 3,22
	m	83,86 ± 2,32	76,75 ± 1,77*	78,63 ± 1,41	81,43 ± 1,34
MON (%)	f	1,25 ± 0,36	1,25 ± 0,36	0,85 ± 0,26	1,87 ± 0,47
	m	2,28 ± 0,18	2,25 ± 0,36	2,00 ± 0,32	2,00 ± 0,30
EOS (%)	f	0,50 ± 0,18	0,625 ± 0,37	1,00 ± 0,30	0,5 ± 0,18
	m	1,42 ± 0,29	0,75 ± 0,16	1,50 ± 0,62	1.14 ± 0,26
BAS (%)	f	0,125 ± 0,125	0	0	0
	m	0	0	0	0
PLT 10 ³ / mm ³	f	754,6 ± 48,96	993, 0 ± 48,8	931,3 ± 28,52	1029 ± 45,49*
	m	943, 0 ± 59,4	897,4 ± 38,85	728,1 ± 35,8	804,8 ± 49,18

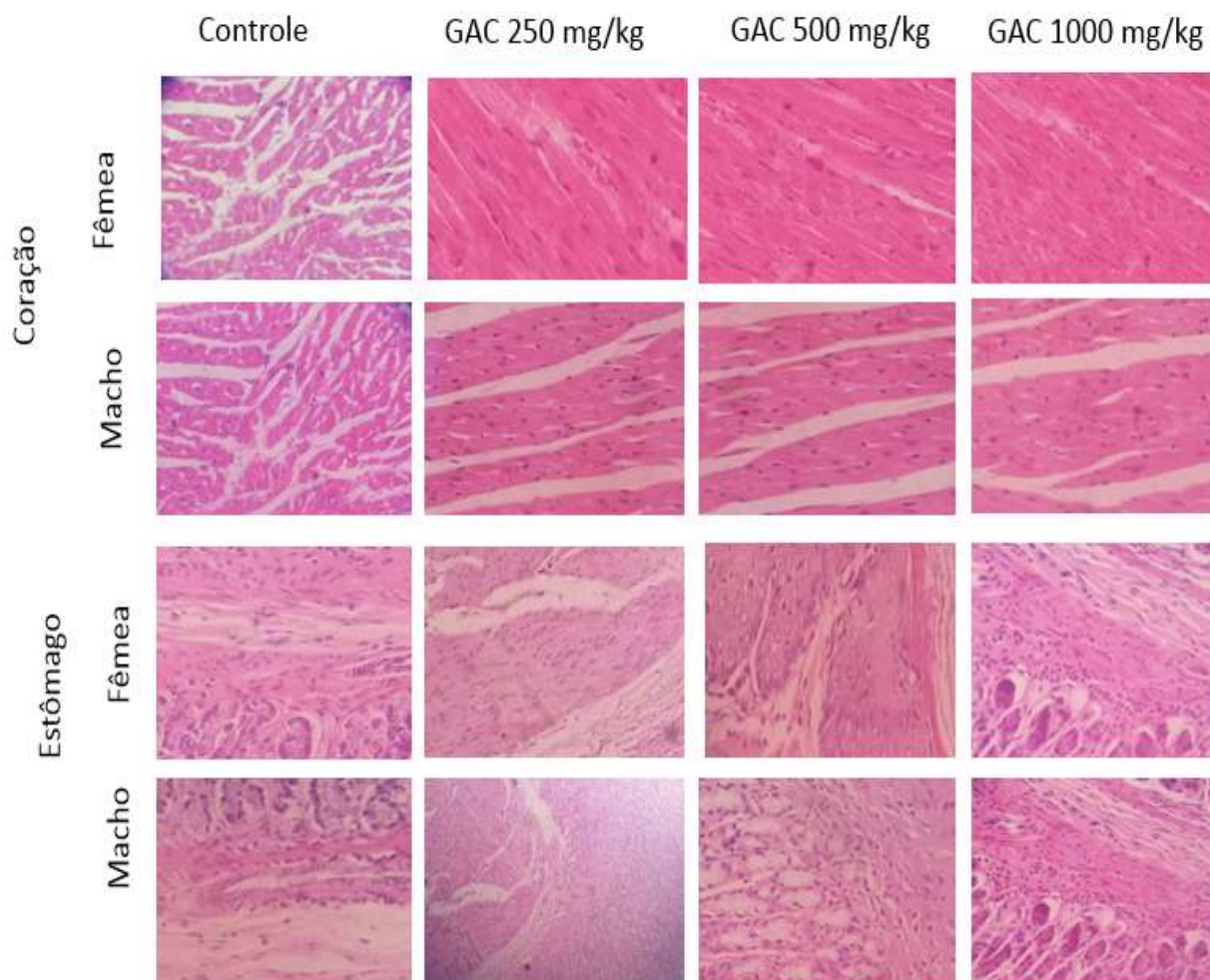
5.1.3 Análise histopatológica

Foi realizada necropsia de todos os animais submetidos ao experimento, os tratados com as GAC (250, 500 e 1000 mg/kg) e controle (veículo=água). A avaliação necroscópica incluiu exames das cavidades e dos órgãos dos animais para verificação de algum sinal macroscópico de toxicidade. Nessa avaliação, não houve alterações macroscópicas em nenhum dos órgãos ou cavidades dos animais.

Na avaliação microscópica, os órgãos dos animais do grupo controle foram utilizados como referência em relação aos grupos tratados com o fitoterápico em estudo. As leituras das lâminas dos fígados dos animais do grupo controle mostraram uma arquitetura preservada, sem sinais de necrose nos hepatócitos, com presença de células de gordura e pontos isolados de inflamação em algumas amostras. Nos animais tratados, a arquitetura dos órgãos foi preservada, e a leitura das lâminas dos intestinos e estômago de todos os animais não apresentaram alterações significativas. Já a referida leitura do fígado, rins pulmões dos animais de todos os grupos (tratados e controle) de ambos os sexos pode-se observar a presença de alguns sinais inflamatórios, como congestão e edema (Figuras 14 e 15).

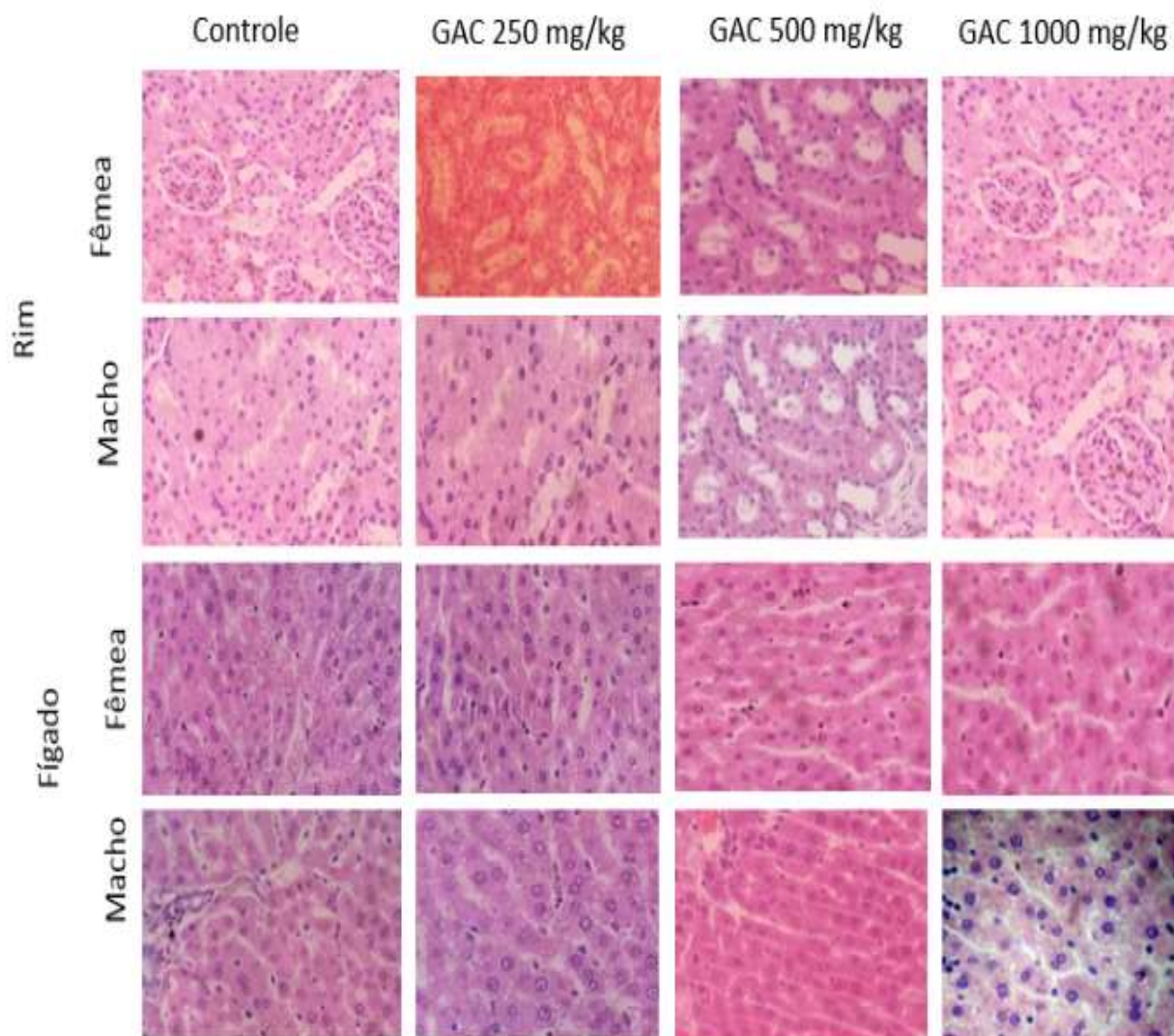
Nos animais tratados com a maior dose do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho, (1000mg/kg), a avaliação microscópica dos fígados mostrou-se preservada, sem sinais de necrose ou apoptose, mas com a presença de células de gordura e sinais de congestão do vaso (Figura 16). Estes sinais foram encontrados em animais tratados com as GAC e nos animais do grupo controle, tratados com água, o que nos leva a acreditar que não há alguma relação de toxicidade nos animais, uma vez que os grupos tratados e não-tratados com o fitoterápico apresentaram as mesmas características. A esteatose possivelmente ocorreu devido à alimentação dos animais e tempo de vida dos mesmos, já que ao final do ensaio, possuíam um peso mais elevado (acima de 250 g em média).

Figura 14 - Fotomicrografias dos órgãos coração e estômago dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade oral de doses repetidas de Gotas Arthur de Carvalho.



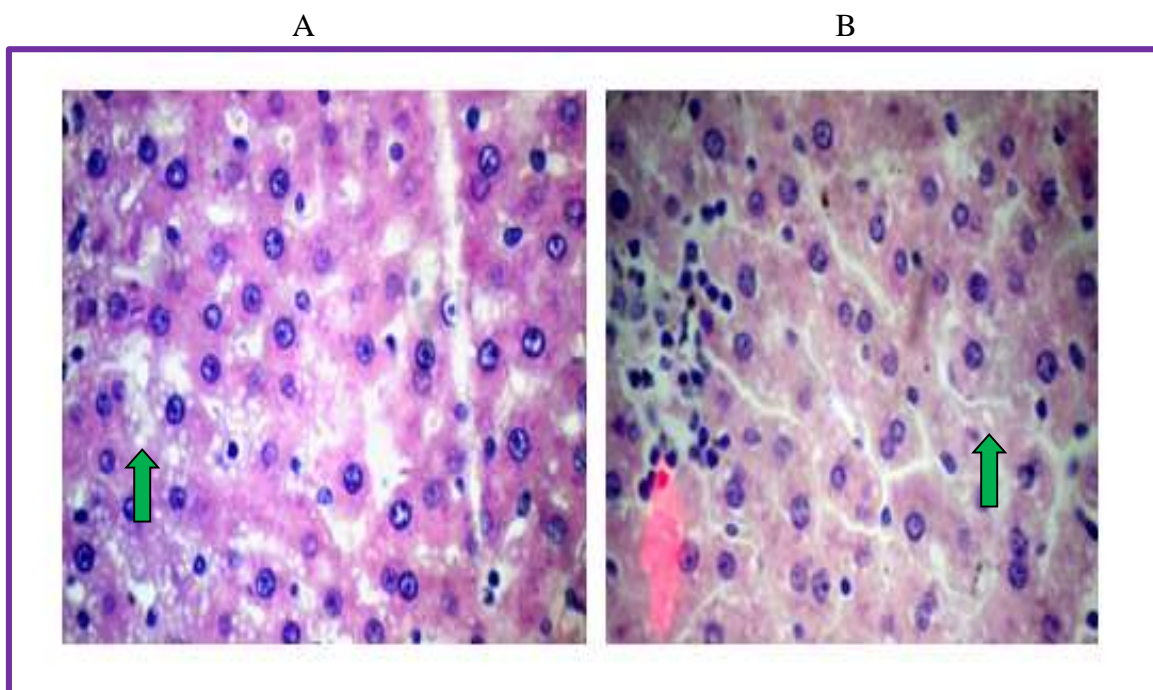
Ratos foram tratados por via oral com veículo (controle) e GAC (250- 1000 mg/Kg) por via oral, com administração em doses repetidas durante 30 dias. Após o período de experimentação, os animais foram anestesiados, sacrificados e necropsiados para avaliação histopatológica dos principais órgãos. Coloração: Hematoxilina/eosina. Aumento 10x.

Figura 15 - Fotomicrografias dos órgãos (rins e fígado) dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade oral de doses repetidas de Gotas Arthur de Carvalho.



Ratos foram tratados por via oral com veículo (controle) e GAC (250- 1000 mg/Kg) por via oral, com administração em doses repetidas durante 30 dias. Após o período de experimentação, os animais foram anestesiados, sacrificados e necropsiados para avaliação histopatológica dos principais órgãos. Coloração: Hematoxilina/eosina. Aumento 10x.

Figura 16 - Fotomicrografias do fígado dos ratos submetidos ao ensaio de toxicidade oral de doses repetidas - 30 dias com as Gotas Arthur de Carvalho.



Ratos foram tratados por via oral com veículo (controle) e GAC (250- 1000 mg/Kg) por via oral, com administração em doses repetidas durante 30 dias. Após o período de experimentação, os animais foram anestesiados, sacrificados e necropsiados para avaliação histopatológica dos principais órgãos. (A)- animal doo grupo controle (tratado com água); (B)- tratado com GAC 1000 mg/kg. Na seta verde, observa-se as células de gordura (esteatose). Coloração: Hematoxilina/eosina. Aumento 100x.

5.2 Avaliação citotóxica das Gotas Arthur de Carvalho

5.2.1 Teste do MTT e LDH em neutrófilo humano

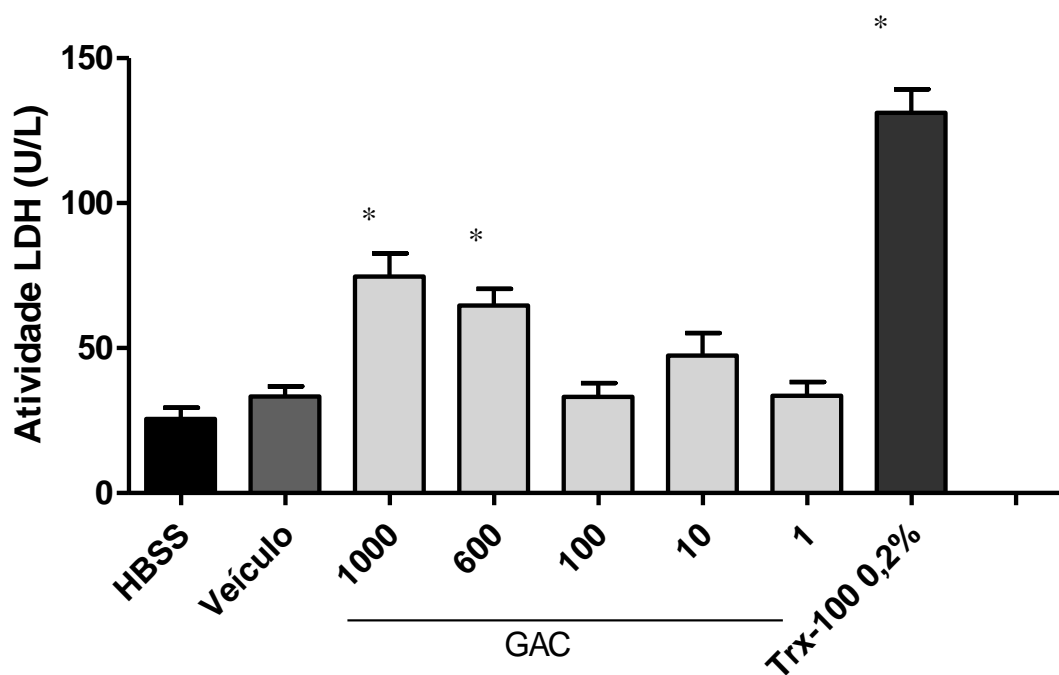
Os possíveis efeitos tóxicos do fitoterápico GAC foram investigados em neutrófilo humano e hepatócitos - linhagem HepG2 com auxílio do teste do MTT e mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH).

Na **Figura 17** pode ser observado o efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a viabilidade de neutrófilos mensurada pela atividade da LDH. As GAC nas maiores concentrações (1000 e 600 μ g/mL) promoveu um aumento significativo na atividade da lactato desidrogenase ($74,65 \pm 8,04$ U/L) em relação ao grupo controle (veículo) ($33,3 \pm 3,4$ U/L). Nas concentrações de GAC 100, 10 e 1 μ g/mL não houve aumento da atividade da LDH, indicando baixa toxicidade do fitoterápico em estudo ($64,75 \pm 5,65$, $33,23 \pm 4,71$, $47,47 \pm 7,69$, $33,51 \pm 4,81$ U/L, respectivamente) quando comparada ao grupo normal (HBSS: $25,59 \pm 3,79$).

Para seguimento da avaliação da citotoxicidade das GAC®, foi realizado o teste de brometo 3[4,5 dimetiltiazol-2-il] -2,5- difeniltetrazólio (MTT) também em neutrófilos humano, que é capaz de detectar possível efeitos tóxicos de uma droga teste sobre o metabolismo celular.

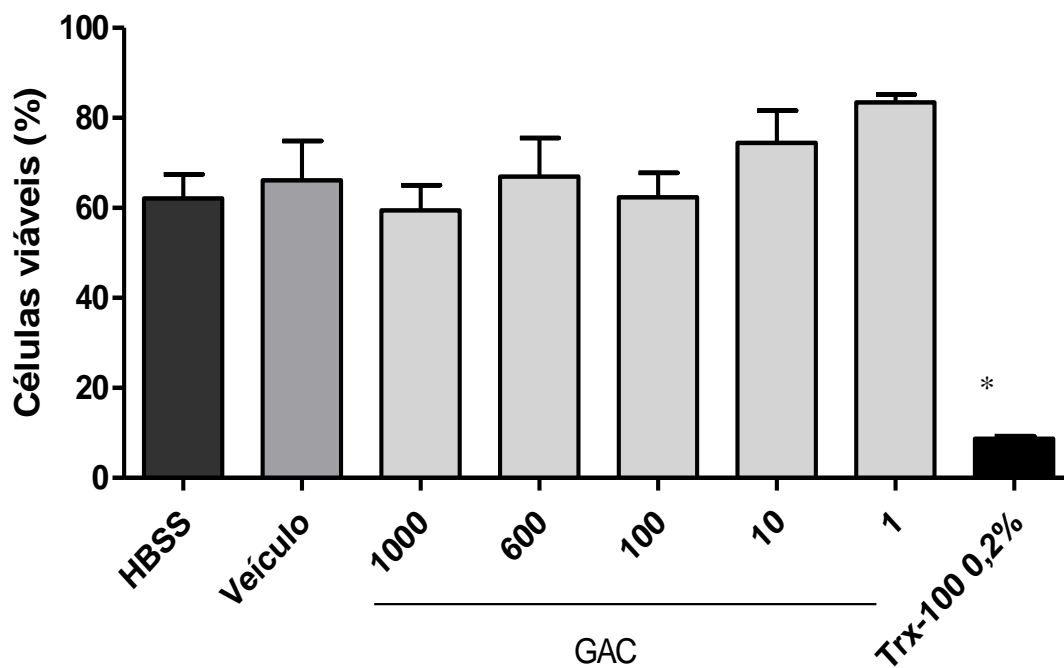
Na **figura 18** é observado que as GAC nas concentrações de 1000, 600, 100, 10 e 1 μ g/mL em neutrófilos humano não houve redução da viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT ($59,42 \pm 5,63$, $66,93 \pm 8,63$, $62,38 \pm 5,41$, $74,43 \pm 7,17$, $83,46 \pm 1,73$, respectivamente) quando comparadas ao HBSS ($62,15 \pm 5,32$). Já o Triton x-100 0,2%, utilizado como controle positivo, padrão de citotoxicidade, apresentou redução de viabilidade celular ($8,69 \pm 0,34$), indicando que o fitoterápico em estudo não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas.

Figura 17 - Avaliação da toxicidade das GAC em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH).



Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA, teste de Tukey).

Figura 18 - Efeito das GAC sobre a citotoxicidade em neutrófilos humano determinada através do teste de MTT.

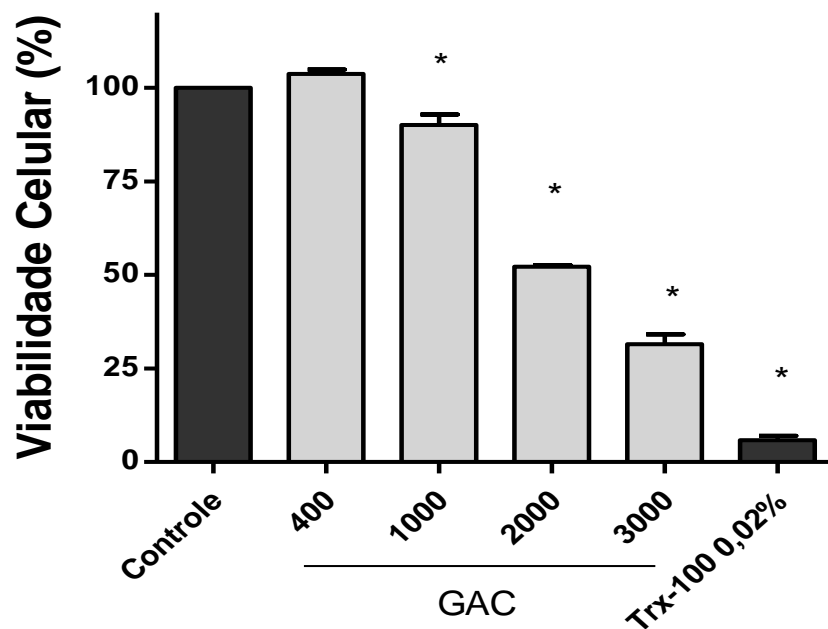


Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs HBSS, (ANOVA e Teste de Tukey).

5.2.2 Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a avaliação da citotoxicidade em células HEPG2: teste MTT

Nesse modelo pode-se observar que as GAC nas concentrações de 3000, 2000, 1000 $\mu\text{g/mL}$ em células HEP-G2 houve redução da viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT ($31,5 \pm 2,64$, $52,17 \pm 0,44$, $90,0 \pm 2,88$, respectivamente) quando comparadas ao controle ($100,0 \pm 0,0$). Com o aumento das doses do fitoterápico, foi possível encontrar uma relação de dose-efeito, onde o aumento da atividade citotóxica do produto em estudo foi proporcional ao aumento das doses testadas. Também foi observado que na adição de Triton X-100, padrão citotóxico, a viabilidade celular foi reduzida ($5,83 \pm 1,20$), demonstrando que as Gotas Arthur de Carvalho não demonstra citotoxicidade em concentrações menores que 400 $\mu\text{g/mL}$ em células HEP-G2 (Figura 19).

Figura 19 - Efeito das GAC sobre a citotoxicidade em células HEP-G2 determinada através do teste de MTT.



Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e Teste de Tukey).

5.3 Avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho no sistema gastrointestinal

5.3.1 Efeito das GAC sobre o trânsito intestinal em camundongos

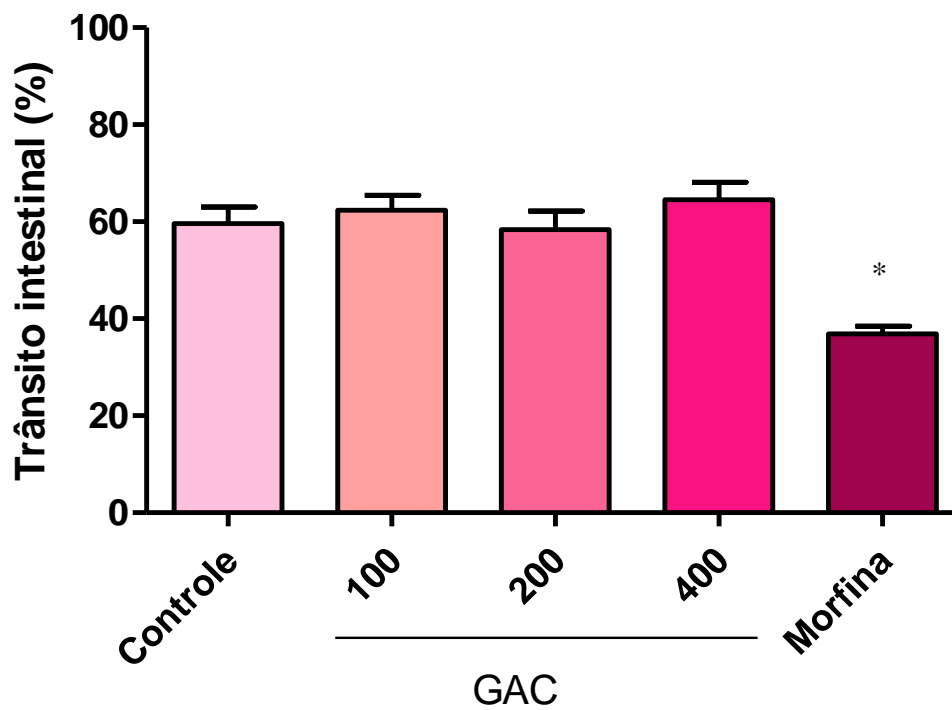
Os resultados na **Tabela 8 e Figura 20** mostram que a administração oral das Gotas Arthur de Carvalho[®] (GAC), nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, não alterou significativamente o percentual de trânsito intestinal normal dos camundongos ($62,41 \pm 3,06$; $58,38 \pm 3,80$; $64,54 \pm 3,54$ %, respectivamente) quando comparado ao grupo controle ($59,61 \pm 3,39\%$). Morfina, utilizada como controle positivo, reduziu de forma significativa ($36,24 \pm 2,45\%$), o percentual de trânsito intestinal normal dos animais em relação ao controle ($59,61 \pm 3,39\%$).

Tabela 8 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho[®] (GAC) sobre o trânsito intestinal normal de camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Trânsito Intestinal (%)
Controle	-	$59,61 \pm 3,39$
GAC	100	$62,41 \pm 3,06$
	200	$58,38 \pm 3,80$
	400	$64,54 \pm 3,54$
Morfina	2.5	$36,24 \pm 2,45^*$

Os animais foram tratados e 60 minutos após a administração oral ou após 30 minutos da administração subcutânea, administrou-se o marcador (0,2mL/animal, v.o.). Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e mensurada a distância corrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado, expressos como porcentagem. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. do percentual (%) de trânsito intestinal para 8 animais. * $p < 0,05$ versus grupo controle (ANOVA, teste Newman-Keuls).

Figura 20 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o trânsito intestinal normal em camundongos.



Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e teste Newman-Keuls).

5.3.2 Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre motilidade gastrointestinal induzida por betanecol em camundongos

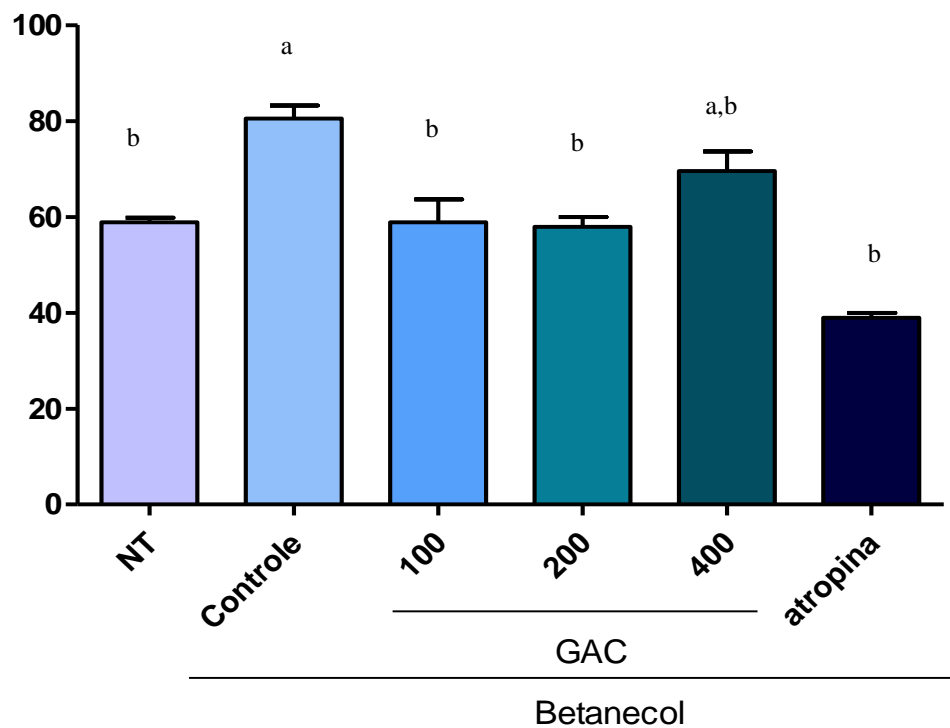
Os resultados da avaliação do efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre o aumento de motilidade gastrointestinal induzida por betanecol (agonista muscarínico que atuam aumentando a motilidade do TGI) estão demonstrados na **Tabela 9**. A administração de betanecol (10mg/kg) promoveu um aumento significativo do percentual de trânsito intestinal ($80,49 \pm 2,76\%$) quando comparado aos animais do grupo não-tratado ($58,85 \pm 1,00\%$). As Gotas Arthur de Carvalho® (GAC), nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, foi capaz de reduzir ($58,86 \pm 4,78$; $57,92 \pm 2,04$; $66,90 \pm 3,80\%$, respectivamente), de forma significativa, o aumento do percentual de trânsito intestinal induzido pelo betanecol. A atropina (antagonista muscarínico), utilizada como controle positivo, reduziu de forma significativa ($38,92 \pm 1,03\%$) o percentual de aumento do trânsito intestinal induzido pelo betanecol, alcançando um nível de trânsito intestinal inferior, até mesmo em relação ao grupo controle.

Tabela 9 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) sobre o trânsito intestinal induzido por betanecol em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Trânsito Intestinal (%)
Não-tratado	-	$58,85 \pm 1,00^{**}$
Controle	10	$80,49 \pm 2,76^*$
GAC	100	$58,86 \pm 4,78^{**}$
	200	$57,92 \pm 2,04^{**}$
	400	$69,57 \pm 4,08^{*,**}$
Atropina	5	$38,92 \pm 1,03^{**}$

Os animais foram tratados e após 60 minutos receberam betanecol (10 mg/kg, s.c.) e após 60 minutos dessa administração, os animais receberam por via oral o marcador (carvão). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. do percentual (%) da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado para 8 animais. * $p < 0,05$ versus grupo não-tratado; ** $p < 0,05$ versus grupo controle (ANOVA e teste Newman-Keul).

Figura 21 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o trânsito intestinal induzido por betanecol em camundongos.



Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. ^a vs veículo, ^b vs betanecol ($p < 0,05$; ANOVA e teste Newman-Keuls).

5.3.3. Efeito da Gotas Arthur de Carvalho sobre o volume secretório e acidez gástrica em ratos

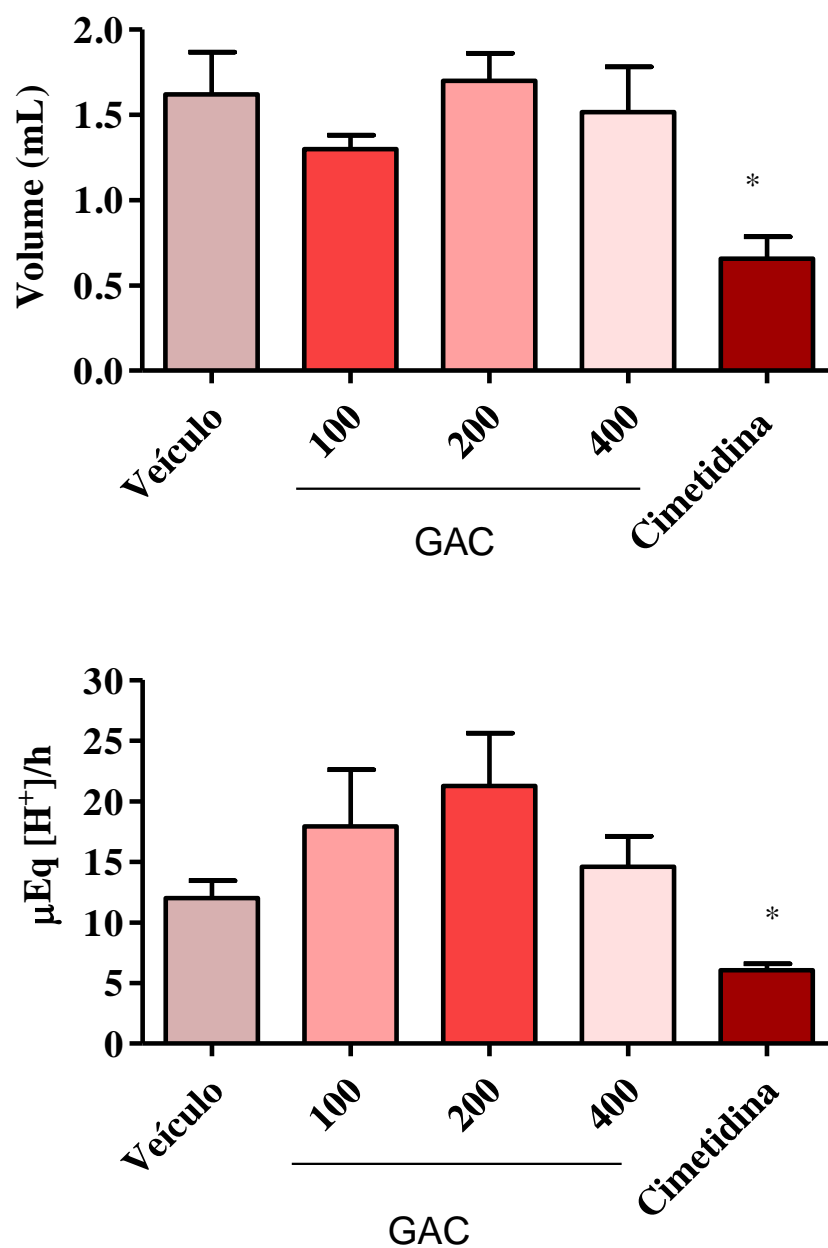
A **Figura 22** demonstra que a administração oral das Gotas Arthur de Carvalho® nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, não alterou significativamente o volume secretório gástrico ($1,30 \pm 0,08$; $1,70 \pm 0,16$; $1,52 \pm 0,26$ mL, respectivamente) ou a acidez total gástrica ($17,92 \pm 4,67$; $21,25 \pm 4,37$; $14,58 \pm 2,53$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]$ /h) em ratos com ligadura pilórica quando comparado ao controle ($1,62 \pm 0,25$ mL e $12,00 \pm 1,46$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]$ /h, respectivamente). A cimetidina, um antagonista dos receptores H_2 e que atua na diminuição da secreção ácida do estômago, utilizada como controle positivo, reduziu significativamente o volume secretório ($0,66 \pm 0,13$ mL) e a acidez total gástrica ($6,07 \pm 0,50$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]$ /h) quando comparado ao controle veículo ($1,62 \pm 0,25$ mL e $12,00 \pm 1,46$ $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]$ /h, respectivamente).

Tabela 10 - Efeito das GAC sobre o volume secretório e acidez gástrica em ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	Acidez $\mu\text{Eq}[\text{H}^+]$ /h
Controle	-	$1,62 \pm 0,25$	$12,00 \pm 1,46$
GAC	100	$1,30 \pm 0,08$	$17,92 \pm 4,67$
	200	$1,70 \pm 0,16$	$21,25 \pm 4,37$
	400	$1,52 \pm 0,26$	$14,58 \pm 2,53$
Cimetidina	2	$0,66 \pm 0,13^*$	$6,07 \pm 0,50^*$

Os animais foram anestesiados, a ligação do piloro realizada e tratados por via intraduodenal com veículo (água destilada, 10 mg/kg), GAC (100, 200 e 400 mg/kg) ou cimetidina (2mg/kg). Após 4 horas da ligadura, os animais são sacrificados e o estômago retirado. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. do percentual do volume em mL do conteúdo gástrico e da acidez gástrica para 8 animais. * $p < 0,05$ versus grupo controle (ANOVA e teste Newman-Keuls).

Figura 22 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o volume e acidez gástrica em animais com ligadura pilórica.



Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. do volume do conteúdo gástrico (mL) (A) e da acidez total gástrica ($\mu\text{Eq}[\text{H}^+]/\text{h}$) (B) para 6 ratos. * $p < 0,05$ versus grupo veículo (ANOVA e teste Newman-Keul).

5.3.4 Avaliação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nociceção visceral induzida por óleo de mostarda intracolônico em camundongos.

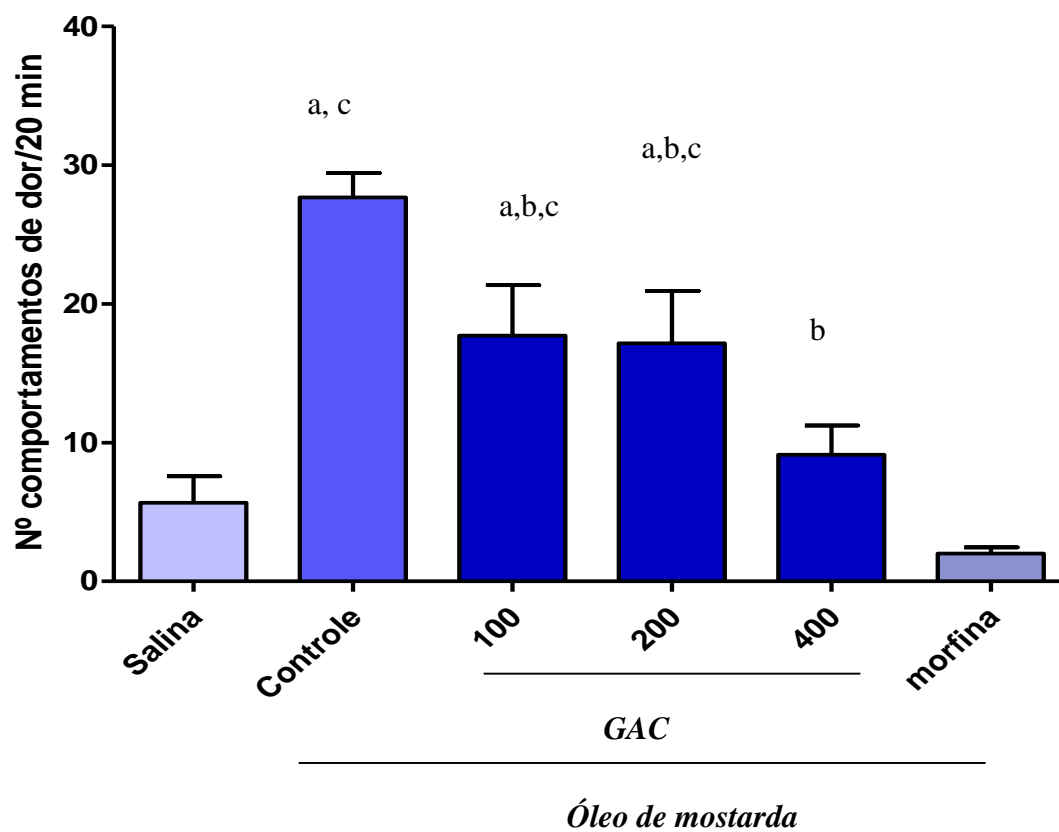
Na **Figura 23** e **Tabela 11** pode ser observado que a administração intracolônica do óleo de mostarda induziu, de maneira significativa, o comportamento de dor visceral no animal tratado em relação ao animal não-tratado (salina). Esse efeito nociceptivo promovido pelo óleo de mostarda foi reduzido pelo tratamento com as GAC (100, 200 e 400 mg/kg), alcançando um maior nível significativo na maior dose (400 mg/kg), com inibição de 74,9% da nociceção em relação ao grupo controle. A morfina, analgésico opióide utilizada como controle positivo, diminuiu significativamente os comportamentos de nociceção nos animais.

Tabela 11- Efeito das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20 min
Salina	-	5,66 ± 1,90
Controle	-	27,67 ± 1,76 ^{a,c}
GAC	100,v.o.	17,71 ± 3,63 ^{a,b,c}
	200	17,71 ± 3,75 ^{a,b,c}
	400	9,12 ± 2,10 ^b
Morfina	5, s.c.	2,00 ± 0,44

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração de óleo de mostarda. GAC (100,200 e 400mg/kg), água destilada e morfina foram administrados 60 min. antes da administração intracolônica do óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 µL/animal). O grupo salina recebeu apenas solução salina por via intracolônica. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^a p< 0,05 vs salina, ^b p< 0,05 vs controle; ^c p< 0,05 vs morfina . (ANOVA - teste de Newman-Keuls).

Figura 23 - Efeito antinociceptivo das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nociceção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.



Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração de óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo, ^a $p < 0,05$ vs salina, ^b $p < 0,05$ vs controle; ^c $p < 0,05$ vs morfina. (ANOVA- teste de Newman-Keuls).

5.3.4.1 Estudo do envolvimento do sistema opióide na nocicepção visceral das GAC

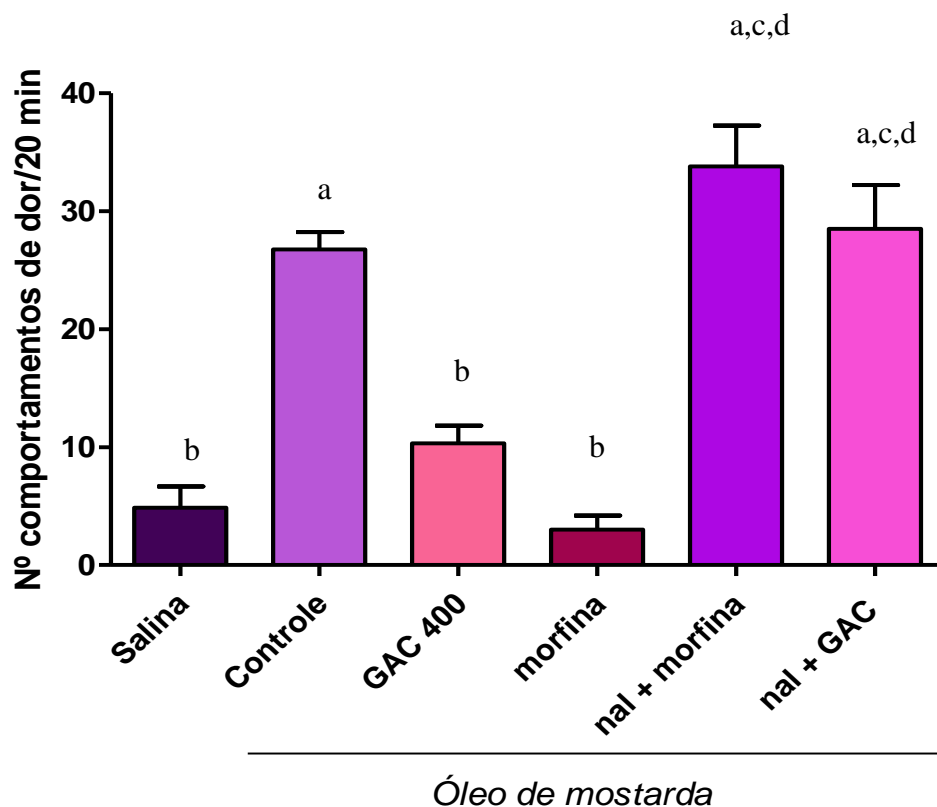
Na avaliação da possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo das GAC no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos, os ensaios foram conduzidos com a naloxona, um antagonista dos receptores opióides, para determinar o papel do fitoterápico no modelo. Na **Figura 24** pode ser observado que o tratamento dos animais com as Gotas Arthur de Carvalho ou com morfina promoveu inibição significativa do número de comportamentos de dor expressos nos animais, quando comparados ao grupo controle. O pré-tratamento com naloxona (2mg/kg, i.p.) reverteu a inibição dos comportamentos nociceptivos das GAC (400 mg/kg) e da morfina (5 mg/kg, s.c.) em comparação com o grupo controle (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva das Gotas Arthur de Carvalho e morfina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20 min
Salina	-	4,85 ± 1,80 ^b
Controle	-	28,8 ± 1,12 ^a
GAC	400	10,33 ± 1,48 ^b
Naloxona + GAC	2,i.p. + 400,v.o.	24,9± 3,32 ^{a,c,d}
Naloxona + Morfina	2, i.p + 5, s.c.	28,4 ± 2,88 ^{a,c,d}
Morfina	5,s.c.	3,00 ± 1,20 ^b

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração de óleo de mostarda. Veículo (controle), GAC e morfina foram administrados 60 min. antes da administração intracolônica do óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 µL/animal). A naloxona foi administrada 30 min. antes da morfina ou juntamente das GAC. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^a p< 0,05 vs salina, ^b p< 0,05 vs controle, ^c p<0,05 vs GAC e ^d p<0,05 vs. morfina. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 24 - Efeito do envolvimento dos receptores opióides no mecanismo de ação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nociceção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.



Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 minutos após a administração de óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs salina, ^b $p < 0,05$ vs controle, ^c $p < 0,05$ vs GAC e ^d $p < 0,05$ vs morfina (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

5.3.4.2. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico na nocicepção visceral das GAC

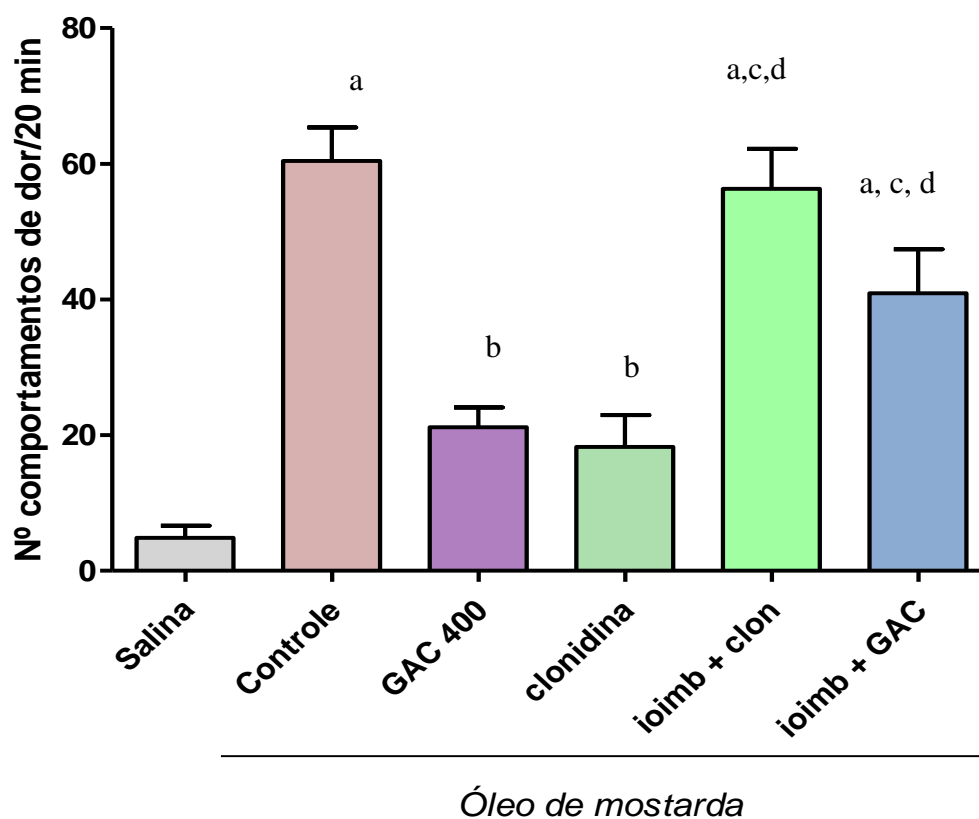
Na sequência da avaliação do mecanismo de ação do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho, a possível participação do sistema adrenérgico no efeito antinociceptivo foi estudado. Na **Figura 25** pode ser observado que a atividade antinociceptiva das GAC (400 mg/kg) foi significativamente revertida pela ioimbina, um antagonista dos receptores adrenérgicos. O tratamento dos animais com as Gotas Arthur de Carvalho ou com clonidina (0,1mg/kg, i.p.) promoveu uma inibição significativa do número de comportamentos de dor nos animais, quando comparado ao grupo controle (veículo + óleo de mostarda). O pré-tratamento com ioimbina (2mg/kg, i.p.) reverteu a inibição dos comportamentos nociceptivos da clonidina e do fitoterápico, (**Tabela 13**) indicando uma possível participação desses receptores na antinocicepção das GAC no modelo visceral em camundongos.

Tabela 13 - Efeito da ioimbina na atividade antinociceptiva das Gotas Arthur de Carvalho e clonidina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20 min
Salina	-	4,85 ± 1,80
Controle	-	60,43 ± 4,94 ^{a,c,d}
GAC	400, v.o.	21,17 ± 2,9 ^b
Ioimbina + GAC	2, i.p. +400, v.o.	40,93 ± 6,46 ^{a,c,d}
Ioimbina + Clonidina	2, i.p +5, s.c.	56,3 ± 5,89 ^{a,c,d}
Clonidina	0,1, i.p.	18,29 ± 4,65 ^b

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração de óleo de mostarda. Controle, GAC e clonidina foram administrados 60 min. antes da administração intracolônica do óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 µL/animal). A ioimbina foi administrada 30 min. antes da clonidina ou juntamente das GAC. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^a p< 0,05 vs salina, ^b p< 0,05 vs controle, ^c p<0,05 vs GAC e ^d p<0,05 vs. clonidina. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 25 - Estudo do envolvimento dos receptores adrenérgicos no mecanismo de ação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nociceção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.



Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 minutos após a administração de óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs salina, ^b $p < 0,05$ vs controle, ^c $p < 0,05$ vs GAC e ^d $p < 0,05$ vs clonidina (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

5.3.4.3 Estudo do envolvimento dos canais de K⁺ na nocicepção visceral das GAC

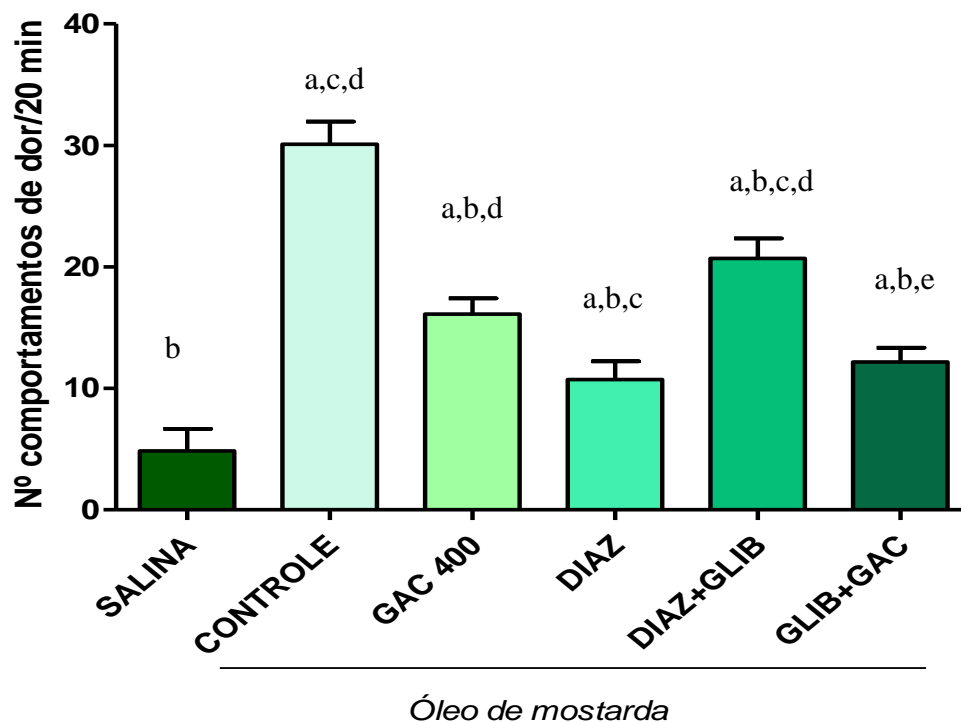
Na avaliação da possível participação dos canais de K⁺ no efeito antinociceptivo das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos, foram realizados testes com o pré-tratamento com a glibenclamida, um conhecido bloqueador dos canais de K⁺ - dependentes. Na **Figura 26** e **Tabela 14** pode-se observar que os grupos tratados com as Gotas Arthur de Carvalho (400mg/kg, v.o.) e diazóxido (10mg/kg, i.p.) inibiram significativamente o número de comportamentos de dor nos animais em comparação com o grupo controle. O pré-tratamento com glibenclamida (2mg/kg, i.p.) não reverteu o efeito inibitório dos comportamentos nociceptivos das Gotas Arthur de Carvalho.

Tabela 14 - Efeito da glibenclamida na atividade antinociceptiva das Gotas Arthur de Carvalho e diazóxido no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20 min
Salina	-	4,85 ± 1,80 ^b
Controle	-	30,10 ± 1,85 ^{a,c,d}
GAC	400, v.o.	16,11 ± 1,29 ^{a,b,d}
Glibenclamida + GAC	2, i.p. + 400, v.o.	12,17 ± 1,18 ^{a,b}
Glibenclamida + Diazóxido	2, i.p. + 10, i.p.	20,69 ± 1,65 ^{a,b,c,d}
Diazóxido	10, i.p.	10,73 ± 1,49 ^{a,b,e}

Os animais (n=8) foram tratados com veículo (10 ml/kg, v.o.), GAC (400mg/kg, v.o.) ou diazóxido (10mg/kg, i.p.) 60 minutos antes da administração intracolônica do óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 µL/animal). A glibenclamida foi administrada 30 min. antes do diazóxido ou juntamente das GAC. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração de óleo de mostarda. ^a p< 0,05 vs salina, ^b p< 0,05 vs controle, ^c p<0,05 vs GAC, ^d p<0,05 vs diazóxido e ^e vs glibenclamida + diazóxido. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 26 - Estudo do envolvimento dos canais de K^+ no mecanismo de ação das Gotas Arthur de Carvalho no modelo de nociceção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos.



Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 minutos após a administração de óleo de mostarda. ^a $p < 0,05$ vs salina, ^b $p < 0,05$ vs controle óleo de mostarda (veículo:água), ^c $p < 0,05$ vs GAC, ^d $p < 0,05$ vs diazóxido e ^e vs glibenclamida + diazóxido. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

5.4 Avaliação das GAC sobre atividade motora: campo aberto

Para avaliar a possível influência das GAC sobre a atividade motora dos animais foi realizado o teste do campo aberto. Não houveram diferenças significativas entre o grupo controle ($49,00 \pm 5,25$) e o grupo de GAC 400 mg/kg ($37,5 \pm 5,82$) que receberam por via intracolônica solução salina. Para os grupos com a instilação do óleo de mostarda, também foi verificada nenhuma diferença significativa entre o controle versus o grupo do fitoterápico em estudo ($50,17 \pm 3,37$ e $35,67 \pm 5,4$, respectivamente) (**Tabela 15**).

Desta forma, podemos observar que o produto GAC na dose de 400 mg/kg não possui atividade no sistema nervoso central, com efeito sedativo/depressor.

Tabela 15 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho no comportamento dos camundongos no teste do campo aberto.

Grupo	Dose	Campos explorados
Salina	10,i.c.	$51,33 \pm 5,63$
Veículo	10,v.o.	$49,00 \pm 5,25$
GAC	400,v.o.	$37,5 \pm 5,82$
Veículo + O.M	10/50	$50,17 \pm 3,37$
GAC + O.M.	400/50	$35,67 \pm 5,40$

Camundongos (n=8) foram tratados por via oral com veículo (água destilada, 10ml/kg), GAC (400mg/kg) 60 minutos antes da administração intracolônica do óleo de mostarda ($50\mu\text{L}/0,75\%$ em solução salina), salina (10ml/kg, via intracolônica) GAC e veículo, observando o número de cruzamentos de cada animal individualmente no campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de seções transpassadas pelo animal (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

5.5 Avaliação das Gotas Arthur de Carvalho sobre a dispepsia

Para a avaliação das GAC sobre o modelo de dispepsia, todos os animais utilizados no experimento passaram pelo período de adaptação do ambiente, do isolamento (animais em caixas individuais) e da disponibilidade dos dois tipos de ração: a padrão e de caulim. Nenhum comportamento diferente foi notado, assim como não ocorreu a ingestão da ração de caulim, só a ração normal. Uma vez por semana os animais foram tratados (GAC; salina, água e ondansetrona + cisplatina) e observados quanto a variação ponderal e de consumo de alimentar. Inicialmente, é possível observar que o grupo de animais não-tratado (normal) houve diferença significativa de ingestão de ração normal, em comparação ao controle, após as 5 semanas de tratamento, o que demonstra a efetividade do experimento (**Tabela 16**). Para a avaliação de ingestão de ração de caulim, foi possível observar que as Gotas Arthur de Carvalho® nas doses de 100 e 200mg/kg ($0,77 \pm 0,11$; $0,77 \pm 0,14$ g, respectivamente) alteraram significativamente a ingestão em relação ao controle ($2,53 \pm 0,48$ g), além de demonstrar um melhor efeito antidispéptico quando comparado com a ondansetrona ($1,28 \pm 0,31$). Já para a ingestão de ração padrão dos animais tratados com o fitoterápico, não houve nenhuma diferença significativa durante as 5 semanas de experimentação em relação ao controle (**Figura 27**). Na avaliação do peso ponderal dos animais tratados durante as 5 semanas, foi possível observar nos grupos tratados com as GAC e os controles (ondansetrona e veículo) não houve nenhuma diferença significativa na evolução do peso dos animais de cada grupo, reiterando o resultado de não afetar a ingestão de ração padrão desses animais, o que nos leva a acreditar que o fitoterápico em estudo não causa nenhuma alteração no apetite ou alimentação desses animais (**Tabela 17**).

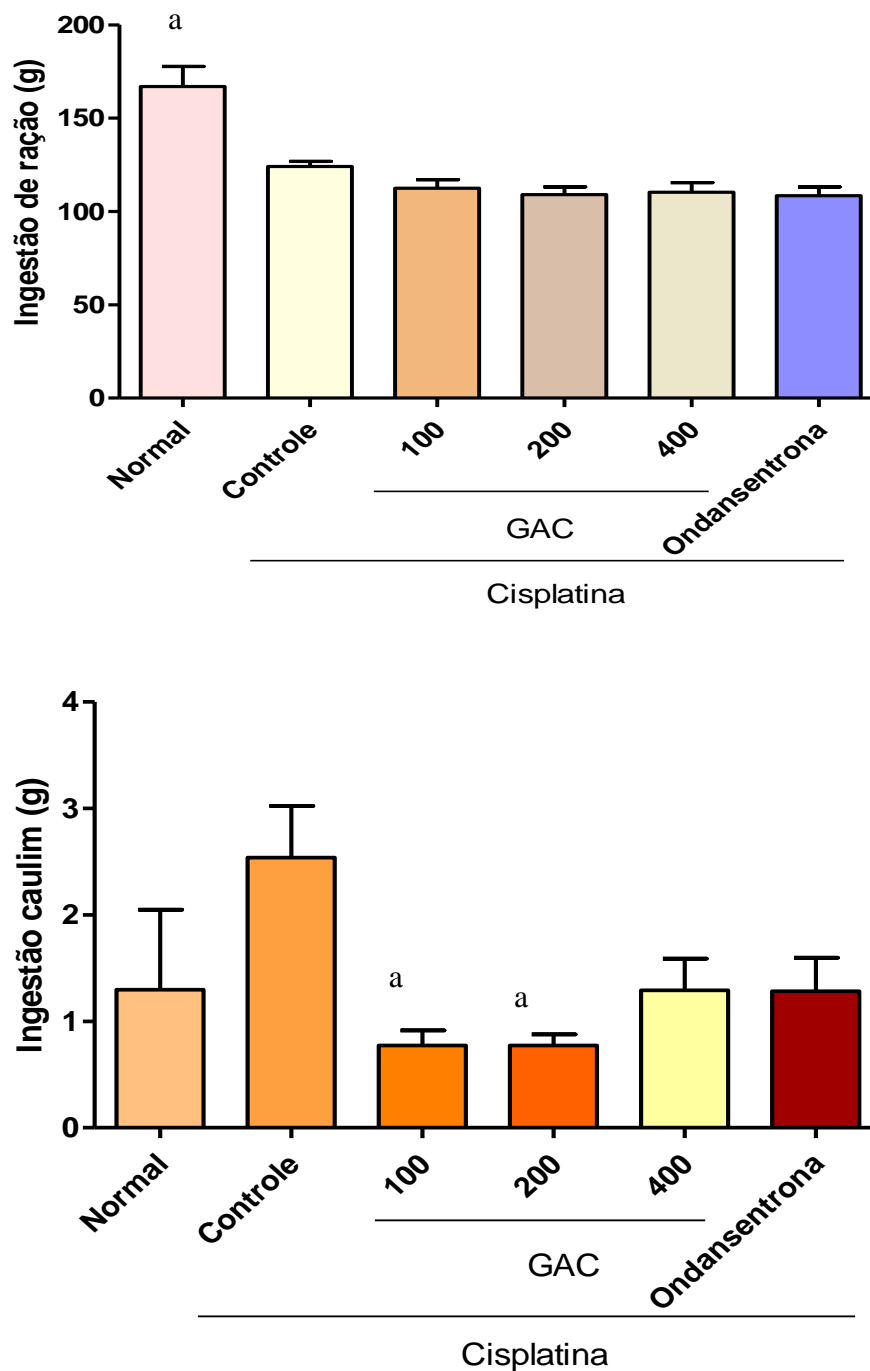
Também foi possível observar que houve diferença significativa na avaliação do conteúdo gástrico dos animais tratados com as GAC e os controles (água e ondansetrona) (**Tabela 18**).

Tabela 16 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o consumo de ração padrão e caulim oferecidos aos animais no ensaio da dispepsia.

Grupo	Dose (mg/kg)	Consumo de ração (g)	Consumo de caulim (g)
Normal	-	166,9 ± 10,7 ^a	1,46 ± 0,51
Controle	-	124,0 ± 2,81	2,53 ± 0,48
GAC	100,v.o.	112,4 ± 4,55	0,77 ± 0,14 ^a
	200,v.o.	109,0 ± 4,18	0,77 ± 0,10 ^a
	400,v.o.	110,0 ± 5,23	1,29 ± 0,29
Ondansetrona	1,i.p.	108,5 ± 4,65	1,28 ± 0,31

Os valores representam a média ± E.P.M. do consumo de ração padrão e ração de caulim após o período de 5 semanas. ^ap < 0,05 vs. controle. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 27 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o consumo de ração de caulim e ração padrão em ratos no modelo de dispepsia induzida por cisplatina.



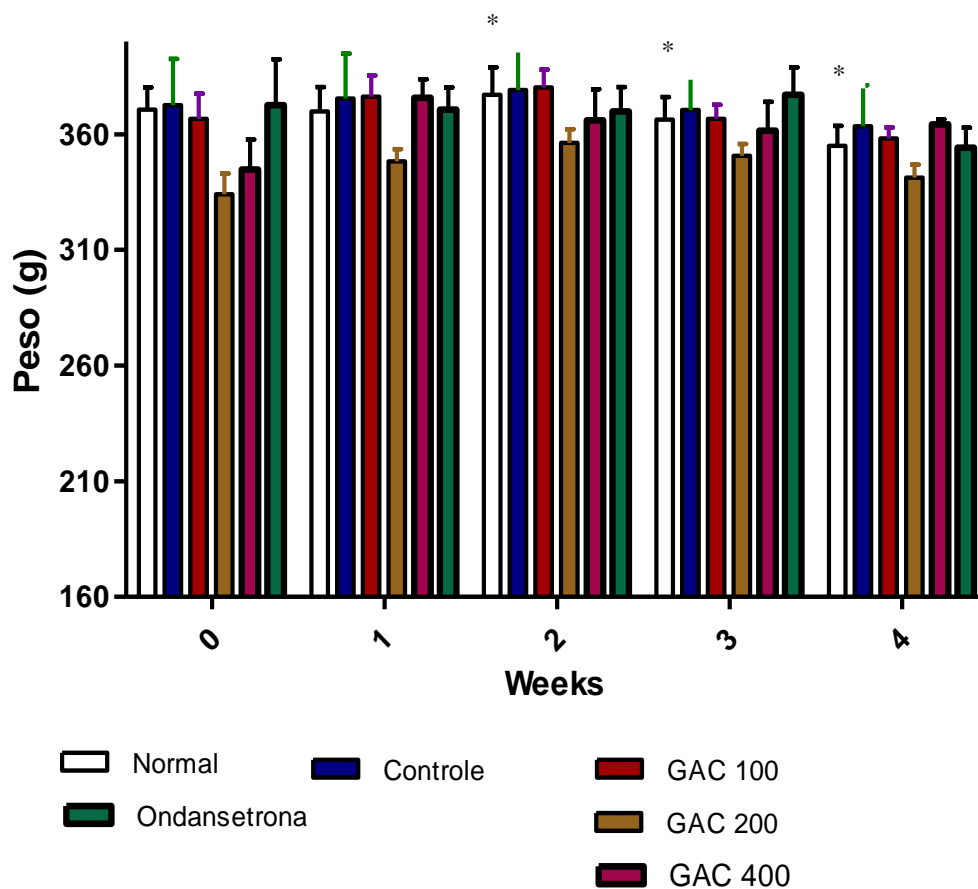
Os valores representam a média \pm E. P. M. do consumo em gramas de ração padrão e caulim durante 5 semanas para 6 animais. ^a $p < 0,05$ vs grupo veículo. (ANOVA e teste Newman-Keuls).

Tabela 17 -Variação do peso dos animais na avaliação das Gotas Arthur de Carvalho na dispepsia induzida por cisplatina.

SEMANA	Grupo					
	Normal	Controle	GAC 100	GAC 200	GAC 400	Ondan.
0	248,7 ± 10,76	372,5 ± 19,9	366,7 ± 10,8	334,0 ± 9,06	344,8 ± 12,9	370,7 ± 9,57
1	274,9 ± 9,48	373,3 ± 19,9	376,2 ± 9,22	348,2 ± 5,39	375,7 ± 8,04	369,8 ± 10,5
2	311,8 ± 10,6*	379,2 ± 20,1	380,2 ± 7,66	356,2 ± 6,00	366,0 ± 13,4	377,0 ± 11,9
3	328,0 ± 15,0*	374,5 ± 18,5	376,0 ± 6,17	353,0 ± 5,25	354,8 ± 11,9	372,7 ± 10,4
4	335,0 ± 8,62*	370,5 ± 17,5	366,7 ± 6,00	350,7 ± 5,12	361,5 ± 12,4	366,3 ± 9,77

Os valores representam a média ± E. P. M. da variação do peso dos animais em gramas durante 5 semanas. * $p < 0,05$ vs semana 0 (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 28 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a variação de peso dos ratos no modelo de dispepsia induzida por cisplatina durante 5 semanas.



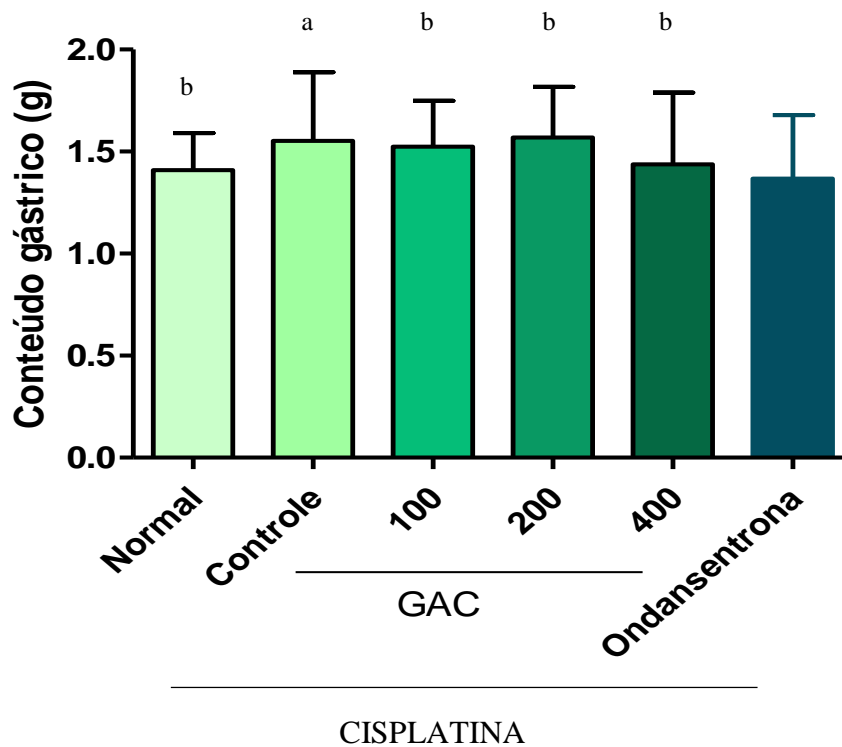
Os valores representam a média \pm E. P. M. da variação do peso dos animais em gramas durante 5 semanas. * $p < 0,05$ vs semana 0 (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Tabela 18 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® no conteúdo gástrico de ratos na avaliação da dispepsia.

Grupo	Dose (mg/kg)	Conteúdo gástrico (g)
Normal	-	1,41 ± 0,18 ^b
Controle	-	2,27 ± 0,37 ^a
GAC	100,v.o.	1,54 ± 0,22 ^b
	200,v.o.	1,16 ± 0,24 ^b
	400,v.o.	1,15 ± 0,35 ^b
Ondansetrona	1,v.o.	1,07 ± 0,13

Os ratos (n=8) foram tratados com veículo (água destilada, 10ml/kg, v.o.), GAC (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) e ondansetrona (1 mg/kg, v.o.) e imediatamente após, foi administrada cisplatina (1mg/kg, i.p.) uma vez por semana, durante 5 semanas. O grupo normal se refere ao grupo que não recebeu tratamento durante o experimento. Os valores representam a média ± E.P.M. do volume de conteúdo gástrico em gramas do estômago dos animais sacrificados após as 5 semanas. ^a p<0,05 vs ondansetrona, ^b p<0,05 vs controle (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 29 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre o conteúdo gástrico em ratos no modelo de dispepsia induzida por cisplatina.



Os valores representam a média \pm E. P. M. do conteúdo gástrico em gramas após 5 semanas de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs ondansetrona, ^b $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

5.6 Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® sobre diarreia induzida por óleo de rícino

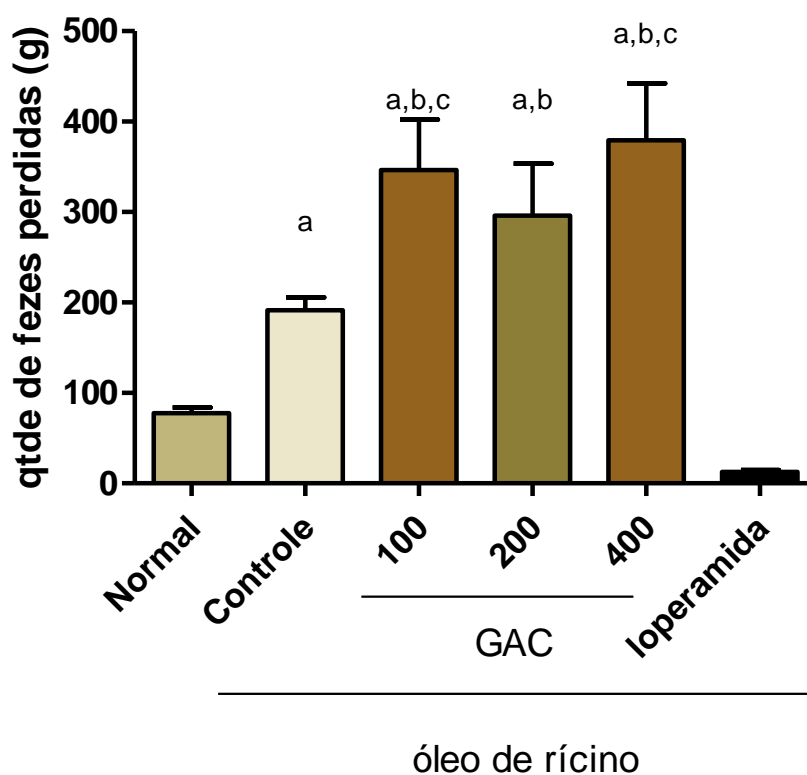
Na avaliação das Gotas Arthur de Carvalho sobre a diarreia induzida por óleo de rícino, foi observado que o produto em estudo influencia significativamente ($p < 0,05$) a quantidade em gramas de fezes eliminadas pelos animais, em comparação com o grupo da loperamida (antidiarreico de uso oral), assim como na avaliação com o mesmo controle, foi possível observar o aumento de perda peso corporal dos animais tratados com as GAC 100, 200 e 400 mg/kg. Com a realização deste experimento, também foi possível identificar uma atividade laxativa do fitoterápico, pois as GAC (100, 200 e 400 mg/kg) aumentaram 92,7%, 64,5% e 111,07%, respectivamente em comparação com o controle.

Tabela 19 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Fezes eliminadas (g)	Perda de peso corporal (g)
Normal		77,89 ± 6,19	0,600 ± 0,05 ^a
Controle	-	191,3 ± 14,4 ^a	0,871 ± 0,21 ^a
GAC	100, v.o.	346,3 ± 56,1 ^{a,b}	1,243 ± 0,20 ^a
	200, v.o.	295,9 ± 57,8 ^{a,b}	1,214 ± 0,14 ^a
	400, v.o.	379,3 ± 63,0 ^{a,b}	0,890 ± 0,20 ^a
Loperamida	2, v.o.	12,5 ± 2,32	0,0 ± 0,0

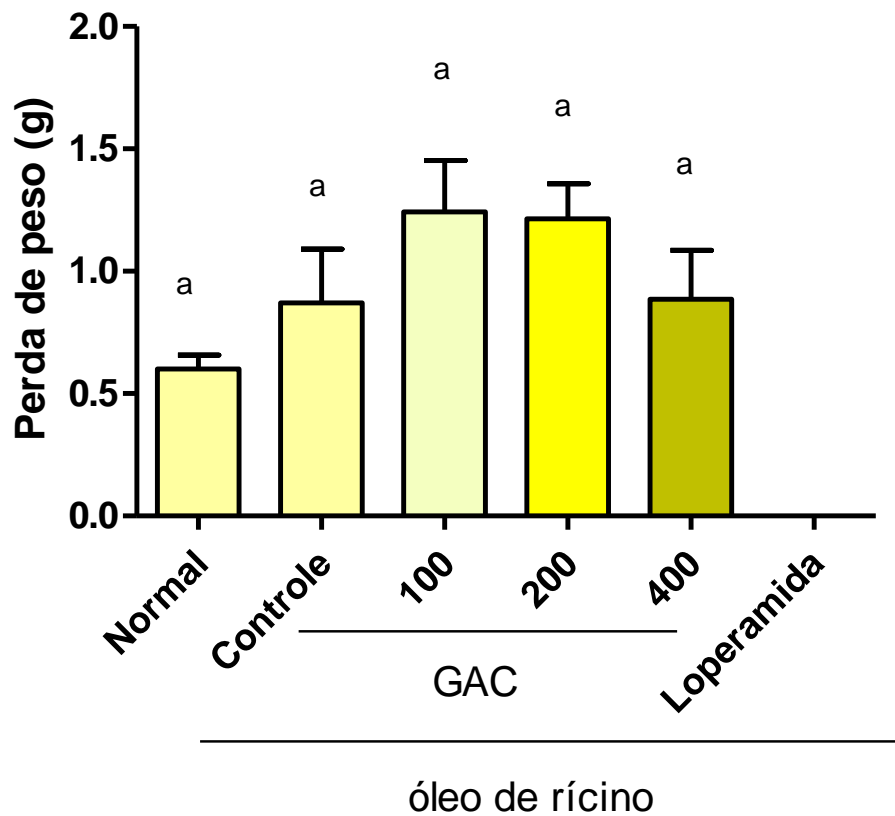
Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento receberam 0,2 mL de óleo de rícino por via oral. Os valores representam a média ± E.P.M. da quantidade de fezes eliminadas (g) e a perda de peso corpóreo sobre a diarreia induzida por óleo de rícino. Controle (água destilada), GAC e loperamida foram administrados 60 min. antes da administração do óleo de rícino. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^a $p < 0,05$ vs loperamida; ^b $p < 0,05$ vs normal, ^c $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e teste Newman-Keuls).

Figura 30 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a quantidade de fezes eliminadas pelos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.



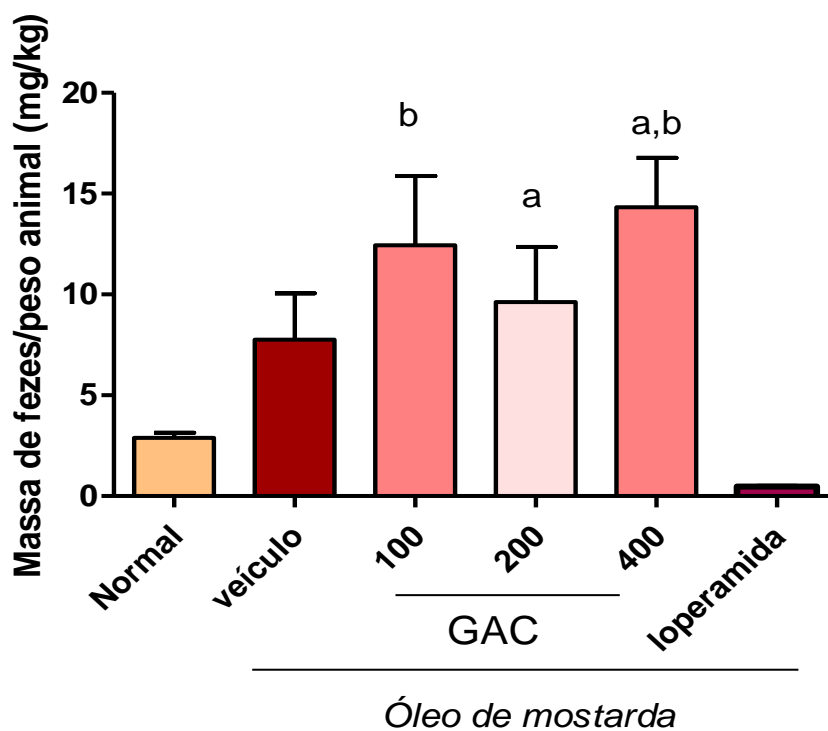
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em gramas de fezes eliminadas pelos animais após a administração do fitoterápico. ^a $p < 0,05$ versus grupo loperamida (ANOVA e teste Newman-Keuls).

Figura 31 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho sobre a perda de peso corporal dos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.



Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da quantidade em gramas de peso perdido pelos animais após a administração do fitoterápico. ^a $p < 0,05$ *versus* grupo loperamida (ANOVA e teste Newman-Keuls).

Figura 32 - Efeito das Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) sobre a quantidade de fezes eliminadas (g) por peso de quilo corpóreo dos animais no modelo de diarréia induzida por óleo de rícino em ratos.



Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. da quantidade de fezes (g) eliminada por quilo de peso corpóreo do animal, no intervalo de 2 hs após a administração de óleo de rícino para 6 ratos. ^a $p < 0,05$ versus grupo loperamida, ^b $< 0,05$ versus grupo normal (não-tratado) (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

6. DISCUSSÃO

A toxicidade de plantas medicinais é considerada um problema sério de saúde pública, pois a ocorrência de efeitos adversos oriundos do uso desses fitomedicamentos ocorrem de forma expressiva, embora existam poucos registros no Brasil (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O presente estudo avaliou, inicialmente, a segurança não clínica do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho® (GAC) em roedores e células de cultura. As GAC foram analisadas por HPLC, o que permitiu detectar e quantificar simultaneamente os marcadores químicos/espécie, com o seguinte ranking de concentração: apigenina > gentiopicrosidio > trans-anetol e/ou estragol.

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos adversos em um período de tempo mais curto, com a administração de dose única ou fracionada no período de 24 horas, com observação clínica de sinais e sintomas que podem ocorrer durante 14 dias. (BRASIL, 2004). Um ensaio de toxicidade aguda bem conduzido oferecer uma lista de dados, incluindo letalidade / mortalidade, sinais clínicos, mudanças de pesos corporais, identificação de órgãos-alvo e considerações farmacocinéticas preliminares (GAD; CHENGELIS, 1998).

Na realização do ensaio de toxicidade aguda, foi observado que a administração de uma dose única das Gotas Arthur de Carvalho® (em concentrações crescentes: 125, 250, 500, 750, 1000 e 2000 mg/kg) em camundongos de ambos os sexos mostraram ausência de letalidade até a dose de 2000 mg/kg, ou seja, não houve morte de nenhum animal nas doses testadas. Assim, a DL_{50} parece estar acima de 2 g/Kg. Na observação clínica dos sinais apresentados pelos animais testados, as GAC a partir da dose de 750, 1000 e 2000 mg/kg produziram algumas reações nos animais como diarreia, analgesia, sedação, piloereção e letargia. Esses sintomas desapareceram com o tempo, sendo observadas somente nas primeiras 24 horas e durante os 14 dias de observação dos animais tratados, não foi observada nenhuma alteração.

Estes sintomas observados nos animais são confirmados por trabalhos anteriores (ZANOLI et al, 2000; ALEXANDROVICH et al, 2003; BADGUJAR et al, 2014.), que mostraram que os extratos ou constituintes químicos de camomila, erva-doce ou genciana possuem efeitos nos sistemas gastrointestinal e nervoso central. De acordo Savino et al. (2008) e Valissi (2011) o extrato de camomila foi capaz de reduzir significativamente a motilidade intestinal e tem um efeito sedativo, enquanto que a

administração de erva-doce, também induz a sedação e aumento da motilidade gástrica e espontânea das secreções ácidas gástricas em roedores.

Parâmetros de peso corporal são frequentemente determinados em testes de toxicidade, sendo considerado, um indicador sensível, mas não específico de saúde. No presente trabalho, o tratamento agudo e subcrônica dos animais (fêmeas e machos) com doses de GAC não interferiu com a capacidade dos animais para ganhar ou manter o seu peso. Além disso, não foi observada mortalidade ou morbidade dos animais tratados.

Diante dos sinais clínicos demonstrados pelos animais durante o tratamento com as GAC, os estudos de toxicidade aguda prosseguiram com a avaliação dos efeitos do fitoterápico administrados nas maiores doses sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais. O tratamento agudo dos animais de ambos os sexos com GAC em doses mais elevadas (1 e 2g/kg) apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos, que foram reproduzidos apenas no grupo feminino após o tratamento subcrônico com GAC. Estudos anteriores (KRASOVSKIJ, 1975; GAD; CHENGELIS, 1998) demonstraram que as espécies de roedores fêmeas tendem a ser mais sensíveis do que os machos, e em geral, as diferenças foram de 8 a 12%, sendo um pouco maior em ratos do que em camundongos.

No presente estudo, o tratamento agudo de ratos com a dose mais elevada de GAC aumentaram ligeiramente os números de neutrófilos ($18,2 \pm 1,8\%$) e monócitos ($2,7 \pm 0,5\%$) para as fêmeas, ao passo que os valores para os machos (neutrófilos: $8,8 \pm 1,0\%$; monócitos : $2,1 \pm 0,3\%$) foram reduzidos. No entanto, independentemente das alterações induzidas por GAC (2g/kg), os valores de neutrófilos e monócitos foram semelhantes aos valores de controle de neutrófilos e monócitos encontrados em Restel et al. (2014) (neutrófilos em fêmeas: $18,3 \pm 6,0\%$) e Vasconcelos et al (2007) (ambos os sexos: $2,0 \pm 0,3\%$). Neste contexto, os valores reduzidos de neutrófilos em ratos machos induzidos pela GAC podem ser referidos a um efeito de toxicidade, mas a influência de outros fatores nas células de sangue dos animais não pode ser descartada. Neste contexto, a literatura (CAMPBELL; ELLIS, 2007; RESTEL et al, 2014; BRANCO et al, 2011) mostraram que os parâmetros hematológicos de camundongos ou ratos são influenciados por vários fatores, incluindo o local de coleta de amostras, idade, gênero, condições ambientais e estresse.

A toxicidade de algumas drogas tem sido observada dependendo do sexo dos animais. Um número crescente de drogas tem sido descrito por induzir efeitos tóxicos, predominantemente em um dos sexos animal, por estarem diretamente relacionadas com

variações no metabolismo de drogas por machos e fêmeas. (HU et al, 1993; ROFF *et al.*, 1992). Shah, Qureshi, Ageel (1991) avaliaram os efeitos agudo e crônico do extrato de *Foeniculum vulgare* em camundongos de ambos os sexos nas doses 0,5, 1,0 e 3 g/kg (agudo) e 100 mg/kg (crônica) e foi possível observar que o extrato não causou mortalidade em camundongos machos, que apresentaram ganho de peso durante o período de estudo (90 dias), enquanto as fêmeas tiveram perda ou nenhum ganho de peso. Em estudo de Branco (2011), foi realizada a avaliação do extrato hidroalcoólico de *Foeniculum vulgare* durante 28 dias e o tratamento com o fitoterápico resultou em diminuição de peso nas fêmeas tratadas. Pode-se relacionar que a redução do peso corpóreo dos animais seja um indício simples de toxicidade após a exposição (RHIOUANIA et al., 2008), entretanto, não podemos desconsiderar outros fatores relacionados ao animal, como idade, número de animais/caixa, competição por comida, etc.; que pode causar essas variações de peso.

Estes achados corroboram os resultados obtidos no tratamento agudo de animais com GAC, que mostra que o sexo feminino são mais sensíveis do que os machos, e mostram que a interferência das GAC para os valores de neutrófilos podem variar de acordo com o sexo, o tratamento e a dose do fitoterápico.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos dos animais tratados com a dose única das GAC mostraram que, não foram observadas alterações significativas dos grupos testados em relação ao grupo controle, com exceção para os níveis de glicose dos camundongos machos tratados com a maior dose, que mostraram um aumento na glicemia ($151,2 \pm 4,4$ mg/dL) em relação ao controle ($117,2 \pm 9,6$ mg/dL), com um incremento da ordem de 29%. Na avaliação hematológica, as GAC promoveram alterações significativas em parte dos parâmetros investigados, tais como CHCM, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos. Embora as GAC tenham promovido uma alteração significativa no nível de CHCM (GAC 2 g/kg: $29,55 \pm 0,16$; controle: $28,64 \pm 0,28$) e no número de neutrófilos segmentados (GAC 1g/kg e 2 g/kg: $15,50 \pm 2,21$ e $18,25 \pm 1,79$; controle: $16,67 \pm 1,83$), estas variações foram discretas, não ultrapassando 10% em relação ao grupo controle.

Outros estudos de toxicidade realizados com plantas que compõem as GAC, corroboram com os resultados do presente estudo, como o desenvolvido por Shah *et al.*, (1991) que ao avaliarem a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Foeniculum vulgare* (0,5; 1,0 e 3,0 g/kg, v.o.) não registrou morte ou sinal de toxicidade nos animais, corroborando com os nossos resultados. Mohamad et al., (2011) avaliaram o extrato das

sementes do funcho em camundongos (doses crescentes 50-1000 mg/kg, via i.p.) e não foi observada morte de nenhum animal ou mudança ponderal significativa nos animais testados até a dose de 100 mg/kg. A partir de 500 mg/kg, houve perda de apetite e piloereção. Já na maior dose, de 1000 mg/kg, metade dos animais morreram e foram observados vários sinais clínicos 24 horas após a administração (sedação, desordem de movimentos, hiperatividade transitória).

Já Sebai et al., (2014) mostraram que a estimativa da DL_{50} do extrato aquoso de *Matricaria recutita* foi acima de 3200mg/kg, enquanto Chandrashekhar (2011) demonstrou que o extrato metanólico da planta até a dose de 3200 mg/kg não foi letal ou induziu sinais de toxicidade, conforme discutido anteriormente. Corroborando os dados obtidos no presente estudo, o FDA classifica tanto o óleo essencial quanto o extrato de camomila (ativo majoritário nas GAC) como seguros (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008).

O estragol, substância ativa presente na espécie *Foeniculum vulgare* deve ser observada com atenção, já que existem relatos de efeito carcinogênico, como danos de tecidos e desenvolvimento de tumores malignos. O efeito carcinogênico do estragol não possui ação direta, mas sim, através da ativação metabólica de moléculas e radicais livres que causam danos no DNA (RATHER et al., 2012). A EFSA (*European Food Safety Authority*) sugere o uso do MOE (*Margin of Exposure*) para avaliação dos riscos de compostos usados em alimentos e prováveis danos genotóxicos e carcinogênicos. O estragol possui o MOE entre 129-471, e de acordo com a EFSA, qualquer composto com MOE abaixo de 10.000 pode ser considerado um fator de risco para uso em humanos (GORI et al., 2012).

Com base nos resultados obtidos no estudo de toxicidade aguda e considerando os guias para estudos de toxicidade não-clínica (BRASIL, 2010; OECD 425), os estudos de toxicidade de doses repetidas foram realizados com o tratamento diário dos animais de ambos os sexos com as GAC, por via oral, nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg durante 30 dias. Durante este período, os ratos submetidos ao tratamento apresentaram aspecto sadio, bom estado geral, sem ocorrência de qualquer alteração do aspecto físico dos mesmos. O tratamento dos animais com as Gotas Arthur de Carvalho® não alterou o desenvolvimento ponderal dos animais (ambos os sexos), pois não ocorreram diferenças significativas dos grupos tratados com o fitoterápico (250, 500 e 1000 mg/kg) em relação ao grupo controle em relação ao ganho de peso durante os 30 dias de tratamento, por via oral, com as GAC.

No estudo de toxicidade de doses repetidas as GAC (250, 500 e 1000 mg/Kg, v.o.) administrada por até 30 dias não foi letal em ratos de ambos os sexos. Foram observadas algumas alterações, principalmente nas ratas, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em relação ao grupo controle.

O tratamento subcrônico dos animais com as GAC (250 – 1000 mg/Kg) promoveu um maior número de alterações bioquímicas nas fêmeas em relação aos machos. As fêmeas tratadas principalmente com a maior dose de GAC, mostraram aumento significativo no nível de glicose ($97,38 \pm 4,88$ mg/dL) e redução de triglicérides ($30,13 \pm 2,99$) e de amilase ($556,7 \pm 34,3$) quando comparados ao grupo controle ($71,38 \pm 5,13$; $43,13 \pm 4,71$; $563,2 \pm 31,3$ mg/dL, respectivamente). Em relação aos machos, estes tratados com maior dose apresentaram um aumento na glicemia ($114,3 \pm 9,76$ mg/dL) em relação ao controle ($83,29 \pm 3,16$ mg/dL). Em algumas circunstâncias embora o tratamento com GAC tenha induzido alterações em parte dos parâmetros bioquímicos investigados, estas mantiveram-se dentro da faixa de normalidade (para fêmeas, valor de referência dos níveis de glicose 59,59 - 107,15 mg/dL e para machos para o mesmo parâmetro: 75,57-126,65 mg/dL), baseado em valores de referência da literatura (CLIFFORD; GIKNIS, 2008) e em estudo prévio do nosso laboratório (LEAL et al., 2003).

As GAC reduziram significativamente os níveis de AST/TGO e de triglicérides em ratas. Esse efeito pode estar relacionado a presença do gentiopicrosídeo e anetol no fitoterápico, princípios ativos/marcadores químicos das matérias-primas ativas das GAC. Ozturk et al. (1998) sugerem em seu estudo que o extrato etanólico de *Gentiana lutea* possui uma alta atividade colerética quando aplicado em doses múltiplas, atividade que pode ser relacionada ao gentiopicrosídeo, um composto iridóide que foi capaz de inibir danos hepáticos induzidos química e imunologicamente em ratos. O efeito hepatoprotetor do gentiopicrosídeo também pode ser visto no estudo de Lian et al. (2010), que avaliou seu potencial hepatoprotetor in vivo, com a administração de d-galatosamina/Lipopolissacarídeo (LPS), toxina hepática-específica que aumenta a sensibilidade dos animais para o efeito letal de LPS, produzindo apoptose hepática seguida de falha fulminante do órgão, com significativo aumento dos níveis de AT e ALT. O gentiopicrosídeo foi capaz de diminuir os níveis de AST e ALT mesmo com a administração de d-Gal/LPS, reforçando o efeito hepatoprotetor da molécula. No entanto, Singh et al (2012) avaliaram a toxicidade hepática da apigenina, um princípio ativo da camomila (principal constituinte do GAC), e foi encontrado que a administração

intraperitoneal deste flavonóide nas doses de 100 e 200 mg/kg, aumentou significativamente os níveis de ALT, AST nos animais. Neste contexto, é possível que as GAC não tenham induzido esses aumentos significativos nos níveis das transaminases nos animais tratados porque a dose de apigenina que os animais foram expostos, por via oral com GAC, era inferior a 100 mg/kg.

Segundo Garg et al (2011), o trans-anetol, principal componente do *Foeniculum vulgare*, mostrou desempenhar papel importante no tratamento das dislipidemias, onde ratos alimentados com ração rica em gordura, tiveram seus parâmetros lipídicos diminuídos, como o colesterol, triglicerídeos e HDL. Essa atividade pode ser relacionada à presença de flavonóides no extrato, pois vários estudos sugerem que os flavonóides são responsáveis por atividades terapêuticas através de vários mecanismos, como por exemplo, a atividade antioxidante.

De acordo com Panda e Kar (2007) a administração de apigenina foi capaz de diminuir os níveis de glicose em ratos com diabetes induzida por aloxano, sugerindo o uso desse composto para regulação da hiperglicemia. Também foi possível observar a redução do colesterol total dos animais, sintoma comum em diabéticos, reforçando a propriedade antidiabética da apigenina. Análises da planta *F. vulgare* mostraram atividade hipoglicemiante e existem indícios que os frutos são eficazes na redução da glicemia, particularmente em diabetes crônica (SUSHUTA et al., 2006; JAVADI et al., 2008). A partir estas informações podemos observar os efeitos contraditórios no nosso trabalho com os dados da literatura, o que pode ser justificado pela presença de 3 espécies vegetais nas GAC que pode estar contribuindo para a hiperglicemia, muito embora que ainda esteja dentro dos valores de referência.

O tratamento subcrônico de ambos os sexos de ratos com GAC (500 – 1000 mg/Kg) interferiu de forma significativa apenas nos parâmetros hematológicos de ratas (RBC, HTC, RDW e PLT). O aumento do número de neutrófilos segmentados induzido pelas GAC na dose de 250 mg/Kg em ratos, sugerem que possivelmente durante o período de tratamento os animais podem ter desenvolvido um processo inflamatório sem comprometimento do seu estado físico. Embora a administração do GAC tenha induzido mudanças nesses parâmetros hematológicos, os valores dos grupos de GAC (250 - 1000g/Kg) ficaram dentro da normalidade (CLIFFORD; GIKNIS, 2008; MELO et al, 2012).

Para complementar a avaliação do potencial tóxico do fitoterápico em estudo, também foi realizada a avaliação histopatológica dos principais órgãos dos animais

(machos e fêmeas) para comprovação de segurança do produto. A análise histopatológica dos órgãos de ratos tratados com GAC permitiu demonstrar que o produto não induziu alterações significativas nos órgãos vitais, incluindo o rim, coração, cérebro, fígado, pulmão e estômago. Apesar de ligeiros sinais de inflamação observados em alguns órgãos dos animais, esses sinais foram encontrados tanto nos animais tratados quanto nos animais do grupo controle, além do que esses achados não foram refletidos de forma significativa nos parâmetros hematológicos. As análises histológicas dos fígados dos animais tratados com as Gotas Arthur de Carvalho mostraram uma arquitetura preservada, sem sinais de necrose nos hepatócitos ou apoptose, mas com presença de células de gordura (sem área específica) e sinais de congestão no vaso. Esses sinais foram encontrados de forma semelhante nos animais tratados e nos animais do grupo controle, o que nos leva a acreditar que não existe alguma relação de toxicidade pelo tratamento com as GAC.

O acúmulo de gordura nos hepatócitos encontrado nos grupos tratados e não tratados com GAC, nos leva a crer que não há relação com a hepatotoxicidade da fitoterápico na dose testada. No entanto, estudo adicional deve ser realizado para confirmar esta hipótese, considerando que Choi et al (2007) mostraram que a apigenina (presente na *M. chamomilla*) e *F. vulgare* tem efeito esteatogênico em células de hepatoma humano SK-HEP1, diminuindo β -oxidação de ácidos graxos e aumento da lipogênese. Observando em conjunto os resultados clínicos e laboratoriais apresentadas pelos animais após a administração sistêmica do GAC (250- 2000 mg/ Kg), o NOAEL (*no observable adverse effect level* - nível sem observações de efeitos adversos) do GAC parece ser acima de 500 mg / Kg.

Considerando os resultados obtidos na avaliação da toxicidade do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho *in vivo*, deu-se o seguimento para determinação do comportamento do produto a nível celular. Ensaio *in vitro* podem ser bastante úteis na avaliação do perfil tóxico de substâncias químicas, além de necessitarem de pequenas quantidades da substância teste para sua execução. Para avaliar essa atividade, foram realizados testes com neutrófilos humano e células de hepatoma humano, HepG2, com mensuração da atividade da enzima LDH e do MTT. A LDH é um tetrâmero de quatro subunidades com quatro locais de ligação independentes que ocorre no citoplasma, por isso em condições normais seu nível no soro é baixo (GUPTA; GOAD; KADEL, 1991), e somente quando ocorre lesões na membrana plasmática esta enzima é encontrada em níveis elevados no meio extracelular (KABEYA, 2002; PEAKALL, 1992). Dessa forma, a determinação da atividade da LDH permite detectar possível efeito citotóxico de novos

fármacos, por exemplo a nível de membrana plasmática. Quanto ao teste do MTT, este baseia-se na redução do sal de tetrazólio (coloração amarela) principalmente por uma família de enzimas succinato-tetrazol redutase ao sal de formazan, que possui coloração púrpura (MOSMANN, 1983). Assim, a ausência de redução do MTT é indicativo de redução na atividade metabólica celular, ou seja na viabilidade celular (VERMA *et al.*, 2010).

Na avaliação da viabilidade celular das Gotas Arthur de Carvalho pela mensuração da atividade de LDH (enzima presente no citoplasma celular, que constitui um marcador de integridade da membrana) foi possível observar que somente na dose mais alta (1000µg/mL) houve um aumento significativo da atividade da enzima, sugerindo uma baixa toxicidade do fitoterápico sobre a membrana celular de neutrófilo humano.

A citotoxicidade das GAC em neutrófilos humanos também foi investigada através da medida da produção de sal de formazan no teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2) -2,5-difeniltetrazólio). De acordo com os resultados, em nenhuma das doses testadas (1-1000µg/mL) houve redução da viabilidade celular avaliada pelo MTT, certificando uma baixa toxicidades das GAC, particularmente nesse método, relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

O presente estudo determinou de maneira pioneira a ausência de citotoxicidade das GAC® em neutrófilo humano, contudo existem na literatura estudos de segurança acerca das espécies que compõem esse fitoterápico. Trovato et al. (1996) mostraram que o extrato aquoso de *Matricaria recutita* L. não foi citotóxico em células do sarcoma de Yoshida. Bijak et al (2013) apresentaram que o extrato seco de *M. chamomilla* não possui nenhum efeito citotóxico em células humanas (linhagem de pulmão) e de camundongos (fibroblastos). Kaileh at al. (2007) através do demonstraram através do teste do MTT a ausência de citotoxicidade do extrato orgânico dos frutos de *Foeniculum vulgare*. Ainda, mais recentemente a apigenina (1,85 mM) não mostrou genotoxicidade em linhagem de células leucêmicas - HL-60 (ANTER et al., 2011). Testes *in vivo* com a tintura de *Matricaria recutita* não mostraram efeito citotóxico ou mutagênico nas doses correspondentes até 100 gotas diárias do produto

(DELARMELINA et al., 2012). Portanto, os dados obtidos no presente estudo acerca da citotoxicidade das GAC®, corroboram estudos anteriores que mostraram a ausência de citotoxicidade de produtos derivados ou moléculas obtidas de espécies que compõem esse fitoterápico.

Este trabalho também investigou a possível toxicidade do GAC em células de hepatoma HepG2 determinado pelo ensaio de MTT. A adição de quantidades crescentes de concentrações de GAC em células HepG2 interferiu significativamente com a viabilidade das células em concentrações elevadas do fitoterápico, o que sugere que o produto possui baixa toxicidade para o metabolismo de células hepáticas. Este resultado é, possivelmente, obtido através de uma ação sinérgica das espécies que compõem o fitoterápico (camomila, erva-doce e gengiana), que tem apigenina entre outros componentes ativos. A presença deste flavonóide está relacionada com uma atividade anticâncer em muitas células cancerígenas humanas, incluindo HepG2, baixa citotoxicidade e ausência de atividade mutagênica, além da sua atividade anti-inflamatória (LIN et al, 2012; MASCARAQUE et al, 2015). Além disso, Choi et al (2007) demonstraram que, o extrato de erva-doce (aquoso e etanólico) mostrou pouca ou nenhuma citotoxicidade em células de hepatoma humano SK-HEP1.

A baixa toxicidade do fitoterápico GAC observada pela realização do presente estudo motivou prosseguirmos os estudos pré-clínicos com esse produto, agora avaliando seu possível efeito farmacológico no sistema gastrointestinal, efeito esperado do uso do fitoterápico em estudo considerando sua indicação no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Destaca-se que os resultados obtidos no estudo da avaliação da segurança das GAC orientou a seleção de doses do fitoterápico para o estudo de eficácia, onde foram empregadas doses abaixo da NOAEL estimada para o fitoterápico.

A avaliação farmacológica das GAC foi realizada investigando os seus possíveis efeitos sobre a motilidade gastrointestinal, a secreção gástrica, dispepsia, diarreia e a dor visceral. Essas ações foram investigadas considerando, dentre outros aspectos os principais sintomas das distúrbios gastrointestinais funcionais, que incluem dor, náuseas, vômitos, saciedade precoce e azia (HOLTMANN et al., 2006).

Inicialmente foi avaliado o efeito das GAC sobre o trânsito intestinal normal de camundongos através do modelo do carvão ativado, uma ferramenta muito útil na avaliação farmacológica de um novo fármaco, capaz de determinar seu possível efeito inibitório ou estimulatório sobre a atividade peristáltica. No presente estudo, foi observado que a administração oral das GAC não induziu alteração no trânsito intestinal

normal de camundongos, enquanto a morfina, usada como droga padrão - agonista opióide, reduziu significativamente o trânsito intestinal dos animais, confirmando o potencial dos opiáceos como fármacos capazes de induzir a constipação intestinal (ROEBEL et al., 1979; WALTERS & MONTAGNINI, 2010; CAMILLERI, 2011).

O betanecol é um agonista colinérgico seletivo para receptores muscarínicos, resistente à hidrólise pela acetilcolinesterase, e considerado um fármaco pró-cinético, capaz de aumentar a atividade peristáltica do trato gastrointestinal. Os principais subtipos de receptores muscarínicos presentes no trato gastrointestinal são M2 e M3 (RANG et al., 2012; BROWN; TAYLOR, 2003). No presente estudo o aumento do trânsito intestinal induzido por betanecol em camundongos foi significativamente inibido pelas GAC, bem como pela atropina, antagonista muscarínico. Ainda nas avaliações dos possíveis efeitos das GAC sobre o sistema gastrointestinal, foi observado que o fitoterápico, ao contrário da cimetidina, um antagonista histamínico – receptor H2, não interferiu no volume secretório gástrico e na acidez total gástrica determinadas em ratos submetidos a ligadura de pilórica.

Estudo realizado por Savino et al (2008; 2005) mostraram que o fitoterápico ColiMil (*Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare* e *Melissa officinalis*) indicado na clínica no tratamento da cólica infantil, e que possui uma composição comparável às GAC, é capaz de inibir o trânsito intestinal de camundongos normais ou tratados com óleo de cróton. Análises isoladas dos extratos de *Matricaria recutita* e *Melissa officinalis* mostraram que estes, mas não o extrato de *Foeniculum vulgare* interferiram na motilidade intestinal. Confirmando esse estudo, Calzado et al. (2010) analisaram o extrato metanólico da camomila sobre a hiperperistalsia em ratos, encontrando que o extrato em questão inibiu em 56% o trânsito intestinal dos animais, sendo considerada um efeito moderado, quando comparado com a loperamida, um fármaco opiáceo.

Acerca dos constituintes bioativos presentes nas GAC, Di Carlo et al. (1993) mostraram que a apigenina (12,5 – 50 mg/Kg), flavonóide bioativo da camomila (componente majoritário das GAC) foi capaz de reduzir o trânsito intestinal em camundongos. Assim, possivelmente, parte do efeito inibitório das GAC observado sobre o trânsito intestinal de camundongos está relacionado à presença de apigenina no fitoterápico, que quando administrado na dose de 400 mg/Kg, por exemplo, expôs os animais a uma dose de apigenina de aproximadamente 7 mg/Kg. Assim, a inibição do trânsito intestinal pelas GAC em animais sob a ação do betanecol, está possivelmente relacionado a uma ação da apigenina, presente na camomila.

O aumento da secreção de ácido clorídrico, assim como alterações da integridade da mucosa e dos fatores de citoproteção gástrica podem contribuir para a patogênese da úlcera péptica, um dos sintomas associados aos quadros de dispepsia (BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002). A secreção ácida é regulada principalmente, pelas células parietais, acetilcolina, gastrina e histamina (HERNEY; SACHS, 1995), e acredita-se que seu aumento seja pela ativação do refluxo vago-vagal por estimulação dos receptores de pressão na mucosa gástrica no modelo de hipersecreção de ligadura do piloro (BAGGIO et al., 2003). A patogênese da úlcera péptica envolve um distúrbio no balanço entre os fatores agressivos (produção de ácido gástrico e pepsina) e mecanismos de defesa da mucosa (produção de muco e bicarbonato). Atualmente, o tratamento desta patologia é geralmente baseado na inibição da secreção ácida gástrica por bloqueadores dos receptores H₂ de histamina, inibição da bomba de prótons ou ainda, o uso de muscarínicos.

Os inibidores H₂ se ligam de modo reversível aos receptores H₂ da célula parietal, inibindo a resposta secretória ácida desses receptores. Apresentam efetividade comprovada e são usados por milhões de pessoas no mundo. A eficácia clínica da droga depende da inibição gástrica desejada e de aspectos inerentes a essa inibição. Essa classe de drogas é mais eficiente em inibir a secreção ácida basal, particularmente a secreção ácida noturna, sendo a cimetidina um dos representantes de medicamentos desta classe (GUIMARÃES, MARGUET; CAMARGO, 2006).

As GAC nas concentrações testadas (100-400 mg/kg) não foram capazes de alterar significativamente os valores de volume secretório e acidez gástrica em ratos submetidos ao modelo de ligação do piloro. A cimetidina, droga utilizada como controle positivo, foi eficaz em reduzir esses dois parâmetros nos animais tratados.

Khayaal et al (2006) avaliaram as espécies vegetais que compõem o fitoterápico Iberogast, onde a camomila é uma das plantas presentes na formulação, que tem como indicação de uso nas desordens gastrintestinais. O extrato aquoso de *M. chamomille* foi testado e relatada a sua eficácia na diminuição da produção de ácido gástrico, sendo possível inclusive, encontrar resultados semelhantes do extrato de camomila com os valores encontrados pela cimetidina.

O extrato aquoso (10% v/v) de *F. vulgare* foi utilizado para avaliar o possível aumento de secreção ácida gástrica em ratos. A espécie vegetal foi capaz de aumentar quase quatro vezes o valor de secreção (em mL), quando comparados com o grupo basal (0,42 mL; 0,12 mL, respectivamente) (VADUSEVAN et al., 2000).

De forma contraditória aos achados deste trabalho, os trabalhos citados acima mostraram atividades antagônicas do extrato de camomila e de funcho, e que no fitoterápico GAC eles estão presentes na composição da formulação. Provavelmente esses efeitos podem ter sido anulados, justificando a ausência de efeitos das GAC no volume secretório e acidez gástrica nos animais testados.

Dentre os sintomas típicos presentes nas desordens gastrointestinais podemos relacionar desconforto ou dor e distensão abdominal, flatulência, náuseas, vômitos e alteração do hábito intestinal (constipação, diarreia ou alternância de constipação e de diarreia) (HOLTMANN et al., 2006). Nesse sentido, prosseguindo o estudo das GAC, foi investigado seu efeito sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino em camundongos.

A administração oral das GAC em camundongos ampliou o efeito laxante/diarreico do óleo de rícino, não mostrando uma ação dose-dependente. Por outro lado, a loperamida (droga padrão) inibiu significativamente a diarreia induzida pelo óleo de rícino, por prolongar o trânsito intestinal via receptor opióide μ (DE LUCA; COUPAR, 1996).

A diarreia significa mudança no hábito intestinal, e normalmente estão envolvidos mais de um mecanismo de indução, como alteração na motilidade e acumulação de fluido no lúmen intestinal, que pode ser ocasionado por um aumento na secreção de eletrólitos, um aumento na ingestão de substâncias osmóticas ou a presença de microorganismos, relacionada a uma diarreia infecciosa (FIELD, 2003; CHRISTENSEN, 1994).

A diarreia induzida pelo óleo de rícino está relacionada especialmente a presença do ácido ricinoléico, que age aumentando a atividade peristáltica e alterando a permeabilidade da membrana à água e eletrólitos, reduzindo a absorção de Na^+ e K^+ e decrescendo a atividade da Na^+ e K^+ ATPase (AMMON; THOMAS; PHILIPS; 1974). Ainda, há um consenso de que o óleo de rícino induz a diarreia estimulando a síntese de prostaglandinas (AWOUTER, 1978). No presente estudo, a ampliação do efeito diarreico do óleo de rícino pelas GAC pode envolver um ou mais mecanismos de ação promotores da diarreia, que não relacionado a uma ação peristáltica. Estudo anterior (KLEIN, 1998) determinou o efeito laxante do funcho, bem como da camomila no modelo experimental de diarreia induzida pelo óleo de rícino (SEBAI et al., 2014). Dessa forma, pelo menos parte do efeito das GAC determinado, está relacionado a presença dessas espécies no produto. Além disso, outras formulações farmacêuticas contendo quatro espécies vegetais incluindo *Foeniculum vulgare* e *Pimpinella anisium*, ambas aromáticas e ricas em anetol,

possui comprovado efeito laxante determinado através de estudo clínico (PICON et al., 2010).

Como um tipo de desordem do trato gastrointestinal, a dispepsia funcional acomete em torno de 20% dos pacientes do mundo, sendo considerada uma das doenças mais prevalentes. É definida como uma dor crônica e recorrente ou apresentada com desconfortos centralizados na parte superior do abdômen, onde os sintomas são a forma de detecção da dispepsia funcional, já que não provoca nenhuma anormalidade funcional nos pacientes (TALLEY, 2006; SHAIB; EL-SERAG, 2004, TACK et al. 2006a). A etiologia e a fisiopatologia da dispepsia não estão plenamente esclarecidas, mas vários fatores estão envolvidos: alteração da sensibilidade e percepção visceral, disfunção gastrointestinal motora e secretórias, infecção por *Helicobacter pylori*, fatores psicossociais e contribuições genéticas (TACK; LEE, 2005, FILIPOVIC et al., 2013; LIU et al., 2013).

O desafio da busca de novos tratamentos para as desordens gastrointestinais é significativo, pois, mesmo com o surgimento de novas drogas, o uso de tratamentos complementares para melhorar os sintomas e a qualidade de vida dos pacientes é contínuo, principalmente por aqueles acometidos pela dispepsia funcional e síndrome do intestino irritável. Nesse contexto, os modelos experimentais de desordens gastrointestinais têm um papel importante auxiliando na possível obtenção de novos fármacos, que apresentem vantagens terapêuticas em relação a terapia atual para o tratamento dessas desordens gastrointestinais. Dentre os modelos existentes, podemos relacionar a dispepsia induzida por cisplatina em ratos.

O uso clínico da cisplatina (quimioterápico) está associado a ocorrência de efeitos colaterais a nível do trato gastrointestinal, especialmente a experiência de náusea, vômito, anorexia e mal-estar gástrico. Dessa forma, a cisplatina tem sido empregada como modelo experimental para indução de sintomas que integram a clínica da dispepsia, sendo assim uma ferramenta muito útil para a pesquisa de fármacos anti-eméticos. A indução desse modelo nos roedores, tais como, ratos e camundongos constitui um desafio, considerando que estes não possuem o reflexo da êmese. Porém, essa dificuldade tem sido superada pela indução nos animais do hábito de ingerir produtos sem valor nutricional, como o caulim, um comportamento denominado *pica* e que mimetiza a náusea e a êmese (VERA et al., 2006; TAKEDA et al., 1993). Vários agentes podem ser empregados na indução da êmese nesses animais (ex.: apomorfina, cisplatina, etc), que inclui fenômenos como a liberação de serotonina por células enterocromafins (ENDO et

al., 2002) e a ativação de neurônios na *area postrema or the nucleus tractus solitarius* (YAMADA et al., 2000). Ainda, destaca-se que fármacos utilizados clinicamente no controle da náusea e da êmese, como ondansetrona, dexametasona e bloqueadores da NK1 têm sido eficazes na redução do *pica* nos ratos (TAKEDA et al., 1993; de WIT et al., 2004).

O tratamento dos animais com as GAC promoveu um efeito anti-dispético/anti-emético comparável a ondansetrona, um antagonista 5-HT₃, reduzindo o *pica*, o retardamento e o conteúdo gástrico dos ratos em relação ao grupo controle (água+cisplatina). Ainda, à semelhança de trabalho anterior (LIU et al., 2006), foi observado no presente estudo que a administração de cisplatina nos ratos interferiu no peso corporal dos animais, que não mostraram um aumento gradual do peso ao longo do período de estudo (4 semanas), como observado nos animais do grupo não tratado. Esse efeito da cisplatina não foi inibido pelas GAC ou pela ondansetrona.

O retardo no esvaziamento gástrico é considerado um dos principais sintomas em pacientes com dispepsia funcional, pois acredita-se que esse atraso no esvaziamento gástrico pode reduzir a fome, aumentar a saciedade, e até mesmo causar desconforto gástrico, os quais representaria uma barreira significativa à alimentação adequada. Esse retardo também pode influenciar a função da secreção gastrointestinal, o que por sua vez pode afetar ainda mais a motilidade gastrointestinal, resultando em alterações no ambiente químico luminal, refluxo biliar anormal e os sintomas da dispepsia funcional (MEARIN et al., 1995; MOAYYEDI et al., 2003; TALLEY et al., 2006). Dessa forma, a inibição do retardo do esvaziamento gástrico apresentada pelas GAC, e o seu efeito anti-emético, sugere um potencial promissor desse fitoterápico no tratamento da dispepsia. O mecanismo pelo qual as GAC exercem seu efeito anti-dispético/anti-emético é desconhecido, podendo estar relacionado a modulação de um ou mais mediadores como serotonina, dopamina, neurocinina e/ou prostaglandinas, que têm um papel importante na gênese da emese (VEYRAT-FOLLET; FARINOTTI; PALMER, 1997; JOHNSTON; RUDD, 2014; TAKEDA et al., 1993; WIT et al., 2004).

Corroborando o potencial das espécies que compõem as GAC nas desordens gastrointestinais, vários estudos envolvendo fitoterápicos que têm em sua composição as espécies vegetais que fazem parte da formulação (*M. camomila*, *F. vulgare* e *G. lutea*), tem comprovado a eficácia clínica destas no tratamento destas desordens, como o Iberogast®. Este produto de origem europeia, presente no mercado há mais de 40 anos, possui eficácia frente aos distúrbios gastrintestinais, como a dispepsia e síndrome do

intestino irritável e úlceras induzidas por indometacina, demonstrou uma boa tolerabilidade em humanos, sem nenhuma modificação em parâmetros laboratoriais nos pacientes que utilizaram o produto, confirmando a sua segurança e eficácia em uso clínico (ROSCH et al., 2006) (ROSCH et al., 2006; KHAYYAL et al., 2001; KHAYAAL et al., 2006; BERTRAM et al., 2013).

Vários estudos (ALANIS et al., 2005; AL-HASHEM, 2010; ROSCH et al., 2006; SINGH, 2008) tem mostrado o potencial da camomila, genciana e funcho, e de seus respectivos constituintes bioativos, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. O efeito estimulante gástrico de *Gentiana lutea* deve-se principalmente a presença de glicosídeos secoiridóides de sabor amargo como a swertiamarina, gentiopicrosídio, amarogencina, e swerosídio (NEWALL et al., 1996). Os efeitos biológicos da genciana são devidos também a outros constituintes, como o ácido logânico (iridóide com atividade antiinflamatória), glicosídeos de xantonas (genciosídio e seu isômero) e xantonas (gencisina e a isogencisina) (RECIO et al., 1994). Extratos das raízes de *G. lutea* mostraram efeito antibacteriano contra *H. pylori*, com um CIM de 100 µg/ml (MAHADY et al., 2005).

Um outro fitoterápico, o Lomatol® (preparação composta por extratos de *Carum carvi*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita* e *Artemisia absinthium*) mostrou ser bastante eficaz no tratamento de pacientes com transtornos gastrintestinais quando comparado ao uso de metoclopramida, um antagonista dopaminérgico utilizado no tratamento das mesmas queixas. Os pacientes que utilizaram o fitoterápico relataram alívio dos sintomas, sem o surgimento de efeitos adversos significativos, que mostra que o medicamento de origem vegetal é seguro e eficaz quando comparado ao tratamento padrão (WESTPHAL; HORNING; LEONHARDT, 1996). E por fim, um fitoterápico do Japão, Xiao Pi-II, preparado com nove ervas chinesas: Dangshen (*Radix Codonopsis*), Baizhu (*Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*), Cangzhu (*Rhizoma Atractylodis Lanceae*), Fuling (*Poria*), Banxia (*Rhizoma Pinelliae*), Sharen (*Fructus Amomi*), Chenpi (*Pericarpium Citri Reticulatae*), Zhiqiao (*Fructus aurantii Submatutus*), Gancao (*Radix Glycyrrhizae*), utilizado tradicionalmente para regular a motilidade gastrointestinal e tratar a dispepsia, foi avaliado em comparação com a mosaprida (agonista seletivo dos receptores 5-HT₄), que aumenta a motilidade gastrointestinal. O fitoterápico aumentou o esvaziamento gástrico e diminuiu os sintomas pós-prandiais, sendo até mesmo superior à mosaprida, justificando o uso de Xiao Pi-II pela população e se tornando uma nova opção de tratamentos para esses pacientes (LIU et al., 2013).

Nas desordens gastrointestinais, a dor visceral tem um papel importante no desconforto relatado por pacientes (HOLTMANN et al., 2006). Isso, somada a observação de vários estudos (RAHIMI et al., 2013; BLUMENTHAL, 1998; NASTASIJEVIC et al., 2012) comprovando o potencial anti-inflamatório de extratos ou constituintes químicos das espécies que compõem as GAC[®], nos levou a investigar o potencial antinociceptivo desse fitoterápico em camundongos.

Os modelos animais utilizados na avaliação de moléculas com atividade antinociceptiva baseia-se na observação da resposta animal frente à utilização de estímulos de diversos tipos e duração, e são divididos em três categorias: os que utilizam estímulos térmicos, mecânicos e químicos (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). A nociceção desencadeia no animal comportamentos típicos, como lambar a área lesada, apresentar o reflexo da retirada da parte do corpo agredida pelo calor, já que o animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor. Portanto, drogas que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominadas antinociceptivas e, aquelas que induzem o comportamento nociceptivo são chamadas de pró-nociceptivas ou algogênicas (CARVALHO, 2011). O uso de substâncias algogênicas como capsaicina, mostarda e ciclofosfamida em animais, quando aplicado nas estruturas viscerais, pode provocar comportamentos relacionados à dor, como também reações inflamatórias, quando tanto os neurônios aferentes viscerais são sensibilizados ou quando os neurônios centrais sofrem sensibilização central. Na busca de novos produtos com atividade antinociceptiva, é utilizado o modelo agudo de dor visceral induzida pela instilação intracolônica de óleo de mostarda, para produzir comportamentos relacionados com a dor espontânea em camundongos (lamber o abdômen, alongamento e contorções musculares), que tem relação com os sintomas de distúrbios gastrointestinais em humanos (MAIA et al., 2006).

A dor e o desconforto são as principais sensações expressas pelas vísceras e aumentam a intensidade e frequência em pacientes com alguma desordem funcional. Os nociceptores viscerais sensibilizados podem contribuir para estas sensações alteradas, e sabe-se que poucas drogas estão disponíveis para o tratamento da dor de origem visceral (LIMA JUNIOR, 2005).

O alil-isotiocianato, o principal constituinte do óleo de mostarda, é um potente ativador neuronal que promove alodinia e hiperalgesia em poucos minutos após a administração. Seu principal mecanismo de ação está relacionado ao seu papel nos receptores da capsaicina TRPV1, além de desenvolver lesão tecidual direta com produção

de mediadores inflamatórios, como a bradicinina e prostaglandinas (LIMA JUNIOR, 2005).

No presente estudo pode ser observado que a administração de óleo de mostarda aos camundongos induziu um aumento significativo no número total de comportamentos de dor visceral em relação aos animais administrados apenas com salina. Porém, o pré-tratamento dos animais com as Gotas Arthur de Carvalho nas doses investigadas, promoveu à semelhança da morfina, fármaco padrão/agonista opióide, uma redução significativa ($p < 0,05$) no comportamento da dor/nocicepção visceral induzida pelo óleo de mostarda em relação ao grupo controle.

Estudo realizado por Kimball et al. (2005) mostraram que a administração intracolônica do óleo de mostarda nos animais induz um quadro de colite, que envolve um processo inflamatório intenso. Nesse contexto, considerando que os agonistas adrenérgicos- α_2 mostraram ação antinociceptiva em modelo de colite induzida por formalina em ratos (MIAMPAMBA et al., 1996), foi investigado no presente estudo a possível participação dos receptores adrenérgicos- α_2 no efeito antinociceptivo das GAC. Para tanto, foram empregados no estudo a clonidina e a ioimbina, agonista e antagonista adrenérgicos- α_2 , respectivamente. No estudo, ambos, clonidina e GAC, mostraram atividade antinociceptiva que foram revertidas na presença da ioimbina, sugerindo assim, que pelo menos parte do efeito antinociceptivo das GAC envolve a participação de receptores adrenérgicos- α_2 . Destaca-se o papel importante desses receptores, que exercem um efeito regulatório inibitório importante na modulação da dor aguda e hiperalgesia inflamatória, destacando um papel importante na dor de origem somática e também na de origem visceral, atuando via proteína G na inibição da enzima adenilato-ciclase para aumentar o efluxo celular de K^+ e suprimir as correntes de Ca^{++} , que impede a liberação de substância P e glutamato pelos terminais nervosos (MANSIKKA et al., 2004; MILLAN, 2002).

O sistema opióide exerce papel fundamental na modulação da dor tanto em condições fisiológicas quanto em condições inflamatórias (LOHMANN; WELCH, 1999; CUNHA et al., 2010; MAIA, 2006). Assim, prosseguindo os estudos foi investigada a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo das Gotas Arthur de Carvalho.

O tratamento dos animais com GAC (400 mg/kg, v.o.) ou com morfina (5mg/kg, s.c.) promoveu inibição significativa ($p < 0,05$) do número de comportamentos de dor nos animais, quando comparados ao grupo controle. Porém, à semelhança do que foi observado para a morfina, o efeito antinociceptivo das GAC foi revertido pela

naloxona, antagonista opióide- μ , sugerindo assim a participação dos receptores opióides também na antinocicepção visceral das GAC.

Estudos mostram que o efeito analgésico da morfina é mediado pela inibição da proteína G, que inibe a formação de AMPc e a condutância do Ca^{++} , enquanto ativa a condutância dos canais de K^+ , induzindo a hiperpolarização de células nociceptivas (NESTLER, 2004; RODRIGUES; DUARTE, 2000). Portanto, embora o efeito analgésico da morfina seja mediado por receptores μ , os canais de Ca^{++} e K^+ têm um papel importante na analgesia desse opióide (CHIOU & HOW, 2001; CUNHA et al., 2010; BENEDEK; SZIKSZAY, 1984). Assim, considerando os resultados até então obtidos acerca do mecanismos de ação antinociceptiva das GAC, foi investigada a participação do canal de K^+ ATP-dependente nesse efeito.

No presente estudo, foi observado que o efeito antinociceptivo das GAC não foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com a glibenclamida, antagonista do canal de K^+ ATP-dependente, enquanto o diazóxido (atua na abertura do canal de K^+ ATP-dependente) teve seu efeito significativamente revertido pela glibenclamida. Assim, diante dos resultados obtidos os canais de K^+ ATP-dependente parecem não estar envolvidos no efeito antinociceptivo visceral das GAC.

As GAC possuem efeito antinociceptivo visceral, que parece estar relacionado a ativação de receptores adrenérgicos α_2 e opióide μ , onde os canais de K^+ ATP-dependente parecem não ter um papel importante. Contudo, não pode ser descartada a participação de canais iônicos na ação das GAC, tais como os canais de cálcio, a serem investigados, juntamente com o possível envolvimento de receptores vanilóides, que têm também um papel importante na nocicepção induzida pelo óleo de mostarda. Por fim, destaca-se que possibilidade do efeito antinociceptivo das GAC estar relacionado a uma outra ação do produto, tais como efeito sobre a movimentação espontânea ou sedação, foi descartada pois as GAC (400 mg/Kg, v.o.) não induziu alteração significativa no parâmetro investigado (número de cruzamento) em relação ao grupo controle no teste do campo aberto.

Dentre as espécies que compõem as GAC, destaca-se a contribuição da camomila (matéria-prima ativa majoritária) para o efeito antinociceptivo do fitoterápico. Pinheiro et al. (2012) mostraram que a apigenina, flavonóide bioativo da camomila/marcador no controle de qualidade das GAC, possui efeito antinociceptivo inibindo tanto a primeira quanto a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. Além disso, a ação antinociceptiva desse flavonóide foi determinado

em outro modelo de nociceção, como contorção abdominal induzida por ácido acético, onde mostrou efeito comparável ao ácido acetilsalicílico e a morfina. Ainda, no mesmo estudo foi demonstrada a participação dos sistemas colinérgico e opióide no seu efeito antinociceptivo da apigenina, reforçando os resultados do presente estudo.

Corroborando o papel importante da camomila para o efeito antinociceptivo das GAC, estudos (LEITE et al., 2010; ROCHA, 2009) mostraram o potencial antinociceptivo do alfa-bisabolol, um sesquiterpeno da camomila, determinado através de vários modelos de nociceção, como o modelo experimental de dor visceral induzida pelo óleo de mostarda, contorção abdominal induzida por ácido acético e formalina em camundongos.

Estudo realizado no nosso laboratório (SILVEIRA, 2013) mostrou que o fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho[®] possui efeito relaxante muscular em intestino de rato, além de efeito antiespasmódico por mecanismo não-competitivo envolvendo provável inibição do influxo de Ca^{2+} a partir do meio extracelular. Assim, as GAC constituem um fitoterápico com dupla ação, ou seja, antiespasmódico e antinociceptiva, uma característica de interesse considerando que na clínica é comum medicamentos formulados pela associação de fármacos antiespasmódicos e analgésico para o tratamento da dor de origem espasmogênica.

Acerca de todos os dados no presente trabalho, pode-se considerar a sua relevância por ser um estudo inédito sobre a segurança e eficácia não clínica do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho (GAC), indicado tradicionalmente no Nordeste para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, corroborando suas indicações terapêuticas e justificando seu uso pela população. Ainda, destaca-se o efeito anti-dispético e antinociceptivo das GAC em modelo de dor visceral, isso, sem estar associado a constipação, como ocorre com opióides. Contudo, estudos adicionais são ainda necessários relacionados especialmente à determinação do mecanismo de ação de parte das atividades farmacológicas determinadas, como atividade anti-dispética, bem como perseverar nos estudos desse fitoterápico apoiando a realização de estudos clínicos, que irá viabilizar o registro das Gotas Arthur de Carvalho como fitoterápico no país.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As GAC mostraram uma baixa toxicidade tanto *in vitro* (neutrófilo e hepatócitos) quanto *in vivo* – em roedores, com estimativa de uma DL50 acima de 2g/kg. Ademais, estudo de toxicidade de dose repetida ratificou a baixa toxicidade do produto através de avaliações bioquímica, hematológica e histopatológica.

Na avaliação farmacológica, as GAC mostraram potencial antidispéptico, reduziu o trânsito intestinal induzido por betanecol, além do efeito laxativo. Ainda, o fitoterápico mostrou um efeito antinociceptivo no modelo de dor visceral induzido pelo óleo de mostarda onde tanto sistemas opióide e adrenérgico, além dos canais de potássio que mostraram um papel importante nessa ação.

Os dados não clínicos das GAC padronizadas quanto ao teor de marcadores ativos (apigenina, gentiopicrosídeo e anetol) são relevantes para compor todas as informações necessárias para a confirmação de segurança e eficácia desse fitoterápico tradicional na região Nordeste, fortalecendo a indicação do produto e viabilizando a renovação de seu registro, ou obtenção de novo registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Somada a isso destaca-se a importância de trabalhos dessa natureza que envolveu parceria universidade-empresa/ Indústria Farmacêutica, tornando o trabalho algo concretamente aplicada às necessidades sociais e econômicas da região.

REFERÊNCIAS

ABAD, A.N.A.; NOURI, M.H.K.; GHARJANE, A., TAVAKOIF, F. **Effect of Matricaria chamomilla hydroalcoholic extract on cisplatin-induced neuropathy in rats.** Chinese Journal of Natural Medicines, v. 9, n.126, p. 131, 2011

AL-HASHEM, F.H. **Gastroprotective effects of aqueous extract of Chamomilla recutita against ethanol-induced gastric ulcers.** Saudita Medical Journal, v. 31, p. 1211–1216, 2010.

AL-RAMAHI, R., JARADAT, N. AND ADAWI, D. **Use of herbal medicines during pregnancy in a group of Palestinian women.** Journal of Ethnopharmacology, v. 150, n. 1, p. 79—84, 2013.

ALANÍS, A.D., CALZADA, F., CERVANTES, J.A., TORRES, J., CEBALLOS, G.M. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology, v. 100, p. 153–157, 2005.

ALEXANDROVICH I, RAKOVITSKAYA O, KOLMO E, SIDOROVA T, SHUSHUNOV S. **The effect of fennel (Foeniculum Vulgare) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized, placebo-controlled study.** Alternative Therapy Health Medicine, v. 9, p.58-61, 2003.

ALMEIDA, F.R.C., OLIVEIRA, F.S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos.** Rio de Janeiro, p.176-188, 2006.

ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW. **Matricaria chamomilla (German chamomile).** Monograph, v. 13, n. 1, 2008.

AMARAL, V.L.L., FRAJBAT, M., PETREANU, M., ZERMIANI, T., FREITAS, R.A. MAISTRO, E.L., NIERO, R., BRESOLIN, T.M.B., CECHINEL FILHO, V., ANDRADE, S.F. **Reproductive toxicology and clastogenic evaluation in mice of a phytotherapeutic formulation obtained from Cinchona calisaya Weddel (Rubiaceae) used in Brazilian folk medicine as female fertility stimulant.** Journal of Ethnopharmacology, v. 155, p. 508–1512, 2014.

AMARAL, V.L.L. **Estudo de toxicidade reprodutiva e potencial mutagênico do fitoterápico contendo *Cinchona calisaya*, *Jateorhiza palmata*, *Centarium erythraea*, *Baccharis trimera*, *Artemisia absinthium*, *Matricaria recutita* e *Cinnamomum cassia*.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina. 2011.

AMENI, A.Z. **Avaliação Dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearea silvestris*, em ratos Wistar.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós graduação em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

AMMON, H.V., THOMAS, H.V., PHILIPS, S. **Effects of oleic and ricinolic acids net jejunal water and electrolyte movement.** Journal of Clinical Investigation 53, 374–379, 1974.

ANTER, J., ROMERO-JIMÉNEZ, M., FERNÁNDEZ-BEDMAR,Z., VILLATORO-PULIDO, M., ANALLA, M., ALONSO-MORAGA, A., MUÑOZ-SERRANO, A. **Antigenotoxicity, Cytotoxicity, and Apoptosis Induction by Apigenin, Bisabolol, and Protocatechuic Acid.** Journal of Medicinal Food, v. 14, n. 3, p. 276-283, 2011.

ARAÚJO, F.L.O. **Estudos dos efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de (o-metil)-n-benzoil tiramina (riparina) de *Aniba riparia* (Nees) mez (LAUREACEAE) em camundongos.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

AWOUTERS, F., NIEMEGEREERS, C.J.S., LENAERTS, F.M., JANSSEN, P.A.J. **Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 30, p. 41–45, 1978.

BADKE, M.R., BUDÓ, M.L.D., ALVIM, N.A., ZANETTI, G.D., HEISLER, E.V. **Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o Uso de plantas Medicinais.** Contexto Enferm, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 363-70, 2012.

BAGGIO, C.H., DE MARTINI, OTOFUJI, G., DE SOUZA, W.M., DE MORAES, SANTOS, C.A., TORRES,L.M., RIECK, L., DE ANDRADE MARQUES, M.C. **Gastroprotective mechanisms of indlos alkaloids from *Himantanthus lancifolius*.** Planta Medica, v.71, p.733-738, 2005.

BALBINO, E.E.; DIAS. M.F. **Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010

BADGUJAR, S.B., PATEL, V.V., BANDIVDEKAR, A.H. ***Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology.** BioMedical Research International 32 pages, 2014.

BEIER, K., EHLERT, D. **Methods for evaluation of picking performance of chamomile (*Matricaria recutita* L.) harvesters. Part II: Development of new**

methods. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, v. 1, n. 2, p. 35-42, 2014.

BENEDEK, G., SZIKSZAY, M. **Potential of thermoregulatory and analgesic effects of morphine by calcium antagonists.** Pharmacology Research Community, v. 16, p. 1009–1018, 1984.

BEZERRA, S.B., LEAL, L. K. A. M., NOGUEIRA, N., A.R. CAMPOS. **Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ATP channels.** Journal of Medicinal Food, 2009.

BHATTARAM, V.A., GRAEFE, U., KOHLERT, C., VEIT, M., DERENDORF, H. **Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicine products.** Phytomedicine, v.9, n.3., p.1-33, 2002.

BIGHETTI, A.E., ANTONIO, M.A., CARVALHO, J.E. **Regulação e modulação da secreção ácida.** Revista de Ciências Médicas, v. 11, n. 11, p. 55-60, 2002

BIJAK, M., SALUK, J., TSIRIGOTIS-MANIECKA, M., KOMOROWSKA, H., WACHOWICZ B. **The influence of conjugates isolated from *Matricaria chamomilla* L. on platelets activity and cytotoxicity.** International Journal of Biological Macromolecules, 2013

BIRDANE, F.M., CEMEK, M., BIRDANE, Y.O., GÜLÇİN. I., BÜYÜKOKUROĞLU, M.E. **Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats.** World Journal of Gastroenterology, v. 28;13(4), p. 607-11, 2007.

BLUMENTHAL, M. **The complete german comission E monographs. Therapeutic guide to herbal medicines.** Boston, MA, EUA: American Botanical Council. p- 685. 1998.

BLUMENTHAL, M., GOLDBERG, A., BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs.** Boston (MA): Integrative Medicine communications; 2000.

BOKAIE, M.; BEHNAZ ENJEZAB, T.; KHOSHBIN, A.; MOJGAN, K.M. **Oral fennel (*Foeniculum vulgare*) drop effect on primary dysmenorrhea: Effectiveness of herbal drug.** Iran Journal Nursery Midwifery Research, v. 18, n.2, p. 128–132, 2013.

BORSATO, A.V. **Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila submetida à secagem em camada fixa.** Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006

BRAGA, F.T.M.M. **Enxaguatório bucal de chamomilla recutita (camomila): preparo e aplicação na mucosite oral.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Enfermagem. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.

BRANCO, A.C.S.C. **Avaliação da toxicidade crônica pré-clínica de *Foeniculum vulgare* Mill.** Tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais

e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16/03/2004. **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>. Acesso em 02 de março de 2014.

BRASIL, **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 08 de agosto de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária .**Resolução- RDC nº. 14 de 31 março de 2010**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>. Acesso em 15 de abril de 2012.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária .**Resolução- RDC nº. 89 março de 2010. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>. Acesso em 15 de abril de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado das Normas do COFID IV**. Brasília, abril de 2013. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>.

BROWN, H.M.; CHRISTIE, A.B; COLIN JONES, E. **Glycirrhetic acid hydrogen succinate (disodium) salt, a new anti-inflammatory compound**. *Lancet*, v.2, n. 492, 1959.

BROWN, J.H., TAYLOR, P. Muscarinic receptors agonists and antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. **Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics**, 10ª edição. Nova York: McGraw-Hill, 2003.

BUÉNO, L., FIORAMONTI, J., GARCIA-VILLAR, R. **Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications. III. Visceral afferent pathways: a source of new therapeutic targets for abdominal pain**. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, v. 278(5), p.670-6, 2000.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, Ribeirão Preto, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALZADA, F.; ARISTA, R.; PÉREZ, H. **Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal–gum acacia-induced hyperperistalsis in rats**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 49-51, 2010.

CAMILLERI, M. **Opioid-Induced Constipation: Challenges and Therapeutic Opportunities**. *American Journal of Gastroenterology*, v.106, p.835–842, 2011.

CAMPBELL, T. W., ELLIS, C. **Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology**, 3rd edn. Ames: Iowa State Press, 2007.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. **Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats.** *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 10, p. 1199–1202, 2003.

CAPASSO, R., IZZO, A.A., PINTO, L., BIFULCO, T., VITOBELLO, C., MASCOLO N. **Phytotherapy and quality of herbal medicines.** *Fitoterapia*, v. 71, p. 58-65, 2000.

CAPASSO R, SAVINO F, CAPASSO. **Effects of the herbal formulation Colimil on upper gastrointestinal transit in mice in vivo.** *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 999-1101, 2007.

CAPAZ, F.R., VASCONCELLOS, L.E., DE MORAES, S., NETO, J.P. **The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms.** *Archives Internationals of Pharmacodynamic Therapy*, v.251, p.228-236, 1981.

CERVEJO, F. **Visceral hyperalgesia revisited.** *Lancet*, v.356, n. 1127, 2000.

CHANDRASHEKHAR, V.M., RANPARIYA, V.L, GANAPATY, S., PARASHAR, A., MUCHANDI, A.A. **Neuroprotective activity of *Matricaria recutita* Linn against global model of ischemia in rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127 (3), p. 645-651, 2010.

CHANDRASHEKHAR, V.M., HALAGALI, K.S., NIDAVANI, R.B., SHALAVADI, M.H. , BIRADAR, B.S , BISWAS, D., MUCHCHANDI, I.S. **Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137(1), p. 336- 340, 2011.

CHIOU, L. C., HOW, C. H. **ATP-sensitive K⁺channels and cellular actions of morphine in periaqueductal gray slices of neonatal and adult rats.** *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutic*, v. 298, p. 493–500, 2001.

CHOI, S.I., JEONG, C.S., CHO, S.Y., LEE, Y.S. **Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase.** *Arch. Pharm. Res.* 30 (10), 1328-35, 2007.

CLIFFORD, C, GIKNIS, M. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han) Rats.** Charles River Laboratories, 2008.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J.E.; YUM, M.E.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.D.; CELEDONIO, N.R.; FEITOSA, R.G.; DUARTE, G.P.; SANTOS, C.F.; ALBUQUERQUE, A.A.; LEAL-CARDOSO, J.H. **Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer.** *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 26 pp. 1–10, 2012.

CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Introdução. In: CORRÊA, C.L.; LEMONICA, I.P.; ZAMBRONE, F.A.D.; CAMARGO, J.L.V. **Bases científicas para a avaliação da toxicidade de Agrotóxicos**, São Paulo. International Life Sciences Institute do Brasil, 2009.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3v. V.1, 1031 pp., 1978.

CARL, W., EMRICH, L.S. **Management of oral mucositis during local radiation and systemic chemotherapy: A study of 98 patients**. The Journal of prosthetic dentistry, Elsevier, 1991.

CARVALHO, A.M.R. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da riparina II (metil-n-2-hidroxi-benzoil tiramina) em modelos experimentais**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 210 pp, 1981.

CHRISTENSEN, J. The motility of the colon. In: JOHNSON LR, ed. **Physiology of the gastrointestinal tract**, 3th ed. Raven Press, New York, p. 991-1024, 1994.

CUNHA, A. P., SILVA, A.P., ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 186-7, 2003.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 9, 2005.

CUNHA, G.H. **Avaliação da eficácia terapêutica da Tintura de Jalapa no tratamento da constipação intestinal funcional**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CUNHA, T. M., ROMAN-CAMPOS, D., LOTUFO, C. M., DUARTE, H. L., SOUZA, G. R., VERRI, W. A., J.R. **Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ / AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, p. 4442-4447, 2010.

DELARMELINA, J.M.; BATITUCCI, M.C.P.; GONÇALVES, J.L.O. **The cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of *Matricaria chamomilla* L. tincture in vivo**. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 17, n. 2, p. 149-159, 2012.

DE LUCA, A., COUPAR, I.M. **Insights into opioid action in the intestinal tract**. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 69, n. 2, pp. 103–115, 1996.

DI CARLO, G., AUTORE, G., IZZO, A.A., MAIOLINO, P. **Inhibition of Intestinal Motility and Secretion by Flavonoids in Mice and Rats: Structure-activity Relationships**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 45, pp. 1054-1059, 1993.

DROSSMAN, D.A., MCKEE, D.C., SANDLER, R.S. **Psychosocial factors in the irritable bowel syndrome. A multivariate study of patients and nonpatients with irritable bowel syndrome.** *Gastroenterology*, v.95, p. 701–708, 1998.

DROSSMAN, D.A. **What Does the Future Hold for Irritable Bowel Syndrome and the Functional Gastrointestinal Disorders?** *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 39, n. 5, p. 251-256, 2005.

DRUMMOND, J.P.F. Neurofisiologia. In: DRUMMOND, J.P.F. **Dor aguda-Fisiopatologia, Clínica e terapêutica.** Curitiba: Ed. Atheneu, cap. 01, p. 1-25, 2000.

ENDO, T., HAMAUE, N., IHIRA, E., TERAMOTO, Y., LIU, Y., HIRAFUJI, M., MINAMI, M. **Effects of granisetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on 5-hydroxytryptamine (5-HT) release from the isolated ileum in a delayed-emesis rat model.** *Research Communication Molecular Pathology Pharmacology*, v.111, p. 55– 68, 2002.

ETGES, R.N. **Avaliação toxicológica pré-clínica do Fitoterápico contendo *Gossypium herbaceum* (Tintura de Algodoeiro Cangeri) em ratos Wistar.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5.0. Vienna: Verlag Österreich; P. 2045–46. 2005.

EVANS, C.W. **Pharmacognosy.** 14th ed. UK: WB Saunders Company Limited, 1996.

FALCÃO, H.S. **Mecanismos antiulcerogênicos das fases cloroformicas e acetate de etila obtidas das partes aéreas de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M. King & Robinson (Asteraceae).** Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2011.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a edição. São Paulo: Atheneu editora LTDA, 1988.

FAUSTINO, T.T., ALMEIDA, R.B., ANDREATINI, R. **Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 32, n. 4, 2010.

FIELD, M. **Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 7, pp.931–943, 2003.

FILIPOVIĆ, B.F., RANDJELOVIC, T., ILLE, T., MARKOVIC, O., MILOVANOVIĆ, B., KOVACEVIC, N., FILIPOVIĆ, B.R. **Anxiety, personality traits and quality of life in functional dyspepsia-suffering patients.** *European Journal of International Medicine*, v. 24, n. 1, p. 83-6, 2013.

FONTELES, M. M. F.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; BESSA, B.M.B.; FRANCELINO, E.V.; CARVALHO, D.M.S.; COELHO, H.L.L. **Vigilância pós-comercialização da Aguardente Alemã® (*Operculina macrocarpa* e *Convolvulus scammonia*).** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, p. 748-753, 2008

FUKUDO, S., KUWANO, H., MIWA, H. **Management and pathophysiology of functional gastrointestinal disorders.** Digestion, v. 85, p. 85-9, 2012.

GAD, C. S., CHENGELIS, C. P. **Acute toxicity testing.** Second edition, USA: Academic Press, 1998.

GARG, C.; ANSARI, S.H.; KHAN, S.A.; GARG, M. **Effect of *Foeniculum vulgare* Mill. Fruits in Obesity and Associated Cardiovascular Disorders Demonstrated in High Fat Diet Fed Albino Rats.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, v. 8, n. 19, 2011.

GHANEM, M.T.M.; RADWAN, H.M.A.; MAHDY, E.S.M.; ELKHOLY. Y.M.; HASSANEIN, H.D.; SHAHAT, A.A. **Phenolic compounds from *Foeniculum vulgare* (Subsp. *Piperitum*) (Apiaceae) herb and evaluation of hepatoprotective antioxidant activity,** v. 4 , n. 2, p. 104-108, 2012

GOLAN, D.E.; TASHIJAN JR, A.H.; ARMSTRONG, E.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: as bases farmacológicas da farmacoterapia.** Ed. Guanabara Koogan, 2ª ed. Rio de Janeiro, 2009.

GORI, L., GALLO, E., MASCHERINI, V., MUGELLI, A., VANNACCI, A. FIRENZUOLI, F. **Can Estragole in Fennel Seed Decoctions Really Be Considered a Danger for Human Health? A Fennel Safety Update.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 10 pages, 2012.

GRAFF,S. **Fundamentos de toxicologia clínica.** 1ª ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2006, 157 p.

GUENTHER, E. **The essencial oils,** Huntington, newyork: Robert E. Krieger Publisinhg.,. 6v. V.4, 1974.

GUEDES, M. M. **Investigação farmacológica dos mecanismos de ação gastroenteroprotetores do Ácido Centipédico, um diterpeno de *Egletes Viscosa* Less., em modelos experimentais.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.

GUIMARÃES, E,V., MARGUET, C., CAMARGOS, P. **Treatment of gastroesophageal reflux disease.** Jornal de pediatria, 2006.

GUPTA, R.C.; GOAD, J.T.; KADEL, W.L. **In vivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication.** Archives Enviromental Contaminants Toxicology, v. 21, p. 263-269, 1991

GULLUCE, M., ORHAN, F., ADIGUZEL, A., BAL, T., GUVELNAP, Z., DERMIZERER, L.O. **Determination of antimutagenic properties of apigeni-7-0-rutinoside, a flavonoid isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *longifolia* with yeast DEL assay.** Toxicology and Industrial Healt, v.29, n.6, 2013.

HERSEY, S.J., SACHS, G. **Gastric acid secretion**. *Physiological Reviews*, v.75, n.1., p.155-189, 1995.

HOEHNE, F. C. **Plantas e Substâncias Tóxicas e Mediciniais**. Rio de Janeiro, Graphicards, 1939.

HARAGUCHI, H, TANAKA, Y, KABBASH, A, FUJIOKA, T, ISHIZU T, YAGI, A. **Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea***. *Phytochemistry*, v.15, p. 2255-60, 2004.

HOLTMANN, G., TALLEY, N. J., LIEBREGTS, T., ADAM, B., PAROW, C. **Placebo-Controlled Trial of Itopride in Functional Dyspepsia**. *The New England Journal of Medicine*, v. 354, p. 832-840, 2006.

HU, J.J.; LEE, M.J.; VAPIWALA, M.; REUHL, K.; THOMAS, P.; YANG, C.S. **Sex related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen**. *Toxicology Applied Pharmacology*, v.122, p.16-23, 1993.

IASP - International Association for Study of Pain. **Definition of pain; Pain Terminology; Curriculum on Pain for Students in Psychology**, 2008.

IZZO, A.A., NICOLETTI, M., GIANNATTASIO, B., CAPASSO, F. Antidiarrhoeal activity of *Terminalia sericea* Burch ex. DC extracts. In: Capasso F, Mascolo N, editores. **Natural drugs and the digestive tract**. Roma: EMSI, 223-30, 1992.

JAVADI, S.; ILKHNIPOUR, M.; HEIDARI, R.; NETAJI, V. **The effect of *Foeniculum vulgare* mill (Fennel) essential oil on blood glucose in rats**. *Plants Science Research.*, v.3., p.47-49, 2008.

JOHNSTON, K.D., LU, Z., RUDD, J.A. **Looking beyond 5-HT₃ receptors: a review of the wider role of serotonin in the pharmacology of nausea and vomiting**. *European Journal of Pharmacology*, v. 722, p. 13–25, 2014.

KESAVAN, R., POTUNURU, U.R., NASTASIJEVIC, B., AVANEESH, T., JOKSIC, G., DIXIT, M. **Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by *Gentiana lutea* Root Extracts**. *PLOS ONE*, v, 8, n. 4, 2013.

KIMBALL, E.S., PALMER, J.M., D'ANDREA, M.R., HORNBY, P.J., WADE, P.R. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 288(6), p. 1266-73, 2005.

KHAYYAL, M.T., EL-GHAZALY, M.A., KENAWY, S.A., SEIF-EL-NASR, M., MAHRAN, L.G., KAFABI, S.N. **Okpanyi Antiulcerogenic effect of certain plant extracts and their combinations** *Arzneimittelforschung/Drug Res.*, 51 (II) (2001), pp. 545–553

KHAYYAL, M.T., SEIF-EL-NASR, M., EL-GHAZALY, M.A., OKPANYI, S.N., KELBER, O. **Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast®) and its components against ulcers and rebound acidity**. *Phytomedicine*, V, 13, n. 1, Pages 56–66, 2006.

KABEYA, L.M. **Estudo dos efeitos de cumarinas simples no metabolism oxidative de neutrófilos de Coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos.**

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP. 2002.

KAILEH, M., VANDEN, BERGHE W., BOONE, E., ESSAWI, T., HAEGEMAN, G. **Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. **25**; n. **113(3)**, p. **510-6**, 2007.

KIM, J.B., SHIN, J.W., KANG, J.Y., SON C.G., KANG, W., LEE, H.W., LEE D.S., PARK, Y.C., CHO, J.H. **A traditional herbal formula, Hyangsa-Pyeongwi san (HPS), improves quality of life (QoL) of the patient with functional dyspepsia (FD): randomized double-blinded controlled trial.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. **151**, p. **279-86**, 2014.

KLEIN S, RISTER R, RIGGINS C: **The complete German commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines** Austin: American Botanical Council, 1998.

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

KOBAYASHI Y, TAKAHASHI R, OGINO F. **Antipruritic effect of the single oral administration of German chamomile flower extract and its combined effect with antiallergic agents in ddy mice.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.101, p. **308-312**, 2005.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Berne e Levy Fisiologia.** Ed. Elsevier. 6ª ed. 2009.

KRASOVSKI, G.N. Species and sexes differences in sensitivity to toxic substances. In **Methods used in USSR for stablishing biologically safe levels of toxic substances.** Geneva, WHO, 1975.

KRAYCHETE, D.C.; GUIMARÃES, A.N. **Hiperalgisia Visceral e Dor Abdominal Crônica: Abordagem Diagnóstica e Terapêutica** *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. **53**, n. **6**, p. **833 – 853**, 2007.

LAIRD J.M, L. MARTINEZ-CARO, E. GARCIA-NICAS, F. CERVERO. *Pain* **92**, pp. **335–342**, 2001.

LARINI, L; SALGADO, P. E.T; LEPERA, J. S. **Avaliação toxicológica.** In: LARINI, L. *Toxicologia*. 3.Ed. São Paulo: Manole, p.131-135, 1997.

LANS, C, TURNER, N, KHAN, T, BRAUER, G. **Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada.** *Veterinary Parasitology* **148**, **325–340**, 2007.

LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., GODINHO R.O., NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

LEITE, A. **Ação gastroprotetora do óleo essencial de Citrus lemon (*Rutaceae*), de seus componentes principais limoneno e beta-pineno e do óleo essencial da casca de *Croton cajucara* (*Euphorbiaceae*)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo. 2009.

LEFORT, E.C., BLAY, J. **Apigenin and its impact on gastrointestinal cancer**. Molecular Nutrition Food Research, v. 57, p. 126-144, 2013.

LIMA, C.R. **Atividade cicatrizante e avaliação toxicológica pré-clínica do Fitoterápico Sanativo**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LIAN, L.H., WU, YL, WAN, Y, LI, X, XIE, W.X., NAN, J.X. **Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure**. Chemical Biological Interactive, v. 6; n. 188, p. 127-33, 2010.

LIN, C.C., CHUANG, Y.J., YU, C.C., YANG, J.S., LU, C.C., CHIANG, J.H., LIN, J.P., TANG, N.Y., HUANG, A.C., CHUNG, J.G. **Apigenin Induces Apoptosis through Mitochondrial Dysfunction in U-2 OS Human Osteosarcoma Cells and Inhibits Osteosarcoma Xenograft Tumor Growth *in vivo***. Journal of Agriculture Food Chemistry, v.60,n. 45, 11395-11402, 2012.

LIU, Y.L., MALIK, N.M., SANGER, G.J., ANDREWS, P.L.R. **Ghrelin alleviates cancer chemotherapy-associated dyspepsia in rodents**. Cancer Chemotherapy Pharmacology, v. 58: 326–333, 2006.

LIU, Q., CHEN, X., YANG, G., MIN, X., DENG, M. **Apigenin inhibits cell migration through MAPK pathways in human bladder smooth muscle cells**. Biocell, v. 35(3), p. 71-9, 2011

LIU, P.; QIN, W.; WANG, J.; ZENG, F.; ZHOU, G.; WEN, H.; DENEEN, K.M.; LIANG, F.; GONG, Q.; TANG, J. **Identifying Neural Patterns of Functional Dyspepsia Using Multivariate Pattern Analysis: A Resting-State fMRI Study**. PLoS One.; 8(7), 2013.

LIU, B., PIAO, X., GUO, L. **Effect of herbal formula Xiao Pi-II on functional dyspepsia** Traditional Chinese Medicine, v. 15, 33(3), p. 298-302, 2013b.

LEAL, L.K.A.M., FERREIRA, A.A.G., BEZERRA, G.A., VIANA, G.S.B., CUNHA, K.M.A., PESSOA, C., MORAES, M.F.J.A. **Antinociceptive, antiinflammatory and**

brochodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. Journal of Ethnopharmacology, v. 70, p.151-159, 2000.

LEAL LKAM, OLIVEIRA FG, FONTENELE JB, FERREIRA MAD, VIANA GSB. **Toxicological study of hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats.** Pharmaceutic Biology, v.41,p. 308-314, 2003.

LEAL, L. K. A. M. , MOURA, R. R. ; GOES, J. G. S. ; SILVA, A. H. **Development and validation of analytical method (hplc-pda) for standardization of Gotas Arthur de Carvalho , a phytomedicine based on *Matricaria recutita*, *Gentiana lutea* and *Foeniculum vulgare*.** In: 7th International Congresso of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto. 7th International Congresso of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto, SP, 2009.

LEITE, G.O. **Atividades antiinflamatória tópica e antinociceptiva visceral do óleo essencial do caule de *Vanillosmopsis arborea* BAKER e do seu principal constituinte, (-)-alfa-bisabolol.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós graduação em Bioprospeção Molecular. Universidade Regional do Cariri, Crato. Ce. 2011.

LEITE, G.O. FERNANDES, C.N.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R.. **Attenuation of visceral nociception by α -bisabolol in mice: investigation of mechanisms.** Org Med Chem Lett. 2: 18, 2012.

LIMA JUNIOR, R.C.P. **Efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos pentacíclicos α e β - amirina em modelos de nocicepção visceral em camundongos.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2005.

LOHMANN, A.B., WELCH, S.P. **ATP-gated K^+ channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides.** European Journal of Pharmacology, v. 385, n. 2-3, p. 119-127, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, p. 480. 2002.

LUCCA, P.S.R., ECKERT, R.G., SMANHOTTO, V., KUHN, L.M.; MINANTI, L.R. **Avaliação farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal camomila (*Chamomilla recutita* L.) comercializada como alimento em Cascavel- Paraná.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v.12, n.2., p.153-156, 2010.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. **Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG.** Journal of Immunology, v. 132, p. 2015–2020, 1984.

MAIA, J.L., LIMA-JÚNIOR, R.C.P., DAVID, J.P., DAVID, J.M., SANTOS, F.A., RAO, V.S. **Oleanolic Acid, a Pentacyclic Triterpene Attenuates the Mustard Oil-Induced Colonic Nociception in Mice** *Biol. Pharm. Bull.* v. 29, n. 1, p. 82—85, 2006.

MAHADY, GB, PENDLAND, S, STOIA, A, HAMILL, FA, FABRICANT, D, DIETZ, BM, CHADWICK, LR. 2005. *Phytother. Res.* 19, 988–991.

MANGIPUDY, R., BURKHARDT, J., KADAMBI, V.J. **Use of animals for toxicology testing is necessary to ensure patient safety in pharmaceutical development.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, 439–441, 2009.

MANSIKKA, H; LAHDESMAKI, J.; SCHEININ, M.; PERTOVAARA, A. **ALPHA (A2) Adrenoreceptors contribute to feedback inhibition of capsaicin-induced hyperalgesia.** *Anesthesiology.*, v. 101, p. 185-190, 2004.

MASCARAQUE, C., GONZÁLEZ, R., SUÁREZ, M.D., ZARZUELO, A., MEDINA, F.S., MARTINEZ-AUGUSTIN, O. **Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium.** *British Journal of Nutrition*, v.113, n.4, p. 618-626, 2015.

MATSUDA, N.M.; DANTAS, R.O. **Mecanismos intracelulares dos mediadores inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos no trato gastrointestinal.** *Revista Brasileira de Biociências*, v.6, n.4, p. 315-320, 2008.

McCURDY, C.R., SCULLY, S.S. **Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals).** *Life Sciences*, v. 78, p. 476-484, 2005.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. **A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.).** *Phytotherapy Research*, v.20, n. 7, p. 519-530, 2006.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. **A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.).** *Phytotherapy Research*, v.20, n. 7, p. 519-530, 2006.

MEARIN, F., DE RIBOT, X., BALBOA, A., ANTOLÍN, M., VARAS, M.J, MALAGELADA, J.R. **Duodenogastric bile reflux and gastrointestinal motility in pathogenesis of functional dyspepsia. Role of cholecystectomy.** *Dig Dis Sci*; 40(8): 1703-1709, 1995.

MENKOVIC, N., JURANIC, Z., STANOJKOVIC, T., RAONIC-STEVANOVIC, T., SAVIKIN, K., ZDUNIĆ, G., BOROJEVIC, N. **Radioprotective activity of *Gentiana lutea* extract and mangiferin.** *Phytother Researcher*, v. 24, n. 11, p. 1693-6, 2010.

MEDEIROS, A.S. **Fortaleza dos remédios: a presença dos medicamentos na capital cearense durante as primeiras décadas do século XX.** *Anais do XXVI Simpósio Nacional de História – ANPUH*, São Paulo, 2011.

MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A.. **Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera*.** *Lat. Am. J. Pharm.* v. 27, n. 1, p. 10-6, 2008.

MELO, M. G. D., DÓRIA, G. A. A., SERAFINI, M. R., ARAÚJO, A.A.S. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.** Scientia Plena, v. 10, n. 03, 2012.

MENON-MIYAKE, M.A.; SALDIVA, P.H.N., LORINZI-FILHO, G., FERREIRA, M.A., BUTUGAN, O., OLIVEIRA, R.C. **Efeitos da *Luffa operculata* sobre o epitélio do palato da rã: aspectos histológicos.** Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 71, n. 2, 2005.

MEYER, A.A.L.; ABOIN, S. J.A.; BACCHI, E.M. **Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat.** Journal of Ethnopharmacology, v. 82, n. 1, p. 44-48, 2002.
MIAMPAMBA, M., CH'RY-CROZE, S., D'TOLLE-SARBACH,S., GUEZ, D., CHAYVIALLE,J.A. **Antinociceptiw effects of oral clonidine and S 12813-4 in acute colon inflammation in rats.** European Journal of Pharmacology, v. 308, p. 251-259, 1996.

MILLAN, M.J. **Descending control of pain.** Progress in Neurobiology, v.66, n.6, p.355-474, 2002.

MILLER, T.; WITTSTOCK, U.; LINDEQUIST, U.; TEUSCHER, E. **Effects of some components of the essential oil of chamomile, *Chamomilla recutita*, on histamine release from rat mast cells.** Planta Medica, v. 62, n.1, p. 60–61, 1996.

MIN, Y.S, YIM, S.H., BAI, K.L., CHOI, H.J. **Autonomic Autocoid Pharmacology,** v. 25, p.85-91, 2005.

MOHAMAD, R.H, EL-BASTAWESY, A.M, ABDEL-MONEM, M.G., NOOR, A.M., AL-MEHDAR, H.A., SHARAWY, S.M., EL-MERZABANI, M.M. **Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*).** Journal of Medicinal Food, v. 14, p. 986-1001, 2011.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunology Methods., v. 16; p. 55-63, 1983.

MOAYYEDI, P., DEEKS, J., TALLEY, N.J., DELANEY, B., FORMAN, D. **An update of the Cochrane Systematic Review of *Helicobacter pylori* eradication therapy in nonulcer dyspepsia: resolving the discrepancy between systematic reviews.** American Journal of Gastroenterology, v. 98, p. 2621–2626, 2003.

NASTASIJEVIC, B.; LAZAREVIC-PASTI, T.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S.; PASTI, I; VUJACI, A.; JOKSIC, G.; VASIC, J.**Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 66, p. 191-196, 2012.

NESTLER, E.J. **Molecular mechanisms of drug addiction.** Neuropharmacology, 47 n. 1, p. 24-32, 2004

NETTO, E.M, NSMSAQ, S., BALBINO, E.E, CARVALHO, A.C.B. **Comentários sobre o registro de fitoterápicos.** Rev Fitos. 1(3):9-17, 2006.

NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON., J.D. **Herbal Medicines**, first ed., The Pharmaceutical Press, London, 1996. Organización Mundial de la Salud, Programa de Medicina Tradicional, Pautas para la evaluación de medicamentos Herbários. Genebra, 1991.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals: acute oral toxicity- up-and-down procedure.** Paris: OECD , Guideline 425, 2008.

OLIVEIRA, R.R.B., GÓIS, R.M.O., SIQUEIRA, R.S., ALMEIDA, J.R.G.S., LIMA, J.T., NUNES, X.P., OLIVEIRA, V.R., SIQUEIRA, J.S., QUINTAS-JUNIOR, L. **Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, n.3, 2009.

OZTÜRK, N., HEREKMAN-DEMIR, T., OZTÜRK, Y., BOZAN, B., BAŞER, K.H. **Choleretic activity of *Gentiana lutea* ssp. *symphyandra* in rats.** Phytomedicine, v. 5, n. 4, p. 283-8, 1998.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. **Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats.** Journal of Ethnopharmacology, v.93, n.1, p.51- 6, 2004.

PANDA, S, KAR, A. **Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 59, n. 11, p. 1543-8, 1998.

PEAKALL, D. **Animal Biomarkers as Pollution Indicators.** London: Chapman and Hall. 1992.

PEREIRA, L.M.S. **Efeito antinociceptivo do HC-030031, um antagonista seletivo do receptor do potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1), em modelos animais de nociceção visceral.** Dissertação de Mestrado do Programa de PósGraduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2011.

PICON, P.D., PICON, R.V., COSTA, A.F., SANDER, G.B., AMARAL, K.M., ABOY, A.L., HENRIQUES, A.T. **Randomized clinical trial of a phytotherapeutic compound containing *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Sambucus nigra*, and *Cassia augustifolia* for chronic constipation.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 10, n. 17, 2010.

PINHEIRO, M.M., BOYLAN, F., FERNANDES, P.D. **Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin.** Life Sciences, v. 24, n. 9-10, p. 293-300, 2012.

QUEIROZ, M.B.R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada**

- com gel de diclofenaco sódico.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- RADANOVIĆ, D., MARKOVIĆ, T., AIELLO, N., FUSANI, P. **Cultivation trials on *Gentiana lutea* L. in Southern and South-eastern Europe.** Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, v. 1, n. 4, p. 113-122, 2014.
- RAHIMI, R.; ARDEKANI, M.R.S. **Medicinal Properties of *Foeniculum Vulgare* Mill. in Traditional Iranian Medicine and Modern Phytotherapy** Chinese Journal of Integral Medicine, v. 19, n.1, p.73-79, 2013.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Rang and Dale's Pharmacology.** Churchill Livingstone Elsevier. Rio de Janeiro; 778 p, 2012.
- RATHER, M.A., DAR, B.A., SOFI, S.N., BHAT, B.A., QURISHI, M.A. ***Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety.** Arabian Journal of Chemistry, 2012.
- RAUBER, C. **Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos wistar.** Acta Scientiae Veterinariae, vol. 35, núm. 2, 2007, pp. 269-270 Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Brasil
- RECIO, M.C, GINER, R.M., MEZ, S., RIOS, J.L. **Planta Medica**, v. 60, p. 232–234, 1994.
- RENZI, D., VALTOLINA, M., FORSTER, R. **Evaluation of a multi-endpoint cytotoxic assay system.** Food and Agriculture Organization of United Nations, v. 21, n. 1, p. 89-96, 1993.
- RHIOUANA, H.; EL-HILALYA, J.; ISRAILI, Z.; LYOUSSE, B. **Acute and subchronic toxicity of aqueous extract of the leaves of *Herniara glabra* in rodents.** Journal of Ethnopharmacology, v.118, p.378-386, 2008.
- RESTELL, T.I., PORFIRIO, L.C., SOUZA, A.S., SILVA, I.S. **Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages.** Acta Cir. Bras. v.29, n. 5, p. 306-12, 2014.
- ROCHA, N.F.M. **Estudo dos efeitos farmacológicos do alfa-bisabolol em modelos animais de nociceção, inflamação e úlcera gástrica em camundongos.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.
- ROCHA, N.F., RIOS, E.R, CARVALHO, A.M., CERQUEIRA, G.S., LOPES, A.D.E. A., LEAL, L.K., DIAS, M.L., DE SOUSA D.P, DE SOUSA F.C. **Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2011.

RODRIGUES, A. R, DUARTE, I. D. **The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels.** Brazilian Journal of Pharmacology, v. 129, p. 110–114, 2000.

ROEBEL, L.E., CAVANAGH, R.L., BUYNISKI, J.P. **Comparative gastrointestinal and biliary tract effects of morphine and butorphanol (Stadol).** Journal of Medicine, v.10, n. 4. p. 225-238, 1979.

ROOF, C.F.; PASTOZYN, A.; STRAUSS, J.F.; BILLMEIER, J.T.; VANIER, M.T.; BRADY, R.O.; SCALLEN, T.J.; PENTCHEV, P.G. **Protein variability in male and female rats Wistar liver proteins.** Journal of Biology Chemistry, v.267, p. 15902-15906, 1992.

RÖSCH, W., LIEBREGTS, T., GUNDERMANN, K.J., VINSON, B., HOLTMANN, G. **Phytotherapy for functional dyspepsia: A review of the clinical evidence for the herbal preparation STW 5.** Phytomedicine, v. 13, n. 1, p. 114–121, 2006.

SANTOS, C.C.M.P. **Atividade antinociceptiva e antioxidante fitol em modelos *in vivo* e *in vitro*.** Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2011.

SALAMON, I. 1992. **Chamomile: A medicinal plant.** Herb Spice Med. Plant Dig. 10, 1-4.

SAVINO F, CRESI F, CASTAGNO E, SILVESTRO L. **Phytother Res.**, v. 19, p. 335-340, 2005.

SAVINO, F., CAPASSO, R., PALUMERI, E., TARASCO, V., LOCATELLI, E., CAPASSO, F. **Advances on the effects of the compounds of a phytotherapeutic agent (COLIMIL) on upper gastrointestinal transit in mice. Minerva Pediatric, 60, 285-90, 2008.**

SCHRIPSEMA J, DAGNINO D, GOSMANN G. Alcalóides indólicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.679-705, 1999.

SCHRÖDER, S., BECKMANN, K., FRANCONI, G., HAMME, G.M., FRIEDEMANN, T., GRETEN, H.J., ROSTOCK, M., EFFERTH, T. **Can Medical Herbs Stimulate Regeneration or Neuroprotection and Treat Neuropathic Pain in chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013.

SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Melo, J. C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3. Ed. Porto Alegre. Editora da Universidade UFRGS, CAPITULO 15, p. 301-332, 2001.

- SEBAI, H., JABRI, M.A., SOULIA, A., RTIBI, K., SELMI, S., TEBOURBI, O., EL-BENNA, J., SAKLY, M. **Antidiarrheal and antioxidant activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract in rats.** JEP. V. 152 (2), P.327-332, 2014.
- SENATORE, F., OLIVIERO, F., SCANDOLERA, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., ROSCIGNO, G., ZACCARDELLI, M., DE FALCO, E. **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell].** Fitoterapia. 2013 Oct;90:214-9. doi: 10.1016/j.fitote.2013.07.021. Epub 2013 Aug 9.
- SHAH, A.H., QURESHI, S., AGEEL, A.M. **Toxicity studies in mice of ethanol extracts of *Foeniculum vulgare* fruit and *Ruta chalepensis* aerial parts.** Journal of Ethnopharmacology, v. 34, n.2-3, p. 167-72, 1991.
- SHAIB, Y.; EL-SERAB, H.B. **The prevalence and risk factors of functional dyspepsia in a multiethnic population in the United States.** American Journal of Gastroenterology, v. 99, p. 2210-2216, 2004.
- SHAY, H., SUN, D.C.H., GRUENSTEIN, M. **A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat.** Gastroenterology, v. 26, p. 906, 1954.
- SILVA, F.M. **Dyspepsia: clinical aspects and current approach.** Revista Medica, v. 8, n. 4, p. 213-23, 2008.
- SILVAN, S.; MANOHARAN, S.; BASKARAN, N.; ANUSUYA, C.; KARTHIKEYAN, S.; PRABHAKAR, M.M. **Chemopreventive potential of apigenin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced experimental oral carcinogenesis.** European Journal of Ethnopharmacology, v. 670, p. 561-571.2011.
- SILVEIRA, P.F., BANDEIRA, M.M.; ARRAIS, P.S.D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(4): 618-626, Out./Dez. 2008.
- SILVEIRA, E.S. **Análise farmacêutica e avaliação da atividade antiespasmódica do fitoterápico Gotas Arthur de Carvalho em ratos.** Monografia de Graduação apresentada no Curso de Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Ceará, 2011.
- SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. **A pesquisa e a produção de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 12, n. 1, p.35-40. 2002.
- SIMÕES, C. M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P., **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul.** 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade. 174 pp., 1998.
- SINGH, A. **Phytochemicals of Gentianaceae: a review of Pharmacology Properties.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology, v.1, n.1, 2008.

SINGH, P., MISHRA, S.K., NOEL, S., SHARMA, S., RATH, S.K. **Acute Exposure of Apigenin Induces Hepatotoxicity in Swiss Mice.** PLoS ONE, v. 7, n. 2, 2012.

SIQUEIRA, R.J.B. **Efeitos farmacológicos do álcool sesquiterpênico (-)- α - bisabolol em preparações isoladas de músculo liso vasculares e não vasculares.** Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2011.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.N.; PIETRO, R.C.L.R. **O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

STEFANELLO, R., GARCIA, D.C., MENEZES, N.L., MUNIZ, M.F.B., WRASSE, C.F. **Efeito da luz, temperatura e estresse hídrico no potencial fisiológico de sementes de funcho.** Revista Brasileira de Sementes, vol. 28, nº 2, p.135-141, 2006.

STICKNEY, J.C., NORTHRUP, D.W. **Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 101, p. 582, 1959.

SUSHUTA, K.; SATYANARAYANA, S.; SRVINAS, N.; SEKHAR, J.R.. **Evaluation of the blood glucose reducing effects of aqueous extracts of the selected umbeliferous fruits, used in culinary practices.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v.5, p.613-617, 2008.

TACK, J., LEE, K.J. **Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia.** Journal of clinical gastroenterology, v.39, v.5, p.211-216, 2005.

TACK, J., TALLEY, N.J., CAMILLERI, M., HOLTMANN, G., HU, P., MALAGELADA, J.R, AND STANGHELLINI, V. **Functional gastroduodenal disorders.** Gastroenterology, 130: 1466-1479, 2006a.

TACK, J., FRIED, M., HOUGHTON, L.A., SPICAKS, J. AND FISHER, G. **Alimentary Pharmacology Therapy,** v. 24, p. 183-205, 2006b.

TAKEDA, N., HASEGAWA, S., MORITA, M., MATSUNAGA, T. **Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research.** Pharmacology Biochemical Behavior, v. 45, p. 817– 821, 1993.

TALLEY, N.J., STANGHELLINI, V., HEADING, R.C., KOCH, K.L., MALAGELADA, J.R., J TYTGAT, G.N. **Functional gastroduodenal disorders.** Gut, v. 45, n. 2, 1999.

TALLEY, N.J., VAN ZANTEN, S.V, SAEZ, L.R., DUKES, G., PERSCHY, T., HEATH, M., KLEOUDIS, C., MANGEL, A.W. **Alimentars Pharmacology Therapy,** v. 15, p. 525-537, 2001.

TALLEY, N.J, LOCKE, G.R, LAHR, B.D. **Functional dyspepsia, delayed gastric emptying, and impaired quality of life.** Gut, v. 55, n.7, p. 933-939, 2006.

TINOCO, M.T.; MARTINS, M.R.; CRUZ-MORAIS, J. **Antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* Miller essential oil.** Revista De Ciências Agrárias. V.30, n1. 2007

TIRILLINI, B.; PAGIOTTI, R.; MENGHINI, L.; PELLEGRINO, R.; PINTORE, G. Distribuzione dei principali componenti dell'olio essenziale di Chamomilla recutita (L.) Rauschert nei capolini. **In:** PAGIOTTI, R.; POLI, F. (Coord) **Prospettive di produzione e di impiego delle piante officinali: la camomilla.** San Sepolcro: Erboristeria Domani, p.97-101, 2003.

TOMIC, M., POPOVIC, V., PETROVIC, S., STEPANOVIC-PETROVIC, R., MICOV, A., PAVLOVIC- DROBAC, M., COULADIS, M. **Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides rich oil in rats model of inflammation.** Phytoterapy Researche, v. 28, n.5, p. 756-66, 2014.

TORRADO, S.; TORRADO, S.; AGIS, A.; JIMENEZ, M. E.; CADORNIGA, R. **Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid.** Pharmazie, v. 50, n. 2, p. 141-3, 1995.

TRENTINI, A. M., TESKE, M. **Compêndio de Fitoterapia,** Herbarium, 1997.

TRIPATHI P, TRIPATHI R, PATEL RK, PANCHOLI SS. **Investigation of antimutagenic potential of *Foeniculum vulgare* essential oil on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice.** Journal of Medicinal Food, v. 14, n.9, p. 986-1001, 2011.

TRONCON, L.E.A. **Novas drogas no tratamento da dispepsia funcional.** Arquivos de Gastroenterologia, v. 38, n.3, 2001.

TROVATO, A., MONFORTE, M.T., ROSSITTO, A., FORESTIERI, A.M. **Gastroenterology. In vitro cytotoxic effect of some medicinal plants containing flavonoids.** Bolletim Chim Farmacology, v. 135, n.4, p.263, 1996.

TUROLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. V. 42, n. 2, 2006.

VADUSEVAN, K., VEMBAR, S., VEERARAGHAVAN, K., HARANATH, P.S. **Influence of intragastric perfusion of aqueous spice extracts on acid secretion in anesthetized albino rats.** Indian Journal of Gastroenterology, v. 9, n. 2, p.53-6, 2000.

VASCONCELOS, T.H., MODESTO-FILHO, J., DINIZ, M.F.F.M., SANTOS, H.B., AGUIAR, F.B., MOREIRA, P.V.L. **Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, p.583-9, 2007.

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

- VEYRAT-FOLLET, C., FARINOTTI, R., PALMER, J.L. **Physiology of chemotherapy-induced emesis and antiemetic therapy. Predictive models for evaluation of new compounds.** *Drugs*, v.53, n. 2, p. 206–34, 1997.
- VERA, G., CHIARLONE, A., MARTIN, M.A., ABALO, R. **Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats.** *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v.126– 127, p.81 – 92, 2006.
- VERMA, A., PRASAD, K.N, SINGH, A.K., NYAT,I K.K., GUPTA, R.K., PALIWAL, V.K. **Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 81, n. 2, p. 175-8, 2010.
- VIOLA, H., WASOWSKI, C., LEVI DE STEIN, M., WOLFMAN, C. **Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects.** *Planta Medica*, v. 61, n.3, p. 213-6, 1995.
- XU, Y., XIN, Y., DIAO, Y., LU, C., FU, J., LUO, L., YIN, Z. **Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells.** *PLoS One*, v. 6, n. 12, 2011.
- YAMADA, Y., TSUKAMOTO, G., KOBASHI, M., SASAKI, A., MATSUMURA, T. **Abdominal vagi mediate c-Fos expression induced by X-ray irradiation in the nucleus tractus solitarii of the rat.** *Autonomic Neuroscience*, v. 83, p. 29– 36,2000.
- WALLE, T., WEN, X., WALLE, K. **Improving metabolic stability of cancer chemoprotective polyphenols.** *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 3, n.3, p. 379-388, 2007.
- WALTERS, J.B., MONTAGNINI, M. **Current concepts in the management of opioid-induced constipation.** *Journal of Opioid Management*, v.6, n.6, p.435-444,2010.
- WESTPHAL, J., HÖRNING, M., LEONHARDT, K. **Phytotherapy in functional upper abdominal complaints Results of a clinical study with a preparation of several plants.** *Phytomedicine*, v. 2, n.4, p. 285-91, 1996.
- WHO/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine Quality control methods for medicinal plant materials.** Geneva: WHO, 2008.
- WOOLTORTON, E. **Herbal kava: reports of liver toxicity.** *Can med. Asso. Journal*, v.166, n.177, 2002.
- WIT, R., HERRSTEDT, J., RAPOPORT, B., CARIDES, A.D., GUO GUANG-MA, J., ELMER, M., SCHMIDT, C., EVANS, J.K., HORGAN, K.J. **The oral NK(1) antagonist, aprepitant, given with standard antiemetics provides protection against nausea and vomiting over multiple cycles of cisplatin-based chemotherapy: a combined analysis of two randomised, placebo-controlled phase III clinical trials.** *European Journal of Cancer*, v. 40, p. 403–410, 2004.
- WU, K., YUAN, L.H., XIA, W. **Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 7, n.11(29),

p.4461-4464, 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2004.

ZHANG, Z.G, LU, X.B, XIAO, L, TANG, L, ZHANG, L.J., ZHANG, T., ZHAN, X.Y., MA, X.M, ZHANG, Y.X. ZHONGHUA, GAN ZANG BING, ZA ZHI. **Antioxidant effects of the Uygur herb, *Foeniculum Vulgare* Mill, in a rat model of hepatic fibrosis.** Chinese Journal of Hepatology, v. 3, p. 221-6, 2012.

ZANOLI, P., AVALLONE, R., BARALDI, M. **Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin.** Fitoterapia, v. 71, n. 1, p. 117-23, 2000.