

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
MESTRADO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DE TOXICOLOGIA CLÍNICA E
GENOTOXICIDADE DO FITOTERÁPICO TAMARIL[®]
CÁPSULA, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS**

MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS

FORTALEZA

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DE TOXICOLOGIA CLÍNICA E
GENOTOXICIDADE DO FITOTERÁPICO TAMARIL[®]
CÁPSULA, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS**

MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

FORTALEZA

2004

MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS

**ESTUDO DE TOXICOLOGIA CLÍNICA E
GENOTOXICIDADE DO FITOTERÁPICO TAMARIL[®]
CÁPSULA, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS**

Dissertação aprovada em 09 de julho de 2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Orientadora
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará

Dedicatória

“Dedico esta dissertação aos meus pais Lena e Mário Vasconcellos, apoio e proteção constantes ao longo dessa minha jornada, mesmo afastada de seu convívio.”

Homenagem Especial

“Aos meus tios e padrinhos, Carlito e Disinha, de fundamental importância para minha permanência em Fortaleza, cuja acolhida carinhosa proporcionou a realização deste mestrado”.

AGRADECIMENTOS

“Graças porém, sejam dadas a Deus, que nos dá a vitória, por nosso senhor Jesus Cristo.”

A Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes que me recebeu e proporcionou na Unidade de Farmacologia Clínica, orientação, aprendizagem e as melhores condições de trabalho para a realização deste trabalho, além de seu apoio e compreensão em todas as horas.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes, que me aceitou em seu laboratório, quando eu ainda era estudante de Farmácia, em Manaus, e pelas oportunidades de aprendizado durante o Mestrado.

Ao Dr. Fernando Antonio Frota Bezerra pela orientação, pelo convívio, com seu maravilhoso senso de humor e a paz de espírito que transmitia nas horas difíceis.

A Dra. Claudia do Ó Pessoa, pelo acolhimento no Laboratório de Oncologia Experimental, eu ainda estudante de graduação, pela troca científica, vastos conselhos e amizade.

A Dra. Letícia Veras Costa Lotufo que no Laboratório de Oncologia Experimental, sempre nos momentos difíceis me recebeu e apoiou, pelo seu carinho, amizade e compreensão constantes.

A Dra. Maria Rosa Lozano Borrás, pelo incentivo, carinho e amizade dispensados desde a graduação até este momento.

A Dra. Célia Regina Amaral Uchoa (Senhora Dona), pelas avaliações clínicas realizadas neste trabalho e por sua energia positiva em todos os momentos que esteve presente durante o mestrado.

A Dra. Helena Serra Azul Monteiro, por ter aceito participar da minha banca e por sempre contribuir com seus conselhos sábios, desde de Farmacologia Geral e Autonômica até esse momento tão esperado;

A Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar por aceitar participar da minha banca;

Aos voluntários, sem os quais essa pesquisa não poderia ser realizada;

Aos bolsistas Luciana Bessa, responsável pelo estudo de Toxicologia Clínica comigo e Bruno Coelho, com quem desenvolvi o teste do cometa.

A todos os demais bolsistas da UNIFAC e do LOE, sem os quais não conseguiria tão rápido entrosamento.

Aos pós-graduandos do LOE Alessandra, Ana Angélica, Ana Paula, Hélio, Hemerson, Gardênia, Patrícia, Raimundo e Rômulo por compartilharem suas experiências e amizade;

Aos amigos do LOE, Diego, Ivna, Ivana, Clarissa, Hidelbrando, Juliana, Rafael, Lícia, Germana, Ana Raquel e Márcia.

À Marcelle Almeida de Sousa Nogueira, pelo assessoramento técnico, amizade e carinho dispensados.

Aos antigos companheiros do LOE, Meton, Denissa, Lícia e Sérgio.

Aos amigos da Unidade de Farmacologia, mesmo aos que me chamam de “Guinomo”, Demétrius, Giovanni, Isabelle, Ismael, Ismênia, Gilmara, Aline, Janaína, Arnaldo e Pacífica.

Aos companheiros, Adriano, Ana e Mariuza pela convivência e amizade.

À Silvana pela imensurável ajuda neste trabalho.

Aos técnicos Fátima, David, Evanir, Raimundo e Paulo sempre prontos a ajudar.

Às secretárias Fábiana, Maria Tereza, Flávia, Rosana, Malu, Sílvia e Áurea que davam “um jeito” em tudo.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmacologia pelos ensinamentos.

À Rose, Fernando, Chiquinho, Íris, Sílvia, Dona Bia, Sr. Francisco, Sílvia e Sr. Aroldo e demais funcionários da UNIFAC e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, por fornecerem sempre boas condições de estudo e trabalho.

Ao amigo Marcio Pinho Pereira, por estar sempre disposto a me ajudar em todas as horas, por sua amizade, carinho, compreensão e por não reclamar quando digo, *Bora, Cala a Boca...*

À amiga Paula Christine Jimenez, por sempre estar por perto e por sempre me acolher em datas especiais como os dias das Mães.

A amiga Raquel Carvalho Montenegro, por sua amizade, cumplicidade, carinho, compreensão, por agüentar minhas chatices e se fazer presente em todos os momentos fossem esses bons ou ruins, claros ou escuros.

Aos amigos, que nunca me esqueceram e sempre estiveram comigo apesar da longa distância, Yama, Karlinha, Fran, Rayka e Evandro, Karina e Heráclio, Karen e Fabico.

Aos meus irmãos Marla e Marcel, e ao meu cunhado Marcos que durante a minha ausência, compartilharam comigo o incentivo carinhoso neles contido.

Agradeço também ao apoio financeiro da Marjan Indústria e Comércio Ltda., ao CNPq e ao Instituto Claude Bernard, sem os quais não poderia realizar este trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Agarose LMP – agarose Low Melting Point (baixo ponto de fusão)
Agarose NMP – agarose Normal Melting Point
Anti-HBc IgM – Anticorpo da Hepatite B
Anti-HCV – Anticorpo para vírus da hepatite C
ALT/TGP – Alanina-aminotransferase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST/TGO – Aspartato-aminotransferase
CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CFM – Conselho Federal de Medicina
CNS – Conselho Nacional de Saúde
ECG - Eletrocardiograma
FDA – Food and Drug Administration
Gama GT – Gama-glutamiltransferase
GLDH – Glutamato desidrogenase
HBs Ag – Antígeno de superfície da hepatite B
HIV – Vírus da Imunodeficiência MS – Ministério da Saúde
LDH – Lactato desidrogenase
MDH – Malato desidrogenase
NAD – Nicotinamida –Adenina-dinucleotídeo
NADH – Nicotinamida – Adenina-dinucleotídeo hidrogenada
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Phosphate Buffer Solution
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
U/mL – Unidade por mililitro
USP – Farmacopéia dos Estados Unidos
WHO – World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do fitoterápico Tamaril [®] .	42
Tabela 2	Avaliação pré-clínica de senosídeos puros e extratos de Senna.	91
Tabela 3	Parâmetros hematológicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	146
Tabela 4	Parâmetros hematológicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	146
Tabela 5	Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	147
Tabela 6	Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	147
Tabela 7	Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	148
Tabela 8	Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	148
Tabela 9	Parâmetros renais avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	149
Tabela 10	Parâmetros renais avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	149
Tabela 11	Parâmetros metabólicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	150
Tabela 12	Parâmetros metabólicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	150
Tabela 13	Valores de eletrólitos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	151
Tabela 14	Valores dos eletrólitos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Os quatro humores: (A) fleuma, (B) sangue, (C) bÍlis amarela e (D) bÍlis negra.	22
Figura 2a	Painel das plantas que constituem o fitoterápico Tamaril [®] e suas indicações na medicina popular.	27
Figura 2b	Painel das plantas que constituem o fitoterápico Tamaril [®] e suas indicações na medicina popular.	28
Figura 3	Estrutura dos senosÍdeos A e B.	29
Figura 4	Seleção dos voluntários – Foram realizados história clínica, exame físico e exames laboratoriais para seleção de voluntários sadios. Ao término de cada semana, os voluntários foram submetidos aos mesmos critérios de avaliação realizados no pré-estudo.	46
Figura 5	Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etÍdeo e visualizados no microscÓpio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano.	49
Figura 6	Frequência de idade dos 24 voluntários selecionados para participar do ensaio clínico do Tamaril [®] .	70
Figura 7	Índice de Massa CorpÓrea dos 24 voluntários que participaram do estudo de toxicologia clínica do Tamaril [®] , antes e após o término do estudo.	71
Figura 8	NÍveis séricos de Hemoglobina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	72
Figura 9	NÍveis séricos de Hematócrito avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	72
Figura 10	NÍveis séricos de LeucÓcitos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	73
Figura 11	NÍveis séricos de Plaquetas avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	73
Figura 12	NÍveis séricos de TGO avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	74
Figura 13	NÍveis séricos de TGP avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	74
Figura 14	NÍveis séricos de Gama-GT avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril [®] durante 28 dias consecutivos.	75

Figura 15	Níveis séricos de Fosfatase Alcalina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	75
Figura 16	Níveis séricos de Bilirrubina Total avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	76
Figura 17	Níveis séricos de Proteínas Totais avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	76
Figura 18	Níveis séricos de Albumina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	77
Figura 19	Níveis séricos de Uréia avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	78
Figura 20	Níveis séricos de Creatinina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	78
Figura 21	Níveis séricos de Glicose avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	79
Figura 22	Níveis séricos de Colesterol avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	79
Figura 23	Níveis séricos de Triglicerídeos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	80
Figura 24	Níveis séricos de Ácido Úrico avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	80
Figura 25	Níveis séricos de Sódio avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	81
Figura 26	Níveis séricos de Potássio avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.	81
Figura 27	Alanina-aminotransferase (ALT/TGP), alterada em (1) voluntário do sexo masculino na após a primeira semana da administração do fitoterápico Tamaril®, com subsequente diminuição até normalização.	82
Figura 28	Porcentagem de eventos adversos relacionados à administração do medicamento, observados durante os 28 dias do uso do fitoterápico Tamaril® 2 cápsulas uma vez ao dia v.o (n=24).	83
Figura 29	Escores dos cometas de dezesseis voluntários tratados por 28 dias ininterruptos com Tamaril®. * $p < 0,05$.	84

Resumo

RESUMO

ESTUDO DE TOXICOLOGIA CLÍNICA E GENOTOXICIDADE DO FITOTERÁPICO TAMARIL[®] CÁPSULA, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS. Marne Carvalho de Vasconcellos. Orientadora: Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2004.

O Tamaril[®] é um fitoterápico composto de cinco plantas medicinais: *Cassia fistula* (extrato mole), *Cassia angustifolia* (Sene), *Coriandrum sativum* L., *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz), e *Tamarindus indicus* L. (extrato mole); todas com conhecida ação laxativa. Todo medicamento que vai ser registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), passa por diversas etapas de pesquisa sendo uma delas a toxicologia clínica. A genotoxicidade é uma especialidade relativamente recente, e se situa na interface entre a toxicologia e a genética. Esta visa o estudo dos processos que alteram o DNA (ácido desoxirribonucléico). O objetivo desse estudo foi avaliar a segurança e o potencial genotóxico da formulação de Tamaril[®] cápsulas em voluntários saudáveis. O ensaio clínico consistiu de um estudo aberto com 25 voluntários de ambos os sexos, (13 homens e 12 mulheres), que receberam diariamente duas cápsulas de Tamaril[®] v.o. por 28 dias ininterruptos. Os voluntários foram incluídos no estudo após avaliação clínica, exames físicos e laboratoriais. Ao final de 28 dias, amostras de sangue (5mL) foram coletadas de cada voluntário, para avaliar o efeito genotóxico do Tamaril[®] em linfócitos periféricos humanos através do teste do cometa. A idade média dos voluntários foi de $30,1 \pm 6,9$ anos e o índice de massa corpórea foi de $24,21 \pm 3,00$ Kg/ cm² no pré-estudo e $24,26 \pm 3,05$ Kg/ cm² no pós-estudo. As funções hematológica, hepática, renal e metabólica, bem como os eletrólitos sódio e potássio foram analisados semanalmente através dos exames laboratoriais, os quais não evidenciaram sinal de toxicidade, estando todos os resultados dentro da faixa de normalidade. Fezes pastosas, dor abdominal e flatulência foram os eventos adversos mais observados. Pelo teste do cometa, foram observados danos tipo 1 ($p < 0,05$) nos linfócitos periféricos dos voluntários tratados com Tamaril[®]. Os estudos de Toxicologia Clínica e genotoxicidade não evidenciaram nenhuma toxicidade nos voluntários tratados com Tamaril[®] por 28 dias ininterruptos 2 cápsulas por dia v.o.

Palavras-chave: fitoterápico, toxicologia, genotoxicidade, Tamaril[®]

Abstract

ABSTRACT

CLINICAL TOXICOLOGY AND GENOTOXICITY EVALUATION OF THE PHYTOMEDICINE TAMARIL[®] (CAPSULE) ON HEALTHY VOLUNTEERS. Marne Carvalho de Vasconcellos. Advisor: Maria Elisabete Amaral de Moraes. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC. July, 2004.

Tamaril[®] is a phytomedicine constituted of 5 medicinal plants well known for their laxative proprieties: *Cassia fistula* (soft extract), *Cassia angustifolia* (Senna), *Coriandrum sativum* L. e *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz) and *Tamarindus indicus* L. (soft extract). Every medication to be launched on the market must succeed in a series of research steps, where clinical toxicology evaluation is an important one among them. Genotoxic assessment, which aims on the processes altering DNA integrity, is a relatively recent field in drug development and stands on the interface between toxicology and genetics. This study consisted on the evaluation of clinical safety and genotoxic potential of Tamaril[®] capsules in healthy volunteers. The clinical evaluation consisted of an open study with 25 healthy volunteers of both sexes (13 males and 12 females) who received a daily oral dose of two capsules Tamaril[®] for 28 consecutive days. The volunteers were selected for the study if considered in good health after criterious clinical, physical and laboratorial evaluations. At the end of the 28 study days, blood samples (5 mL) were collected from each volunteer for the genotoxic assessment of Tamaril[®] on peripheral lymphocytes through the comet assay. The mean age of the volunteers was of 30.1 ± 6.9 years and the body mass index was of 24.21 ± 3.00 Kg/cm² on the pre-study evaluation and 24.26 ± 3.05 Kg/cm² on the post-study. Hematological, hepatic, renal and metabolic functions, as well as sodium and potassium did not show signs of abnormality in any volunteer throughout the weeks of the study. Soften faces, abdominal pain and flatulence were the adverse events regularly observed. Through the comet assay, score 1 DNA damage was most frequently registered on peripheral lymphocytes of volunteers treated with Tamaril[®] ($p < 0.05$). Clinical and genotoxic evaluation of healthy volunteers receiving Tamaril[®] for 28 uninterrupted days did not show signs of toxicity related to the treatment.

Keywords: phytomedicine, toxicology, genotoxicity, Tamaril[®].

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
HOMENAGEM ESPECIAL	v
AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xv
ABSTRACT	Xvii
SUMÁRIO	Xv
INTRODUÇÃO	1
1. FITOTERÁPICOS	2
1.1 DEFINIÇÃO	2
1.2 HISTÓRICO	3
1.2.1 <i>Fitoterápicos no Brasil</i>	5
1.3 QUALIDADE	7
1.4 SEGURANÇA	8
1.5 EFICÁCIA	8
1.6 RELEVÂNCIA SOCIAL	9
2. TAMARIL [®]	10
3. DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS	14
3.1 FASES DA PESQUISA CLÍNICA EM HUMANOS	16
4. TOXICOLOGIA CLÍNICA	17
5. GENOTOXICIDADE	18
6. OBJETIVOS	20
6.1 GERAL	21
6.2 ESPECÍFICOS	21
7. MATERIAIS E MÉTODOS	22
7.1 REAGENTES	23
7.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS	24
7.3 SOLUÇÕES	24

7.4 TAMARIL®	25
7.5 DESENHO DO ESTUDO	26
7.6 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS	26
7.6.1 <i>Crerios de incluso</i>	26
7.6.2 <i>Crerios de excluso</i>	27
7.7 ACOMPANHAMENTOS DOS EVENTOS ADVERSOS	28
7.8 TOXICOGENÉTICA	30
7.8.1. TESTE DO COMETA	30
7.8.2 <i>Protocolo do Teste do Cometa</i>	30
7.8.2.1 <i>Coleta do Material</i>	30
7.8.2.2. <i>Isolamento dos linfocitos</i>	30
7.8.2.3 <i>Preparação das amostras</i>	31
7.8.2.4 <i>Preparação das lâminas</i>	31
7.8.2.5 <i>Lise celular</i>	31
7.8.2.6 <i>Neutralização e Eletroforese</i>	31
7.8.2.7 <i>Fixação e coloração</i>	32
7.8.2.8 <i>Escore das lâminas</i>	32
7.9 TOXICOLOGIA CLÍNICA	33
7.9.1 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA	33
7.9.1.2 <i>Aspartato-aminotransferase</i>	33
7.9.1.3 <i>Alanina-aminotransferase</i>	34
7.9.1.4 <i>Gamaglutamiltransferase</i>	35
7.9.1.5 <i>Fosfatase Alcalina</i>	36
7.9.1.6 <i>Bilirrubina total</i>	36
7.9.1.7 <i>Albumina</i>	37
7.9.1.8 <i>Proteínas Totais</i>	38
7.9.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	39
7.9.2.1 <i>Uréia</i>	39
7.9.2.2 <i>Creatinina</i>	40
7.9.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO METABÓLICA	40
7.9.3.1 <i>Glicose</i>	40
7.9.3.2 <i>Colesterol total</i>	41
7.9.3.3 <i>Triglicerídeos</i>	43

7.9.3.4 <i>Ácido úrico</i>	44
7.9.4 ELETRÓLITOS	45
7.9.5 PARASITOLÓGICO DE FEZES	45
7.9.6 SUMÁRIO DE URINA	46
7.9.7 ANÁLISE SOROLÓGICA	46
7.9.7.1 <i>Anti-HBC IgM</i>	46
7.9.7.2 <i>HbsAg</i>	47
7.9.7.3 <i>HIV 1 e HIV 2</i>	47
7.9.7.4 <i>Anti-HVC</i>	48
7.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
8. RESULTADOS	51
8.1 <i>População Estudada</i>	51
8.2 <i>Exames Laboratoriais</i>	53
8.3 <i>Eventos Adversos</i>	65
8.4 <i>Genotoxicidade</i>	66
9. DISCUSSÃO	67
10. CONCLUSÃO	75
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO I	88
ANEXO II	104
ANEXO III	123
ANEXO IV	125
ANEXO V	127
ANEXO VI	130

Introdução

1. FITOTERÁPICOS

1.1. DEFINIÇÃO

Fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecno-científicas em publicações ou ensaios clínicos Fase III. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (Brasil, 2004)

1.2. HISTÓRICO

O uso popular de plantas medicinais é uma arte que acompanha o homem desde os primórdios da civilização humana. O conhecimento histórico do uso de plantas medicinais nos mostra ao que pela própria necessidade humana, as plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados (PHILLIPS & GENTRY, 1993). Esses conhecimentos foram adquiridos desde a pré-história quando o homem primitivo utilizava – se de plantas para sua alimentação, assim como para tratar os males que lhe afligiam. Ao longo da história os povos puderam determinar as espécies boas para o consumo alimentar e as que se destinam à terapêutica .

Os curandeiros foram os primeiros a utilizar as plantas medicinais e a observar os seus efeitos curativos. Entretanto, as receitas mais antigas registradas sobre o uso de plantas para fins medicinais, datam de aproximadamente 3700 anos a.C. e foram encontradas na pirâmide do faraó Quéops, no Egito. Esta prática repassada de geração em geração, traz de nossos antepassados informações, sobre plantas que amenizavam ou curavam seus males (PHILLIPS & GENTRY, 1993).

A história da terapêutica começa, provavelmente, por Mitridates, rei de Ponto, século II a.C., sendo ele o primeiro farmacologista experimental. Nessa época, já eram conhecidos os opiáceos, a cila e inúmeras plantas tóxicas. No Papiro de Ebers, de 1550 a.C.,

descoberto em meados do século passado em Luxor, no Egito, foram mencionadas cerca de 700 drogas diferentes, incluindo extratos de plantas, metais (chumbo e cobre) e veneno de animais (ALMEIDA, 1993; CARNEIRO, 1997).

A arte de embalsamar cadáveres, evitando que estes entrassem em estado de putrefação, foi desenvolvida pelos antigos egípcios. Foram necessários vários experimentos com diferentes plantas para dar conhecimento ao mundo e deixar tal arte como herança (ALZUGARY & ALZUGARY, 1983).

O cheiro teve muita importância na escolha das ervas medicinais. Na Idade Média, acreditava-se que determinados aromas espantavam os espíritos das doenças que acometiam o corpo. A aromaterapia é um ramo da fitoterapia, que já existe há tempo suficiente para considerar seu valor terapêutico e sua ação fisiológica benéfica (ALZUGARY & ALZUGARY, 1983).

Na Idade Antiga, os gregos foram, praticamente, os iniciadores dos primeiros ensaios médico-botânicos, usando para isso os cultos aos deuses vegetais nas suas curas milagrosas, através das plantas. O valor terapêutico ou tóxico de algumas delas eram bastante conhecidas na Antiga Grécia. Em muitos jardins e hortas cultivava-se determinada espécie medicinal. Hipócrates (460-377 a.C.), denominado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra *Corpus Hippocraticum* a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando, para cada enfermidade, o remédio e o tratamento adequado. Prescrevia para os seus pacientes regimes e dietas, nos quais incluía o uso de plantas com propriedades medicinais (LYONS, 1987; GUILLÉM, 1987).

A produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso de plantas medicinais. No começo da Era Cristã, Pedanius Dioscórides, médico grego que trabalhou nas legiões romanas, coletou e descreveu muitas plantas ao redor do mar Mediterrâneo e publicou a obra *De Materia Médica*, usada há mais de 15 séculos, em cinco volumes, com mais de 500 produtos de origem vegetal, descrevendo o emprego terapêutico de muitas delas. A farmacopéia grega assimilou grande parte da farmacopéia cretense e da micênica, que conheciam várias plantas medicinais como a dormideira, o sésamo, o açafraão e os líquens (LYONS, 1987).

Em meados de 161-180d.C., Galeno (Claudius Galenus) nascido em Pérgamo, Ásia Menor, iniciou sua carreira como médico dos gladiadores em Alexandria, e mais tarde foi o médico particular do Imperador Marco Aurélio, em Roma. Desenvolveu a ciência de preparação de medicamentos, sendo por isso considerado como o “pai das ciências farmacêuticas”. Até os nossos dias, preparações de origem natural são classificadas como “galênicas” (GUILLÉM, 1987; MARGOTTA, 1998).

Os árabes, que foram os primeiros a distinguir a medicina da farmácia, contribuíram muito para a difusão de diversas plantas medicinais nas costas do Mediterrâneo (França, Itália e Espanha). Dentre os principais médicos árabes que se ocuparam das plantas medicinais estão, Avicena (978-1036), que se tornou tão famoso quanto Hipócrates e Galeno, e Ibn Baithar, que em sua obra *Kitabal-Dschamial Kabu* (grande compilação de medicamentos e alimentos simples) trata de 1.400 drogas, das quais 200 citadas ineditamente. Deve-se aos árabes os primeiros cultivos de açafrão, cana-de-açúcar, arroz, algodão e algarroba (GUILLÉM, 1987).

Durante a Renascença, o compêndio de Dioscórides foi revisado, sendo ilustrado com as plantas descritas por ele. Esse, ainda, era baseado na patologia humoral clássica, que ensinava que saúde e doença eram determinadas pelos quatro humores corporais (legado hipocrático/galênico), – sangue, fleuma, bÍlis negra e bÍlis amarela que se relacionavam com órgãos particulares (FIGURA 1).



FIGURA 1 – Os quatro humores: (A) fleuma (B) sangue, (C) bÍlis amarela e (D) bÍlis negra. (Illuminuras do manuscrito MS C. 54. da Zentralbibliothek de Zuriq. Data: séc. XIV.)

O sangue procedia do coração, a fleuma do cérebro, a bÍlis amarela do fÍgado e a bÍlis negra do baço. Hipócrates, Galeno e Avicena basearam-se nos elementos da natureza (ar, Água, fogo, terra), representando-a no corpo humano, o qual passava a ser visto como um microcosmo natural. O sangue era quente e úmido, como o ar; a fleuma era fria e úmida, como a Água; a bÍlis amarela era quente e seca, como o fogo; a bÍlis negra era fria e seca, como a terra. Dessa maneira, se uma doença em particular fosse classificada como úmida, quente ou seca, ela seria tratada pela administração de uma planta medicinal que tivesse a propriedade oposta (JUTTNER, 1983).

Ao final do século XIX o desenvolvimento da química abriu caminho para a pesquisa dos princípios farmacológicos ativos obtidos de fontes naturais.

1.2.1. FitoterÁpicos no Brasil

A utilização popular das plantas medicinais no Brasil, com fins terapêuticos e rituais religiosos, provém de diferentes origens e culturas tradicionais, principalmente de índios brasileiros e seitas afro-brasileiras, e da cultura e tradição africana e européia. O uso e

o comércio destes recursos, como em outros países, foram estimulados pelas necessidades de uma crescente população que demanda cada vez mais plantas medicinais para o cuidado de sua saúde e para seus cultos e tradições religiosos; pela facilidade de acesso, devido aos custos elevados da medicina ocidental, aos efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, além do crescente interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico e econômico que representam e à demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica (SIMÕES et al., 1999).

O conhecimento científico de uma planta medicinal abrange uma visão profunda sob vários aspectos da farmacologia, toxicologia, química orgânica e da botânica taxonômica. É necessário desenvolver estudos integrados nestas áreas. A escolha da planta, pode ser feita baseada em informações populares de seu uso, da sua taxonomia ou da quimiosistemática (MATOS, 1992).

Em países em desenvolvimento como o Brasil, o uso terapêutico de plantas medicinais e seus manufaturados ajudam a reduzir a importação de drogas, e ainda incrementa o desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998). Além disso, medicamentos derivados de plantas conhecidas tendem a ser mais aceitos pela população, facilitando a aderência ao tratamento (WHO, 1999). O número de plantas nativas do Brasil usadas *in natura* ou manufaturadas como fitomedicamentos já ultrapassa uma centena (CALIXTO, 2000).

Dessa forma, as plantas medicinais em países como o Brasil, são uma alternativa para a prescrição de medicamentos, o fácil acesso e o conhecimento popular contribuem para o uso de fitomedicamentos. No entanto, apesar da vasta flora brasileira e do alto consumo desses medicamentos, pouco tem sido feito para estudar novas fontes medicamentosas.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, vem conseguindo regulamentar a comercialização dos fitoterápicos no Brasil de uma forma mais segura, no entanto, a RDC 48 de março de 2004, é muito recente, mas já é um grande começo, pois faz cobranças maiores sobre as indústrias para que os fitoterápicos tenham um controle de qualidade rigoroso e a sua segurança e eficácia comprovadas através de ensaios clínicos,

estimulando dessa maneira que estudos pré-clínicos, clínicos e de desenvolvimento de medicamentos, sejam desenvolvidos no Brasil com plantas medicinais.

1.3. QUALIDADE

O controle da matéria-prima é essencial para assegurar a qualidade de um medicamento fitoterápico. Em comparação com as preparações convencionais, os produtos fitoterápicos apresentam alguns problemas singulares relacionados à qualidade. Isso acontece por causa da natureza das plantas, formada por misturas complexas de compostos químicos que podem variar consideravelmente, dependendo dos fatores ambientais e genéticos. Além disso, os princípios ativos responsáveis pelos efeitos farmacológicos, são parcialmente ou totalmente desconhecidos, e isso impede o nível de controle que pode ser feito rotineiramente com substâncias sintetizadas nos medicamentos convencionais. Um outro fator complicador é o uso de combinações de plantas, onde certos fitoterápicos apresentam mais de cinco plantas diferentes em um mesmo produto.

Por isso, deve-se levar em consideração no controle da matéria-prima: identificação da planta, variação intra- e interespecífica entre as espécies, fatores ambientais, época de colheita, parte usada, armazenamento e processamento após a colheita, adulteração com material de outra planta, teste de identidade, análise dos constituintes, teor de cinza e contaminantes de plantas, microorganismos, pesticidas, fumigantes, metais tóxicos, entre outros.

Além de seus ingredientes ativos principais, que determinam o tipo de ação produzida, os fitoterápicos contêm componentes secundários que podem modificar o efeito dos ingredientes principais, por exemplo, influenciando sua estabilidade ou biodisponibilidade. As drogas vegetais também contêm impurezas destituídas de atividade farmacológica, ou podem, até mesmo, produzir efeitos indesejados. Isso explica porque fitomedicamentos com diferentes tipos de ação podem ser feitos a partir da mesma planta, dependendo da qualidade da droga vegetal, da parte da planta que é usada, do solvente utilizado e do processo de extração. (SCHULZ *et al.*, 2002)

1.4. SEGURANÇA

Assim como acontece com todas as formas de automedicação, o uso de fitoterápicos representa um risco potencial para saúde do ser humano (D'ARCY, 1991- Part I; D'ARCY, 1993 – Part II). A segurança dos fitoterápicos é especialmente importante, pois na maioria dos casos esses medicamentos não são prescritos por um profissional e são geralmente utilizados por tempo prolongado (uso crônico).

O uso tradicional de plantas com finalidade terapêutica permitiu que os medicamentos com sinais agudos e aparentes de toxicidade sejam reconhecidos e evitados. Entretanto, a premissa de que o uso tradicional de uma planta, por centenas de anos, estabelece a sua segurança, não é necessariamente verdadeira. Isso porque formas mais sutis e crônicas de toxicidade, como carcinogenicidade, mutagenicidade e hepatotoxicidade, podem não ter sido detectadas pelas gerações anteriores, e esses tipos de toxicidades são os que mais preocupam na avaliação da segurança dos fitoterápicos. Há de se convir que os dados toxicológicos sobre as plantas medicinais são limitados, sendo necessários estudos para comprovação de sua segurança para o uso humano, com doses e composições estabelecidas.

1.5. EFICÁCIA

Apesar de muitas plantas utilizadas com fins medicinais terem seu uso preconizado, existe pouco registro de trabalhos científicos a respeito dos seus princípios ativos, farmacodinâmicos ou eficácia clínica. Para que a eficácia de uma planta seja comprovada cientificamente, vários fatores específicos precisam ser levados em consideração: falta de dados fitoquímicos, estudos pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* e estudos clínicos com relevância, produtos formulados x extrato bruto, entre outros.

No entanto, o conhecimento de alguns preceitos básicos é fundamental para a condução adequada dos ensaios clínicos de eficácia terapêutica com fitoterápicos, como planejamento, randomização e controle (BULPITT, 1993).

1.6 RELEVÂNCIA SOCIAL

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial usam os recursos da medicina popular para suprir as necessidades de assistência médica primária. Nos países desenvolvidos, as drogas derivadas de plantas têm um papel importante na prescrição médica (WHO, 1991).

Nos Estados Unidos, em torno de 25% das receitas contêm medicamentos com compostos derivados de plantas, princípios ativos preparados de plantas superiores ou extratos de plantas. No Brasil, a grande maioria da população tem fácil acesso às ervas e plantas medicinais, enquanto que os medicamentos industrializados apresentam como principal obstáculo, além dos efeitos colaterais ocasionados pelo seu uso extensivo, o alto custo, tanto para o consumidor individual como para as entidades previdenciárias. No entanto, de acordo com a resolução 1499/98 do Conselho Federal de Medicina (CFM), o CFM resolve proibir aos médicos a utilização de práticas terapêuticas não reconhecidas pela comunidade científica.

Diante disso, é de fundamental importância que sejam desenvolvidos estudos criteriosos a fim de avaliar sua atividade farmacológica, tendo seus princípios ativos isolados tornando-se muitas vezes o medicamento de escolha. Com isso, algumas instituições e organizações têm demonstrado interesse em encontrar soluções menos onerosas para resolver os problemas de saúde da população de baixa renda; estes grupos têm voltado seus olhos a Fitoterapia.

2. TAMARIL®

O Tamaril® é um fitoterápico composto de cinco plantas medicinais: *Cassia fistula* (extrato mole), *Cassia angustifolia* (Sene) (FIGURA 2a), *Coriandrum sativum* L. e *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz), *Tamarindus indicus* L. (extrato mole); todas com conhecida ação laxativa (FIGURA 2b).


<i>Painel</i>	<i>Uso Popular</i>
	<p data-bbox="922 703 1134 734"><i>Cassia fistula</i> L.</p> <p data-bbox="630 792 1428 1104">Ocorrência natural na Índia. Suas flores amarelo-dourado perfumadas, dispostas em longos cachos pendentes, se destacam na paisagem. Presta-se bem à arborização urbana. Constituintes químicos: substâncias antraquinônicas livres e combinadas senosídeos A e B. É indicado na febre e prisão de ventre. (CORRÊA, 1984)</p> <p data-bbox="922 1144 1174 1176"><i>Cassia angustifolia</i></p> <p data-bbox="630 1216 1428 1688">Embora originário da Arábia é cultivado na Índia. O Sene foi introduzido na fitoterapia pelos médicos árabes. É classificado e utilizado como laxativo de contato, por não provocar inflamações secundárias. Constituintes químicos: substâncias antraquinônicas livres e combinadas, senosídeos A e B, mucilagens, flavonóides como o Rampferol, resinas e glicosídeos. Os efeitos do Sene são obtidos após a absorção e liberação dos heterosídeos no intestino grosso. (CORRÊA, 1984)</p>

FIGURA 2 – Painel das plantas que constituem o fitoterápico Tamaril® e suas indicações na medicina popular.

Painel	Uso Popular
	<p data-bbox="959 327 1262 360"><i>Coriandrum sativum L.</i></p> <p data-bbox="751 421 1430 618">Indicação: abscesso, ansiedade, apetite excessivo, atonia gastrintestinal, cólica abdominal, debilidade estomacal, espasmo, ferida, gases, inflamação, nervosismo, tumor. (CORRÊA, 1984)</p>
	<p data-bbox="948 719 1230 752"><i>Glycyrrhiza glabra L.</i></p> <p data-bbox="751 786 1430 983">Propriedades Medicinais: antimicrobiana, antioxidante, antitóxica, anti-séptico, aromática, diurético, emoliente, expectorante, laxante, refrescante, tônica .</p> <p data-bbox="751 1032 1430 1229">Indicação: abscesso, catarro, catarro da bexiga, espasmo, ferida, gota, inflamação, inflamação bucal, pedra e cálculo, resfriado, tosse, tumor, úlcera, vesícula, vias urinárias. (CORRÊA, 1984)</p>
	<p data-bbox="948 1279 1230 1312"><i>Tamarindus indica L.</i></p> <p data-bbox="751 1352 1430 1550">Constituintes químicos da planta: carboidratos; proteínas; gorduras; sais de cálcio, fósforo e ferro; ácidos fosfórico, láctico, málico, tartárico e acético; pectina; glicose; levulose; vitaminas A, B1, B2 e C.</p> <p data-bbox="751 1576 1430 1715">Indicação: febre, intestino preso, inflamações da garganta e estômago, hematemese, vermes intestinais, tosse. (CORRÊA, 1984)</p>

FIGURA 2b – Painel das plantas que constituem o fitoterápico Tamaril® e suas indicações na medicina popular.

As indicações do Tamaril® são amplas: todas as relacionadas a um distúrbio organo-funcional da motricidade intestinal; tratamento sintomático da constipação, tanto crônica como secundária e preparação para os exames radiológicos e endoscópicos. Indicações farmacêuticas complementares: constipação decorrente de viagens prolongadas, período menstrual, gestação, dietas, pós-operatórios. Podem ocorrer esporadicamente cólicas abdominais, vômitos ou diarreias, que desaparecem com a suspensão da medicação ou espaçamento da dose e é contra-indicado nas retocolites e doença de Crohn .

O princípio ativo da Sene foi inicialmente isolado e caracterizado por Stoll em 1941. Os dois primeiros glicosídeos foram identificados como sendo da família das antraquinonas (FIGURA 3).

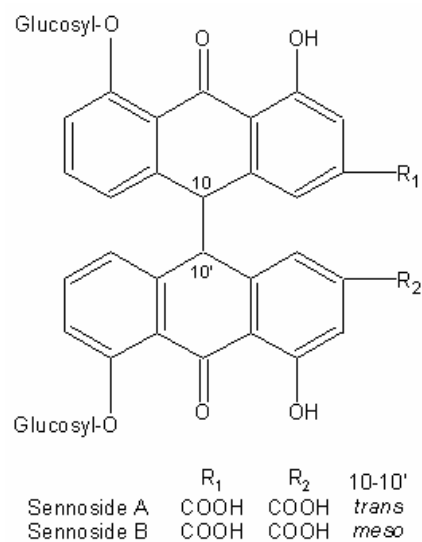


FIGURA 3 – Estrutura dos senosídeos A e B.

As preparações que contêm Sene representam uma classe de medicamentos laxativos dos mais utilizados. O mecanismo de ação é ainda pouco conhecido. Considera-se, geralmente, que eles aumentam o peristaltismo, seja irritando a mucosa intestinal, seja estimulando-a diretamente por ação sobre o plexo mesentérico. Sua ação é devida à presença de senosídeos, derivados antraquinônicos ligados às moléculas de glicose, que quando hidrolisados resultam da liberação de derivados antracênicos. Ao lado dos seus princípios ativos, segundo a qualidade de preparação, podemos encontrar conteúdo mais ou menos elevado das formas antraquinônicas livres, consideradas por alguns autores como responsáveis por náuseas e colites (VAN OS, 1976; LENG-PASCHLOW, 1992).

Ensaio pré-clínico realizado por Dufor e colaboradores (1983) compararam uma preparação farmacêutica contendo pó de sene com uma preparação que continha uma antraquinona livre (Diantrona) em ratos, de condições idênticas, com dose “equilaxativa”, sobre o tecido intestinal dos animais. Nas condições experimentais adotadas, a ingestão de sene foi perfeitamente tolerada pela mucosa intestinal dos animais. Ao contrário, em dose “equilaxativa”, uma amostra de Diantrona, administrada nas mesmas condições, foi responsável na totalidade dos animais, por anomalias localizadas ao nível do plexo e fibras nervosas do mesentério. Estes tipos de lesões, somente reveladas por microscópio eletrônico, parecem ser equivalentes aos observados por B. Smith.

Ainda em 1983, Phillip Dufor mostrou que a administração cotidiana, durante 11 semanas em ratos do pó de Sene diluído, de concentração em senosídeos definida, praticamente isenta de derivados antracênicos livres foi perfeitamente tolerada pela mucosa intestinal dos animais. Nenhuma lesão da estrutura e da ultra-estrutura deste tecido foi destacada após exame de microscopia ótica e eletrônica. A inocuidade da preparação em relação ao conteúdo em derivados antracênicos livres sugere a hipótese de uma certa nocividade destes últimos.

Já em 1984, Dufor & Gendre observaram ratos após um longo período de administração de antraquinona, comparando o efeito da polpa de fruta contendo senosídeos A e B com aqueles da antraquinona livre, 1-8 dihidroxiantraquinona. As observações foram feitas através de microscópio eletrônico de transmissão após 16 semanas de tratamento nos dois grupos. Nenhum dano ao tecido intestinal foi observado com os senosídeos. Algumas mudanças, no entanto, foram detectadas na região nervosa do intestinos de todos os animais tratados com 1-8 dihidroxiantraquinona, principalmente na forma de vacuolização de axônios, formação de estruturas lisossomiais e em alguns casos aparentes degenerações fibrilares.

3. DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

A atividade de pesquisa clínica envolve ativamente as grandes indústrias farmacêuticas, diretamente interessadas na descoberta, desenvolvimento e fabricação de novos medicamentos. Isso porque a planta medicinal utilizada em medicamentos é um xenobiótico, ou seja, um produto estranho ao organismo humano, utilizado com fins terapêuticos.

Portanto, o uso popular ou tradicional não são suficientes para comprovar a segurança e a eficácia de uma planta. Neste sentido, as plantas não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização ou autorização com fins medicamentosos devem ser evidenciadas em experimentações científicas (BRASIL, 1996)

Para o desenvolvimento de medicamentos, devem ser seguidas etapas sequenciais que visam promover a segurança e garantir a eficácia desses medicamentos, desde sua preparação até o consumo humano, essas etapas são:

Etapa botânica: relacionada à identificação do material. A identificação do material é uma etapa importante pela própria variedade entre as espécies de plantas, os efeitos biológicos de mesmas plantas colhidas em regiões diferentes e em clima diferentes modifica a proporção dos seus constituintes químicos encontrados. Deve-se considerar que o que define uma espécie vegetal é o seu genoma, direcionando a formação de suas características morfológicas externas (fenótipo) e a síntese de seus metabolismos primário e secundário, o que demonstra que a identificação botânica é insuficiente para garantir a atividade medicinal de uma planta (EVANS, 1996).

Etapa farmacêutica: relacionada ao preparo e forma de administração do medicamento. O controle de estabilidade da forma farmacêutica de um fitoterápico qualquer, pressupõe que a matéria-prima em estudo seja uniforme e, na maioria das vezes, exige conhecimento prévio da sua constituição química. Também nesse caso, o controle da atividade farmacológica seria a alternativa disponível para garantir a estabilidade da substância ativa e, conseqüentemente, do fitoterápico.

Etapa de ensaios biológicos pré – clínicos : relacionadas a estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicológicos em animais.

Os estudos farmacocinéticos pré-clínicos servem para avaliar o destino do fármaco depois de sua administração. A velocidade e a intensidade de absorção, a distribuição no organismo, a afinidade pelos sítios de ligação, as formas de metabolização e os órgãos responsáveis pela sua excreção são parâmetros importantes para os estudos de eficácia e toxicidade.

Os estudos farmacodinâmicos têm por objetivo comprovar o efeito que motivou o estudo do novo medicamento e o perfil de seus efeitos colaterais, relacionando esses efeitos às doses e a um possível mecanismo de ação em várias espécies de animais de laboratório.

A toxicologia pré-clínica deve indicar o grau de confiança depositado em um medicamento a ser administrado à espécie humana. Esses estudos devem seguir protocolos internacionalmente aceitos, ainda que as exigências variem de país para país.

Etapa clínica : realizada em humanos , dividida em quatro fases.

Os ensaios clínicos podem ser prospectivos ou retrospectivos. O prospectivo é aquele que ocorre baseado em um protocolo de pesquisa e inclui pacientes após a idealização do protocolo. Ou seja, só após se conceber um plano de pesquisa é que se inicia o recrutamento dos pacientes. O estudo retrospectivo, por outro lado, baseia-se em dados que foram acumulados antes de sua concepção. Geralmente é baseado em levantamentos do que ocorreu, por exemplo, com pacientes tratados com uma droga específica ou de uma forma especial durante um certo período de tempo em uma dada instituição. Como os dados coletados retrospectivamente não obedeceram necessariamente a um protocolo, podem existir muitas falhas nesses estudos (BIBLIOMED, 2004)

3.1. FASES DA PESQUISA CLÍNICA EM HUMANOS

Esses estudos visam, primordialmente, estabelecer a segurança do fitoterápico em curto prazo e estabelecer a dose máxima tolerada (SPILKER & SCHOENFELDER,1990). Portanto, é importante monitorizar o voluntário com o intuito de detectar possíveis eventos adversos.

Para ser submetido a um estudo de fase I o fitoterápico deverá conter informações pré-clínicas suficientes, demonstrando que o produto é seguro para ser usado em seres humanos . Além disso, o protocolo clínico deverá ser bem delineado para que possa atingir com sucesso os objetivos propostos (FRIEDMAN *et al.*,1996).

Os estudos de fase I deverão ser realizados em voluntários sadios ou, em alguns casos (câncer e AIDS), com pacientes para determinação da segurança e tolerabilidade do fitoterápico (BAGULEY & KERR,2002).O número de voluntários necessários aos estudos de Fase I varia de 20 a 50, podendo, em alguns casos, chegar até 100 (GRADY & JOUBERT, 1997).

Dependendo da complexidade do fitoterápico pesquisado, algumas informações sobre o perfil farmacocinético (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e sobre os efeitos farmacodinâmicos, poderão também ser obtidos nos estudos clínicos de fase I para auxiliar no planejamento e interpretação dos estudos de fase II. Como os produtos fitoterápicos, na maioria das vezes, são constituídos por um complexo de substâncias químicas, muitas vezes não é possível determinar o princípio ativo, o que impossibilita a determinação dos parâmetros farmacocinéticos (BHATTARAM *et al.*,2002). Isso ajuda, principalmente, no controle de qualidade do material botânico que está sendo utilizado.

A eficácia terapêutica poderá ser constatada durante alguns desses estudos de fase I, quando o ensaio clínico for realizado em pacientes ou forem mensurados biomarcadores para algumas doenças (MATOREN, 1994).

Os estudos de fase II objetivam, num estágio inicial, avaliar a eficácia terapêutica do fitoterápico e definir uma faixa posológica ideal em uma doença alvo e, ao mesmo tempo, procuram definir a sua segurança e tolerabilidade nos pacientes participantes do ensaio

clínico. Geralmente, utilizam 50 a 100 pacientes, mas podem chegar a 300 ou mais, dependendo do delineamento experimental (GLENNY & NELMES, 1996).

Na fase seguinte, após a definição de uma faixa posológica ideal, onde não ocorreram reações adversas graves, vem o ensaio clínico e fase III. Nesse estudo, se faz uma avaliação comparativa com outras terapêuticas já estabelecidas, envolvendo um grande número de pacientes, que pode variar de poucas centenas a alguns milhares. Esses estudos adicionam também maiores informações sobre a segurança e a tolerabilidade dos fitoterápicos (POCOCK, 1987). Os dados positivos resultantes dos estudos de fase III possibilitam o registro do fitoterápico na Anvisa .

Nos estudos de fase IV, realizados no período de pós-comercialização, as avaliações da farmacovigilância realizadas em um grande número de pacientes, adicionam informações sobre a eficácia e segurança dos fitoterápicos. Além disso, essas novas informações podem possibilitar indicações terapêuticas adicionais (WHO, 1998).

A obtenção de resultados fidedignos e conclusivos nos estudos de fases I, II e III, está na dependência de um planejamento adequado dos ensaios clínicos, através de um delineamento experimental correto (COHEN & POSNER, 2000). Portanto, é de fundamental importância que o protocolo da pesquisa seja bem elaborado, especificando os objetivos, definindo a população de pacientes, selecionando o tratamento controle, escolhendo a estrutura do ensaio, organizando a randomização e o esquema de acompanhamento (CRAMER, 1996).

4. TOXICOLOGIA CLÍNICA

Os fitoterápicos são considerados medicamentos e, portanto, a toxicidade, as possíveis interações medicamentosas e as reações adversas (RAM) devem ser consideradas e avaliadas pelo médico durante o tratamento (WONG & CASTRO, 2003).

Não existe forma de eliminar completamente a possibilidade de alguma substância, incluindo fitoterápicos, produzir efeitos colaterais como reações alérgicas em pessoas sensíveis às mesmas (D'ARCY, 1991; 1993; PILLANS, 1995). A Organização Mundial de Saúde (OMS), na Declaração de 1978, abriu a possibilidade de um diálogo entre

os métodos tradicionais e os modernos, de cuidados com a saúde, num entendimento de que práticas médicas inseguras devem ser eliminadas e somente aquelas seguras e eficazes devem ser consideradas (WHO, 1998).

A segurança deve ser o principal critério na escolha de um fitoterápico. A seleção criteriosa, análises químicas, ensaios clínicos e medidas regulatórias restritivas devem ser seguidas e respeitadas com relação aos fitoterápicos (WHO, 1993). Não é eticamente aceitável, nem moralmente justificável prescrever fitoterápicos sem a evidência científica da sua qualidade, eficácia e segurança. Portanto, a pesquisa clínica cientificamente conduzida é necessária para proporcionar informações adicionais aos pacientes (SPRIET, 1994).

O desenho experimental de toxicologia clínica consiste de um estudo aberto, não randomizado, com 20 a 26 voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade variando entre 18 a 50 anos. Os voluntários que forem considerados qualificados para inclusão no estudo receberão, ambulatorialmente, a dose diária da posologia especificada, durante um período de tempo variável que pode ser de 07 a 28 dias ininterruptos, dependendo da indicação terapêutica (MEITNERT, 1986).

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o “termo de consentimento livre e esclarecido” deverão ser submetidos e aprovados por um CEP credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) - CNS/MS. O Estudo deve ser conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1965) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), África do Sul (1996) e Edimburgo (2000) e a Resolução 196/96 e 251/97 do CNS-MS (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997; POCOCK, 1987; SPILKER, 1991).

5. GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade é uma especialidade relativamente recente, e se situa na interface entre toxicologia e genética, por isto denominada, freqüentemente, também, de genética toxicológica. Esta visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis

celulares ou orgânicos, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese. Estas três especialidades são agrupadas em uma área de estudo, pois um mesmo produto pode desencadear os três efeitos, a mutagênese, a carcinogênese e a teratogênese, como por exemplo, as radiações gama (PEGAS HENRIQUES, 2003)

Inúmeras técnicas que detectam danos no DNA têm sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica (TICE *et al.*, 2000). Na última década, a técnica de ensaio do cometa ou eletroforese em gel de núcleo individual, permitindo avaliar um maior número de pessoas. A grande vantagem dessa metodologia é ser simples, rápida, podendo ser obtida em um dia, e barata. O teste também tem suas limitações, necessita de controles muito bem estabelecidos por ser muito sensível, o tempo entre a exposição e análise deve ser o mais curto possível, não é um teste de mutagenicidade, pois o dano pode ser reparado, por isto o tempo curto de detecção.

Objetivos

6. OBJETIVOS

6.1 GERAL

6.1.1 Avaliar a toxicologia clínica do fitoterápico Tamaril® administrado por vinte e oito dias ininterruptos em voluntários sadios.

6.2 ESPECÍFICOS

6.2.1 Detectar possíveis alterações nos exames laboratoriais dos voluntários a cada semana de administração do fitoterápico Tamaril®

6.2.2 Avaliar a notificação de possíveis eventos adversos existentes durante à administração do medicamento.

6.2.3 Avaliar se o medicamento tem potencial genotóxico em linfócitos humanos com a administração do Tamaril®.

Material e Métodos

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1. REAGENTES

- Agarose LMP (Gibco®)
- Agarose NMP (Gibco®)
- N-Lauroylsarcosine (Sigma®)
- Brometo de Etídeo (Sigma®)
- Ficoll (Sigma®)
- Trizma (Sigma®)
- Triton X-100
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- Etanol 100%
- Sais: EDTA, NaOH, NaCl e Tris
- Kits de dosagem de Alanina aminotransferase
- Kits de dosagem de Aspartato aminotransferase
- Kits de dosagem de Gama GT
- Kits de dosagem de Fosfatase alcalina
- Kits de dosagem de Proteína total e albumina
- Kits de dosagem de Bilirrubina total e frações
- Kits de dosagem de Uréia
- Kits de dosagem de Creatinina
- Kits de dosagem de Glicose
- Kits de dosagem de Colesterol total
- Kits de dosagem de Triglicérides
- Kits de dosagem de Ácido úrico
- Kits Anti-HBc IgM
- Kits HBsAg
- Kits HIV-1 e HIV-2
- Kits Anti-HCV

7.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS

- Centrífuga (Eppendorf®)
- Cuba e fonte para eletroforese (BioRad®)
- Estufa (Fanem®)
- Microondas (Panasonic®)
- Banho-maria (Fanem®)
- Geladeira e freezer (Cônsul®)
- Microscópio de fluorescência (Olympus®)
- Garrote
- Seringas descartáveis de 10 mL e agulhas 25 x 7mm
- Lâminas e lamínula
- Vidrarias como becker, bastão de vidro e pipetas
- Pipetas automáticas (Gilson®)
- Termômetro thermo flat (Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda - Brasil)
- Esfignomanômetro Tycos 7050-14- USA
- Estetoscópio Lytman - USA
- Eletrocardiógrafo Dixtal - Brasil
- Balança Balmak – Brasil
- Aparelho de automação – Química Seca - USA
- Tubos eppendorfs livre de DNase e RNase (Axygen®)

7.3. SOLUÇÕES

- PBS: NaCl (8,766g), Na₂HPO₄ (2,76g) e NaH₂PO₄ (0,274g)
- Agarose LMP (1,5%): 1,5g de agarose, 100mL PBS
- Agarose NMP (0,5%): 0,5g de agarose 100mL PBS
- Solução de lise: 5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine; a pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO
- Solução neutralizante: 0,4M Tris, pH 7.5
- Tampão de corrida: 1mM Na₂ EDTA, 300mM NaOH; pH>13
- Solução de Brometo de etídeo (20µg/mL)

7.4. TAMARIL®

TABELA 1 – Composição do fitoterápico Tamaril®.

Forma	Cápsulas	
Composição em 1 cápsula	<i>Cassia angustifolia</i> (sene)	25,3mg
	<i>Cassia fistula</i>	19,50mg
	<i>Tamarindus indica</i>	19,50mg
	<i>Coriandrum sativum</i>	9mg
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	4mg
Composição dos excipientes	Óleo Mineral leve, USP	
	Óleo Vegetal Parcialmente hidrogenado – soja	
	Lecitina de soja	
	Cera branca, USP	
	Óleo de soja, USP	
	Propilparabeno, USP	
Composição do Invólucro	Gelatina	
	Glicerina	
	Água destilada	
	Metilparabeno	
	Propilparabeno	
Corantes	Corante Vermelho Ponceau N° 4R	
	Corante Azul Brilhante N° 01	
	Suspensão Dióxido de Titânio	
Lote	1045	
Fabricante	Marjan Indústria e Comércio Ltda.	

7.5. DESENHO DO ESTUDO

Um estudo aberto, não randomizado com 24 voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 a 50 anos. Os voluntários selecionados após avaliação clínica e laboratorial (figura 4), receberam na Unidade de Farmacologia Clínica, duas cápsulas do fitoterápico uma vez ao dia, durante vinte e oito dias ininterruptos.

O estudo foi delineado de forma a permitir a obtenção dos parâmetros clínicos e laboratoriais relevantes para a averiguação de Toxicologia clínica, fazendo uso de doses específicas, de acordo com o uso popular, para avaliação de tolerância, segurança e genotoxicidade.

7.6. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Os voluntários foram selecionados obedecendo aos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

7.6.1 Critérios de Inclusão

- ✓ Homem e mulheres não grávidas e que não estivessem amamentando.
- ✓ Idade entre 18 a 50 anos de idade.
- ✓ Voluntário ter seu índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 30.
- ✓ Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a critério médico, de acordo com as regras definidas no Protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, Eletrocardiograma (ECG), e exames laboratoriais complementares.
- ✓ Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive seus os riscos e possíveis efeitos adversos apresentando intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I).

7.6.2 Critérios de Exclusão

Problemas relacionados com a droga:

✓ O voluntário ter sabidamente uma hipersensibilidade a droga estudada ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga.

✓ História ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfira com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga.

✓ Uso de terapia de manutenção com qualquer droga excetuando-se anticoncepcionais por via oral.

Doenças ou problemas de saúde:

✓ Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastro-intestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca.

✓ Achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do investigador para participação no estudo.

✓ Os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais de acordo com as normas deste protocolo, a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes pelo investigador.

Hábitos e Dependências:

✓ Voluntário fuma mais de 9 cigarros por dia.

✓ O voluntário ingere mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia.

✓ Tem história de abuso de álcool ou drogas.

Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo:

✓ Fez uso regular de medicação dentro das 2 semanas que antecederam o início do tratamento e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de um período inferior a sete meses desta, excetuando-se anticoncepcionais por via oral.

✓ Foi internado por qualquer motivo nas 8 semanas antecedentes ao início do tratamento deste estudo.

✓ O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecedem o início deste estudo.

✓ O voluntário doou ou perdeu 450 ml ou mais de sangue dentro dos três meses que antecederam ao estudo.

Outras condições:

✓ Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres.

✓ O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

7.7 ACOMPANHAMENTO DOS EVENTOS ADVERSOS

Os voluntários foram orientados a relatar a ocorrência de algum evento adverso, bem como a utilização de alguma medicação adicional, verbalmente e com auxílio de um formulário de relato diário de ocorrências. Neste formulário (ANEXO IV) o voluntário deveria especificar os eventos como: número e formato das evacuações, presença ou ausência de flatulência ou dor abdominal, além do tempo de duração dos eventos e se houve necessidade de alguma medicação adicional.

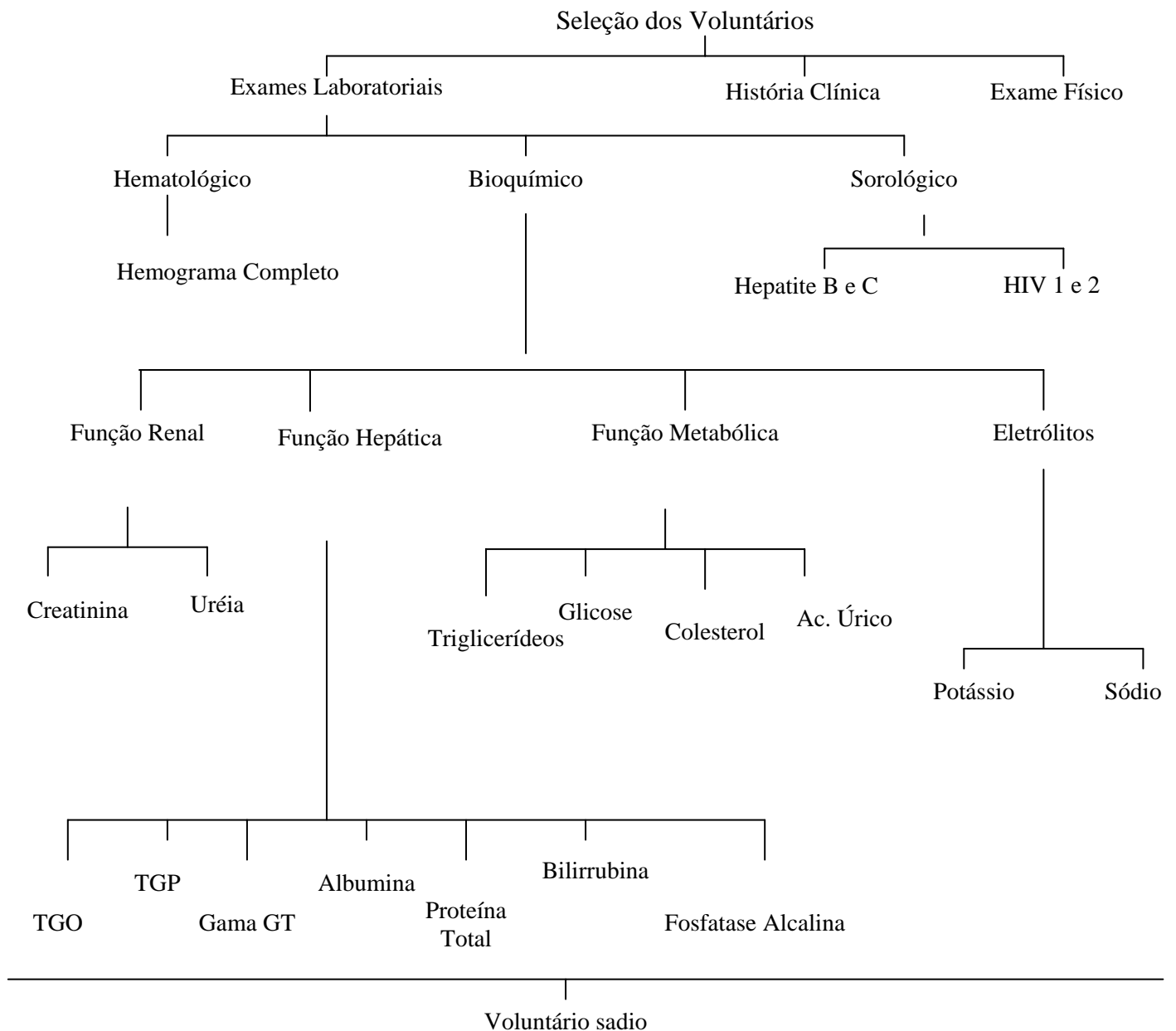


FIGURA 4 – Seleção dos voluntários – Foram realizados história clínica, exame físico e exames laboratoriais para seleção de voluntários sadios. Ao término de cada semana, os voluntários selecionados foram submetidos aos mesmos critérios de avaliação realizados no pré-estudo.

7.8. TOXICOGENÉTICA

7.8.1 Teste do cometa

A análise do cometa alcalino (SINGH *et al.*, 1988), avalia a extensão da quebra ao DNA após exposição de linfócitos a drogas suspeitas de potencial genotóxico. O desenho experimental do estudo do cometa é determinado pela proposta da análise levando em consideração a investigação do dano após a administração do Tamaril® em dezesseis voluntários por 28 dias ininterruptos.

7.8.2 Protocolo do Teste do cometa

7.8.2.1 Coleta do material

A coleta do sangue periférico foi realizada por profissionais capacitados, nas dependências da UNIFAC, utilizando seringa esterilizada e descartável com volume de 5mL. O material assim obtido foi imediatamente transportado para o Laboratório de Oncologia Experimental (I e II) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC.

7.8.2.2 Isolamento dos linfócitos

Os linfócitos foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 3mL de sangue, acrescida de 5mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 244g, e feita aspiração dos linfócitos, presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”). A suspensão de linfócitos foi transferida para um outro tubo o qual foi acrescido com PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 min a 108g . O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspendido em 2mL de PBS.

7.8.2.3 Preparação das amostras

Como controle positivo foi utilizada doxorubicina 3µg/mL, incubada com linfócitos por quarenta minutos. Como controle negativo foram utilizados linfócitos sem a exposição de nenhuma droga.

Das amostras dos linfócitos dos voluntários expostos ao Tamaril[®] e as dos controles positivo e negativo, foi retirada uma alíquota de 10µL de linfócitos, a qual foi adicionada a 110 µL de agarose 1,5%.

7.8.2.4 Preparação das lâminas

1º. Passo: As lâminas foram previamente cobertas com 110µL de agarose (NMP) a 60° C, sendo mantidas a temperatura ambiente por 24h até a solidificação da agarose.

2º. Passo: As amostras estudadas foram colocadas sobre a lâmina, sendo, em seguida, cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

7.8.2.5 Lise celular

Após solidificação da agarose a lamínula foi gentilmente removida e imersa na solução de lise, protegida da luz, a baixa temperatura (4°C) por no mínimo 1h antes da eletroforese.

7.8.2.6 Neutralização e Eletroforese

As lâminas foram removidas da solução de lise, e neutralizadas por 15min na solução de neutralização. Em seguida foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida por 40min para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 min, usando 25V (volts) e a corrente de 300mA. Após eletroforese as lâminas, foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização durante 5min, para neutralizar a alcalinidade.

7.8.2.7 Fixação e Coloração

As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, aplicou-se 30µL da solução de Brometo de Etídio (20µg/mL) e foram cobertas com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência.

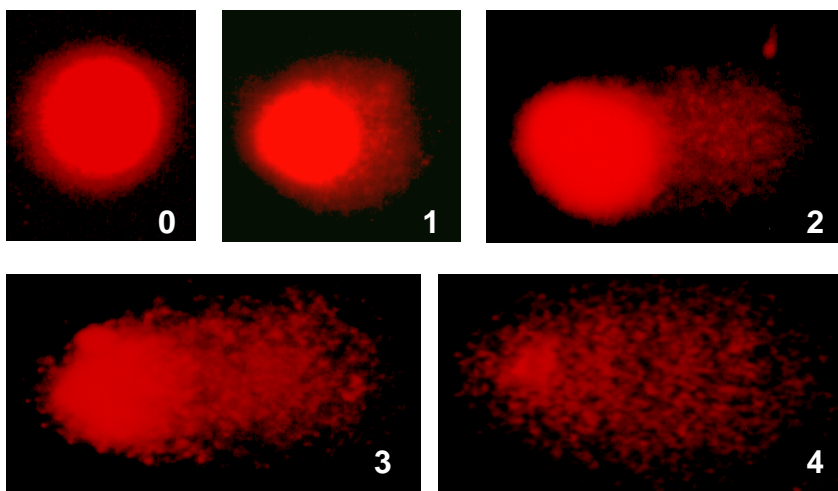
7.8.2.8 Escore das Lâminas

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 5). Foram, contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, nas seguintes categorias:

- 0 = sem danos (<5%)
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20%)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40%)
- 3 = alto nível de danos (40 – 95%)
- 4 = dano total (95%)



O índice de dano (ID) foi obtido em pela seguinte fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Scores}$



Singh (1988), Pool-Zobel (1994), Speit (1995).

FIGURA 5 – Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano.

7.9. TOXICOLOGIA CLÍNICA

7.9.1 Avaliação da Função Hepática

7.9.1.2 ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE (AST/TGO)

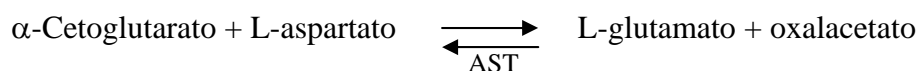
Teste para determinação quantitativa *in vitro* da aspartato-aminotransferase (AST) em soro e plasma humano. Níveis elevados de transaminases podem indicar enfarte do miocárdio, hepatopatias, distrofia muscular e lesões dos órgãos (GREILING *et al.*, 1995).

Princípio do teste

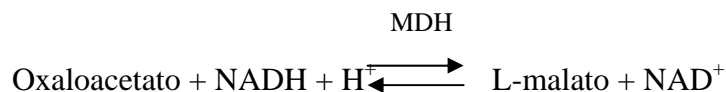
A dosagem sérica de aspartato-aminotransferase é realizada através de teste UV de acordo com método padronizado pela FICC-Federação Internacional de Química Clínica (BERGMEYER *et al.*, 1986).

Amostra e adição de Tris (hidroximetil)-aminometano (tampão TRIS) 100 mmol/L, pH = 7,8, L-aspartato 300mmol/L, NADH 0,23 mmol/L (levedura), MDH \geq 0,53 U/mL (coração de porco), LDH \geq 0,75 U/mL (microorganismos), conservante.

Adição de α -Cetoglutarato 75 mmol/L, conservante.



A enzima AST catalisa esta reação de equilíbrio. O aumento do oxalacetato é determinado numa reação indicadora catalisada pela malato-desidrogenase.



O NADH é oxidado a NAD. A velocidade de diminuição do NADH (medido fotometricamente) é diretamente proporcional à velocidade de formação do oxalacetato e, logo, à atividade da AST.

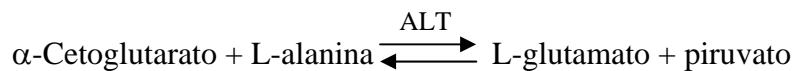
7.9.1.3 ALANINA-AMINOTRANSFERASE (ALT/TGP)

Teste para determinação quantitativa *in vitro* da alanina-aminotransferase (ALT) em soro e plasma humano. Níveis elevados de transaminases podem indicar enfarte do miocárdio, hepatopatia, distrofia muscular e lesões dos órgãos (GREILING *et al.*, 1995).

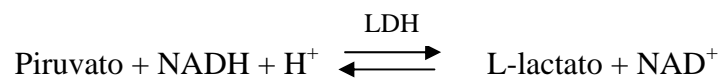
Princípio do teste

A dosagem sérica de aspartato-aminotransferase é realizada através de teste UV de acordo com método padronizado pela FICC-Federação Internacional de Química Clínica (BERGMEYER *et al.*, 1986).

Amostra e adição de Tris (hidroximetil)-aminometano (tampão TRIS) 125 mmol/L, pH = 7,3, L-alanina 625 mmol/L, NADH 0,23 mmol/L (levedura), LDH $\geq 1,5$ U/mL (microorganismos), conservante. Adição de α -Cetoglutarato 94 mmol/L, conservante.



A enzima ALT catalisa esta reação de equilíbrio. O aumento do piruvato é determinado numa reação indicadora catalisada pela lactato-desidrogenase.



O NADH é oxidado a NAD. A velocidade de diminuição do NADH (medido fotometricamente) é diretamente proporcional à velocidade de formação do piruvato e, logo, à atividade da ALT.

7.9.1.4 GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE (GAMA-GT)

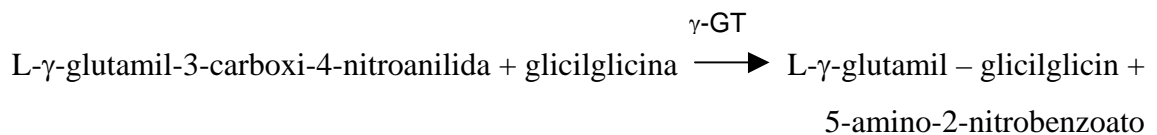
Teste *in vitro* para determinação quantitativa da gama-glutamiltransferase (Gama-GT) em soro e plasma humano. A gama-glutamiltransferase é usada no diagnóstico e monitorização das doenças hepatobiliares (THOMAS, 1992; SHAW, 1982).

Princípio do teste

A dosagem sérica de gama-glutamiltransferase é realizada por teste colorimétrico enzimático (SZASZ *et al.*, 1974).

Amostra e adição de Tris (hidroximetil)-aminometano (tampão TRIS) 123 mmol/L, pH=8,25, glicilglicina 123 mmol/L, conservante, aditivo.

Adição de tampão acetato 10 mmol/L, pH=4,5, L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 25 mmol/L, estabilizante, conservante.



A gama-glutamiltransferase transfere o grupo γ -glutamilo da L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina. A quantidade libertada de 5-amino-2-nitrobenzoato é proporcional à atividade de Gama-GT e pode ser determinada fotometricamente.

7.9.1.5 FOSFATASE ALCALINA

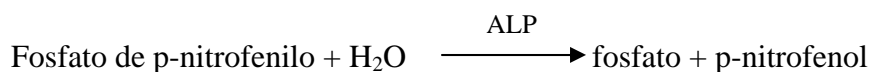
Teste para determinação quantitativa *in vitro* de fosfatase alcalina em soro e plasma humano. Observa-se um aumento na atividade da fosfatase alcalina (ALP) em todas as formas de colestase, sobretudo na icterícia obstrutiva. Apresenta também valores elevados nas doenças do sistema esquelético, como a doença de Paget, hiperparatiroidismo, raquitismo e osteomalacia, bem como em casos de fraturas e tumores malignos (GREILING *et al.*, 1995).

Princípio do teste

A dosagem sérica de fosfatase alcalina é realizada através de teste colorimétrico de acordo com método padronizado pela FICC-Federação Internacional de Química Clínica (TIETZ *et al.*, 1983).

Amostra e adição de 2-amino-2metil-1-propanol 1,12 mol/L, pH = 10,44 (30°C), acetato de magnésio 2,49 mmol/L, sulfato de zinco 0,50 mmol/L, ácido N-(2-hidroxi-etil)-etilenediamina triacético 2,49 mmol/L.

Adição de fosfato de p-nitrofenilo 99,5 mmol/L pH = 8,50 (25°C), conservantes.



Na presença de íons magnésio e zinco, o fosfato de p-nitrofenilo é hidrolisado por fosfatases e forma fosfato e p-nitrofenol. O p-nitrofenol libertado é proporcional à atividade da fosfatase alcalina e pode ser medido fotometricamente.

7.9.1.6 BILIRRUBINA TOTAL

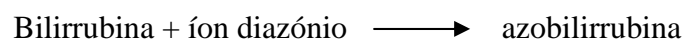
Teste para determinação quantitativa *in vitro* da bilirrubina total em soro e plasma de adultos e recém-nascidos. As determinações de bilirrubina são utilizadas no diagnóstico de doenças hepáticas, na detecção da anemia hemolítica e na avaliação do grau de gravidade da icterícia.

Princípio do teste

A dosagem sérica de bilirrubina é realizada através de ensaio colorimétrico (WAHLEFELD *et al.*, 1972).

Amostra e adição de detergente/ácido clorídrico 120 mmol/L.

Adição de sal de 2,5-diclorofenil diazónio 3,0 mmol/L (reagente diazo).



A bilirrubina indireta é libertada pelo detergente. Numa solução ácida forte contendo sal de 2,5-diclorofenil diazónio, a bilirrubina total acopla-se e forma azobilirrubina.

A intensidade da cor do corante azo vermelho formado é diretamente proporcional à bilirrubina total e pode ser determinada fotometricamente

7.9.1.7 ALBUMINA

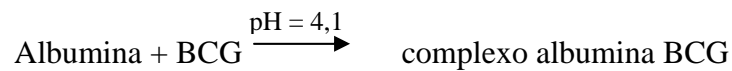
Teste para determinação quantitativa *in vitro* de albumina em soro e plasma humano. A determinação de albumina permite a monitorização da suplementação dietética em um doente controlado e funciona também como teste excelente da função hepática (GRANT *et al.*, 1987; MARSHALL, 1989).

Princípio do teste

A dosagem sérica de albumina é realizada através de ensaio colorimétrico de ponto final (DOUMAS *et al.*, 1971).

Amostra e adição de tampão citrato 95 mmol/L, pH = 4,1 e conservante.

Adição de tampão citrato 95 mmol/L, pH = 4,1, verde de bromocresol (BCG) 0,66 mmol/L e conservante – substrato.



Com um valor de pH = 4,1, a albumina apresenta um caráter suficientemente catiônico para se conseguir fixar um complexo azul-esverdeado.

A intensidade cromática do corante azul-esverdeado é diretamente proporcional à concentração de albumina, podendo ser determinada fotometricamente.

7.9.1.8 PROTEÍNAS TOTAIS

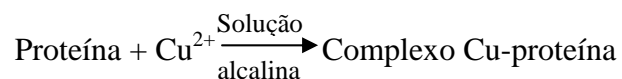
Teste enzimático para determinação de quantitativa *in vitro* de proteínas totais em soro, plasma e urina humano. As determinações das proteínas totais são utilizadas no diagnóstico e tratamento de uma série de doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, bem como outras perturbações metabólicas ou nutricionais (BROBECK, 1973).

Princípio do teste

A dosagem sérica das proteínas totais é realizada através de teste colorimétrico (WEICHSELBAUM, 1946).

Amostra e adição de hidróxido de sódio 400mmol/L, tartarato de sódio/potássio 89 mmol/L (reagente para branco).

Adição de hidróxido de sódio 400 mmol/L, tartarato de sódio/potássio 89 mmol/L, iodeto de potássio 61 mmol/L sulfato de cobre 24,3 mmol/L (reagente biureto).



Em solução alcalina, o cobre bivalente reage com as ligações do peptídeo protéico e forma o complexo de biureto com o característico tom púrpura. O tartarato sódico-

potássico impede a precipitação do hidróxido de sódio e o iodeto impede a auto-redução do cobre.

A intensidade cromática é diretamente proporcional à concentração de proteínas que pode ser determinada fotometricamente.

7.9.2 Avaliação da Função Renal

7.9.2.1 URÉIA

Teste para a determinação quantitativa *in vitro* da uréia/azoto uréico em soro, plasma e urina humanos. Este teste é freqüentemente usado em conjunção com a determinação de creatinina para o diagnóstico diferencial de hiperuremia pré-renal descompensação cardíaca, desidratação, aumento do catabolismo das proteínas, hiperuremia renal glomerunefrite, nefrite crônica, rins policísticos, nefrosclerose, necrose tubular e hiperuremia pós-renal (obstrução das vias urinárias).

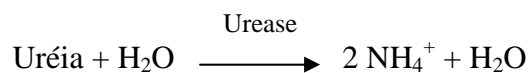
Princípio do teste

Teste cinético UV

Amostra e adição do R1 (tampão/NADH)

Adição de R2 (tampão/enzimas/substrato) e início da reação;

A uréia é hidrolisada pela uréase e forma CO₂ e amônia.



A amônia formada reage então, com α-cetoglutarato e o NADH na presença de GLDH e produz glutamto e NAD⁺.



A medição da absorvância causada pelo consumo de NADH é medida cineticamente.

7.9.2.2 CREATININA

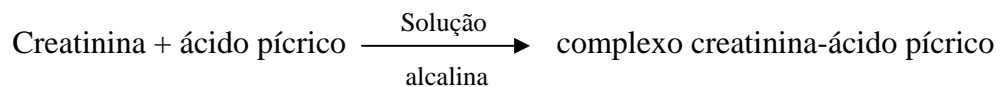
Teste cinético *in vitro*, com utilização de amostra cinético e compensação para determinação quantitativa *in vitro* da creatinina em soro, plasma e urina humano utilizando. As determinações de creatinina são executadas para fazer o diagnóstico e a monitorização das doenças renais agudas e crônicas, bem como para monitorização da hemodiálise (GUDER *et al.*, 1995; WHELTON *et al.*, 1994; THOMAS, 1992).

Princípio do teste

A dosagem sérica de creatinina é realizada através de ensaio colorimétrico cinético (FOSTER-SWANSON *et al.*, 1994; SEELIG *et al.*, 1969)

Amostra e adição de hidróxido de sódio 0,20 mmol/L

Adição de ácido pícrico 25 mmol/L



Em solução alcalina, a creatinina forma um complexo amarelo-laranja com picrato. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de creatinina e pode ser medida fotometricamente.

7.9.3 Avaliação da Função Metabólica

7.9.3.1 GLICOSE

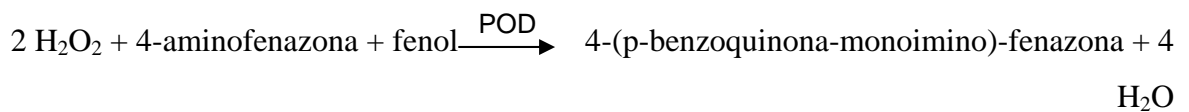
Teste enzimático para determinação quantitativa *in vitro* de glicose em soro e plasma humano. As determinações de glicose são usadas para o diagnóstico e monitorização das doenças metabólicas dos hidratos de carbono, incluindo diabetes mellitus, hipoglicemia

neonatal, hipoglicemia idiopática e tumores das células das ilhotas de Langerhans (GREILING *et al.*, 1995; THOMAS, 1992).

Princípio do teste

A dosagem sérica de glicose é realizada através de teste colorimétrico enzimático (TRINDER, 1969).

Amostra e adição de tampão fosfato 200 mmol/L, pH = 7,5, glicose oxidase (GOD), ≥ 11 U/mL peroxidase (POD) $\geq 0,02$ U/mL, 4-aminofenazona 0,77 mmol/L e fenol 11 mmol/L.



Na presença de oxigênio atmosférico, a glicose é oxidada pela glicose-oxidase (GOD) em gluconolactona. Na presença de peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio resultante oxida a 4-aminofenazona e fenol em 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona.

A intensidade cromática do corante vermelho é diretamente proporcional à concentração de glicose e é determinada fotometricamente.

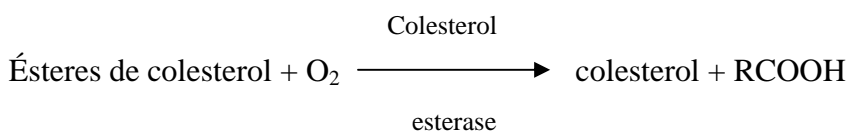
7.9.3.2 COLESTEROL TOTAL

Teste enzimático *in vitro* para determinação quantitativa direta de colesterol em soro e plasma humano. As determinações de colesterol são utilizadas para despistagem do risco aterogênico e no diagnóstico e tratamento de doenças que envolvem níveis elevados de colesterol, bem como de perturbações do metabolismo lipídico e lipoprotéico (GREILING *et al.*, 1995).

Princípio do teste

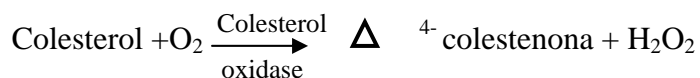
A dosagem sérica de colesterol é realizada através de teste colorimétrico enzimático (National Institute of Health - NIH, 1992).

Amostra e adição de piperazina-1,4-bis(2-ácido etanosulfônico) 75 mmol/L, pH = 6,8 (tampão PIPES), Mg^{2+} 10 mmol/L, colato sódico 0,2 mmol/L, 4-aminofenazona $\geq 0,15$ mmol/L, fenol $\geq 4,2$ mmol/L, éter poliglicólico de álcool gordo 1%, colesterol-esterase (*Pseudomonas sp*) $\geq 0,5$ U/mL, colesterol-oxidase (*E. coli*) $\geq 0,15$ U/mL, peroxidase (rábano) $\geq 0,25$ U/mL, estabilizantes, conservante.

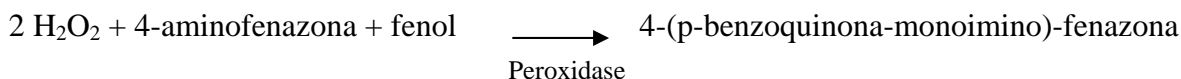


O colesterol é determinado de modo enzimático utilizando colesterol esterase e colesterol oxidase.

Os ésteres de colesterol são clivados através da ação da colesterol esterase e produzem colesterol livre e ácidos graxos.



Com a ajuda da colesterol-oxidase, o colesterol é transformado em Δ^4 -colesteno e peróxido de hidrogênio pela ação do oxigênio.



O peróxido de hidrogênio produzido origina uma coloração vermelha através da reação com a 4-aminofenazona e o fenol, sob a ação catalítica da peroxidase. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de colesterol, podendo ser determinada fotometricamente.

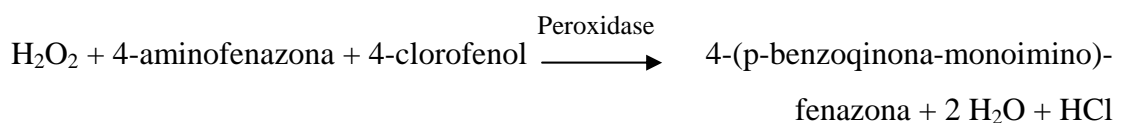
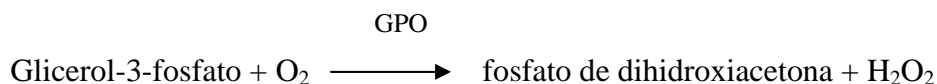
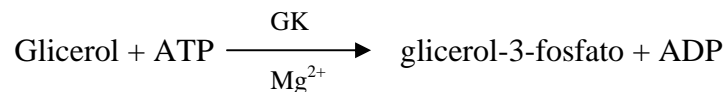
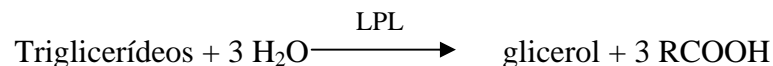
7.9.3.3 TRIGLICERÍDEOS

Teste enzimático para determinação quantitativa *in vitro* de triglicerídeos em soro e plasma humano. A determinação de triglicerídeos é utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças como diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática, perturbações do metabolismo dos lipídeos e várias outras doenças endócrinas (GREILING *et al.*, 1995).

Princípio do teste

A dosagem sérica de triglicerídeos é realizada através de teste colorimétrico enzimático (SIEDEL *et al.*, 1993).

Amostra e adição de piperazina-N,N'-bis (2-ácido etanosulfônico) 50 mmol/L, pH = 6,8 (tampão PIPES), Mg²⁺ 40 mmol/L, colato sódico 0,20 mmol/L, ATP ≥ 1,4 mmol/L, 4-aminofenazona ≥ 0,13 mmol/L, 4-clorofenol 4,7 mmol/L, hexacianoferrato (II) de potássio 1 μmol/L, éter poliglicólico de álcool gordo 0,65%, lípase lipoprotéica - LPL (*Pseudomonas sp*) ≥ 5,0 U/mL, gliceroquinase - GK (*Bacillus stearothermophilus*) ≥ 0,19 U/mL, glicerol fosfato-oxidase - GPO (*E. coli*) ≥ 2,5 U/mL, peroxidase (rábano) ≥ 0,10 U/mL, conservante.



Este ensaio baseia-se no trabalho de Wahlefeld & Bermeyer, 1974. Neste método, utiliza-se uma lipase lipoprotéica de microorganismos para a hidrólise rápida e completa de triglicerídeos em glicerol, com oxidação subsequente para fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio gerado reage, então, com 4-aminofenazona e 4-clorofenol sob a ação catalítica da peroxidase e produz uma coloração vermelha (reação de viragem segundo TRINDER, 1979).

Os voluntários do sexo feminino, além dos exames relacionados, realizavam exame para diagnóstico de gravidez (Beta HCG). Caso o resultado fosse positivo, a voluntária seria automaticamente excluída do estudo.

7.9.3.4 ÁCIDO ÚRICO

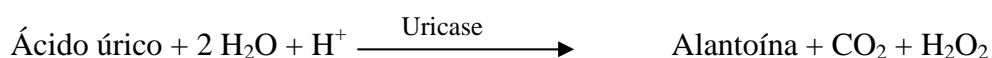
Teste enzimático para determinação quantitativa *in vitro* de ácido úrico em soro, plasma e urina humano. As determinações de ácido úrico são usadas no diagnóstico e tratamento de diversas perturbações renais e metabólicas, incluindo insuficiência renal, gota, leucemia, psoríase, subnutrição ou outras doenças que provocam fraqueza geral, e de doentes a receber fármacos citotóxicos (GREILING *et al.*, 1995; KELLER, 1991).

Princípio do teste

A dosagem sérica de ácido úrico é realizada através de teste colorimétrico enzimático (TOWN *et al.*, 1985).

Amostra e adição de tampão fosfato 0,05mol/L, pH 7,8 uricase 1U/mL e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina 7mmol/L (TOOS).

Adição de tampão fosfato 0,1 mol/L, peroxidase 1U/mL e 4-aminofenazona 3mmol/L.



A uricase desdobra o ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogênio.



Nesta reação, o peróxido de hidrogênio reage na presença de peroxidase, TOOS e 4-aminofenazona e forma um corante imino-quinona. A intensidade da cor vermelha formada é proporcional à concentração de ácido úrico e é determinada fotometricamente.

Todos os testes bioquímicos foram realizados no laboratório Louis Paster, utilizando analisadores automáticos de química clínica.

7.9.4 Avaliação dos Eletrólitos

O método utilizado para determinar as concentrações de sódio e potássio foi o de potenciometria, que é feito pela utilização de íons-seletivos. Para o Na^+ foi utilizado um eletrodo feito de um vidro especial utilizado para Na^+ e para o potássio foi utilizado um eletrodo de membrana líquida de troca iônica, incorporando o antibiótico valinomicina como ligador de K^+ , é o mais seletivo para o K^+ .

7.9.5 Avaliação do Parasitológico de fezes

O parasitológico de fezes foi analisado pelo método de Hoffman com amostras examinadas microscopicamente por procedimentos de concentração podendo ser realizado em amostras frescas ou conservadas, que são mais sensíveis do que os exames por amostras úmidas para a detecção de cistos protozoários e larvas de helmintos por aumentarem a quantidade de material de fundo na preparação e, na maior parte das circunstâncias, realmente concentrarem os microorganismos. Esse método é baseado no princípio de sedimentação, onde os parasitas mais pesados assentam-se no fundo devido à gravidade ou centrifugação (YOUNG, 1979; TRUANT, 1981).

7.9.6 Avaliação do Sumário de Urina

O sumário de urina foi realizado utilizando-se tiras reagentes para uroanálise. As tiras reagentes BAYER para a análise de urina são tiras plásticas às quais estão fixas separadamente várias áreas reagentes. De acordo com o produto que se utiliza, proporcionam prova para glicose, bilirrubina, corpos cetônicos (ácido acetoacético), densidade, sangue, pH, proteína, urubilinogênio, nitrito e leucócitos na urina. As tiras podem ser lidas visualmente, sem necessidade de equipamento adicional de laboratório.

7.9.7 Análise sorológica

7.9.7.1 ANTI-HBc IGM

Imunoensaio para a determinação qualitativa *in vitro* dos anticorpos IgM contra o antígeno central (core) do vírus da hepatite B em soro e plasma humanos. O imunoensaio de eletroquimioluminescência (Electrochemiluminescence immunoassay ou “ECLIA”) foi concebido por ser utilizado nos analisadores de imunoensaios Elecsys 2010 e MODULAR ANALYTICS E170 (Módulo Elecsys) da Roche.

Em casos de hepatite B aguda ou durante crises de hepatite B crônica, podem ser observadas elevadas concentrações de anti-HBc IgM. Para detectar infecções virais agudas de hepatite B utilizam-se testes de detecção de anticorpos anti-HBc IgM, juntamente com determinações de HbsAg.

Princípio do teste

Princípio do teste por captura- μ : duração total do ensaio: 18 minutos.

1ª incubação: pré-tratamento de 10 μ L de amostra (pré-diluídos automaticamente a 1:400 com Elecsys Diluente Universal) com reagente anti- F δ y para bloquear IgG específicas.

2ª incubação: adicionou-se a amostra pré-tratada anticorpos monoclonais anti-IgM humana biotinilados, HBcAg marcado com o complexo de rutênio (GUDAT, *et al.* 1975) e micropartículas revestidas de estreptavidina. Os anticorpos anti-HBc IgM presentes na amostra reagem com o antígeno HBc marcado com rutênio e com anticorpos anti-IgM humana biotinilados, formando um complexo sanduíche que se fixa à fase sólida pela interação da biotina com a estreptavidina.

A mistura da reação é aspirada para a célula de leitura onde as micropartículas são fixadas magneticamente pela superfície do eletrodo. Os elementos não fixados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador

Os resultados são determinados automaticamente pelo software Elecsys comparando o sinal de eletroquimioluminescência obtido do produto de reação da amostra com o sinal do valor de cutoff anteriormente obtido pela calibração do ensaio anti-HBc IgM.

7.9.7.2 HBsAg

Imunoensaio para a determinação qualitativa *in vitro* do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em soro e plasma humanos. O imunoensaio de eletroquimioluminescência (Electrochemiluminescence immunoassay ou “ECLIA”) foi concebido por ser utilizado nos analisadores de imunoensaios Elecsys 2010 e MODULAR ANALYTICS E170 (Módulo Elecsys) da Roche.

O antígeno de superfície da hepatite B, um polipeptídeo de tamanho variável, é um dos componentes do invólucro externo da partícula do vírus da hepatite B (HBV) (GERLICH *et al.*, 1993). O sangue das pessoas infectadas pelo HBV contém além de partículas de HBV infecciosas intactas, partículas de invólucro “vazias” não infecciosas, menores que se formam em excesso e também contêm o antígeno de superfície da hepatite B. A detecção do HBsAg no soro ou plasma humano é indicador de infecção pelo vírus da hepatite B. O HBsAg é o primeiro marcador imunológico, encontrando-se geralmente já presente alguns dias ou semanas antes de os primeiros sintomas clínicos começarem a manifestar-se, sendo observado em pessoas com hepatite B aguda e crônica.

Princípio do teste

Técnica de sanduíche. Duração total do ensaio: 18 minutos.

1^a Incubação: 50µL de amostra, um anticorpo monoclonal biotilado específico de HBsAg e um anticorpo monoclonal específico de HBsAg marcado com complexo de rutênio reagem entre si e formam um complexo sanduíche.

2^a Incubação: após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado fixa-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura da reação é aspirada para a célula de leitura onde as micropartículas são fixadas magneticamente pela superfície do eletrodo. Os elementos não fixados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

Os resultados são determinados automaticamente pelo software Elecsys comparando o sinal de eletroquimioluminescência obtido do produto de reação da amostra com o sinal do valor de cutoff anteriormente obtido pela calibração do ensaio anti-HBc IgM.

7.9.7.3 HIV-1 E HIV-2

Teste qualitativo de despiste da infecção por HIV automatizado no sistema VIDAS, que permite a detecção combinada do antígeno p24 e das imunoglobulinas G anti HIV-1 e anti HIV-2 no soro ou plasma humano pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

A detecção combinada do antígeno p24 e das imunoglobulinas G anti HIV-1 e anti HIV-2 no soro ou plasma humano é um indicador de infecção pelo vírus HIV. O resultado deste teste deve ser interpretado tendo em vista o contexto clínico e, eventualmente, os resultados de outros testes tais como ELISA, Western-blot, carga viral, etc (WEBER *et al.*, 2002; LY *et al.*, 2000; LY *et al.*, 2001; SIMONETTI *et al.*, 2001).

Princípio do teste

Reação 1 - detecção das imunoglobulinas G anti-VIH-1 (incluindo as do grupo O) e anti-VIH-2.

Reação 2 – detecção do antígeno p24.

7.9.7.4 ANTI-HCV

O diagnóstico do vírus da hepatite C (HCV) é dependente da detecção direta do RNA viral por PCR ou pela detecção de anticorpos contra anti-HCV. Imunoensaio para a detecção de anticorpos contra o HCV em soro ou plasma humanos.

Princípio do teste

No murex anti-HCV (versão 4.0) a amostra diluída é incubada em microcavidades revestidas com antígenos altamente purificados que contêm seqüências das regiões do core, NS3, NS4 e NS5 do HCV.

A reação enzimática é interrompida com ácido sulfúrico, resultando em coloração alaranjada que é lida fotometricamente. A quantidade de conjugado ligado e conseqüentemente, a coloração nas cavidades estão diretamente relacionada à concentração de anticorpos na amostra.

7.10 Análise Estatística

Os dados dos exames laboratoriais foram analisados comparando-se os valores do pré-estudo com os valores de cada semana de tratamento através do teste *t* de *Student*.

Para a análise de genotoxicidade, foram analisadas 50 cometas em cada lâmina. As diferenças significantes entre cada voluntário tratado e a correspondência entre os grupos controle negativo e controle positivo foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

O valor de p considerado estatisticamente significante para ambos os testes foi $p < 0,05$.

Resultados

8. RESULTADOS

8.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

O desenho consistiu de um estudo aberto, não randomizado, com 25 voluntários sadios, adultos, de ambos os sexos, (13 homens e 12 mulheres), um voluntário abandonou o estudo por não se adequar ao protocolo (faltou a uma administração).

A idade média dos voluntários foi de $30,1 \pm 6,9$ anos (FIGURA 6) e o índice de massa corpórea dos voluntários foi de $24,21 \pm 3,00$ Kg/ cm² no pré-estudo e $24,26 \pm 3,05$ Kg/ cm² no pós-estudo (FIGURA 7).

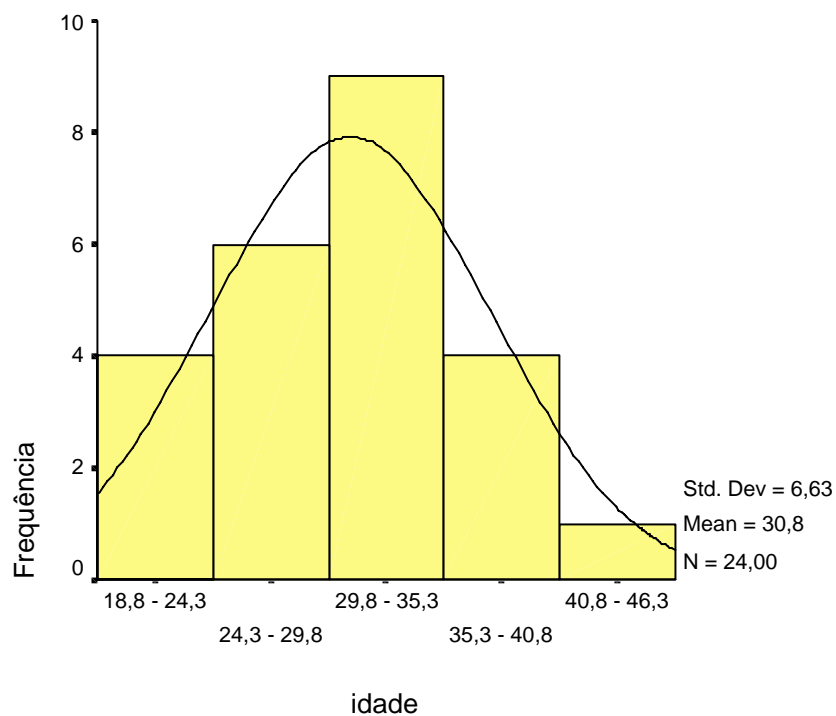


FIGURA 6 - Frequência de idade dos 24 voluntários selecionados para participar do ensaio clínico do Tamaril®.

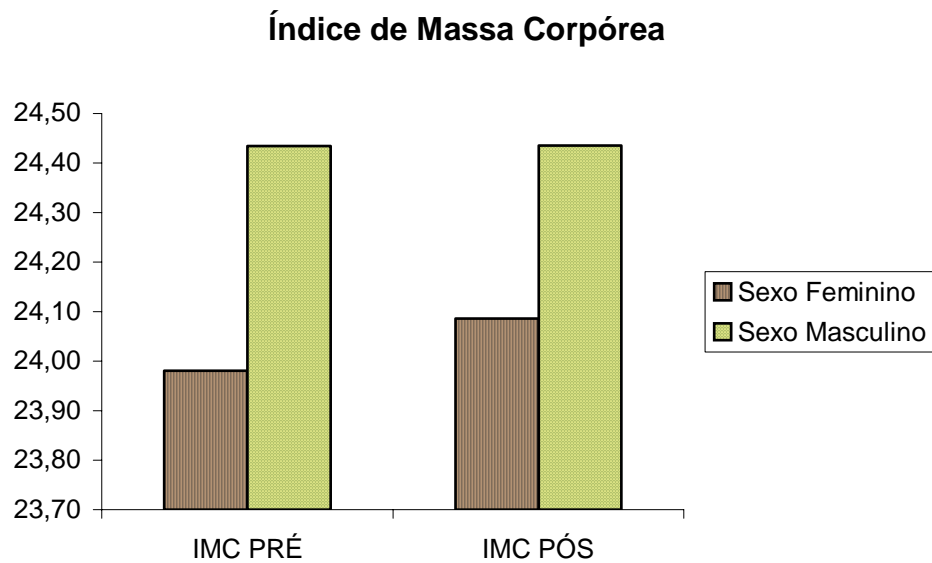


FIGURA 7 - Índice de Massa Corpórea dos 24 voluntários que participaram do estudo de toxicologia clínica do Tamaril®, antes e após o término do estudo.

8.1 EXAMES LABORATORIAIS

As funções hematológica (FIGURAS 8, 9,10 e 11), hepática (12, 13, 14,15,16,17 e 18), renal (19 e 20) e metabólica (21,22,23 e 24), bem como os eletrólitos sódio e potássio (25 e 26) foram analisados semanalmente através dos exames laboratoriais, os quais não evidenciaram nenhum sinal de toxicidade, estando todos os resultados dentro da faixa de normalidade, com exceção do aumento da TGP de um voluntário (FIGURA 27).

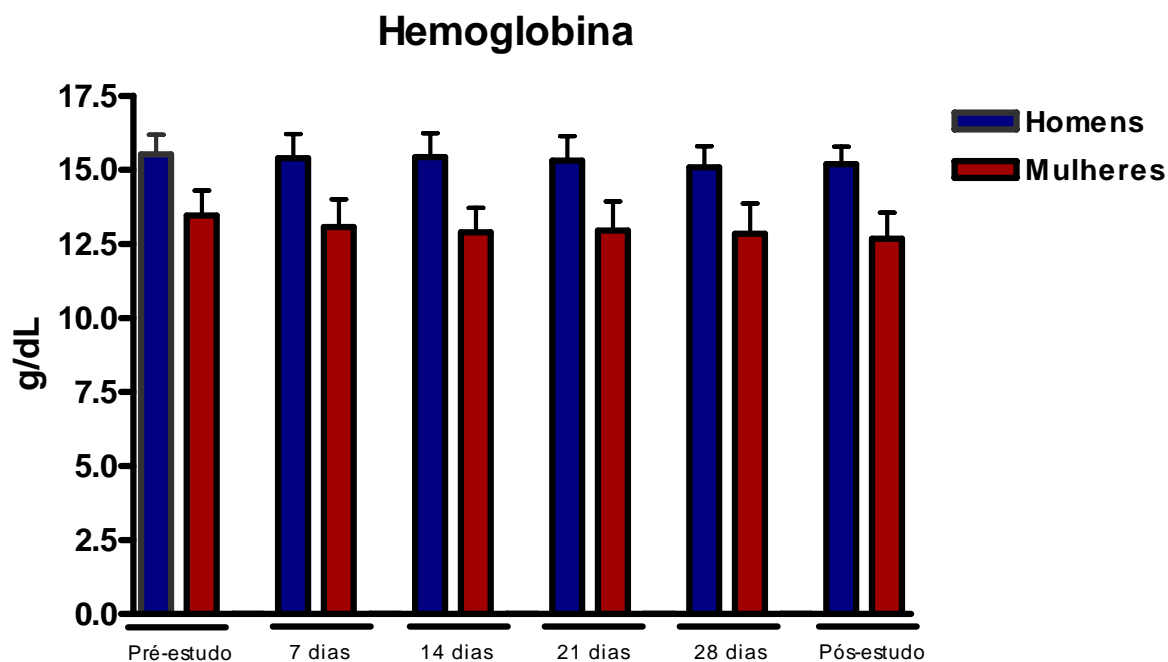


FIGURA 8 – Níveis Séricos de Hemoglobina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos

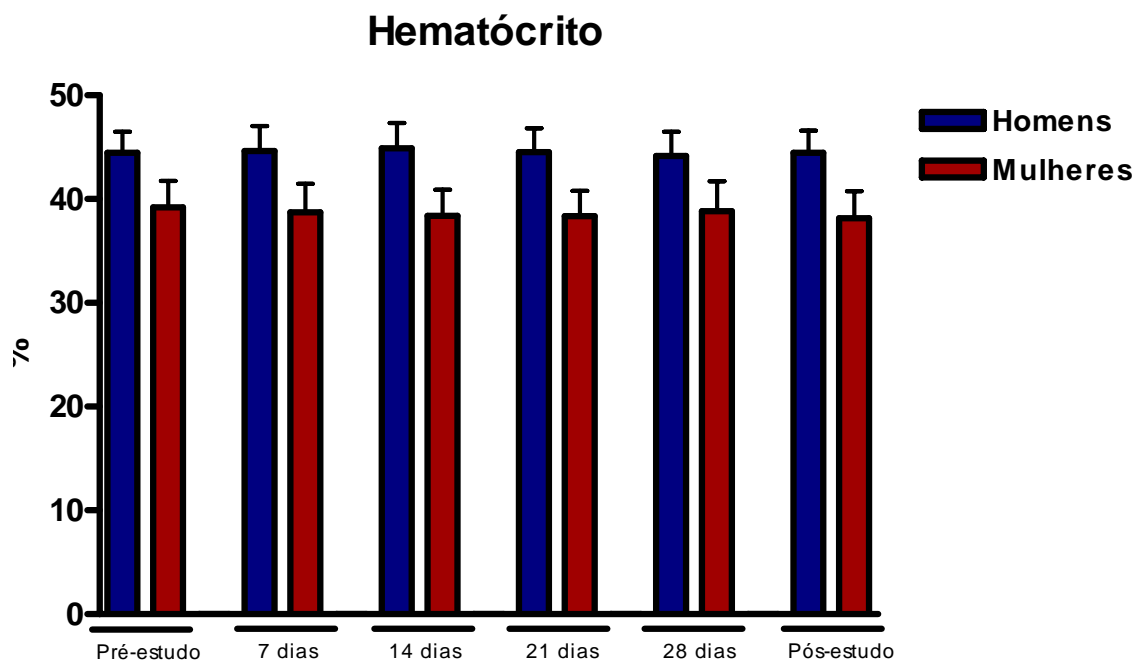


FIGURA 9 – Níveis séricos de Hematócrito avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

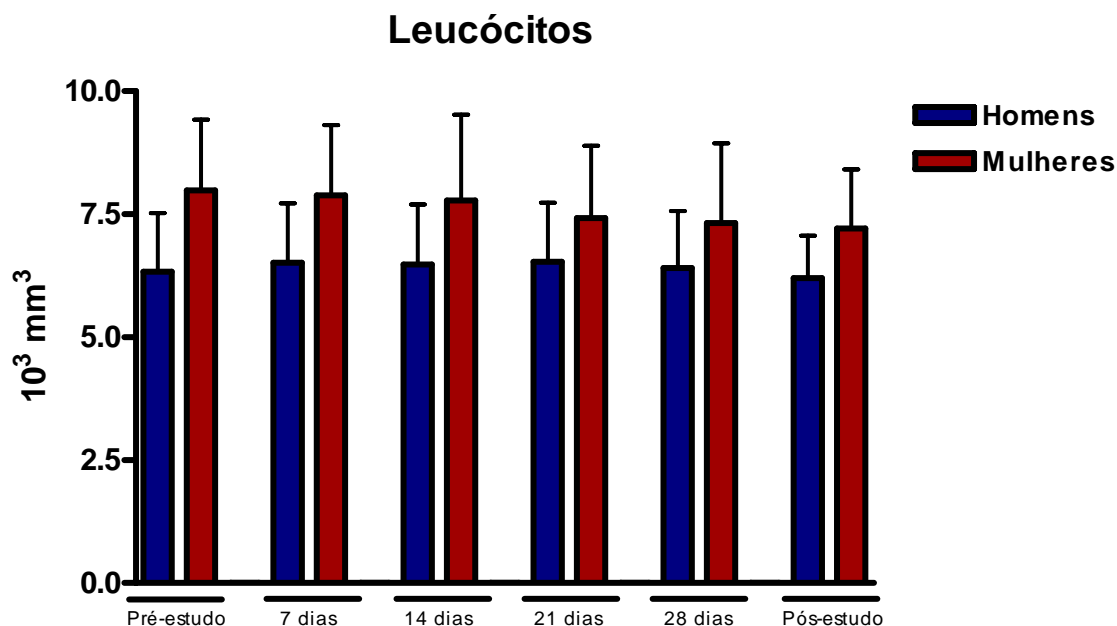


FIGURA 10 – Níveis séricos de Leucócitos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

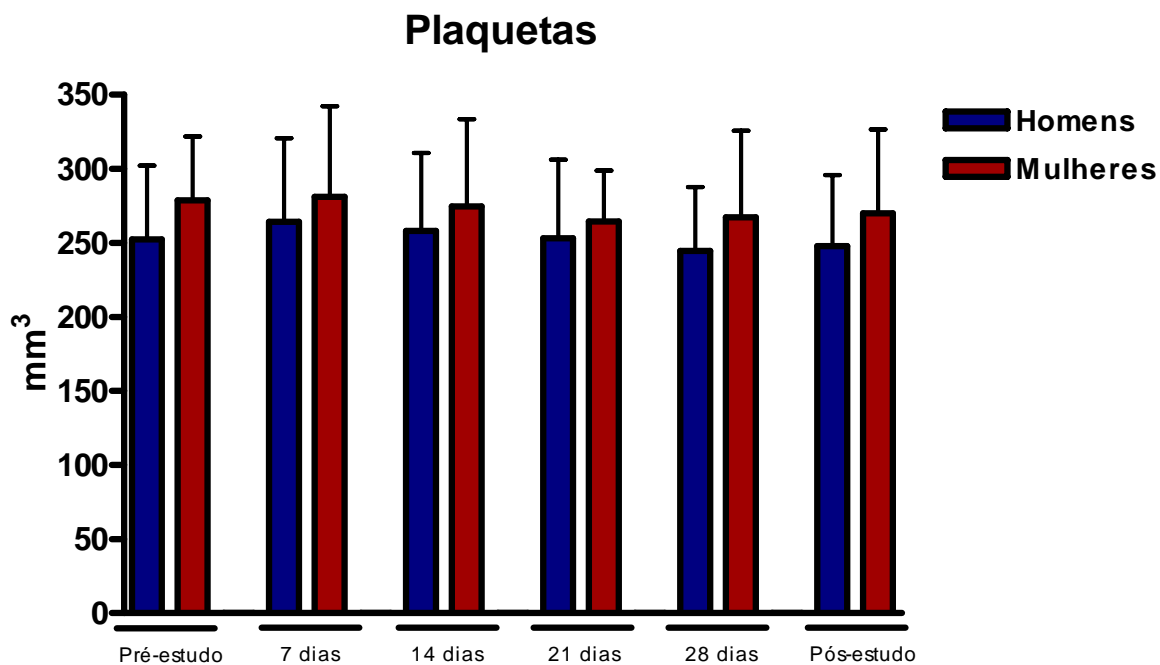


FIGURA 11 – Níveis séricos de Plaquetas avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

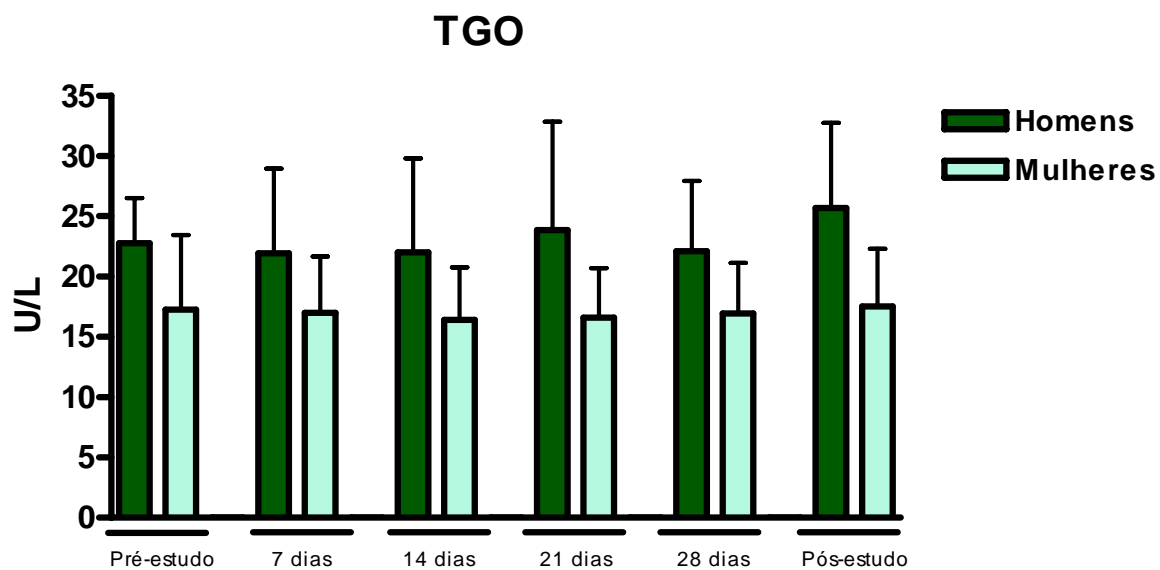


FIGURA 12 - Níveis séricos de TGO avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

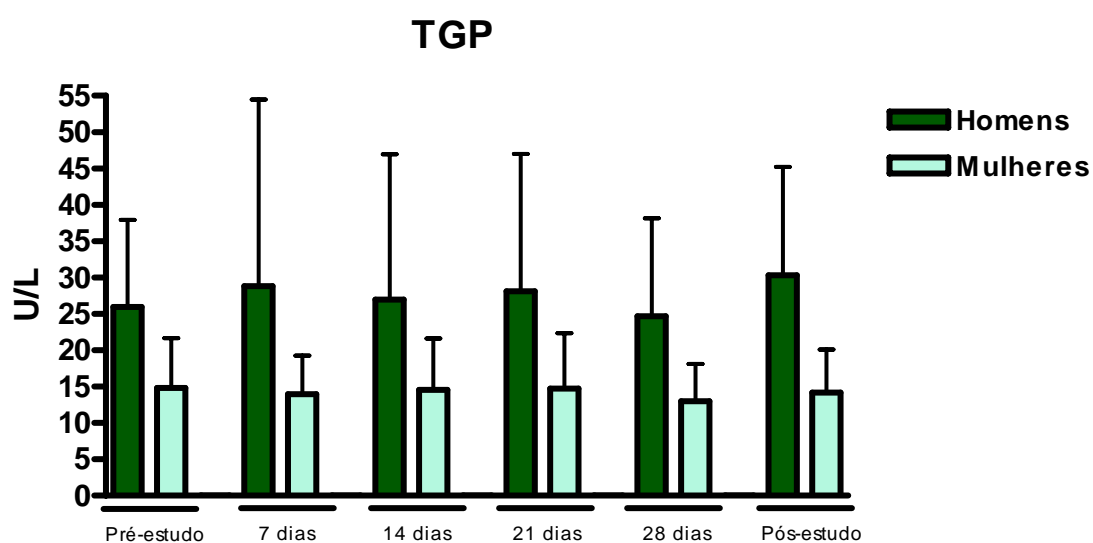


FIGURA 13 – Níveis séricos de TGP avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

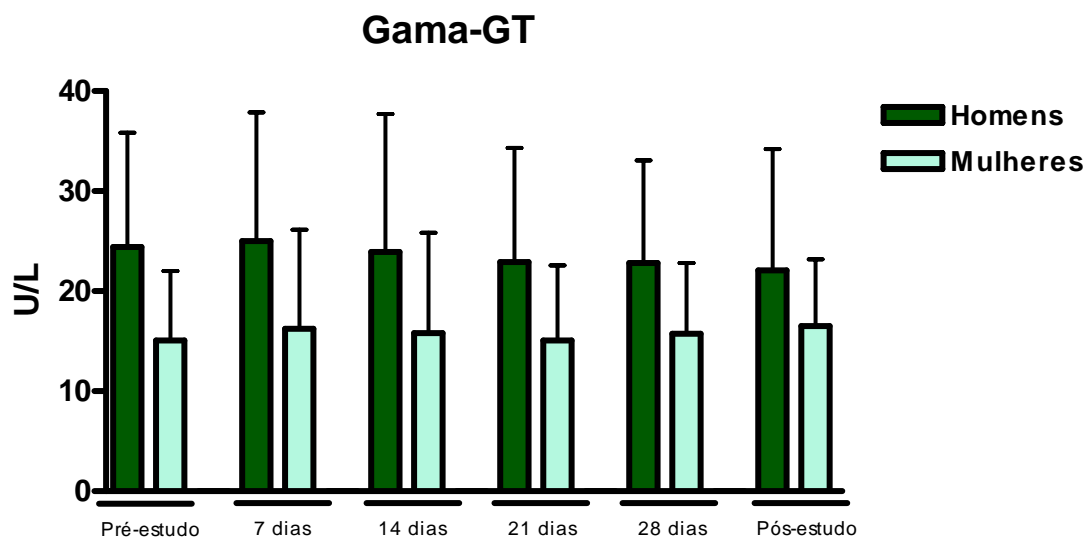


FIGURA 14 – Níveis séricos de Gama-GT avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

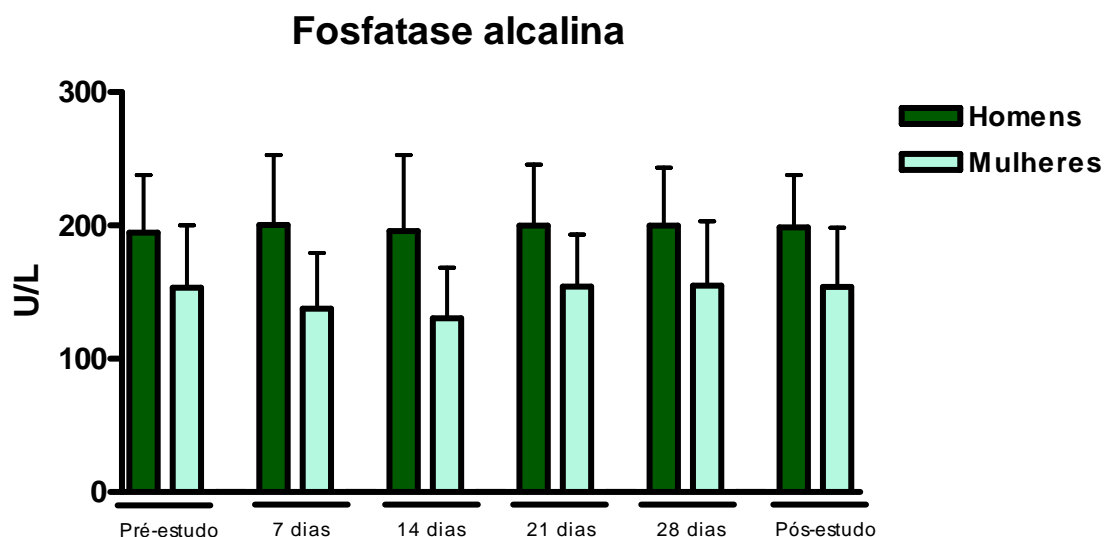


FIGURA 15 - Níveis séricos de Fosfatase Alcalina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

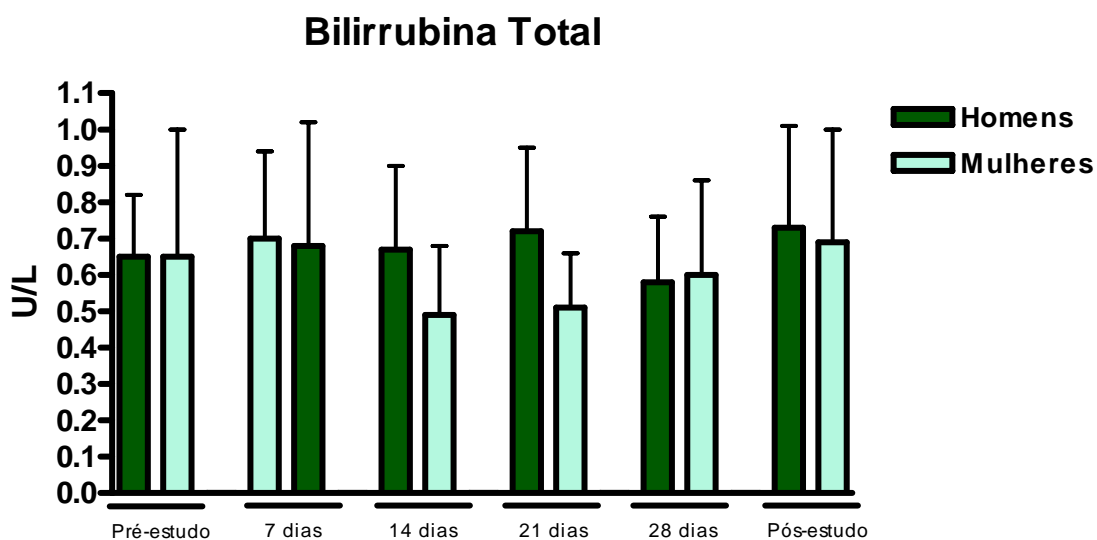


FIGURA 16 – Níveis séricos de Bilirrubina Total avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

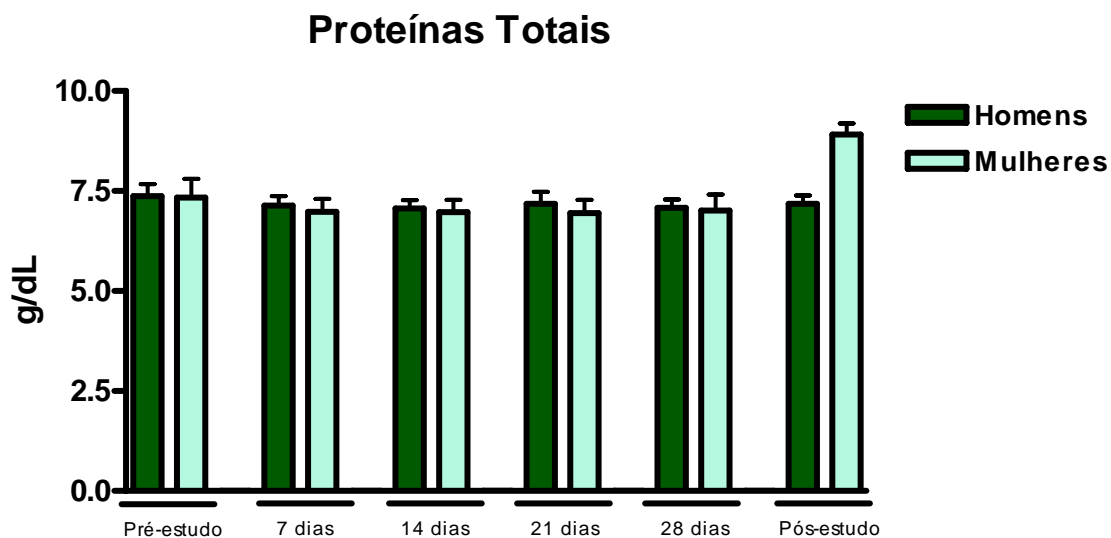


FIGURA 17 – Níveis séricos de Proteínas Totais avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

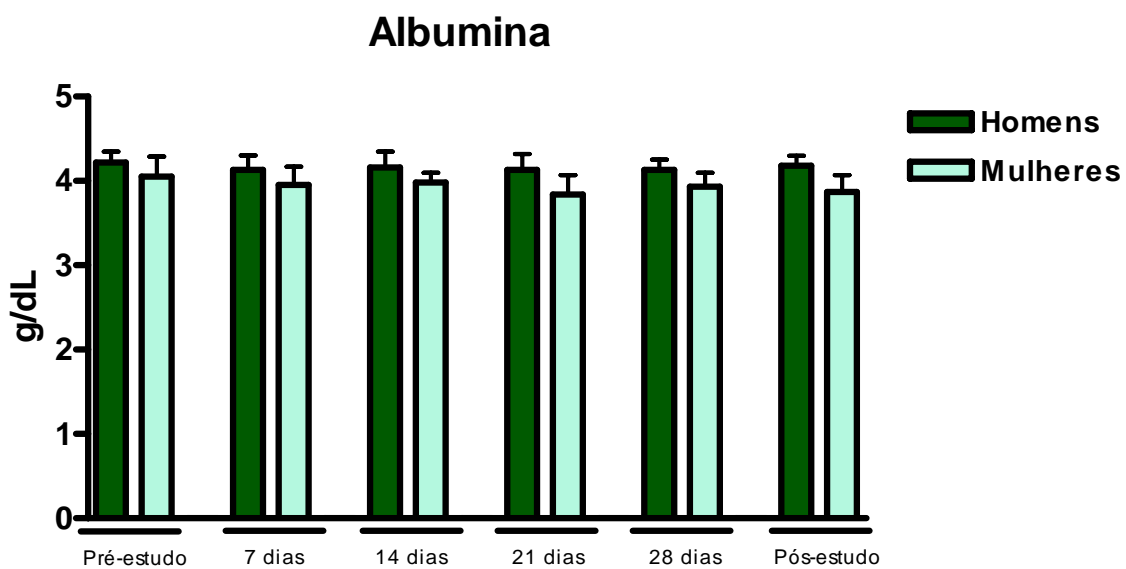


FIGURA 18 – Níveis séricos de Albumina avaliada semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

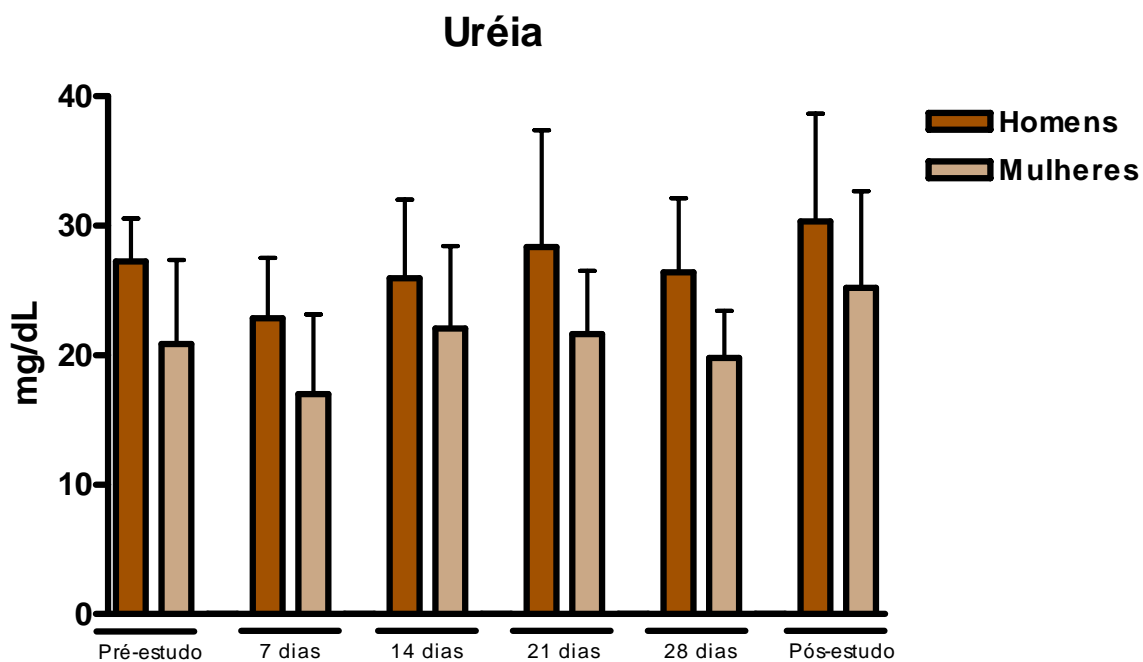


FIGURA 19 – Níveis séricos de Uréia avaliada semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

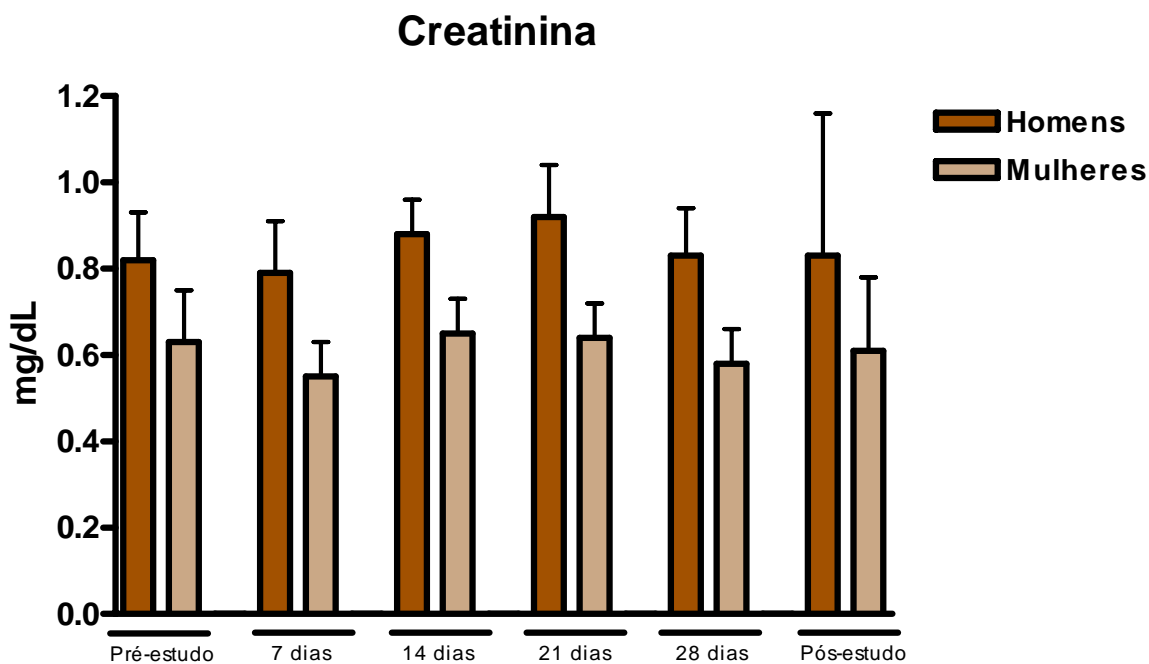


FIGURA 20 – Níveis séricos de Creatinina avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

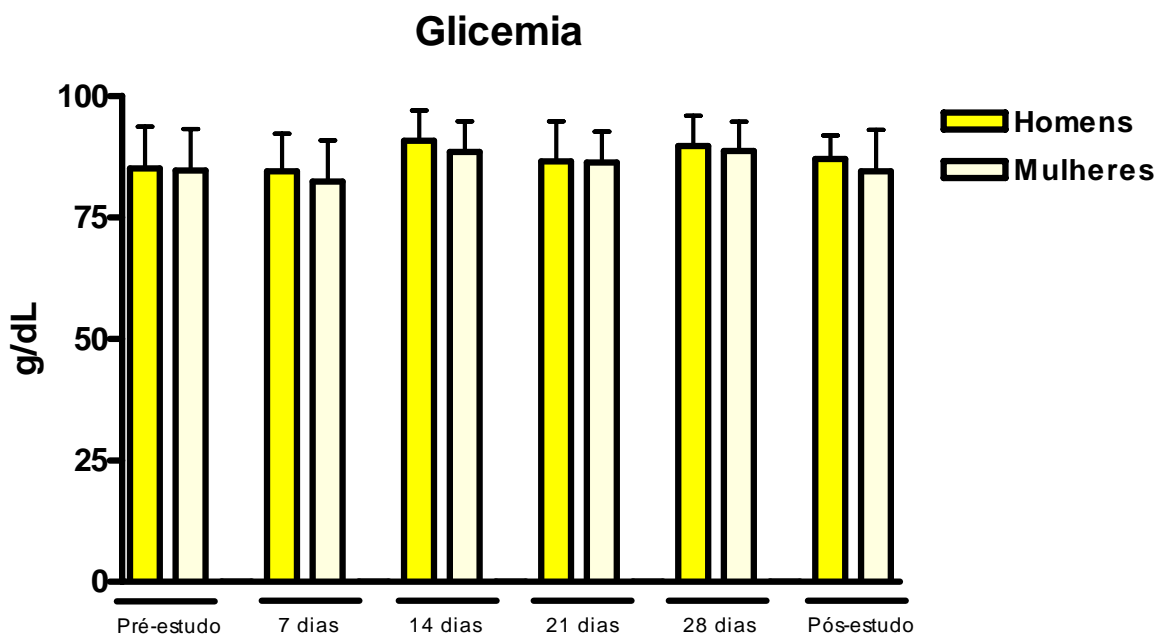


FIGURA 21 – Níveis séricos de glicemia avaliados Semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

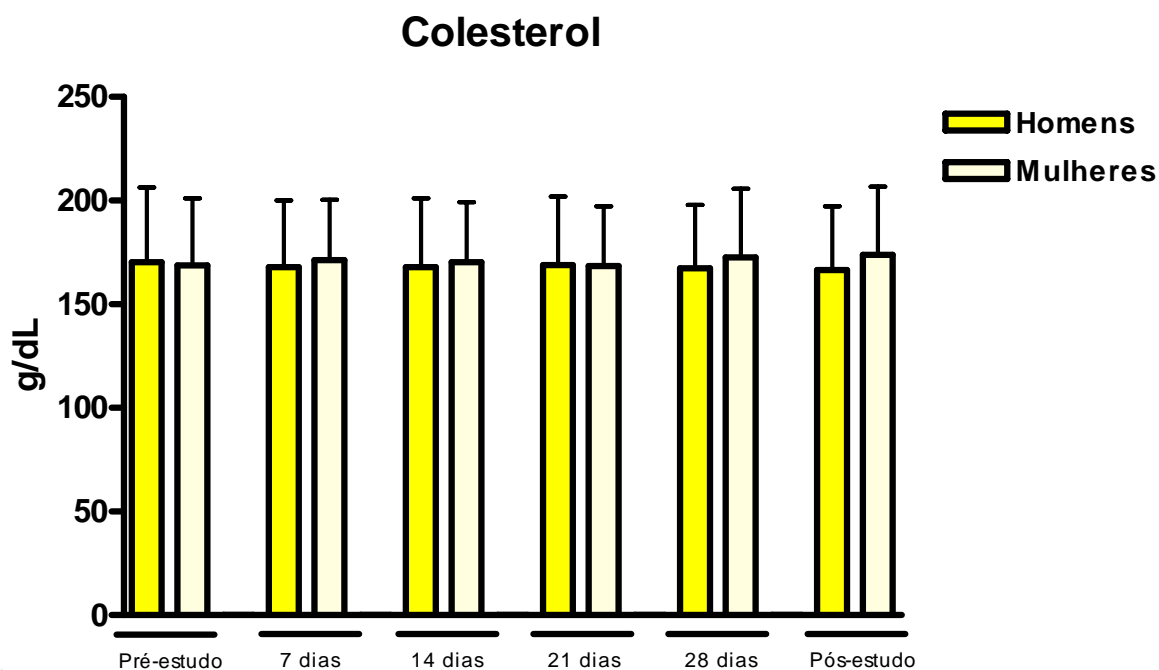


FIGURA 22 – Níveis séricos de Colesterol avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

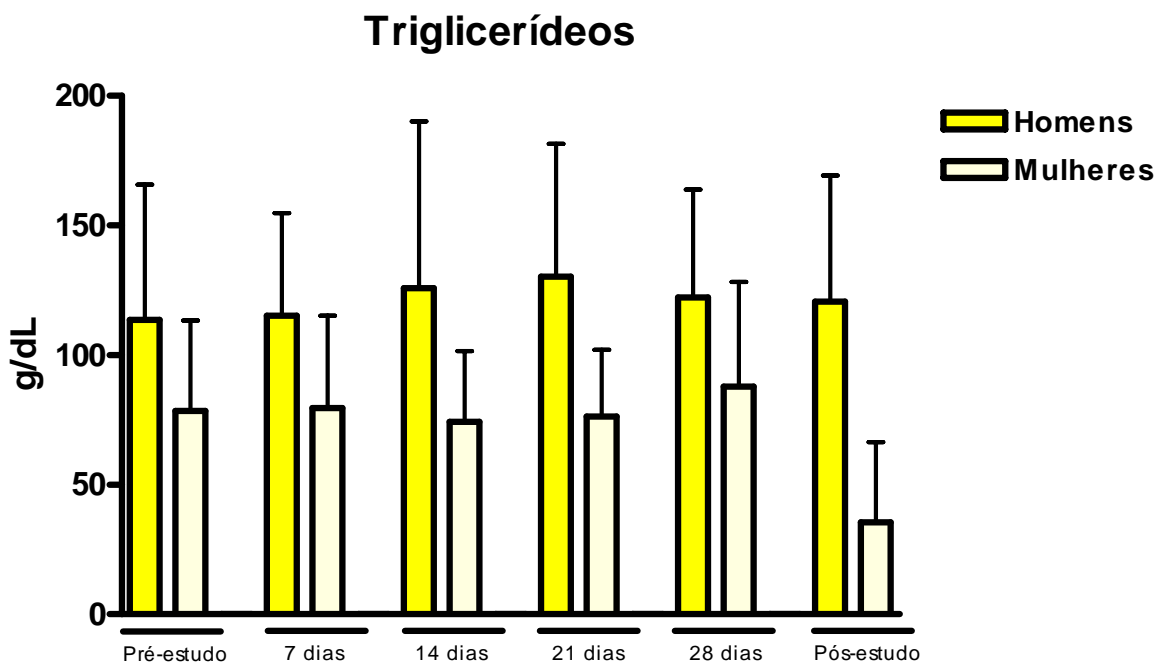


FIGURA 23 – Níveis séricos de Triglicerídeos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

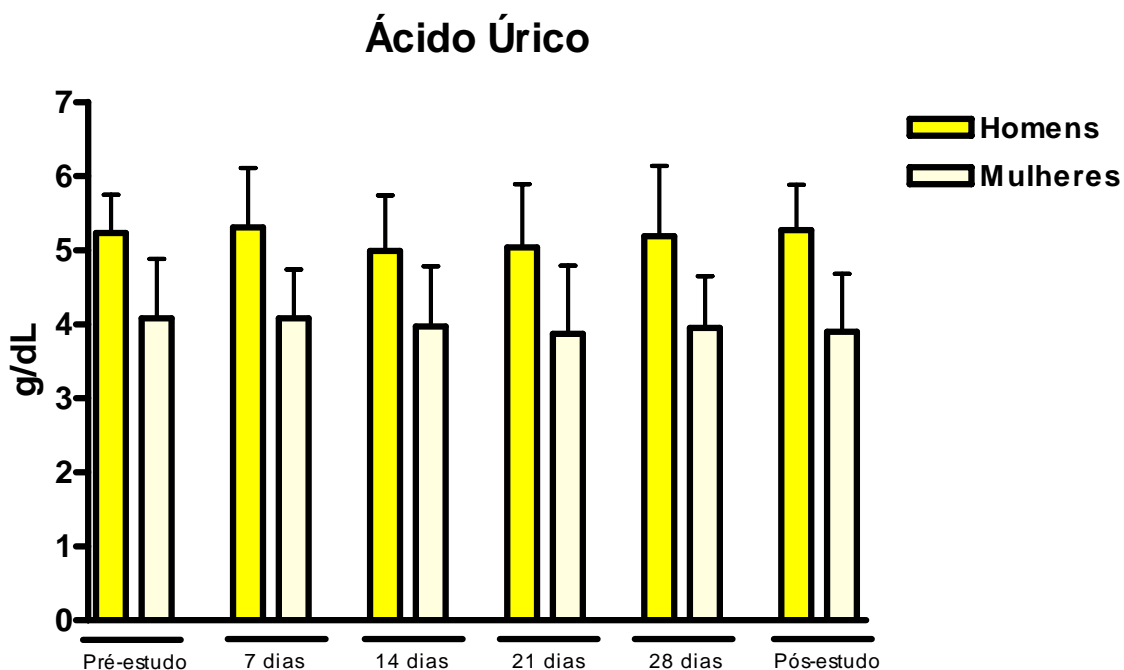


FIGURA 24 – Níveis séricos de Ácido Úrico avaliado semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

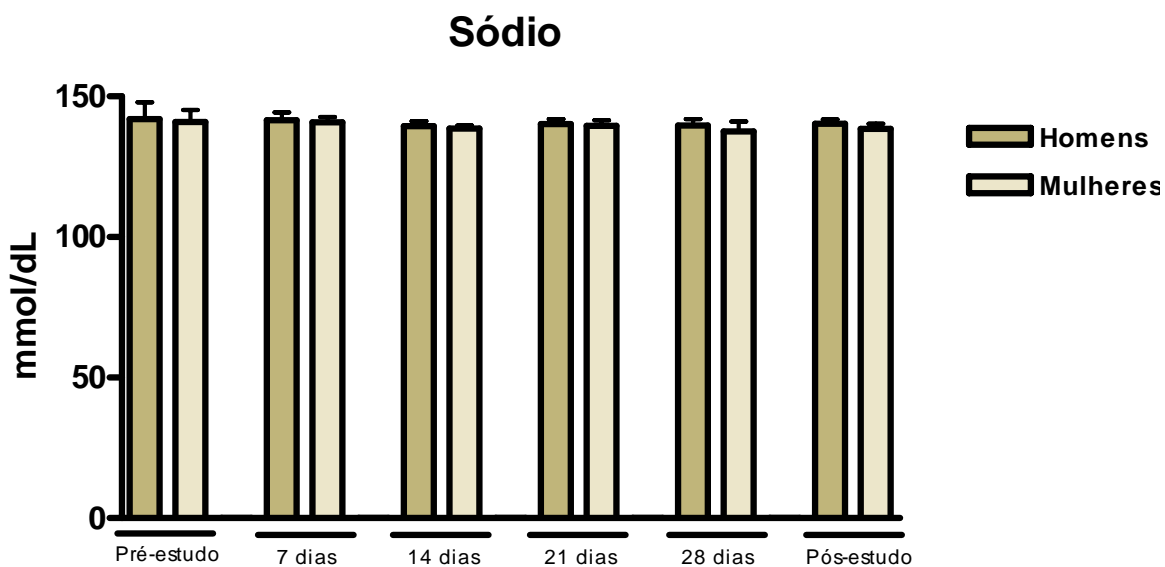


FIGURA 25 – Níveis séricos de Sódio avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

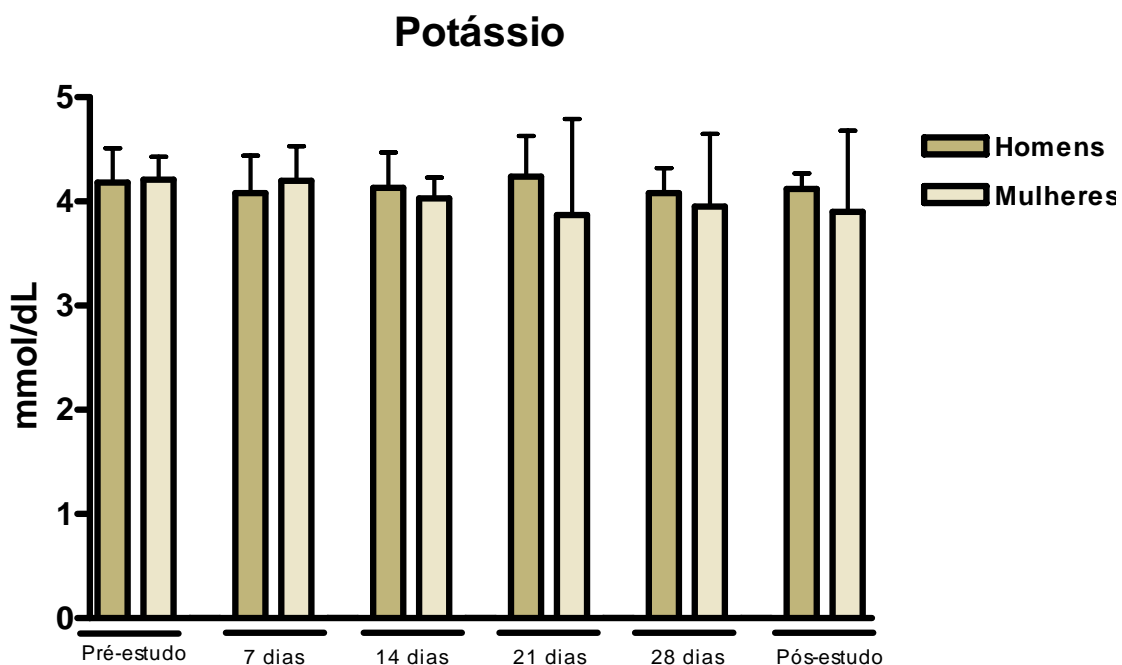


FIGURA 26 – Níveis séricos de Potássio avaliados semanalmente (média \pm DP) em 24 voluntários após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

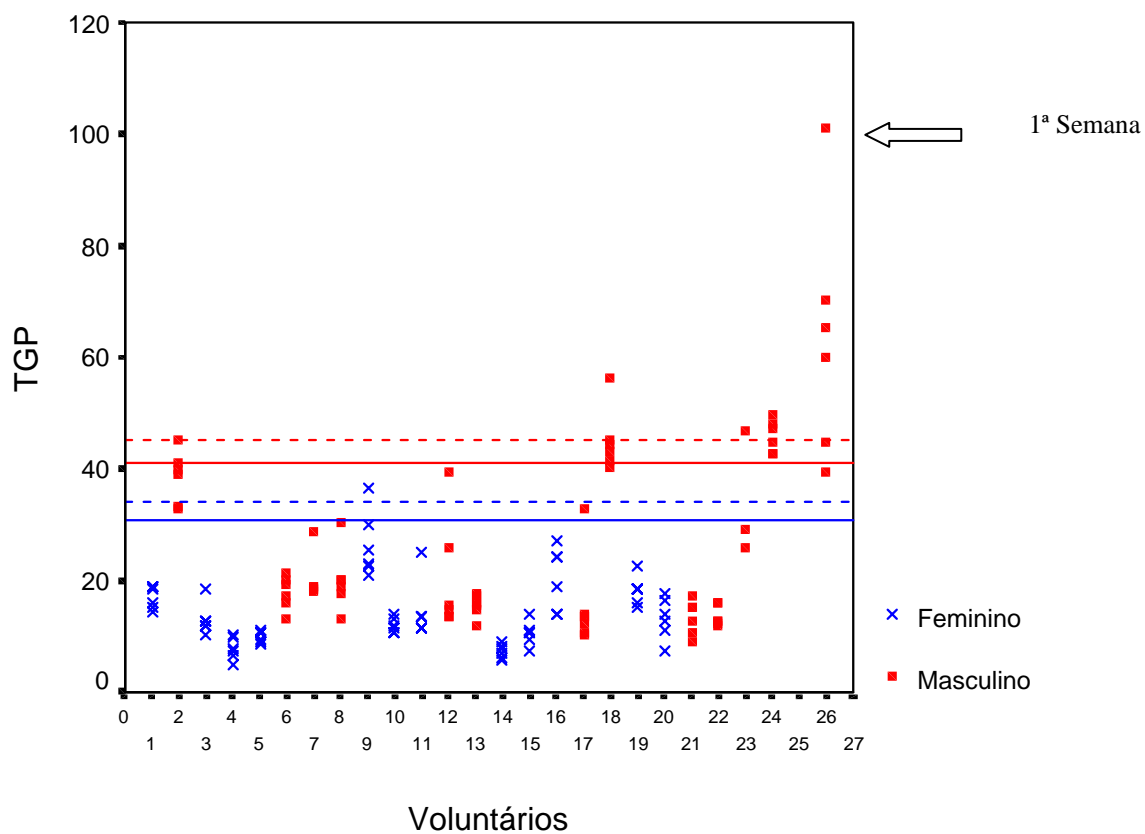


FIGURA 27 – Alanina-aminotransferase (ALT/TGP), alterada em (1) voluntário do sexo masculino na após a primeira semana da administração do fitoterápico Tamaril®, com subsequente diminuição até normalização.

8.3. EVENTOS ADVERSOS

Alguns eventos gastrointestinais foram observados em 21 voluntários (FIGURA 9). Outros eventos como cefaléia n=2, hiperemia nasal n=1, artralgia n=1, gripe n=1 e lombalgia n=1 não foram correlacionados aos efeitos farmacológicos do Tamaril® .

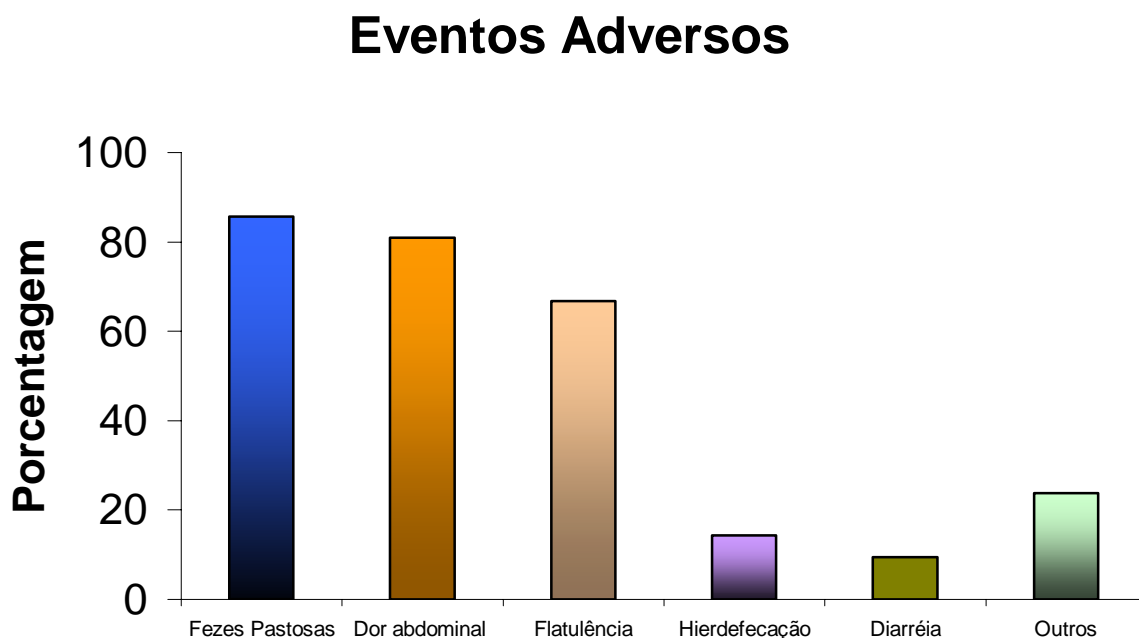


FIGURA 28 - Porcentagem de eventos adversos relacionados à administração do medicamento, observados durante os 28 dias do uso do fitoterápico Tamaril® 2 cápsulas uma vez ao dia v.o (n=24).

8.4 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade foi avaliada pelo teste do cometa em dezesseis voluntários, demonstrando diferença significativa entre os voluntários tratados com o fitoterápico, e os controles, o que nos mostra que o fitoterápico não foi genotóxico nos linfócitos dos voluntários (FIGURA 10).

Cometa Tamaril

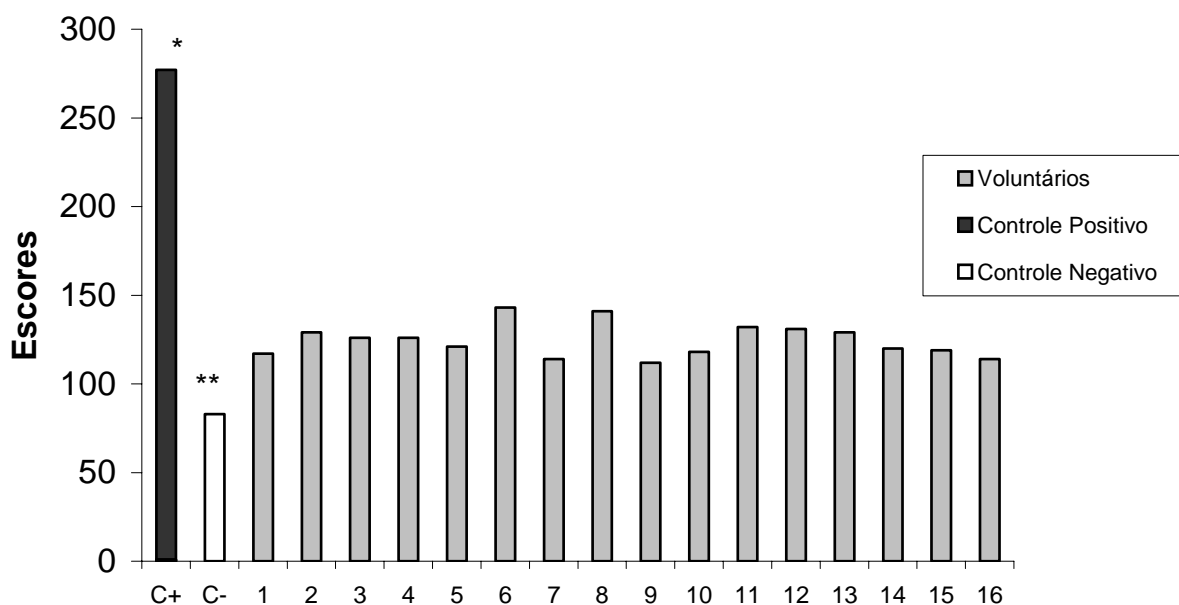


FIGURA 29 – Escores dos cometas de dezesseis voluntários tratados por 28 dias ininterruptos com Tamaril® cápsulas. $p < 0,05$

Discussão

9. DISCUSSÃO

Aproximadamente 20% de todas as bases medicamentosas foram primariamente obtidas a partir de produtos naturais. Dessas, em torno de 120 drogas atualmente usadas na prática clínica são originadas de plantas, representadas por esteróides, anticoagulantes, glicosídeos cardioativos (digitálicos), anticolinérgicos (alcalóides da *Atropa beladonna*) analgésicos e antitussígenos (alcalóides do ópio), antihipertensivos (reserpina), colinérgicos (pilocarpina), anestésicos (cocaína), relaxantes musculares (d-tubocurarina) e agentes anti-câncer (Vimblastina e Paclitaxel) (PETER., et al., 1997; PEZZUTO, 1997). Tais drogas representam 25% da prescrição de fármacos no mercado americano e, em 1990, significaram US\$ 16 bilhões do faturamento bruto das indústrias farmacêuticas.

O uso de extrato de plantas medicinais no tratamento de doença humana é uma comum pratica, a qual tem aumentado recentemente ao longo dos anos, em decorrência dos fatores econômicos e sociais. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial já utilizou ervas na busca do alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (WHO,1991). Desse modo os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais, via de regra, originam fitoterápicos em menor tempo, com custos muitas vezes inferior aos medicamentos, conseqüentemente mais acessíveis à população, que em geral, encontra-se sem quaisquer condições financeiras de arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos que possam ser utilizados como parte do atendimento das necessidades primárias.

Entretanto, há pouca informação sobre os riscos destes produtos à saúde. Não se pode esquecer que fatores naturais ou artificiais podem estar envolvidos no desenvolvimento de mutações e carcinogênese (GARFIELD, 1982). Com base nesses prováveis danos à saúde humana, é que a Anvisa vem desenvolvendo um trabalho de fiscalização na produção e registro de fitoterápicos.

Um desses fitoterápicos utilizados pela população é o Tamaril[®] encontrado na forma de geléia e cápsula. Este é composto de cinco plantas *Cassia fistula* (extrato mole),

Cassia angustifolia (Sene), *Coriandrum sativum* L., *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz) e *Tamarindus indicus* L. (extrato mole); todas com conhecida ação laxativa.. Seus componentes são dosados de forma equilibrada para a ação laxativa, de forma que produzam os efeitos desejados dos laxantes com menos efeitos colaterais.

Com o intuito de comprovar a toxicologia clínica e o potencial genotóxico deste fitoterápico, foram selecionados 25 voluntários sadios para participarem do estudo com a administração de duas cápsulas por dia de Tamaril[®] por 28 dias ininterruptos. Um voluntário abandonou o estudo por não adesão ao tratamento, não sendo incluído no estudo nem nas análises estatísticas. Todos os voluntários toleraram bem a medicação sem apresentar sinais de toxicidade. Um estudo de toxicologia clínica em voluntários sadios, com um medicamento fitoterápico similar ao Tamaril[®], não demonstrou resultados com evidências de toxicidade nos órgãos e sistemas avaliados (SOARES *et al*, 2003), corroborando assim com nossos resultados. Em contraste, um estudo com 14 pessoas idosas portadores de antiga constipação sem causa orgânica para verificar a tolerância ao longo de 6 meses de uso de um laxante, posologia diária correspondente a 20mg de senosídeos, observou-se a medida do *clearance* da alfa 1-antitripsina e do “*pool*” de potássio variou no princípio do estudo, no final do terceiro e do sexto mês. Este achado deve estar relacionado a idade dos voluntários envolvidos no estudo. A média de idade dos nossos voluntários foi de $30,1 \pm 6,9$ sendo considerados jovens adultos.

Somente um voluntário teve aumento de TGP durante a administração do Tamaril[®]. Essa alteração provavelmente não foi devido à droga, porque a TGP teve aumento na primeira semana, seguido de uma diminuição nas semanas subsequentes e no pós-estudo os níveis de transaminases já encontravam-se normalizados.

A senna em doses terapêuticas pode causar dor abdominal. Alguns estudos (SIERGERS, 1993) mostraram que o uso prolongado causa inicialmente diarreia com depleção de potássio e redução de globulinas séricas. Também utilizada por longo período, pode resultar em nefrite, colite reativa ou constipação paradoxal. Nenhuma evidência de diminuição de potássio ou frações protéicas ou proteínas totais foi observada em nosso estudo, provavelmente porque o fitoterápico não foi usado por um período longo de tempo.

Em nosso estudo, os efeitos adversos mais proeminentes foram fezes pastosas, dor abdominal e flatulência. Como o Tamaril[®] apresenta o sene como seu composto majoritário, esses efeitos podem ser previsíveis visto que o sene tem como elementos ativos o ácido catártico, a aleomondina e os senosídeos A e B, que atuam no intestino grosso umidificando as fezes e promovendo um efeito laxativo, aumentando os movimentos peristálticos, com uma latência de 5 a 7 horas. (PDR for Herbal Medicines, 2000). O tamarindo (*Tamarindus indica*) também apresenta princípios ativos de natureza ácida (ácido tartárico, ácido málico, ácido oxálico) que atuam também como laxativos. Apesar do óleo essencial de coriandrum (*Coriandrum sativum*) estimular a secreção de suco gástrico e a *Glycyrrizia glabra* possuir um flavonóide que confere uma ação antiespasmódica e antifatulenta, esses efeitos não deixaram de existir durante o estudo, provavelmente por apresentarem baixa concentração no fitoterápico Tamaril[®]. Essas plantas são usadas quando combinadas com Senna, contribuindo para a atenuação dos efeitos espasmódicos e flatulentos da Senna (SOARES *et al.*, 2003).

Um outro aspecto avaliado foi o potencial genotóxico do Tamaril[®]. Quando o material genético de uma célula é lesado, esta pode reparar este dano, sofrer apoptose (morte celular programada) ou não reparar este dano sendo chamada de célula transformada. A exposição a agentes físicos, químicos, e biológicos podem resultar em alterações no DNA que podem desencadear doenças como o câncer. Foi avaliada a genotoxicidade de apenas dezesseis voluntários porque as amostras dos demais voluntários não estavam muito claras, então foram retiradas para que não houvesse nenhum viés de avaliação.

A genotoxicidade de laxativos contendo antraquinonas é de interesse particular porque a possibilidade de induzir câncer de cólon pelo uso desses compostos é alta no Reino Unido, mais de 20% dos idosos reportaram que tomam laxativos uma vez por semana ou mais, e aproximadamente 80% dos pacientes fazem uso abusivo de drogas laxativas contendo antraquinonas (MAY, 1982).

Heidemann *et al.* (1993) fizeram um extenso estudo de genotoxicidade da Senna e mostrou que os senosídeos não eram genotóxicos e não eram mutagênicos tanto em testes *in vivo* como em testes *in vitro*. Já Mukhopadhyay (1998) demonstrou que a senna tem uma leve toxicidade.

Em 2000, Hallmann classificou os extratos de Senna (e outras plantas) em dois grupos, onde os extratos purificados de Senna são mutagênicos somente em salmonella mas não em mamíferos, e outros extratos que contêm um potencial mutagênico que pode ser eliminado em preparações destinadas ao consumo humano.

Esse conflito de informações provavelmente se deve ao tempo de administração do medicamento e a estudos feitos com extrato, portanto genotóxico (MORI et al 1990) e estudos com sene purificada, não genotóxica (HALLMANN, 2000). Nossos resultados demonstraram que houve diferença entre o grupo tratado com Tamaril[®] e o grupo controle negativo, mas também houve diferença entre o grupo tratado e o controle positivo. Vale ressaltar que a maioria dos danos observados nos linfócitos periféricos do grupo tratado com Tamaril[®] foi de escore 1 que corresponde de 5% a 20% de dano ao DNA, o que provavelmente pode ser reparado, mas para afirmarmos teríamos que aplicar outros testes. Já no controle positivo, a maioria dos danos apresentou escores maiores que 2, o que certamente não pode ser reparado.

Nossos resultados demonstraram que o fitoterápico Tamaril[®] apresentou-se seguro para uso humano na dose utilizada, tanto do ponto de vista clínico quanto do ponto de vista genotóxico, revelando a importância dos estudos de toxicologia clínica na garantia da segurança e a eficácia dos fitoterápicos especialmente nos países em desenvolvimento, onde esses medicamentos são amplamente utilizados.

TABELA 14 – Avaliação pré-clínica de senosídeos puros e extratos de Senna

Substância	Testes in vitro, bactéria	Cultura de células animais	Cultura de células humanas	Animal	Homem
Senna	Genotóxico ¹ Mutagênico ²	Promoção tumoral ³ genotóxico ⁴	Desconhecido	Carcinogênico ⁵	Suspeito ^{6,7} de Proliferação Promoção ^{8,9}
Senna e glicosídeos de cáscara	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Não genotóxico carcinogênico	Desconhecido
Senosídeos Puros e Rhein	Não genotóxico ^{1,11} e não mutagênico ¹¹	Não genotóxico ^{1,11} e não mutagênico ¹¹	Não genotóxico e não mutagênico ¹¹	Não aumentou a frequência de mutação em medula óssea ¹²	Desconhecido

1..Leng-Palschow & Mengs (1995) 2.Sandnes et al (1987) 3. Wolfle et al (1990) 4. Müller et al (1996) 5. Mori et al (1990)
6. Siergers et al (1993) 7. Bronder et al (1999) 8. Van Gorkom et al (1998) 9. Kleibeuker et al (1995) 10.Mereto et al (1996) 11.Heidemann et al (1993) 12. Mukhopadhyay et al (1998)

Conclusões

10. CONCLUSÕES

O ensaio clínico em estudo mostrou que o fitoterápico utilizado foi seguro para uso em voluntários sadios na posologia utilizada de 2 cápsulas por dia no período de 28 dias consecutivos.

Os eventos adversos existentes mostraram-se de acordo aos efeitos farmacológicos esperados conforme as indicações populares da utilização das plantas que compunham o medicamento.

Os resultados do teste do cometa mostraram que o Tamaril[®] não foi genotóxico na posologia estuda em voluntários sadios.

Referências Bibliográficas

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R. As plantas medicinais brasileiras. São Paulo : **Hemus**, p. 339. 1993.

ALZUGARY, D., ALZUGARY, C. Plantas que curam, Rio de Janeiro : s. n., v. 1. 1983.

BERGMEYER, H.; HARDER, M; REJ, R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 24, p. 497-508. 1986.

BERGMEYER, H.; HARDER, M; REJ, R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 24, p. 481-489. 1986.

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

BIBLIOMED CORPORATIVO. Financiamento e Desenvolvimento de Ensaios Clínicos no Brasil, 2003. Disponível em:

<<http://corporativo.bibliomed.com.br/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=181&ReturnCatID=6>>.

Acesso em: 01 junho de 2004.

BULPITT J. DENG H., MARTINUS N.; **Randomised Controlled Clinical Trials**. 1st Ed.; 1993.

BROBECK, J. R. (ed). **Physiological Basis of Medical Practice**, 9^o edicion. Baltimore, MD: Wilkins and Wilkins, p. 4-7. 1973.

BRONDER, E.; KLIMPEL, A.; HELMERT, U. *et al.* Analgetika und Laxantien als Risikofaktoren für Krebs der ableitenden Harnwege – Ergebnisse der Berliner Urothelkarzinomstudie (BUS). **Sozial- und Präventivmedizin**, v. 44, p. 117-125. 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 179-189. 2000

CARNEIRO, S. M. de B. Plantas medicinais como instrumento didático nos livros de ciências da 6ª série do 1º grau maior. Recife : s. n. 1997.

COHEN, A.; POSNER, J. A guide to clinical drug research, 2nd ed. Boston: **Kluwer Academic Publishers**; 2000.

CORRÊA M P **Dicionário Das Planta Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**.Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil Vol.I,II, IV e VI, 1984.

CRAMER, A. Patient Compliance in Medical Practice and Clinical Trials. 1ª Ed. **Lippincott Williams & Wilkins**, Philadelphia, 1996.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 1. Adverse reactions. **Adverse Drugs Reactions & Toxicological Reviews**, v. 10, p. 189-208. 1991.

D'ARCY, P. F. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 1. Adverse reactions. **Adverse Drugs Reactions & Toxicologica Reviews**, v. 12, p. 147-162. 1993.

DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chim ACTA**, v. 31, p. 87-96. 1971.

DUFOUR, P.; GENDRE, P. Ultrastructure of mouse intestinal mucosa and changes observed after long term anthraquinone-administration. **Gut**, v. 25, n. 12, p. 1358-1363. 1984.

DUFOUR, P.; GENDRE, P.; MEUNIER, J. M. *et al.* Tolérance de la muqueus intestinale de la souris à l'ingestion prolongée d'une poudre de Séné. **Ann Pharmaceutiques françaises**, v. 41, n. 6, p. 571-578. 1983.

EVANS, W.C. The plant and animal kingdoms as sourcers of drugs In: **Trease and evan's pharmacognosy**. London. W.b. Saunders., p15-17 , 1996.

FERREIRA SH. Medicamentos a Partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**. 1998.

FOSTER-SWANSON, A.; SWARTZENTRUBER, M.; ROBERTS, P. *et al.* Reference interval studies of the rate – blanked creatinine / Jaffé method on BM/Hitachi systems in six U.S. Laboratories. **Clin Chem**, p. 361. 1994.

FRIEDMAN, M.; FUSBERG, D.; DEMETS, L. Fundamentals of Clinical Trials. 3rd Ed. **Mosby**, St. Louis. 1996.

GARFIELD E. Risk analysis , Part 2 How we evaluate the health risks of toxic substances in the environment. **Current Cont.**, 35, 5-11. 1982.

GERLICH, W. Viral Hepatitis. Section 2, Churchill Livingstone, ed. Zuchermann AJ, Thomas HC, p. 83-113. 1993.

GLENNY, H.; NELMES, P. Handbook of Clinical Drug Research. 1st Ed. Oxford, **Blakwell**. 1996.

GRANDY, J.; JOUBERT, P.; Handbook of phase I/II clinical drug trials. New York: **CRC Press**. 1997.

GRANT, G.; H.; SILVERMAN, L. M.; CHRISTENSON, R. H. Aminoacids and proteins. In Tietz NW (ed) Fundamentals of Clinical Chemistry, 3^o edition. Philadelphia, Pa: **WB Saunders**, p. 328-330.

GREILING, H.; GREENER, A. M. Eds Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3° ed. Stuttgart / New York: **Schattauer Verlag**. 1995.

GUDAT F.; BIANCHI L.; SONNABEND W.; THIEL G.; AENISHAENSLIN W.; STALDER G.A. Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. **Laboratory Investigations**, v. 32, n. 1, p. 1-9. 1975.

GUDER, W. G. NIERE; ABLEITEND HAWRNWEGE. In: Geilin, H.; Gressner, A. M. ed Lehrbuch der Klinischen Chemie and Pathobiochemie, 3° ed. Stuttgart / New York: **Schattauer Verlag**. 1995.

GUILLÉM, D.G. ALBARRACIN, A., ARQUIOLA, E., ERILL,S., MONTIEL L., PESET, J.L., ENTRALGO, P.L. Historia del medicamentos. 4.ed. **Doyma**. 1987.

HALLMANN F., 2000. Toxicity of commonly used laxatives. **Med Sci Monit.**; 6(3): 618-628.

HEIDEMANN A.; MILTONBURGER H. G.; MENGES U. The genotoxicity status of senna. **Pharmacology**, 47, 78-86. 1993.

KELLER, H. (ed) Klinisch-Chemische Labordiagnostik für die Praxis, 2° ed. Stuttgart / New York: **Georg Thieme Verlag**. 1991.

KLEIBEUKER, J.H.; CATS, A.; ZWART, N.; MULDER, NH.; HARDONK, M.J.; VRIES E.G. Excessively high cell proliferation in sigmoid colon after oral purge with anthraquinone glycosides. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 452-3. 1995.

LENG-PESCHLOW, E.; MENGES, U. Sennalaxantien: Sicher und wirksam. **Pharmazeut Ztg**, v. 140, p. 36-46. 1995.

EDLINGER C.; VABRET A.; MORVAN O.; GREUET B. Contribution of combined detection assays of p24 antigen and anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in diagnosis of primary HIV infection by routine testing. **Journal of Clinical Microbiol**, v. 38, p. 2459-2461. 2000.

LY, T. O.; LAPERCH, S.; COUROUCE, A. M. Ealy detection of human immunodeficiency virus infection using third and fourth generation screening assay assays. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases**, 20, p. 104-110. 2001.

LYONS, A.S.M.D., PETRUCCELLI, R.J.II, M.D. **Medicine an illustrated history**. New York: **Abradale Press**. 1987.

MARGOTTA, R. **História ilustrada da medicina**. São Paulo, Manole, 1998.

MARQUES DE SÁ, E. N. **Plantas medicinais**. Disponível em:
<http://www.geocities.com/plantas_medicinais/historic.htm>. Acesso em: 01 junho. 2004.

MARSHALL, W. J. (ed). **Ilustrated Textbook of Clinical Chemistry**, 3^o edition. Londres: **Grower Medical Publishing**, p. 207-218. 1989.

MATOREN, M. **The Clinical Research Process in the Pharmaceutical Industry**. 1st Ed. New York, **Marcel Dekker**, 1994.

MATOS, F.J.A.; ANJOS, M.I.L. **Farmácias vivas: sistema de uso de plantas medicinais cientificamente comprovadas para pequenas comunidades**. Fortaleza: **Ed UFC**. 1989.

MAY H., 1982. Missbrauch von AbfuÈhrmi Heln, nachweisbare schaden an Kolon, Anus and Stoffwechsel. **Arztezeitschrift fuÈr Naturheilverhafen** 7, 365-371

MEITNERT, C. **Clinical Trials – Design, Conduct and Analysis**. 1st Ed. **Oxford University Press**, Oxford. 1986.

MERETO, E.; GHIA, M.; BRAMBILLA, G. Evaluation of the potential carcinogenic activity of senna and cascara glycosides for the rat colon. **Cancer Letters**, v. 101, p. 79-83. 1996.

MORI H, YOSHIMI N, IWATA H, MORI Y, HARA A, TANAKA T, KAWAI K. Carcinogenicity of naturally occurring 1-hydroxy anthraquinone in rats: induction of large bowel, liver and stomach neoplasms. **Carcinogenesis**, 11: 799-802. 1990.

MUKHOPADHYAY MJ, SAHA A, DUTTA A, DE B, MUKHERJEE A. Genotoxicity of sennosides on the bone marrow cells of mice. **Food Chemical Toxicology**, 36: 937-40. 1998.

MÜLLER, S. O.; ECKERT, I.; LUTZ, W. K.; STOPPER, H. Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated?. **Mutation Res**, v. 371, p. 165-173. 1996.

PEGAS HEENRIQUES, J. A.; ERDTMANN, B.; SILVA, J. Genética Toxicológica. Ed. **Alcance** 1ª edição, Rio Grande do Sul, p. 26-27. 2003.

PETER, A. G.M. The Role of Plant Derived Drugs and Herbal Medicines in Healthcare. **Drugs**, 54 (6)., 801-840. 1997.

PEZZUTO, J.M. Plant Derived Anticancer Agents. **Biochemical. Pharmacology**, vol. 53, 121-133. 1997.

PHILLIPS, O., GENTRY, A. H. The useful plants of Tambopata, Peru: I. Statistical hypotheses tests with a new quantitative technique. **Economic Botany**, v.47, n.1, p.15-32. 1993.

PHYSICIAN`S DESK REFERENCE FOR HERBAL MEDICINES TM. 2nd ed.,2000. Medical Economics Co, Montvale. p. 684-688.

PILLANS, P. L. Toxicity of herbal products. **New Zealand Medical Journal**, v. 108, p. 469-471. 1995.

POCOCK, J. Clinical Trials: A Pratical Approach. 4ht Ed. **John Wiley & Son LTD**. 1987.

POOL-ZOBEL BL, LOTZMANN N, KNOLL M, KUCHENMEISTER F, LAMBERTZ R, LEUCHT U, SCHRODER HG, SCHMEZER P. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. **Environ Mol Mutagen**. 24(1):23-45.1994.

RECOMMENDATIONS FOR IMPROVING CHOLESTEROL MEASUREMENT: A Report from the laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. **NIH Publication**, p. 90-2964. 1990.

SANDNES D, JOHANSEN T, TEIEN G, ULSAKER G. Mutagenicity of crude senna and senna glycosides in salmonella typhimurium. **Pharmacol Toxicol**, v. 71, p. 165-172. 1992.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. Fitoterapia Regional. 4° ed. Ed. **Manole**, Barueri-SP, p. 5-8. 2002.

SEELING, H. P.; WÜST, H. **Arztl Labor**, p 15-34. 1969.

SPEIT G, HARTMANN A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**. Nov;10(6):555-9.1995

SHAW, L. M. Keeping pace with a popular enzyme GGT. **Diagnostic Medicine**, p. 1-8. 1982.

SIEDEL, J. *et al.* AACC Meeting Abstract 34. **Clin Chem**, v. 39, p. 1127. 1993.

SIEGERS, C. P.; VON HERTZBERG-LOTTIN, E.; OTTE, M.; SCHNEIDER, B. Anthranoid laxative abuse – a risk for colorectal cancer? **Gut**, v. 34, p. 1099-1101. 1993.

SILVA, É. B. Uso das plantas medicinais pelos moradores do Engenho Uchôa, Recife, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.P., P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, R. P. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Ed UFSC, Florianópolis, p. 545-570. 1999.

SIMONETTI, S. R.; CARVALHO, V. F.; RECHE, C.; *et al.* Detecção simultânea do antígeno p24 e anticorpos contra vírus da imunodeficiência humana tipo 1 para a determinação precoce de infecção. **NewsLab**, v. 46, p. 146–156. 2001.

SINGH, N.P., DANNER, D.B., TICE, R.R. and SCHNEIDER, L.L., A simple technique for Quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, 17, p.184-191. 1988.

SOARES, A.K.A., MARTINS, I.L., UCHOA, C.R.A., MORAES, R. A.; FROTA-BEZERRA, F. A.; MORAES, M.O.; MORAES M.E.A. Clinical Toxicology Study of the Phytomedicine Tamarine® in healthy volunteers. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, 1, 90-95. 2003.

SPIPKER, B.; SCHOENFELDER, J. editors. Presentation of Clinical. 1st Ed. New York **Raven Press**; 1990.

SPRIET, A.; DUPIN-SPRIET, T.; SIMON, P. (ed). Methodology of clinical drug trials. 2nd ed. London: Karger. 1994.

THE WEALTH OF INDIA, Raw Materials, Vol. II., **CSIF**, Delhi. 1990.

THOMAS, J. Ed **Labor and Diagnose**, 4^o ed Marbug: Die Medizinische Verlagsgesellschaft. 1992.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. ; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; AND SASAKI. Y. F.; Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221. 2000.

TIETZ, N. W.; *et al.* **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 21, p. 731-748. 1983.

TOWN, M. H.; GEHM, S.; HAMMER, B. *et al.* **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 23, p. 591. 1985.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, v. 6, p. 24-27. 1969.

VAN GORKOM B.A.; KARRENBELD A.; LIMBURG A.J.; KLEIBEUKER J.H. The effect of sennosids on colonic mucosal histology and bowel preparation. **Z Gastroenterol**, v. 36, p. 13-8. 1998.

VAN OS, F.H.L., 1976. Anthraquinone derivatives in vegetable laxatives. **Pharmacology** 14, 717.

WAHLEFELD, A. W.; HERZ, G.; BEMT, E. Modification of the malloy – evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 126, n. 29, p. 11-12. 1972.

WEBER, B.; GÜRTLER, L.; THORSTENSSON, R.; MICHL, U.; MÜHLBACHER, A.; BÜRGISSER, P.; VILLAESCUSA, R.; EIRAS, A.; GABRIEL, C.; STEKEL, H.; TANPRASERT, S.; OOTA, S.; SILVESTRE, M.J.; MARQUES, C.; LADEIRA, M.; RABENAU, H.; BERGER, A.; SCHMITT, U.; AND MELCHIOR W. Multicenter evaluation of a new automated fourth – generation human immunodeficiency virus screening assay with a sensitive antigen detection module and high specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1938-1946. 2002.

WEICHSELBAUM, T. E. **Amer J Clin Path**, p. 16-40. 1946.

WONG, A.; CASTRO, E. G. R. Aspectos toxicológicos dos fitoterápicos. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Médica**, v. 1, n. 2, p. 97. 1997

WHELTON, A. Nitrogen metabolites and renal function. In: Bentis, C. A.; Ashwood, E. R. ed Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2° ed. Philadelphia, A: **WB Saunders Company**. 1994.

WÖLFLE, D.; SCHMUTE, C.; WESTENDORF, J.; MARQUARDT H. Hydroxyanthraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. **Cancer Res**, v. 50, p. 6540-6544. 1990.

WHO. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **World Health Organization**, Geneva, 1991.

WHO. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. **World Health Organization**, Geneva, p. 1-86. 1993.

WHO. Regulatory situation of herbals medicines. A worldwide review. **World Health Organization**, Geneva, p. 1-43. 1998.

WHO: monographs on selected medicinal plants. Vol. I. **World Health Organization**, Geneva. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO: General guidelines for methodologies on research and evaluation of tradicional medicine. **Who Graphics**, Geneva. 2000.

Anexos

ANEXO 1 protocolo Clínico

DESENHO DO ESTUDO

O desenho consistirá de um estudo aberto, não randomizado com 24 voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 a 50 anos. Os voluntários selecionados receberão ambulatorialmente, na Unidade de Farmacologia Clínica, duas cápsulas de Tamaril uma vez ao dia, durante 28 dias ininterruptamente.

Meta Primária do Estudo

O estudo é delineado de forma a permitir que se obtenham os parâmetros clínicos e laboratoriais relevantes para a averiguação de Toxicologia clínica.

Descrição do Tipo/Desenho do Estudo a Ser Conduzido e Diagrama Esquemático do Desenho, Procedimentos e Etapas

Tipo: Estudo aberto, não randomizado, onde os voluntários, recebem o medicamento uma vez ao dia.

Medicamento teste: Tamaril cápsulas

Posologia: Os voluntários selecionados receberão ambulatorialmente, na Unidade de Farmacologia Clínica, duas cápsulas de Tamaril , durante 28 dias ininterruptamente, com um copo de água mineral (240 mL).

Administração

A administração das cápsulas de Tamaril será realizada por um dos responsáveis pelo estudo. Os voluntários receberão 02 cápsulas, uma vez ao dia, durante 28 dias.

Serão verificados os sinais vitais (pressão arterial e pulso) uma vez ao dia. A partir do primeiro dia de administração até o pós-estudo, será fornecido semanalmente um diário onde o voluntário deverá registrar a cada dia suas evacuações diárias bem como a consistência das fezes e que deverá ser entregue em cada avaliação clínica.

Durante todo o período de administração do medicamento, os voluntários terão assistência e cuidados médicos especializados. Em caso de aparecimento de qualquer efeito colateral, serão avaliados e medicados por um dos responsáveis pelo ensaio clínico. Os voluntários permanecerão em suas atividades rotineiras, assim como em suas dietas gerais normais.

Duração esperada da participação dos Voluntários e Descrição da Sequência e Duração das Etapas, Incluindo Follow-Up

Os voluntários participarão inicialmente de um processo de seleção, após um esclarecimento inicial sobre as condições nas quais são desenvolvidas as pesquisas clínicas. Nesta etapa será realizada uma consulta médica, incluindo anamnese, exame físico, eletrocardiograma (ECG) e será solicitado exames laboratoriais complementares.

O histórico médico de cada voluntário será obtido antes do início da fase de tratamento, ocasião em que os voluntários já serão também informados sobre as restrições de uso de medicamentos e demais quesitos (diretrizes e restrições) constantes neste Protocolo.

Uma vez avaliada a higidez e antes da admissão no estudo, os voluntários serão submetidos a uma entrevista livre para a avaliação da saúde mental, bem como condições emocionais para participar da investigação, ocasião em que serão prestadas as informações adicionais relativas ao estudo em questão. Após isso, os voluntários terão esclarecidas todas as dúvidas restantes, e caso concordem, assinarão o termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo.

Exames Clínicos e Laboratoriais para Avaliação da Toxicidade

Exames físicos, eletrocardiográficos, e exames laboratoriais complementares (**Tabela 2**) serão repetidos semanalmente e após 07 dias da última administração do medicamento. Em horário previamente combinado os voluntários deverão comparecer para o Exame Clínico pós estudo, ocasião em que serão, via de regra, dispensados. No entanto, o acompanhamento de um ou mais voluntários poderá ser prolongado, implicando ou não a realização de consultas ou exames laboratoriais adicionais, em função de possíveis eventos adversos detectados ou a critério médico.

Descrição das "Regras de Parada" ou "Critérios de Descontinuação" para os voluntários individualmente, parte do estudo e todo estudo

Os voluntários poderão ter sua participação no estudo encerrada antecipadamente em função dos "Critérios de Retirada".

Além disto, com o objetivo de garantir o bem estar dos voluntários, o Estudo poderá ser interrompido como um todo caso, a juízo do Investigador Principal ou do Patrocinador, seja estabelecido que os riscos a que os voluntários estão sendo submetidos sejam superiores aos antecipadamente previstos.

Em caso de desligamento individual de um voluntário, o mesmo poderá ser substituído por um voluntário adicional a fim de manter o estudo com o tamanho da amostra adequado.

Procedimentos para contabilização do(s) produto(s) relacionados ao tratamento

O patrocinador enviará quantidades extra da formulação para fins de retenção de amostras e para a administração da mesma a voluntários adicionais que por ventura sejam necessários a fim de que o estudo possa permanecer balanceado em caso de desligamento de um voluntário.

Ao final do estudo, o Investigador Principal ou o Coordenador clínico manterá em local próprio, amostras de retenção da formulação, quantidade suficiente para a repetição do estudo, até o final do prazo de validade especificado na embalagem de cada produto. A medicação remanescente ficará armazenada em suas embalagens originais,

incluindo as parcialmente utilizadas e as não utilizadas, o qual poderá conservá-las como amostras de retenção extra. Cabe ao Investigador principal ou ao responsável designado pelo Investigador manter um inventário com o registro das drogas recebidas, administradas, devolvidas, enviadas ao Patrocinador ou retidas.

Identificação dos dados a serem registrados diretamente no formulário de relato de caso (CRF)

Os seguintes dados serão registrados diretamente no CRF:

Exame físico, incluindo a história médica.

- Dados antropométricos
- Sinais Vitais
- Uso de medicamentos pré ou concomitantemente ao tratamento
- Administração do produtos sob investigação e respectivos horários
- Registro de Eventos Adversos
- Registro do uso de medicação adicional

Nos CRF cada voluntário será identificado pelas iniciais do primeiro nome e sobrenomes. Esta identificação será relatada em cada página do CRF.

Local da Administração do Medicamento aos Voluntários

A Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, credenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe de uma estrutura assistencial própria que consiste de salas para consultório, enfermarias, posto de enfermagem perfazendo um total de 24 leitos, destinados exclusivamente para ensaios clínicos e fármaco-clínicos. Está equipada com uma unidade de procedimentos especiais, dotada de monitores de eletrocardiografia, oxímetro de pulso, cardioversor/desfibrilador, ventilador artificial, bombas de infusão e toda a medicação necessária para procedimentos de urgência, inclusive ressuscitação cardiopulmonar.

SELEÇÃO E RETIRADA DOS VOLUNTÁRIOS

A seleção de voluntários será realizada na Unidade de Farmacologia Clínica. Um mínimo de 24 voluntários sadios serão selecionados diretamente da população da região.

Os voluntários serão aceitos no estudo somente se forem considerados saudáveis, a juízo de profissionais legalmente habilitados, com base na história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem a admissão no estudo.

Para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de seleção os voluntários realizarão os testes apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1: Exames Laboratoriais vinculados ao Processo de Seleção dos Voluntários

Categoria	Exames
<u>ECG</u>	ECG padrão com 12 derivações
<u>Análise hematológica</u>	hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas
<u>Análise Bioquímica</u>	Creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, sódio, potássio, glicemia, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, uréia, triglicérides, ácido úrico, γ GT.
<u>Urina</u>	Sumário de Urina
<u>Fezes</u>	Parasitológico
<u>Sorologia</u>	Análise Sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV(1+2)

Os resultados dos exames de laboratório serão considerados “normais” quando dentro da faixa de normalidade declarada pelo laboratório. Para resultados numéricos, os valores até 10% fora da faixa de normalidade declarada serão ainda considerados como “normais”. Os valores normais, fornecidos pelo laboratório analítico, serão encontrados nos CRFs ou no Relatório Clínico.

No que se refere ao eletrocardiograma, o médico especialista deverá informar se os achados específicos são julgados como normais, anormal não clinicamente significativos (NCS) ou anormais clinicamente significantes. O especialista também irá informar se o voluntário é considerado como apto para participar do estudo. O relatório do ECG deverá ser mantido como parte da documentação do estudo.

Valores além da faixa de 10% poderão, a critério dos investigadores ser considerados como sem relevância clínica e o voluntário aceito para o estudo e registrado no Formulário de Relato de Caso (CRF).

Antes da admissão no estudo, os voluntários deverão submeter-se a um exame clínico, o qual deverá ser explicitamente documentado no Formulário de Relato do Caso (CRFs), englobando a revisão dos seguintes itens:

Tabela 2: Itens da História Clínica e Exame físico a serem explicitamente referenciados no CRF

Categoria	Itens Observados
<u>História Médica</u>	Alergias; olhos, nariz e garganta; sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, genito urinário, nervoso central, hematopoético-linfático, endócrino; dermatológico, musculoesquelético; estabilidade emocional, história familiar, cirúrgica.
<u>Exame Físico</u>	olhos, orelhas, nariz, garganta, pescoço(incluindo tireóide), coração, pulmões, abdômem (incluindo fígado e baço), pele, linfonodos, sistema nervoso, esqueleto e músculos
<u>Dados antropométricos</u>	Pressão arterial (medida 5 minutos após descanso, na posição sentada, pulso, altura, peso (roupas leves), índice de massa corpórea, temperatura em °C

A pressão arterial será considerada como normal dentro dos seguintes limites:100 a 140 mmHg para a sistólica e 60 a 90 mm Hg para a diastólica. O pulso dentro de 50 a 100 p.p.m será considerado normal.

O Índice de Massa Corpórea será considerado normal quando maior de 19 e menor do que 30 (os limites do Índice de Massa Corpórea são definidos no Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 1995, U.S. Department of Agriculture Research Service, Dietary Guidelines Advisory Committee 1995 pp23-4.

Deverá ser anotado pelo investigador na ficha clínica de cada voluntário qualquer anormalidade de história médica e exame físico considerada não clinicamente significativa (NCS), conforme julgado pelo próprio investigador.

Os exames clínicos e exames laboratoriais deverão ser realizados em um período não superior aos 90 dias que antecedem a primeira administração da medicação. Os exames sorológicos, no entanto, podem ter sido realizados anteriormente, até 6 meses antes da primeira administração da medicação.

Expirado este prazo o voluntário deverá ser re-avaliado com base nos mesmos critérios mencionados acima. Independente da aprovação, voluntários do sexo feminino só poderão participar da etapa clínica caso não estejam grávidas, o que deverá ser comprovado por um exame de β -HCG realizado no máximo de 10 dias antes da primeira administração da medicação.

Critérios de inclusão do voluntário

Os seguintes critérios devem ser satisfeitos para que o voluntário possa participar do estudo:

- Homem e mulheres não grávidas e que não estejam amamentando.
- Idade entre 18 a 50 anos de idade.
- Voluntário tem seu índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 30.
- Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a critério médico, de acordo com as regras definidas no Protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, ECG, e exames laboratoriais complementares.
- Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão do voluntário

A resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios excluirá o voluntário do estudo:

Problemas relacionados com a droga:

- 1 O voluntário tem sabidamente uma hipersensibilidade a droga estudada ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga.
- 2 História ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga.
- 3 Uso de terapia de manutenção com qualquer droga excetuando-se anticoncepcionais por via oral.

Doenças ou problemas de saúde

- 4 Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastro-intestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- 5 Achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do investigador para participação no estudo.
- 6 Os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais de acordo com as normas deste protocolo, a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes pelo investigador.

Hábitos e Dependências

- 7 Voluntário fuma mais de 9 cigarros por dia.
- 8 O voluntário ingere mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia
- 9 Tem história de abuso de álcool ou drogas.

Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo

- 10 Fez uso regular de medicação dentro das 2 semanas que antecederam o início do tratamento e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de um período inferior a sete meses desta, excetuando-se anticoncepcionais por via oral.

11 Foi internado por qualquer motivo entre 8 semanas do início do primeiro período de tratamento deste estudo;

12 O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecedem o início deste estudo;

13 O voluntário doou ou perdeu 450 ml ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam ao estudo.

Outras condições

14 Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres.

15 O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador

Critérios de retirada do voluntário

Solicitação por parte do voluntário para se retirar do estudo a qualquer momento

1. Voluntário não deseja continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem razão);
2. Voluntário não deseja continuar no estudo devido os eventos adversos da droga de estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados a droga em estudo)
3. Voluntário não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos por ex. indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.

O investigador pode retirar o voluntário do estudo por uma das seguintes razões:

4. Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente.
5. Não aderência às exigências do protocolo,
6. Eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade
7. Doença intercorrente requerendo medicação.
8. Qualquer outra condição que, a juízo do investigador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário.

Todos os detalhes e razões da retirada do voluntário do estudo será anotada na parte do CRF destinada (Seção de Término do Estudo) e relatada aos monitores.

MEDICAÇÕES/TRATAMENTOS E CONDUTAS PERMITIDAS E NÃO PERMITIDAS ANTES E DURANTE O ESTUDO

Outras Terapias ou Procedimentos Concomitantes

Não estão previstas terapias ou procedimentos concomitantes.

Medicamentos

Todos os voluntários do estudo serão informados de que não podem tomar qualquer remédio incluindo aqueles vendidos sem prescrição médica, por no mínimo 14 dias antes do início do estudo. Durante a fase de tratamento também não é permitida qualquer medicação concomitante, inclusive aquelas vendidas sem prescrição médica.

Todavia, em caso de emergência, incluindo eventos adversos, o Investigador Clínico pode decidir administrar medicações as quais considere absolutamente necessárias para o bem estar dos voluntários. Neste caso, o uso da medicação deve também ser registrada apropriadamente nos CRFs individuais.

Dieta

Durante o estudo os voluntários continuarão com suas dietas gerais normais.

O consumo de cigarros e bebidas alcoólicas deverá ser abolido durante todo o estudo.

A não observância destas restrições deve ser informada ao Investigador Clínico, o qual irá decidir se será permitido que o voluntário permaneça no estudo. O fato e suas características deverão ser registrados no Formulário de Relato de Caso (CRF).

Outras Restrições quanto a Terapias e Condutas

Não é permitida doação de sangue durante o estudo. A perda involuntária de sangue deverá ser comunicada aos investigadores clínicos, que tomarão as providências cabíveis.

Não é permitida a participação no estudo de voluntárias que estejam grávidas (mesmo que o fato ocorra após a realização do exame laboratorial na fase de seleção), que estejam amamentando, ou que estejam pretendendo engravidar durante o prazo de duração do estudo. Caso, mesmo tomadas as devidas precauções, a voluntária vir a suspeitar de que engravidou durante a participação no estudo, deverá imediatamente comunicar o ocorrido à equipe e deverá interromper sua participação. O fato deverá ficar devidamente documentado no Formulário de Relato de Caso (CRF)

Procedimentos para monitorar a adesão do voluntário ao protocolo

Adesão à Terapia

O medicamento sob investigação (e outras terapias) serão administrados na presença de um dos investigadores. O investigador deverá examinar a boca de cada voluntário após ingestão do medicamento.

Adesão a outras condições / restrições

A adesão às restrições quanto ao uso de medicamentos, limitações dietéticas e demais restrições definidas no Protocolo serão investigadas inicialmente através de questionamento ou observação direta por parte do Investigador no momento da administração do medicamento ou durante as avaliações clínicas.

Se houver qualquer dúvida sobre o uso de álcool, poderá ser feito um teste para detecção de álcool baseado na respiração, a juízo do Investigador.

Se o voluntário admitir ingestão de droga, o Investigador Clínico irá decidir se será permitido que o voluntário permaneça no estudo, dependendo da droga usada, do tipo de droga e da dose. A hora em que a droga foi ingerida será anotada no CRF.

Se o voluntário admitir o não cumprimento das demais restrições o Investigador clínico deverá também decidir sobre sua permanência no Estudo, documentando o fato (e a decisão) no CRF.

Outras obrigações e restrições

- Todos os voluntários devem chegar a Unidade de Farmacologia Clínica da Faculdade de Medicina da UFC às 17:00hs.
- Todos os voluntários deverão preencher diariamente o diário entregue durante as administrações.
- Medicamentos concomitantes deverão ser evitados, quando possível. Qualquer medicação, deverá ser registrada na folha apropriada.
- Voluntários devem também retornar a Unidade a fim de se submeterem a um exame físico geral, eletrocardiograma e também para coleta de amostras (sangue e urina)

para os testes laboratoriais. Esta obrigação é válida mesmo em caso de desistência do voluntário (a não ser que ele tenha desistido antes de tomar a medicação), já que está vinculada à avaliação de segurança do uso do medicamento.

- Os voluntários devem comunicar o não cumprimento de qualquer restrição mencionada.

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA

Especificação dos parâmetros de segurança

Para fins de acompanhamento de segurança, os voluntários serão observados clinicamente durante o estudo visando a detecção de eventos adversos.

Um **Evento Adverso** é qualquer ocorrência médica não desejada em um sujeito que esteja participando de uma investigação clínica ao qual já tenha sido administrado alguma das *terapias* vinculadas à investigação. Esta ocorrência não necessita ter uma relação causal com a *terapia*. Um *Evento Adverso* pode portanto ser um sinal (incluindo achados anormais de exames ou sinais vitais) ou sintoma desfavorável e não intencional, ou uma doença temporalmente associada à *terapia*, relacionada ou não à *terapia*.

Um Evento **Adverso Sério** é um Evento Adverso que, independente de dose:

- Provoca a morte;
- Ameaça a vida;
- Requer hospitalização ou prorrogação da hospitalização;
- Resulta em debilidade / incapacitação significativa ou persistente;
- Trata-se de uma anomalia congênita ou defeito ao nascimento;
- Trata-se de uma neoplasia maligna.

A "ameaça a vida" refere-se a condições que efetivamente encontradas no momento da ocorrência do evento ou que requeiram, também no momento do evento, intervenção para prevenir que haja "ameaça a vida"; não se refere à possibilidade de "ameaça à vida" caso o evento fosse mais intenso.

Se define como hospitalização a admissão em um centro hospitalar, mesmo que seja por um período inferior a 24 horas. Se excluem as admissões a) para tratar de uma condição pré-existente que esteja documentada na história clínica e que tenham sido

planejadas anteriormente ao estudo; b) devido a problemas sociais; c) contempladas no protocolo como parte dos procedimentos do estudo; d) eletivas (cirurgia estética)

Além da comunicação de eventos pelo voluntário ou simples observação, os investigadores deverão registrar e avaliar as seguintes variáveis, visando a detecção de eventos adversos:

- Sinais vitais dos voluntários (FC, PA e temperatura) obtidos durante as internações;
- Resultados dos exames laboratoriais (hematologia, bioquímica e análise de urina) e eletrocardiograma, obtidos ao final do estudo e avaliados de forma comparativa àqueles obtidos na fase de seleção dos voluntários.
- Achados de exame físico, obtidos ao final do estudo e avaliados de forma comparativa àqueles obtidos na fase de seleção dos voluntários.

Os eventos adversos deverão ser documentados e notificados de acordo com os critérios e definições constantes no POP “Notificação e Documentação de Eventos Adversos”

Verifique a seção 7.3 no que se refere à notificação e documentação de Eventos Adversos

Os voluntários deverão estar instruídos sobre os efeitos adversos em potencial, bem como sobre a necessidade de comunicá-los imediatamente ao investigador ou sua equipe. Quaisquer eventos adversos que ocorram após o período sob supervisão médica direta deverão ser imediatamente comunicados à equipe, por telefone.

Serão monitoradas, por ocasião da coleta de cada uma das amostras de sangue, a frequência cardíaca e pressão arterial do voluntário. A temperatura corpórea será acompanhada a cada 4 horas – a partir da administração da medicação.

Um médico da equipe estará disponível durante todo o período do estudo.

Procedimentos pós estudo

Após sete dias do final do estudo, os voluntários serão reavaliados clinicamente e por exames laboratoriais subsidiários realizados na fase pré-estudo.

A negativa ou o não comparecimento do voluntário para a realização destes procedimentos, deverá ser devidamente documentada.

Procedimentos para obter relatos de e registrar e comunicar eventos adversos e doenças intercorrentes

As perguntas realizadas para saber se o voluntário teve algum evento adverso deverão ser limitadas a perguntas gerais, tais como: "Como vai você?"

Será solicitado aos voluntários que relatem qualquer evento adverso e quando isto ocorreu. Será também solicitado que notifique ao investigador se foi necessário usar medicação adicional.

Qualquer evento adverso deverá ser registrado em detalhes na(s) folhas(s) apropriada(s) para relato de evento adversos, integrante do Formulário de Relato de Caso (CRF). Os detalhes incluem a descrição do evento utilizando terminologia médica precisa, informação sobre a o momento em que começou, sua duração e as ações médicas tomadas para afastar o evento adverso, bem como informações sobre o desfecho e qualquer outro dado adicional que a juízo do investigador possa ser relevante.

Devem ser empreendidos todos os esforços pelo investigador clínico para explicar cada experiência adversa e avaliar sua relação, se houver, com o medicamento do estudo.

O investigador clínico é responsável por documentar todos os eventos adversos que ocorram durante o estudo e comunicar oportunamente estes eventos ao patrocinador. O investigador principal é responsável pela notificação dos Eventos Adversos Sérios à pessoa indicada pelo patrocinador para tomar conta dos relatórios de Eventos Adversos Sérios (veja seção 2.1.4). Todos os casos de emergência deverão também ser imediatamente comunicados aos monitores.

Tipo e duração do seguimento dos voluntários após efeitos adversos

A equipa da Unidade de Farmacologia Clínica deverá monitorar a segurança dos voluntários desde a ocorrência de um evento adverso até a recuperação satisfatória. Portanto, podem ser necessárias visitas de retorno e testes laboratoriais (quando apropriado), mesmo depois que o estudo tenha sido completado.

Em casos de emergência a Unidade de Farmacologia Clínica tem local próprio, equipado com desfibrilador, monitor, oxímetro, respirador, material para pequena cirurgia e com medicação de urgência para qualquer eventualidade. Além disso, conta com o apoio de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário Walter Cantídio.

É de responsabilidade do investigador garantir que os voluntários envolvidos recebam um tratamento definitivo para qualquer evento adverso, se necessário. Os eventos deverão ser seguidos clinicamente e por estudos laboratoriais (quando indicados) até que os parâmetros voltem ao normal. Estas atividades podem permanecer mesmo após o estudo ter sido completado.

NÚMERO DE VOLUNTÁRIOS A SEREM ESTUDADOS

Número planejado é de 24 voluntários. A análise poderá ser realizada com um menor número de voluntários em função da saída destes antes do final da Etapa Clínica . Não se exclui a possibilidade de inclusão de novos voluntários em substituição aos que tenham saído do estudo. Veja também a seção 10 em relação à análise final

CRITÉRIOS PARA A CONCLUSÃO DO ESTUDO

Não está prevista a conclusão antecipada do estudo, a não ser por questões de segurança.

SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS A SEREM INCLUÍDOS NA ANÁLISE

Serão inicialmente incluídos na análise todos os voluntários que vierem a completar todos os períodos do estudo, bem como aqueles cuja saída seja decorrente de eventos adversos.

ANEXO 2 FICHA DE RELATO DE CASO DOS VOLUNTÁRIOS

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

1. Critérios de Admissão

1.1 Critérios de Inclusão

Os seguintes critérios devem ser satisfeitos para que o voluntário possa participar do estudo:

1. Voluntário do sexo feminino ou masculino com 18 a 50 anos de idade.	() Sim	() Não
2. O voluntário tem índice de massa corpórea maior ou igual que 19 e menor ou igual que 30.	() Sim	() Não
3. O voluntário apresenta boa condição física, de acordo com os requisitos das páginas 2 a 4.	() Sim	() Não
4. O voluntário concordou livremente e assinou o termo de consentimento, após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos, antes de qualquer procedimento.	() Sim	() Não

1.2 Critérios de Exclusão

Qualquer um dos seguintes critérios excluirá o voluntário da participação do estudo:

1. Os resultados dos exames laboratoriais e do ECG estão fora dos limites da normalidade, a menos que sejam considerados clinicamente insignificantes pelo investigador.	() Sim	() Não
2. Participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga no período de três meses anterior ao início deste estudo.	() Sim	() Não
3. Fez uso de medicação regular nas 2 semanas prévias ao início do estudo.	() Sim	() Não
4. Foi hospitalizado por qualquer motivo nas oito semanas antecedentes ao início do estudo.	() Sim	() Não
5. Tem história de abuso ao álcool ou drogas, ou ingeriu bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecedem o início deste estudo.	() Sim	() Não
6. Tem história de doença hepática, renal, epiléptica ou hematológica.	() Sim	() Não
7. Tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia com necessidade de tratamento farmacológico.	() Sim	() Não
8. Tem história ou teve angina pectoris, infarto e/ou insuficiência cardíaca congestiva	() Sim	() Não
9. Doou ou perdeu 450mL ou mais de sangue até 3 meses antes do início do estudo.	() Sim	() Não
10. Tem qualquer outra condição que o investigador julga relevante para a não participação do estudo.	() Sim	() Não

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

2. História Médica - Pré-Estudo

Data

Data nasc:	Sexo Masc. () Fem. ()	Ocupação:
-------------------	--------------------------------	------------------

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Alergia	()	()	
Olhos-Ouvido	()	()	
Nariz-Garganta	()	()	
Respiratório	()	()	
Cardiovascular	()	()	
Gastrointestinal	()	()	
Genitourinário	()	()	
S. Nervoso Central	()	()	
Hematopoiético/linfático	()	()	
Endócrino	()	()	
Dermatológico	()	()	
Musculo-esquelético	()	()	
Estabilidade emocional	()	()	
História familiar	()	()	
História cirúrgica	()	()	
Outros	()	()	

Comentários :

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

3. Exame Físico Geral – Pré-Estudo

Data:

Pressão arterial sist/diastólica (mmHg)	Pulso (bat/min)	Altura (cm)	Peso (Kg)	Temperatura Axilar (°C)

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Aspecto geral	()	()	
Pele	()	()	
Cabeça-pescoço	()	()	
Olhos	()	()	
Ouvidos	()	()	
Nariz	()	()	
Boca	()	()	
Garganta	()	()	
Tórax	()	()	
Coração	()	()	
Abdomen	()	()	
Linfonodos	()	()	
Neurológico	()	()	
Extremidades	()	()	
Outros	()	()	

Comentários:

M Elisabete A Moraes CRM 2145

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

4. ECG - Pré-Estudo

Data:

Ritmo cardíaco		PR intervalo (s)	
SAP (°)		QRS duração (s)	
SAQRS (°)		QT (s)	
SAT (°)		FC (bpm)	

Conclusão:	<input type="checkbox"/> Normal
	<input type="checkbox"/> Anormal, sem significado clínico
	<input type="checkbox"/> Anormal, clinicamente importante

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

5. Administração do Tamaril

5.1 Dose Administrada: 02 caps x dia

5.2 Período de Administração: 28 dias

Dia	Data	Horário	Pressão Arterial (mmHg)	Pulso (ppm)	Temperatura Axilar (°C)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					-
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					-
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					-

Marne Carvalho de Vasconcellos CRF 2756

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

6. Avaliação Clínica - Primeira Semana

Data

Pressão arterial sist/diastólica (mmHg)	Pulso (bat/min)	Peso (Kg)	Temperatura Axilar (°C)

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Aspecto geral	()	()	
Pele	()	()	
Cabeça-pescoço	()	()	
Olhos	()	()	
Ouvidos	()	()	
Nariz	()	()	
Boca	()	()	
Garganta	()	()	
Tórax	()	()	
Coração	()	()	
Abdomen	()	()	
Linfonodos	()	()	
Neurológico	()	()	
Extremidades	()	()	
Outros	()	()	

Comentários:

Manoel Odorico de Moraes CRM 2144

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

7. ECG - Primeira Semana

Data:

Ritmo cardíaco		PR intervalo (s)	
SAP (°)		QRS duração (s)	
SAQRS (°)		QT (s)	
SAT (°)		FC (bpm)	

Conclusão:	<input type="checkbox"/> Normal
	<input type="checkbox"/> Anormal, sem significado clínico
	<input type="checkbox"/> Anormal, clinicamente importante

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica - UNIFAC - 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

8. Avaliação Clínica - Segunda Semana

Data

Pressão arterial sist/diastólica (mmHg)	Pulso (bat/min)	Peso (Kg)	Temperatura Axilar (°C)

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Aspecto geral	()	()	
Pele	()	()	
Cabeça-pescoço	()	()	
Olhos	()	()	
Ouvidos	()	()	
Nariz	()	()	
Boca	()	()	
Garganta	()	()	
Tórax	()	()	
Coração	()	()	
Abdomen	()	()	
Linfonodos	()	()	
Neurológico	()	()	
Extremidades	()	()	
Outros	()	()	

Comentários:

Manoel Odorico de Moraes CRM 2144

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

9. ECG - Segunda Semana

Data:

Ritmo cardíaco		PR intervalo (s)	
SAP (°)		QRS duração (s)	
SAQRS (°)		QT (s)	
SAT (°)		FC (bpm)	

Conclusão:	<input type="checkbox"/> Normal
	<input type="checkbox"/> Anormal, sem significado clínico
	<input type="checkbox"/> Anormal, clinicamente importante

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica - UNIFAC - 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

10. Avaliação Clínica - Terceira Semana

Data

Pressão arterial sist/diastólica (mmHg)	Pulso (bat/min)	Peso (Kg)	Temperatura Axilar (°C)

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Aspecto geral	()	()	
Pele	()	()	
Cabeça-pescoço	()	()	
Olhos	()	()	
Ouvidos	()	()	
Nariz	()	()	
Boca	()	()	
Garganta	()	()	
Tórax	()	()	
Coração	()	()	
Abdomen	()	()	
Linfonodos	()	()	
Neurológico	()	()	
Extremidades	()	()	
Outros	()	()	

Comentários:

Manoel Odorico de Moraes CRM 2144

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

11. ECG - Terceira Semana

Data:

Ritmo cardíaco		PR intervalo (s)	
SAP (°)		QRS duração (s)	
SAQRS (°)		QT (s)	
SAT (°)		FC (bpm)	

Conclusão:	<input type="checkbox"/> Normal
	<input type="checkbox"/> Anormal, sem significado clínico
	<input type="checkbox"/> Anormal, clinicamente importante

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

12. Avaliação Clínica – Quarta Semana

Data

Pressão arterial sist/diastólica (mmHg)	Pulso (bat/min)	Peso (Kg)	Temperatura Axilar (°C)

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Aspecto geral	()	()	
Pele	()	()	
Cabeça-pescoço	()	()	
Olhos	()	()	
Ouvidos	()	()	
Nariz	()	()	
Boca	()	()	
Garganta	()	()	
Tórax	()	()	
Coração	()	()	
Abdomen	()	()	
Linfonodos	()	()	
Neurológico	()	()	
Extremidades	()	()	
Outros	()	()	

Comentários:

Manoel Odorico de Moraes CRM 2144

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica –UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

13. ECG - Quarta Semana

Data:

Ritmo cardíaco		PR intervalo (s)	
SAP (°)		QRS duração (s)	
SAQRS (°)		QT (s)	
SAT (°)		FC (bpm)	

Conclusão:	<input type="checkbox"/> Normal
	<input type="checkbox"/> Anormal, sem significado clínico
	<input type="checkbox"/> Anormal, clinicamente importante

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Médico	Assinatura	Data
---------------	-------------------	-------------

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

14. Avaliação Clínica – Pós-Estudo

Data

Pressão arterial sist/diastólica (mmHg)	Pulso (bat/min)	Peso (Kg)	Temperatura Axilar (°C)

Sistema revisto	Normal	Anormal	Se Anormal, descreva os achados
Aspecto geral	()	()	
Pele	()	()	
Cabeça-pescoço	()	()	
Olhos	()	()	
Ouvidos	()	()	
Nariz	()	()	
Boca	()	()	
Garganta	()	()	
Tórax	()	()	
Coração	()	()	
Abdomen	()	()	
Linfonodos	()	()	
Neurológico	()	()	
Extremidades	()	()	
Outros	()	()	

Comentários: Voluntário excluído por absenteísmo durante o ensaio.

Manoel Odorico de Moraes CRM 2144

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

15. ECG - Pós-estudo

Data:

Ritmo cardíaco		PR intervalo (s)	
SAP (°)		QRS duração (s)	
SAQRS (°)		QT (s)	
SAT (°)		FC (bpm)	

Conclusão:	<input checked="" type="checkbox"/> (4) Normal
	<input type="checkbox"/> Anormal, sem significado clínico
	<input type="checkbox"/> Anormal, clinicamente importante

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n.º:

Iniciais do Voluntário:

16. Determinações Laboratoriais (cont.)

Sumário de Urina	Pré-Estudo	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	Pós-estudo	Normal
Data							
Densidade							1005-103
Ph							4,5-8
Albumina							-
Glicose							-
Cetona							-
Microscopia							
Leucócitos							0-4
Hemácias							0-4
Cilindros							0-1
Cristais							-
Cél.							Algumas
Bactérias							-
Outros							-
Parasitológico de Fezes:							

Sorologia:		
Hepatite B	() negativo	() positivo
Hepatite C	() negativo	() positivo
HIV	() negativo	() positivo

Comentários:

F A Frota Bezerra CRM 2367

Investigador

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

17. Registro de Eventos Adversos

Eventos adversos durante o estudo?	()	Sim	()	Não
---	-----	-----	-----	-----

Descrição	Período	Severidade			Atribuída a droga?				Ação adotada
		Leve	Mod.	Ser.	Sim	Pos	Não	Des	
1.		()	()	()	()	()	()	()	
2.		()	()	()	()	()	()	()	
3.		()	()	()	()	()	()	()	
4.		()	()	()	()	()	()	()	
5.		()	()	()	()	()	()	()	

Mod. = Moderada

Ser. = Séria

Pos. = Possível

Des = Desconhecida

18. Medicação para Tratamento de Eventos Adversos

Se a ocorrência de evento adverso necessitou uso de drogas para tratamento, abaixo encontram-se as informações relevantes.

Nº do evento adverso	Droga administrada (nome genérico ou comercial)	Via (oral, IV, IM)	Dosagem (mg/dose, nº doses/dia)	Total dose administrada (mg)

Comentários:

M Elisabete A Moraes CRM 2145

Médico

Assinatura

Data

Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril

Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – 09 /2002

Voluntário n°:

Iniciais do Voluntário:

19. Término Prematuro do estudo

Voluntário saiu do estudo? Sim () Não () Data da saída

Razões que o levou a sair do estudo:

20. Comentários Adicionais

21. Autenticação

Declaro que todos os dados contidos neste protocolo são acurados, completos, verdadeiros e que todos os dados correspondem aos obtidos durante o estudo

ANEXO 3**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

“Estudo de Toxicologia Clínica do Tamaril[®] cápsulas.”

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

O abaixo-assinado (Nome, idade e RG), declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos pesquisadores Maria Elisabete Amaral de Moraes, Manoel Odorico de Moraes, Fernando A. Frota Bezerra e Marne Carvalho de Vasconcellos da Unidade de Farmacologia Clínica da Faculdade de Medicina - UFC O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é avaliar a toxicidade clínica e laboratorial da Tamaril[®] cápsulas – Marjan Farma Indústria Farmacêutica Ltda

ii - Durante o período de 28 dias, ser-lhe-á administrado 2 cápsulas do supracitado medicamento, 1 vez ao dia, na Unidade de Farmacologia Clínica da UFC.

iii - Antes de iniciado o estudo (pré-estudo), nas primeira, segunda, terceira e quarta semanas de administração das cápsulas de Tamaril[®] e sete dias após o término do estudo, você será submetido a exame médico, eletrocardiográfico e rotina laboratorial (hemograma completo, VHS, glicemia, transaminases, gama GT, fosfatase alcalina, bilirrubina, proteínas totais e frações, creatinina, ácido úrico, colesterol total, sódio, potássio e sumário de urina) para verificação de hígidez; perfazendo um total de 6 (seis) avaliações. No pré-estudo e na quarta semana de administração do Tamaril[®] realizará coleta de sangue para avaliação da integridade genética (genotoxicidade). Análise Sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV, teste sorológico para gravidez (Beta – HCG) e Parasitológico de Fezes serão realizados somente antes do estudo.

iv - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

v - A administração oral do Tamaril[®] cápsulas pode causar cólicas abdominais, vômitos e diarreia. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente e livremente sobre a participação do referido ensaio clínico.

vii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento.

viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade de Farmacologia Clínica não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - A Unidade de Farmacologia Clínica o manterá informado e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa caso o voluntário assim o desejar.

xi - Caso surja alguma intercorrência, devem procurar o serviço Médico do Hospital das Clínicas da UFC e solicitar que o mesmo contacte os médicos e a farmacêutica responsável pelo ensaio clínico (ver abaixo).

xii - Caso houver gastos adicionais para tratamento médico, e o motivo desse tratamento for decorrente do uso da medicação durante o ensaio clínico, estes gastos serão absorvidos pela Marjan Farma Indústria Farmacêutica Ltda.

xiii - De acordo com valores previamente estabelecidos, os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo dispendidos na realização do supracitado estudo clínico.

xiv - Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (Fone 288 8330) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

xv - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

xvi - Aos voluntários do sexo feminino é condição indispensável para participação no ensaio clínico que não esteja grávida, comprovado pela sorologia (Beta-HCG).

Fortaleza,

Assinatura do voluntário

Manoel Odorico de Moraes - Fone 288 8201

Maria Elisabete Amaral de Moraes - Fone 288 8346 e 288 8250

Fernando A. Frota Bezerra - Fone 288 8060

Marne Carvalho de Vasconcellos – Fone 288-8250

ANEXO 4

Diário Preenchido pelos voluntários que fizeram uso do Tamaril® cápsulas por 28 dias ininterruptos

Data	Nº de evacuações 0= Ausente 1=Uma 2=Duas 3= ≥ 3	Consistência das fezes 1= pelotas separadas e duras 2= Formato tubular, duras 3= Formato tubular, com rachaduras na superfície. 4= Formato tubular, amolecidas e lisas 5=Glóbulos macios, bordas definidas 6= Fezes pastosas 7= Líquidas	Dor Abdominal 0=Ausente 1=presente, mas tolerável 2=presente, mas interfere nas funções normais como sono ou trabalho 3=impede as funções normais	Flatulência (Gases) 0=Ausente 1=presente, mas tolerável 2=presente, mas interfere nas funções normais como sono ou trabalho 3=impede as funções normais
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()
___/___/___	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3() 4() 5() 6() 7()	0() 1() 2() 3()	0() 1() 2() 3()

Uso de Medicação concomitante:

Data do uso	Nome da medicação e quantidade	Data do uso	Nome da medicação e quantidade

ANEXO 4 Escala utilizada para o preenchimento do diário pelos voluntários que fizeram uso do Tamaril[®] cápsulas por 28 dias ininterruptos.

ESCALA DE BRISTOL - FORMA DAS FEZES		
Tipo	Forma das fezes	Aparência
1	Pelotas separadas e duras, semelhantes a nozes	
2	Formato tubular, como lingüiça porém duras	
3	Formato tubular ou serpenteante, porém com rachaduras na superfície	
4	Formato tubular ou serpenteante, consistência amolecida e lisa	
5	Glóbulos macios com bordas definidas	
6	Pedaços fofos com extremidades irregulares, fezes pastosas	
7	Aquosas sem porções sólidas	Inteira mente Líquidas

**ANEXO 5 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
UNIVERSIDADE FAEDARL DO CEARÁ**

ANEXO 6 TABELAS

TABELA 03 – Parâmetros hematológicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Hematológica)			
	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas
Pré-estudo- controle	15,53 \pm 0,66	44,46 \pm 2,03	6,33 \pm 1,19	252,42 \pm 49,82
1ª avaliação (7 dias)	15,40 \pm 0,81	44,63 \pm 2,39	6,51 \pm 1,21	264,33 \pm 56,32
2ª avaliação (14 dias)	15,43 \pm 0,81	44,90 \pm 2,45	6,48 \pm 1,22	258,00 \pm 51,82
3ª avaliação (21 dias)	15,31 \pm 0,83	44,51 \pm 2,32	6,53 \pm 1,20	253,08 \pm 53,13
4ª avaliação (28 dias)	15,08 \pm 0,72	44,15 \pm 2,33	6,40 \pm 1,16	244,58 \pm 43,20
Pós-estudo	15,19 \pm 0,59	44,46 \pm 2,14	6,20 \pm 0,86	247,92 \pm 47,93
VALORES DE REFERÊNCIA	13,5-18 (g/dL)	40-54 (%)	5-10 (10^3mm^3)	150-450 (10^3mm^3)

TABELA 04 – Parâmetros hematológicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Hematológica)			
	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas
Pré-estudo- controle	13,46±0,84	39,20±2,54	7,98±1,44	278,67±43,31
1ª avaliação (7 dias)	13,07±0,94	38,72±2,74	7,88±1,43	281,00±61,39
2ª avaliação (14 dias)	12,89±0,83	38,38±2,52	7,78±1,74	274,75±58,69
3ª avaliação (21 dias)	12,95±0,98	38,36±2,43	7,42±1,47	264,42±34,37
4ª avaliação (28 dias)	12,84±1,02	38,83±2,88	7,32±1,62	267,33±58,39
Pós-estudo	12,68±0,88	38,14±2,62	7,21±1,20	270,00±56,74
VALORES DE REFERÊNCIA	11,5-16,4 (g/dL)	36-47 (%)	5-10 (10 ³ mm ³)	150-450 (10 ³ mm ³)

TABELA 05 – Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média ± DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Hepática)			
	TGO	TGP	Gama GT	Fosfatase alcalina
Pré-estudo- controle	22,75±3,74	25,98±11,93	24,42±11,42	194,67±43,08
1ª avaliação (7 dias)	21,92±7,03	28,82±25,65	25,00±12,87	200,25±52,55
2ª avaliação (14 dias)	22,00±7,78	26,98±19,99	23,92±13,78	195,92±56,91
3ª avaliação (21 dias)	23,83±8,99	28,14±18,86	22,92±11,41	199,83±45,78
4ª avaliação (28 dias)	22,08±5,85	24,68±13,46	22,83±10,24	199,83±43,42
Pós-estudo	25,67±7,06	30,34±14,87	22,08±12,15	194,50±39,39
VALORES DE REFERÊNCIA	17-59 (U/L)	21-72 (U/L)	15-73 (U/L)	38-126 (U/L)

TABELA 06 – Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média ± DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Parâmetros avaliados (Função Hepática)			
--	--	--	--

	Bilirrubina Total	Proteínas totais	Albumina
Pré-estudo- controle	0,65±0,17	7,37 ± 0,30	4,22 ± 0,13
1ª avaliação (7 dias)	0,70±0,24	7,14 ± 0,23	4,13 ± 0,17
2ª avaliação (14 dias)	0,67±0,23	7,06 ± 0,21	4,16 ± 0,19
3ª avaliação (21 dias)	0,72±0,23	7,18 ± 0,30	4,13 ± 0,19
4ª avaliação (28 dias)	0,58±0,18	7,08 ± 0,21	4,13 ± 0,12
Pós-estudo	0,73±0,28	7,18 ± 0,21	4,18 ± 0,12
VALORES DE REFERÊNCIA	0,2-1,3 (mg/dL)	6,3-8,2 (g/dL)	3,4-4,8 (g/dL)

TABELA 07 – Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média ± DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Hepática)			
	TGO	TGP	Gama GT	Fosfatase alcalina
Pré-estudo- controle	17,25± 6,18	14,84±6,82	15,08±6,92	153,42±46,80
1ª avaliação (7 dias)	17,00±4,67	13,97±5,31	16,25±9,91	137,50±41,86
2ª avaliação (14 dias)	16,42±4,34	14,55±7,06	15,83±10,03	130,25±38,07
3ª avaliação (21 dias)	16,58±4,10	14,74±7,62	15,08±7,50	154,00±39,13
4ª avaliação (28 dias)	16,92±4,21	12,98±5,14	15,75±7,06	154,92±48,19
Pós-estudo	17,50±4,81	14,20±5,92	16,50±6,69	153,83±44,53
VALORES DE REFERÊNCIA	17-59 (U/L)	21-72 (U/L)	15-73 (U/L)	38-126 (U/L)

TABELA 08 – Parâmetros para avaliação da função hepática semanal (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Hepática)		
	Bilirrubina Total	Proteínas totais	Albumina
Pré-estudo- controle	0,65 \pm 0,35	7,34 \pm 0,46	4,05 \pm 0,24
1ª avaliação (7 dias)	0,68 \pm 0,34	6,98 \pm 0,32	3,95 \pm 0,22
2ª avaliação (14 dias)	0,49 \pm 0,19	6,97 \pm 0,31	3,98 \pm 0,12
3ª avaliação (21 dias)	0,51 \pm 0,15	6,95 \pm 0,33	3,84 \pm 0,23
4ª avaliação (28 dias)	0,60 \pm 0,26	7,01 \pm 0,40	3,93 \pm 0,17
Pós-estudo	0,69 \pm 0,31	8,91 \pm 0,28	3,87 \pm 0,20
VALORES DE REFERÊNCIA	0,2-1,3 (mg/dL)	6,3-8,2 (g/dL)	3,4-4,8 (g/dL)

TABELA 09 – Parâmetros renais avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros Avaliados (Função Renal)	
	Uréia	Creatinina
Pré-estudo- controle	27,23 \pm 3,33	0,82 \pm 0,11
1ª avaliação (7 dias)	22,84 \pm 4,68	0,79 \pm 0,12
2ª avaliação (14 dias)	25,93 \pm 6,07	0,88 \pm 0,08
3ª avaliação (21 dias)	28,35 \pm 9,03	0,92 \pm 0,12
4ª avaliação (28 dias)	26,39 \pm 5,74	0,83 \pm 0,11
Pós-estudo	30,33 \pm 8,32	0,83 \pm 0,33
VALORES DE REFERÊNCIA	15-43 (mg/dL)	0,7-1,4 (mg/dL)

Tabela 10: Parâmetros renais avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros Avaliados (Função Renal)	
	Uréia	Creatinina
Pré-estudo- controle	20,87 \pm 6,47	0,63 \pm 0,12
1ª avaliação (7 dias)	16,98 \pm 6,17	0,55 \pm 0,08
2ª avaliação (14 dias)	22,06 \pm 6,37	0,65 \pm 0,08
3ª avaliação (21 dias)	21,63 \pm 4,89	0,64 \pm 0,08
4ª avaliação (28 dias)	19,78 \pm 3,64	0,58 \pm 0,08
Pós-estudo	25,20 \pm 7,47	0,61 \pm 0,17
VALORES DE REFERÊNCIA	10-50 (mg/dL)	0,5-0,9 (mg/dL)

Tabela 11: Parâmetros metabólicos avaliados semanalmente (média \pm DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Metabólica)			
	Glicemia	Colesterol total	Triglicerídeos	Ácido Úrico
Pré-estudo- controle	85,08 \pm 8,56	170,33 \pm 35,96	113,50 \pm 52,29	5,23 \pm 0,52
1ª avaliação (7 dias)	84,50 \pm 7,76	167,83 \pm 32,23	115,25 \pm 39,51	5,31 \pm 0,80
2ª avaliação (14 dias)	90,75 \pm 6,22	167,83 \pm 33,32	125,83 \pm 64,39	4,99 \pm 0,75
3ª avaliação (21 dias)	86,50 \pm 8,25	168,83 \pm 33,15	130,25 \pm 51,20	5,04 \pm 0,85

dias)				
4ª avaliação (28 dias)	89,67±6,25	167,42±30,38	122,25±41,56	5,19 ± 0,95
Pós-estudo	87,00±4,88	166,50±30,63	120,58±48,70	5,27 ± 0,61
VALORES DE REFERÊNCIA	70-110 (mg/dL)	<200 (mg/dL)	<200 (mg/dL)	2,4-5,7 (mg/dL)

Tabela 12: Parâmetros metabólicos avaliados semanalmente (média ± DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Parâmetros avaliados (Função Metabólica)			
	Glicemia	Colesterol total	Triglicéridos	Ácido Úrico
Pré-estudo- controle	84,67±8,50	168,67±32,36	78,42±34,85	4,08 ± 0,80
1ª avaliação (7 dias)	82,42±8,41	171,25±29,15	79,58±35,56	4,08 ± 0,66
2ª avaliação (14 dias)	88,50±6,27	170,25±29,06	74,17±27,32	3,97 ± 0,81
3ª avaliação (21 dias)	86,33±6,30	168,33±28,84	76,25±25,78	3,87 ± 0,92
4ª avaliação (28 dias)	88,67±5,99	172,58±33,04	87,75±40,48	3,95 ± 0,70
Pós-estudo	84,50±8,52	173,83±32,92	35,42±31,02	3,90 ± 0,78
VALORES DE REFERÊNCIA	70-110 (mg/dL)	<200 (mg/dL)	<200 (mg/dL)	2,4-5,7 (mg/dL)

Tabela 13: Valores de eletrólitos avaliados semanalmente (média ± DP) em 12 voluntários do sexo masculino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Eletrólitos	
	Sódio	Potássio

Pré-estudo- controle	141,92±5,68	4,18±0,33
1ª avaliação (7 dias)	141,50±2,75	4,08±0,36
2ª avaliação (14 dias)	139,42±1,78	4,13±0,34
3ª avaliação (21 dias)	140,17±1,80	4,24±0,39
4ª avaliação (28 dias)	139,67±2,29	4,08±0,24
Pós-estudo	140,25±1,54	4,12±0,15
VALORES DE REFERÊNCIA	135-145 (mmol/dL)	3,5-5,1 (mmol/dL)

Tabela 14: Valores dos eletrólitos avaliados semanalmente (média ± DP) em 12 voluntários do sexo feminino após uma administração diária de 2 cápsulas de Tamaril® durante 28 dias consecutivos.

Período	Eletrólitos	
	Sódio (mmol/dL)	Potássio (mmol/dL)
Pré-estudo- controle	140,92±4,21	4,21±0,22
1ª avaliação (7 dias)	140,75±1,91	4,20±0,33
2ª avaliação (14 dias)	138,50±1,24	4,03±0,20
3ª avaliação (21 dias)	139,50±2,07	3,87±0,92
4ª avaliação (28 dias)	137,58±3,45	3,95±0,70
Pós-estudo	138,42±1,83	3,90±0,78
VALORES DE	135-145 (mmol/dL)	3,5-5,1 (mmol/dL)

REFERÊNCIA		
------------	--	--