

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e
Inovação Tecnológica em Medicamentos
Tese de Doutorado**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA DO EXTRATO ETANOLICO
BRUTO DE *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) EM RATOS**

GUILHERME EDUARDO NUNES DIAS

João Pessoa/2015

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e
Inovação Tecnológica em Medicamentos
Tese de Doutorado**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA DO EXTRATO ETANOLICO
BRUTO DE *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) EM RATOS**

GUILHERME EDUARDO NUNES DIAS

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos, do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Desenvolvimento e
Inovação Tecnológica em Medicamentos

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida

Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice

Profa. Dra. Igara Oliveira Lima

Profa. Dra. Kelly Samara de Lira Mota

João Pessoa/2015

D541a Dias, Guilherme Eduardo Nunes.

Avaliação da toxicidade não-clínica do extrato etanólico bruto de *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) em ratos / Guilherme Eduardo Nunes Dias.- João Pessoa, 2015. 85f.

Orientadora: Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS

1. Medicamentos - inovação tecnológica. 2. *Pilosocereus gounellei*. 3. Toxicidade. 4. Inflamação. 5. Genotoxicidade. 6. Plantas medicinais.

UFPB/BC

CDU: 615(043)

GUILHERME EDUARDO NUNES DIAS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA DO EXTRATO ETANOLICO BRUTO
DE *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) EM RATOS

Aprovada em 02 / 12 /2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba) Orientadora

Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba) Examinador Interno

Temilce Simões de Assis Cantalice
(Universidade Federal da Paraíba) Examinadora Interna

Igara Oliveira Lima
(Universidade Federal de Campina grande) Examinadora Externa

Kelly Samara de Lira Mota
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte) Examinadora Externa

DEDICATÓRIA

A Deus, pela fé que me mantém vivo e fiel a vida honesta de trabalho e de estudo;

A minha mãe Maria Edite Nunes Dias que com amor sempre me incentivou aos estudos e me ensinou a agir de forma honesta e correta diante dos desafios que a vida nos trás;

A meu Pai Edmar de Oliveira Dias, meus Irmãos Yuri Henrique Nunes Dias e Felipe Augusto Nunes Dias e aos meus sobrinhos Pedro Augusto, Bernardo Jose e Arthur Felipe que souberam entender minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no doutorado até a conclusão desta tese;

Com muito amor Dedico a minha esposa Ivana Ferreira Gorgonio Dias que sempre esteve ao meu lado nessa caminhada aguentando meus momentos de ansiedade e estresse nos anos que me dediquei ao doutorado e em especial a minha filha Isabel que esta por vim que com a notícia da sua chegada me deu mais força e incentivo para concluir esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me deu força e me guiou em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Edmar e Maria Edite pela educação, amor e ensinamentos morais que me ajudaram a superar todas as dificuldades que apareceram na minha vida.

A minha esposa Ivana meu porto seguro que sempre acreditou em mim até mais do que eu mesmo acreditei, me incentivando com amor, companheirismo, carinho e me dando força diariamente para realizarmos nossos sonhos. A Lady e Duke que com amor e carinho também fazem parte da nossa família.

A meu irmão e amigo Yuri que sempre me apoiou e deu força para nunca desistir dos meus objetivos e lutar por aquilo que acredito.

A meu irmão Felipe que mesmo distante sempre torceu por mim e me ajudou nessa caminhada.

Aos meus sobrinhos Pedro, Bernardo e Arthur que apesar da distancia me apoiaram com amor e carinho.

A minha vó Edite que com sua sabedoria e ternura serve de exemplo para toda a nossa família.

Aos meus tios e tias que me apoiam com seu amor e carinho contribuindo assim para essa conquista.

Aos meus primos e primas que apesar da grande distância moram no meu coração.

A todos da minha Família que me apoiam e incentivam nessa jornada mesmo a distância.

A minha orientadora Profa. Dra. Margareth Diniz que me acolheu no seu grupo de pesquisa e que serve de exemplo para todos nós do LABETOX não tenho palavras pra expressar a minha gratidão pela oportunidade que me foi dada.

Ao meu amigo Josué Ramalho que me apoiou e me ajudou desde o início do doutorado e com sua amizade os desafios e as disciplinas ficavam sempre mais leves e que considero um irmão.

Aos meus amigos da iniciação científica Igara, Kelly, Juliana e Sabrina (quarteto fantástico) que me proporcionaram momentos e ensinamentos que irei carregar comigo pra sempre, a amizade de vocês foi essencial para nunca me render diante das dificuldades.

Aos amigos e companheiros do LABETOX Mateus, Andressa, Fernanda e Camila.

A Profa. Dra. Caliandra e a todos que fazem parte do LABETOX.

A Profa. Dra Hilzeth pela parceria e contribuição.

A todos os professores da graduação de farmácia que contribuíram com a minha formação.

A todos os Professores que fazem parte do DITM que contribuíram na minha formação.

A todos os amigos da graduação que vão ficar sempre na minha lembrança pelos momentos únicos que passamos.

À José Crispim Duarte e a seu Luís, pelo cuidado com os animais de experimentação.

À todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que não por isso deixam de ser importantes por terem de alguma forma contribuído para a realização deste doutorado, meus sinceros agradecimentos.

Gostaria também de agradecer aos animais de experimentação, pelos quais tenho grande respeito e que deram suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos membros das bancas de qualificação e de defesa pelas sugestões que muito contribuíram com a minha formação e enriqueceram o trabalho.

A CAPES e a UFPB pelo apoio financeiro e as condições para a realização do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

DIAS, GUILHERME EDUARDO NUNES. Avaliação da Toxicidade Não-Clínica do Extrato Etanólico Bruto de *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) em ratos (Tese). Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos

Pilosocereus gounellei é uma planta popularmente conhecida como xique-xique, sendo tradicionalmente empregada pela população do nordeste para o tratamento de inflamações prostáticas. Neste sentido nos propomos realizar uma avaliação toxicológica não-clínica do extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei* (fac weber) (Pg-EEtOH) seguindo o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (01/2013). Para tanto foi realizado o ensaio biológico utilizando Artemia salina para determinar a CL₅₀ e também foram utilizados ratos Wistar e camundongos Swiss de ambos os sexos. Inicialmente foi realizada uma triagem farmacológica com intuito de verificar os efeitos do extrato sobre os parâmetros fisiológicos desses animais. No ensaio toxicológico agudo foi utilizada a dose única de 2000 mg/kg por via oral, após o tratamento foram observados durante 14 dias os seguintes parâmetros: os efeitos comportamentais durante 72 horas; consumo de água e ração diariamente; bem como a evolução ponderal semanalmente. Após o 14 dia foi determinada a DL₅₀. Os animais sobreviventes foram sacrificados para análise dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, avaliação macroscópica dos órgãos e exames histopatológicos nos órgãos alterados. No estudo toxicológico crônico foram administradas doses fracionadas do Pg-EEtOH durante 90 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: temperatura, glicemia, consumo de água e ração, evolução ponderal, atividade exploratória e motora dos animais, parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos em estudo. A genotoxicidade foi avaliada através do teste do micronúcleo em células hematológicas periféricas de roedores *in vivo*. A atividade antiinflamatória foi avaliada através do modelo de edema de pata induzida por carragenina. O Pg-EEtOH apresentou uma CL₅₀ de 547,3 µg/mL, uma DL₅₀ > 2000 mg/kg, não promoveu alterações comportamentais, porém induziu uma diminuição significativa no consumo de água e ração. Nas fêmeas foi observado um aumento nos níveis de séricos de ureia e uma diminuição nos níveis de creatinina. No ensaio crônico o Pg-EEtOH não alterou de forma significativa a temperatura, a glicemia, a evolução ponderal, o consumo de água e ração dos animais. Na análise comportamental não foi observado alteração significativa nos parâmetros avaliados também não ocorreu nenhuma alteração no sistema motor autônomo desses animais. A análise dos Parâmetros bioquímicos e hematológicos não apresentou alteração significativa quando comparado ao grupo controle. Na pesquisa de micronúcleos pode-se observar que o extrato não induziu a formação de micronúcleos quando comparado com o grupo controle. No modelo de edema de pata foi observado que apenas a dose de 25 mg/kg reduziu significativamente o edema. Com base nos dados obtidos pode-se observar que o Pg-EEtOH apresentou baixa toxicidade e genotoxicidade e apresentou atividade antiinflamatória.

Palavras chaves: *Pilosocereus gounellei*, toxicidade, inflamação, genotoxicidade, plantas medicinais.

ABSTRACT

DIAS, GUILHERME EDUARDO NUNES. Evaluation of Non-Clinical Toxicity of the crude ethanol extract *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) em ratos (Tese). Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos

Pilosocereus gounellei popularly known as xique-xique traditionally been used by the northeast population for the treatment of prostatic inflammation. Its wide use in folk medicine justifies the toxicity studies to ensure the safety of its use. In this sense we propose to conduct a pre-clinical toxicological evaluation of the ethanol extract of *Pilosocereus gounellei* K. Schum (Pg-EEtOH) following the guide for the conduct of non-clinical toxicology and safety pharmacology necessary for the development of drugs (01/2013). For this bioassay was performed using *Artemia salina* to determine the LC50 and were also Wistar rats and Swiss mice of both sexes for toxicological analysis in order to verify the effects of the extract on the physiological parameters of these animals. In the acute toxicology test is used a single dose of 2000 mg / kg orally after treatment are observed for 14 days for the following parameters: the behavioral effects at 72 hours; consumption of water and food daily; as well as the weekly weight gain. After the 14th day will determine the LD50. The surviving animals will be sacrificed for analysis of biochemical, hematological, macroscopic evaluation of organs and histopathology in altered organs. In the chronic toxicity study will be administered divided doses of Pg-EEtOH 90 days will be assessed the following parameters: temperature, blood sugar, consumption of water and food, weight gain, exploratory and motor activity of animals, hematological and biochemical parameters of rats in study. The genotoxicity was evaluated by the micronucleus test in peripheral haematological cells in vivo Rodents. The anti-inflammatory activity was assessed by paw edema model induced by carrageenin. Pg-EEtOH showed a LC50 of 547.3 g / ml, an LD50 > 2000 mg / kg did not cause behavioral changes, caused a significant reduction in the consumption of water and feed. In females it was observed an increase in serum levels of urea and a decrease in creatinine levels. The Pg-EEtOH did not change the temperature or blood glucose of significantly animals also did not change the consumption of water and food and not the weight gain. Behavioral analysis of animals no significant changes were not found in the evaluated parameters also there has been no change in the autonomic motor system of these animals. The biochemical and hematological parameters there were no significant change when compared to the control group. In micronuclei research we can see that the extract did not induce micronuclei formation compared to the control group. In the paw edema model it was observed that only the dose of 25 mg / kg significantly reduced the edema. Based on these data we observe that the Pg-EEtOH has a low toxicity, and genotoxicity besides having anti-inflammatory activity.

Key words: *Pilosocereus gounellei*, toxicity, inflammation, genotoxicity, medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Avaliação da toxicidade crônica do extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei* (fac weber) in rats

Grafico 01: Numero de micronúcleos em células sanguíneas de camundongos tratados com o Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio de pesquisa de micronúcleos 72

LISTA DE TABELAS

Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of ethanolic extract from *Pilosocereus gounellei* (fac weber) in rats

Table 1: Effects of oral administration of PgEEtOH at 2000 mg / kg on rats for the consumption of water and feed for 14 days.....	41
Table 2: Effect of PgEEtOH oral administration at 2000 mg / kg on organs per body weight (%) in rats.....	42
Table 3: Effect of Pg-EEtOH 2000 mg / kg oral administrations on the hematological parameters in rats.....	43
Table 4: Effect of oral administrations Pg-EEtOH 2000 mg / kg on biochemical parameters of rats.....	44
Table 5: Paw edema induced by carrageenan in rats, effects of oral administration of doses at 25, 50 and 100 mg / kg of PG-EEtOH.....	45
Table 6: Percentage inflammation inhibition after oral administrations of Pg-EEtOH in doses of 25, 50, and 100 mg / kg in rats.....	45

Avaliação da toxicidade crônica do extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei* (fac weber) in rats

Tabela 1: Temperatura corporal (°C) de ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio de toxicidade crônico.....	60
Tabela 2: Efeito da administração crônica de diferentes doses do Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> sobre a glicemia dos animais.....	61
Tabela 3: Consumo semanal de água por ratos durante os 90 dias de tratamento crônico com diferentes doses do Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i>	62
Tabela 4: Consumo semanal de ração por ratos durante os 90 dias de tratamento crônico com diferentes doses do Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i>	64

Tabela 5: Variação da evolução ponderal de ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio crônico.....	65
Tabela 6: Número de ambulações no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio crônico.....	66
Tabela 7: Número de levantamentos no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio crônico.....	66
Tabela 8: Número de Grooming no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio crônico.....	67
Tabela 9: Número de defecações no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio crônico.....	67
Tabela 10: Tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do aparelho Rota –rod, de ratos durante o tratamento crônico com do Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i>	68
Tabela 11: Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de ratos wistar tratados com o Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio de toxicidade crônico	69
Tabela 12: Parâmetros Bioquímicos obtidos do sangue de ratos wistar tratados com o Extrato Etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> durante o ensaio de toxicidade crônico.....	71

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas.

Pg-EtOH: Extrato etanólico bruto de *Pilosocereus gounellei*

AAPCC: Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SUS: Sistema Único de Saúde

PPPM: Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais

CEME: Central de Medicamentos

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EtOH: Etanol

EEB: Extrato etanólico Bruto

CL₅₀: Concentração Letal 50%

IPeFarM: Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

SNC: Sistema Nervoso Central

SNA: Sistema nervoso Autonomo

HEM: Hemácias

HCT: Hematócrito

HGB: Hemoglobina

VCM: Volume Corpuscular Médio

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

CHCM: Concentração Da Hemoglobina Corpuscular Média

CHDL: *HIGH DENSITY LIPOPROTEINS* (**Lipoproteínas de Alta Densidade**)

AST: Aspartato Amino Transferase

ALT: Alanina Amino Transferase

DL₅₀: Dose letal 50%

Obs. As abreviaturas, símbolos e siglas utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1-Introdução	16
1.1-Considerações gerais	16
1.2- Considerações sobre a família Cactaceae	20
1.3. Considerações sobre o gênero <i>Pilosocereus</i>	22
1.4. Aspectos toxicológicos	23
2-Objetivos	24
3- Materiais e métodos	25
3.1. Local da pesquisa	25
3.2. Materiais	25
3.2.1 Material botânico	25
3.2.2 Animais	25
3.2.3 Aparelhagem	26
3.2.4 Droga utilizada	27
3.3 Metodologia	27
3.3.1 Preparação do extrato etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> (F.A.C. Weber)	27
3.3.2 Determinação da Concentração Letal 50 % (CL ₅₀)	27
3.3.3 Ensaio toxicológico agudo	28
3.3.3.1 Análise laboratorial do sangue	28
3.3.3.1.1 Parâmetros hematológicos	29
3.3.3.1.2 Parâmetros bioquímicos	29
3.3.3.2 Exame anatomopatológico	29
3.3.4 Ensaios toxicológicos crônicos	30
3.3.4.1 Consumo de água e alimento	30
3.3.4.2 Peso corporal	30
3.3.4.3 Temperatura	31
3.3.4.4 Glicemia	31
3.3.4.5 Avaliação comportamental (Teste do campo aberto) e motora (Teste do Rota-rod)	31
3.3.4.6 Avaliação laboratorial do sangue	32
3.3.4.7 Exame anatomopatológico	32

3.3.6 Teste do Micronúcleo em células sanguíneas de Roedores <i>in vivo</i>	32
3.3.6 Edema de pata induzido por carragenina	33
3.4. Análise estatística	33
4-Resultados e discussão	34
4.1- Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of ethanolic extract from <i>Pilosocereus gounellei</i> (fac weber) in rats	35
4.2- Avaliação da toxicidade crônica do extrato etanólico de <i>Pilosocereus gounellei</i> (fac weber) in rats	52
5-CONCLUSÕES	78
6-REFERÊNCIAS	79

1 Introdução

1.1 Considerações gerais

As plantas medicinais são largamente utilizadas pelo homem no tratamento dos seus males desde os primórdios da civilização. Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, elas adquiriram fundamental importância na medicina popular (MARTINS et al., 2000). Inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para a cura ou mesmo alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade (CARLINI, 1995).

As substâncias de origem vegetal representam uma alternativa para a população que, em sua maioria, não tem poder aquisitivo ou acesso à medicina assistencial. Diante da necessidade, cada vez maior, por medicamentos, a busca por fontes alternativas de agentes terapêuticos e a implementação de um projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais é de grande interesse para a comunidade científica (SANTOS, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 65 a 80% da população que vive nos países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas para seus cuidados primários (CALIXTO, 2000), porém, este uso deve ser de forma segura, de modo a garantir que eventos adversos não atrapalhem a terapêutica, ou mesmo, prejudiquem a saúde do paciente, como uma epidemia de hepatite ocorrida na França, após a comercialização de cápsulas de têucrio (*Teucrium chamaedrys* L. – Labiateae) associado à camomila, prescritas para dietas do emagrecimento (LOEPER et al., 1994), e na Bélgica, onde pelo menos 70 pessoas precisaram submeter-se a um transplante renal e diálise, por fibrose intersticial renal, depois de tomar um preparado vegetal, também para emagrecimento. Já nos Estados Unidos, a efedra (*Ephedra sinica*), tradicionalmente usada para tratar congestão respiratória, levou à morte de pelo menos 12 pessoas, além de provocar diversos ataques cardíacos (JUNIOR et al, 2005).

O uso de plantas e derivados tem percorrido uma longa trajetória histórica, sempre na tênue linha divisória entre o bem e o mal, ou seja, entre a restauração da saúde e o surgimento de efeitos colaterais e/ou adversos. Isso talvez ocorra, principalmente, pelo fato de que o uso “terapêutico” de plantas se expandiu pelo

inconsciente coletivo popular como algo inofensivo seguindo a máxima: “se é natural, não faz mal”. Pensamento este, incoerente com os registros de intoxicação humana por plantas, inclusive por aquelas usadas como medicinais (MARIZ, 2006).

Segundo a Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações (AAPCC), só no ano de 1998 foram registradas 122.578 intoxicações por plantas nos Estados Unidos. No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), nos anos de 1985 a 1993 foram registrados 8.236 casos de intoxicações por plantas. Dados mais recentes informam que o problema persiste. Apenas em 2003, ocorreram 1.955 intoxicações por plantas em nosso país (BORTOLETTO et al., 1996; SINITOX, 2003; LING et al, 2005).

A implantação da fitoterapia nos serviços de saúde é de fundamental importância sendo regulamentado pelo relatório Ciplan Nº 8/88, que cria procedimentos e rotinas relativas a sua prática nas unidades assistências médicas. O relatório da 10ª Conferencia Nacional de Saúde, realizada em 1996, que aponta no item 286.12: “incorporar no SUS, em todo o País, as práticas de saúde como a Fitoterapia, acupuntura e homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares”, e no item 351.10: “o Ministério da Saúde deve incentivar a Fitoterapia na assistência farmacêutica pública e elaborar normas para a utilização, amplamente discutidas com os trabalhadores em saúde e especialistas, nas cidades onde existir maior participação popular, com gestores mais empenhados com a questão da cidadania e dos movimentos populares” (BRASIL, 1988).

A portaria nº 3916/98, que aprova a Política Nacional de Medicamentos, a qual estabelece no âmbito de suas diretrizes para o desenvolvimento científico e tecnológico que deverá ser continuado e expandido o apoio as pesquisas que visem o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacional, enfatizando a certificação de suas propriedades “medicamentosas” (BRASIL, 1998).

O Relatório do Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitotérapicos e Assistência Farmacêutica, realizado em 2003, que entre as suas recomendações, contempla “integrar no Sistema Único de Saúde o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos” (BRASIL, 2004).

O Relatório da 12ª Conferência Nacional de Saúde, realizada em 2003, que aponta a necessidade de se “investir na pesquisa e desenvolvimento de tecnologia para produção de medicamentos homeopáticos e da flora brasileira, favorecendo a

produção nacional e a implantação de programas para uso de medicamentos fitoterápicos nos serviços de saúde, de acordo com as recomendações da 1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica” (BRASIL, 2004).

A Resolução nº 338/04 do Conselho Nacional de Saúde que aprova a Política Nacional de Assistência Farmacêutica, a qual contempla, em seus eixos estratégicos, a “definição e pactuação de ações que visem à utilização das plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos no processo de atenção à saúde, com respeito aos conhecimentos tradicionais incorporados, com embasamento científico, com adoção de políticas de geração de emprego e renda, com qualificação e fixação de produtores, envolvimento dos trabalhadores em saúde no processo de incorporação dessa opção terapêutica e baseada no incentivo à produção nacional, com a utilização da biodiversidade existente no País” (BRASIL, 2004).

Atualmente, existem programas estaduais e municipais de Fitoterapia, desde aqueles com memento terapêutico e regulamentação específica para o serviço, implementados há mais de 10 anos, até aqueles com início recente ou com pretensão de implantação. Em levantamento realizado pelo Ministério da Saúde no ano de 2004, em todos os municípios brasileiros, contemplando 22 unidades federadas (BRASIL, 2004). Estas informações nos trazem uma responsabilidade muito maior no sentido de se buscar conhecer não somente a eficácia como também a segurança de produtos extremamente usados pela população, como as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos, a fim de melhorar a saúde e, consequentemente, a qualidade de vida das pessoas. Portanto, o uso irracional de plantas medicinais e produtos derivados se apresenta como um grave problema de saúde pública em nosso país (JUNIOR et al, 2005).

Nas últimas décadas, os esforços conjuntos da comunidade científica, dos profissionais de saúde, educadores e autoridades competentes têm demonstrado preocupação crescente, a fim de implementar uma política mais eficaz no uso racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos.

Um marco realmente importante, no estabelecimento de uma política pública de utilização de plantas medicinais pelas autoridades brasileiras, foi à criação, em 1983, do PPPM (Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais) pela CEME (Central de Medicamentos), órgão do Ministério da Saúde, na época. Neste mesmo ano, foi

nomeada por este órgão, a Comissão de Ensaios Não-Clínicos e Clínicos (BRASIL, 1983), com a finalidade de melhorar a norma vigente sobre a avaliação farmacológica e toxicológica de novos produtos derivados de plantas (BRASIL, 1978).

A partir daí, várias medidas regulatórias se sucederam sempre no intuito de transformar a fitoterapia em uma prática terapêutica cada vez mais racional. De um modo específico, a preocupação com a segurança de fitoterápicos tem se materializado, ao longo dos anos, em medidas legais que normatizam os estudos toxicológicos para o registro destes produtos.

No Brasil, existe uma regulamentação específica para a realização de estudos de toxicidade não-clínica e clínica com vistas ao registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 1996). Recentemente, esta mesma agência, publicou um guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, através da Resolução Específica nº90/04 (BRASIL, 2004).

No ano de 2006, o decreto nº 5.813 de 22 de junho, aprovou e deu outras providências a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de garantir a população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

No ano de 2013 a ANVISA publicou o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos, que tem como objetivo orientar a condução desses estudos durante o desenvolvimento de medicamentos. A partir do guia pretende-se que os estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de novos medicamentos sejam realizados de forma harmonizada e cientificamente válida. Além disso, espera-se que eles possam fornecer dados confiáveis para dar subsídios às futuras pesquisas clínicas.

1.2- Considerações sobre a família Cactaceae

A família *Cactaceae*, dicotiledônea, é composta de 100 gêneros e 1500 espécies (BARTHLOTT; HUNT, 1993) com ampla distribuição em regiões áridas e semi-áridas do mundo (SAWAYA; KHAN, 1982; BARBERA, 2001; REBMAN; PINKAVA, 2001).

No Brasil, esta família é composto por 37 gêneros, sendo 14 endêmicos e cerca de 233 espécies, destas 144 são endêmicas. As plantas desta família estão distribuídas por todo o território brasileiro (ZAPPI et al., 2010). Na região da caatinga brasileira foram registradas a presença de 58 espécies, das quais 42 são endêmicas dessa região. (QUEIROZ et al., 2006). Dentre as espécies que ocorrem no semiárido brasileiro, destacam-se as comumente denominadas de mandacaru (*Cereus jamacaru* P.DC.), facheiro (*Pilosocereus pachycladus*), xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) e coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis*), existindo variações morfológicas e de porte, dependendo da região (AGRA, 1996; TAYLOR; ZAPPI, 2004).

Na sua utilização como forrageiras, as Cactáceas atuam como suplemento de fontes de alimentos para rebanhos de bovinos, caprinos e ovinos. Como plantas medicinais, são muitas as potencialidades das Cactáceas, baseadas em informações oriundas em sua maioria da cultura popular mais que da investigação científica (BRASIL, 2008). Andrade et al. (2006), em pesquisa realizada em área do interior da Bahia, constatou a grande importância de espécies desta família para as populações locais, integrando um amplo espectro de uso popular e detectou que a conexão médica humanos/Cactáceas na região é antiga e, ao mesmo tempo, atual. A utilização medicinal de Cactáceas pelo sertanejo baiano é baseada em um conhecimento etnobotânico parcialmente compatível com os achados da ciência. Embora a medicina erudita descreva pouco as potencialidades medicinais de algumas destas espécies, moradores de municípios do semiárido baiano possuem este conhecimento, inclusive por meio de informações acumuladas através de gerações, inseridas no ambiente em que vivem. Alguns dados obtidos são convergentes com a literatura e muitas informações têm originalidade, sugerindo necessidade de aprofundamento através de pesquisas.

Segundo Andrade et al. (2006), é estranho que na farmacopéia brasileira (1988) não haja citações de cactáceas dentre os fitoterápicos. Por outro lado, encontra-se à venda em farmácias comuns, dois fitoterápicos chamados de elixir sanativo e tintura de cactus. O elixir, segundo o laboratório que o fabrica (Laperli) teria em sua composição o mandacaru (*Cereus hildmannianus*) e outras plantas, como “o angico (*Piptadenia colubrina*), a aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e o camapu (*Physalis angulata*)”. O produto é recomendado para o tratamento tópico de ferimentos, em geral, cortes, contusões, herpes labial e picadas de insetos; gargarejos, contra afecções bucais; banhos de assento para higiene íntima e hemorróidas. Na bula, consta que os resultados medicinais obtidos são atribuídos às propriedades farmacológicas dos extratos vegetais que compõem a formulação, informando-se que os extratos do *Cereus hildmannianus* (sic.), apresentariam propriedades antimicrobianas, úteis à assepsia das regiões lesadas. O segundo medicamento fitoterápico, fabricado pelo laboratório Klein, teria em sua composição o *Cereus brasiliensis*, sem associação com outras plantas. Na bula, consta que a tintura de cactus é utilizada para o tratamento de diversas cardiopatias e que de acordo com a Portaria nº 6, de 31/01/95 do SVS/MS este produto é baseado em indicações tradicionais e encontra-se em estudo para avaliação científica das indicações terapêuticas e da toxicidade.

No México, Cactáceas são amplamente utilizadas na medicina tradicional por curandeiros e tribos indígenas, com diversos fins: analgésicos, antibióticos, anti-inflamatório e diuréticos; para tratar problemas intestinais, tosses, afecções cardíacas e nervosas; curar alguns tipos de úlceras e para o controle de diabetes e colesterol, dentre outras utilidades (HOLLIS; SHEINVAR, 1995; BARBERA et al., 1999).

Levando-se em conta que dentre as relações humanos/vegetais, no Nordeste semiárido, o conhecimento da relação etnomédica de Cactáceas encontra-se disperso na cultura popular e na literatura e que, até agora, não foi feito um esforço para sua sistematização, depreende-se da grande importância de estudos sobre o tema. Considere-se, ainda, a possibilidade de serem gerados produtos a partir dessas plantas, gerando riquezas para populações habitando os locais mais pobres da região, desde que os órgãos de fomento financiem atividades de pesquisa, inclusive abrangendo sistemas de cultivo e de produção. Cactos são uma

realidade no Nordeste seco, adaptados aos mais variados ecossistemas, um sinal de esperanças para populações carentes (AGRA et al., 2008).

1.3. Considerações sobre o gênero *Pilosocereus*

O gênero *Pilosocereus* pertence à subfamília Cactoideae, tribo Cereeae, sendo o maior gênero desta, com 35 espécies distribuídas do México ao Paraguai, mas com a maior diversidade de espécies no Brasil, onde eles ocorrem em uma série de ambientes diferentes, incluindo a caatinga, restinga, e campos rupestres (MARTINS, 2007).

No que tange a quimiotaxonomia, Meiado e colaboradores realizaram um screening fitoquímico na polpa dos frutos das espécies *Pilosocereus tuberculatus* (caixacubri), *Pilosocereus pachycladus* (facheiro) e *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) demonstraram a presença possuem ação alelopática. Não foi observada a presença de alcalóides na polpa dos frutos das espécies estudadas. *Pilosocereus tuberculatus* (Werdermann) Byles & G.D.Rowley e *Pilosocereus pachycladus* subsp. pernambucoensis (F.Ritter) Zappi demonstraram possuir cumarinas, flavonóides, saponinas, taninos e triterpenos. Na polpa de xique-xique foram detectadas cumarinas, flavonóides e traços de saponinas (MEIADO et al., 2010). Agra et al (2008) citam a utilização das raízes de *Pilosocereus gounellei* e *Pilosocereus piauhyensis* contra inflamações prostáticas.

Embora a medicina erudita descreva de modo limitado as potencialidades medicinais de algumas espécies de cactáceas, habitantes de municípios do semiárido brasileiro possuem este conhecimento, inclusive por meio de informações acumuladas através da sua inserção permanente no ambiente em que vivem, transmitindo-o de geração em geração. Alguns dados obtidos são convergentes com a literatura e muitos deles apresentam originalidade, o que sugere necessidade de aprofundamento continuado sobre o possível grau de toxicidade da espécie *Pilosocereus gounellei* afim de garantir a segurança do seu uso.

1.4. Aspectos toxicológicos

Até o presente momento não foi descrito na literatura estudo toxicológico com o extrato etanólico bruto de *Pilosocereus gounellei* (Pg-EEtOH). De acordo com os critérios de classificação de toxicidade da comunidade européia, a não ocorrência de mortes após administração de 2000 mg/kg, por via oral, indica uma baixa toxicidade para a espécie (BARROS; DAVINO, 2003). Porém, esta avaliação é apenas um indicativo de toxicidade, sendo necessário estudos mais detalhados e de maior extensão, estudos crônicos, para avaliar a possível toxicidade da espécie, no uso continuado. Sendo avaliados: parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, no decorrer do uso da planta.

Considerando que toda substância pode ser um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e via pela qual é administrada. Dessa forma, faz-se necessário conhecer as condições de uso seguro dos medicamentos para a saúde humana.

Vários modelos para estudos experimentais têm sido desenvolvidos objetivando melhor conhecer as ações orgânicas de constituintes vegetais e uma previsão mais exata de seus efeitos, sejam eles benéficos ou prejudiciais ao usuário. Os efeitos prejudiciais ao organismo, conhecidos como efeitos tóxicos, são objetos de estudo da Toxicologia. Atualmente, essa ciência trabalha, cada vez mais, dentro de um princípio que consiste em conhecer os riscos da exposição humana a diversos produtos e substâncias químicas para estabelecer condições seguras de exposição a estes agentes (BARROS; DAVINO, 2003).

No Brasil, o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica é uma prática realizada por milhares de brasileiros, sendo influenciada por fatores sociais, econômicos e culturais. Embora esta utilização já esteja consagrada por uma parcela substancial da população, ainda são escassos os dados científicos confirmatórios da ausência de toxicidade ou da ação terapêutica da rica flora nacional (Ministério da Saúde, 2006).

A espécie *Pilosocereus gounellei*, também conhecida como xique-xique é uma espécie da família Cactaceae que tem sido usada popularmente em decorrência de seus possíveis efeitos contra inflamações prostáticas. Tal espécie foi

coletada no município de Serra Branca no estado da Paraíba. Esta espécie não possui estudos de toxicidade que possam comprovar a sua segurança.

Baseado nestes pressupostos e diante da necessidade de se encontrar novos agentes farmacologicamente ativos e seguros esta pesquisa, visou à avaliação da toxicidade não-clínica aguda e crônica do Pg-EEtOH. Bem como investigou a atividade antiinflamatória, contribuindo para o melhor conhecimento da espécie selecionada e ao desenvolvimento de novos medicamentos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade não-clínica e atividade anti-inflamatória do Pg-EEtOH.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração letal 50% (CL50) através do modelo de artemia salina;
- Realizar ensaio toxicológico não-clínico agudo e crônico, em ratos Wistar, com base no guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA;
- Caracterizar o potencial clastogênico (produção de quebras cromossômicas) e aneugênico (indução de aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) de *P. gounellei*, através do teste do micronúcleo em células sanguíneas periféricas de roedores in vivo.
- Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato de *P. gounellei* através do modelo de edema de pata induzido por carragenina.

3 Materiais e métodos

3.1. Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.2. Materiais

3.2.1 Material botânico

Foi utilizado nos experimentos o Pg-EEtOH coletadas no município de Serra Branca, a identificação botânica será realizada pela Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix com a respectiva exsicata depositada no Herbário Prof. Jaime Coelho de Moraes (CCA/UFPB) sob o código 15.437, obedecendo aos critérios para coleta de matéria-prima e às recomendações da RESOLUÇÃO – RDC Nº. 48.

3.2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), albinos, adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 200 e 300 gramas e camundongos albinos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 20-30 g, fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do IPeFarM da UFPB. Todos serão agrupados em gaiolas de polietileno, contendo cinco animais em cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de claro e escuro de 12h e sem uso de qualquer medicamento, tendo livre acesso à ração (tipo pellets) e água. Todos os experimentos foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa animal do IPeFarM da UFPB e foi aprovado com o número de protocolo 0402/11 e todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA.

3.2.3 Aparelhagem

- ✓ Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus® - Roche Diagnostic System - para determinações bioquímicas no soro dos animais em experimentação;
- ✓ Analisador de íons seletivos, AVL 9180- Electrolyte Analyzer AVLAB®, para determinações dos íons sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloreto no soro dos animais testados nos experimentos toxicológicos;
- ✓ Analisador hematológico celular automático de uso veterinário – SCIL Vet abx-Homba ABX®, para obtenção de hemograma e contagem de plaquetas. Os esfregaços sanguíneos serão corados pelo Giemsa.
- ✓ Balança analítica marca AID® – HR – 120 g – Japão, para pesagem das substâncias testadas e órgãos;
- ✓ Balança eletrônica BG – 8000 GEHAKA®, para pesagem dos animais e determinação do consumo de água e ração;
- ✓ Campo aberto – aparelho desenvolvido no IPeFarM, consistindo em uma arena circular de material metálico, de cor branca, dividida em 16 segmentos, com uma lâmpada suspensa de 100 W de potência, para avaliação de alterações na atividade motora;
- ✓ Cânula de gavagem, para administração dos extratos;
- ✓ Centrífuga BIO ENG® BE 4000, para separação do soro em dez minutos, a 3500 rpm;
- ✓ Glicosímetro ADVANTAGE® Boehringer Mannheim - monitor de glicemia com fitas reativas, para determinação quinzenal da glicemia dos animais no experimento de toxicidade crônica;
- ✓ Estufa para determinação do peso seco dos extratos testados;
- ✓ HEMATEL 200® e microscópio Nikon®, para confirmação e controle da contagem das células sanguíneas;
- ✓ Microscópio RML5® Askmania-Germany, utilizado nas análises histopatológicas;
- ✓ Rota rod, fabricado por Ugo Basile (Itália), modelo 7750. Consiste de uma barra giratória de cinco cm de circunferência e 40 cm de comprimento, dividida em compartimentos iguais, separados por cinco discos de 48 cm de diâmetro, posicionada a 40 cm do balcão e regulada a uma velocidade constante de 7 rotações por minuto (rpm), para avaliação de alterações motoras.

- ✓ Termômetro digital, modelo MC – 3BC[®], OMRON/China, para determinação da temperatura dos animais semanalmente.

3.2.4 Droga utilizada

Extrato etanólico bruto de *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber)

3.3 Metodologias

3.3.1 Preparação do Pg-EEtOH

Depois de coletado, o material vegetal foi desidratado em estufa com ar circulante a temperatura média de 45 °C, durante 3 a 4 dias, sendo em seguida submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, reduzindo-se a pó.

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 % por 72 horas, sendo este processo repetido por três vezes, para obter a máxima extração dos constituintes químicos. A solução extrativa resultante, depois de filtrada, foi concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 50 °C, obtendo-se o Pg-EEtOH

3.3.2 Determinação da Concentração Letal 50 % (CL₅₀)

Para realizar este ensaio, foram utilizados náuplios de *Artemia salina*. Dessa forma, 25 mg de ovos (cistos) foram colocados em água salina (pH 8-9 e 29 °C) sob iluminação artificial por 24 horas para a eclosão dos ovos e consequente liberação dos náuplios de *A. salina*. Em seguida, foram colocados 5 mL das diferentes concentrações do Pg-EEtOH em tubos de ensaio, e adicionados 15 nauplios. Cada concentração será testada em triplicata e repetida em três experimentos. Um grupo controle contendo o solvente e as larvas foi utilizado. O conjunto foi incubado sob luz artificial por 24 horas e, após esse período, será realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas. A CL₅₀ será determinada de acordo com o método estatístico de Probitos (LOPES et al., 2002; MCLAUGHLIN; ROGERS, 2006; PARRA et al., 2001) utilizando o programa Microcal Origin. Valores da CL₅₀ abaixo

de 1000 µg/mL indica que o extrato analisado apresenta uma atividade biológica (LOPES et al., 2002).

3.3.3 Ensaio toxicológico agudo

No estudo de toxicidade aguda, os animais foram tratados com dose única com o extrato testado. Grupos de ratos Wistar, sendo 6 machos e 6 fêmeas, colocando 6 animais por caixa, receberam a dose de 2000 mg/Kg de peso corporal por via oral do Pg-EEtOH. Após o tratamento, foram observados os efeitos gerais apresentados pelos animais experimentais nos intervalos: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 13 dias seguintes, com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou no Sistema Nervoso Autônomo (SNA), utilizando-se protocolo experimental, elaborado pelo Setor de Psicofarmacologia do IPeFarM e descrito por Almeida et al (1999). Um grupo também com 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) foi tratado com o veículo de diluição do extrato, permanecendo como grupo controle.

Diariamente, foram observados o consumo de água e a ingestão de alimentos onde colocou-se as mamadeiras graduadas cheias e, no dia seguinte, registrou-se o volume de água ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente, em caixas contendo cinco animais e, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração. Foi avaliada também a evolução ponderal semanal. Após o 14^o dia foi determinado a dose letal 50% (DL₅₀), os animais sobreviventes foram eutanasiados, coletadas amostras de sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os órgãos foram pesados e examinados macroscopicamente.

3.3.3.1 Análise laboratorial do sangue

A coleta das amostras foi realizada através de sangria do plexo braquial, e o sangue foi coletado em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e em tubos com gel

separador – Microtainer Becton Dickson® – que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro para determinação dos parâmetros bioquímicos.

3.3.3.1.1 Parâmetros hematológicos

As análises hematológicas constaram do estudo da série vermelha (eritrograma), branca (leucograma) e contagem de plaquetas. No eritrograma foi realizada a contagem de hemácias (HEM), determinação do hematócrito (HCT), da hemoglobina (HGB), do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), e da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma foi feito a contagem global dos leucócitos e contagem da diferenciação celular; sedimentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos.

3.3.3.1.2 Parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de soro. As dosagens da glicose, uréia, colesterol total, HDL, triglicerídios, ácido úrico (pelo método enzimático), creatinina, creatina kinase, amilase, transaminases: Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT), fosfatase alcalina (pelo método cinético), proteínas totais, albumina e globulina (pelo método do biureto) foram realizadas no analisador bioquímico automatizado COBAS MIRA PLUS® - ROCHE.

3.3.3.2 Exame anatomopatológico

No 14^o dia os animais foram eutanasiados excesso de anestésicos e examinados macroscopicamente, com ressecção e pesagem consecutiva pulmão (submetido à perfusão, via traquéia, com solução de formol a 10%), coração, fígado e rins (seccionados por incisão sagital).

A avaliação dos resultados após este ensaio permitirá conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte, as alterações hematológicas, da bioquímica plasmática. O exame histopatológico indicará as lesões dos órgãos (LARINI, 1999; BARROS; DAVINO, 2003).

3.3.4 Ensaios toxicológicos crônicos

Animais pré-selecionados foram distribuídos em cinco grupos de vinte animais cada (10 machos e 10 fêmeas). Três grupos foram tratados diariamente, no turno da manhã, por via oral (gavagem), com as seguintes doses do Pg-EEtOH: uma dose que produza o efeito terapêutico (menor dose), uma dose que produza um efeito adverso detectável (maior dose) e uma dose intermediária (média geométrica entre a maior e menor dose), por um período de 13 semanas. O Pg-EEtOH foi diluído em um veículo. Ao quarto grupo (controle), será administrado o veículo. O quinto grupo, satélite, recebeu a dose máxima do Pg-EEtOH e foi eutanasiado 30 dias após o fim do experimento, para a verificação da reversão de um possível quadro de intoxicação.

Foram feitas avaliações da administração prolongada do medicamento sobre a temperatura, glicemia, consumo de água e ração, evolução ponderal, atividade exploratória e motora dos animais, parâmetros hematológicos, bioquímicos, comparando-se com os padrões para roedores descritos por DINIZ (2000), foram realizados exames histopatológicos de órgãos dos ratos em estudo. Os resultados foram comparados com os dados obtidos nos animais do grupo controle e com dados da literatura.

3.3.4.1 Consumo de água e ração

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, nas treze semanas de tratamento de acordo como foi descrito no item 3.3.3.

3.3.4.2 Peso corporal

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para cálculo da dose administrada. Para os cálculos da evolução da curva ponderal serão computados os pesos no fim de cada semana.

3.3.4.3 Temperatura

A medida da temperatura corporal foi realizada quinzenalmente em todos os animais, durante todo o período de tratamento. foi utilizado um termômetro digital modelo MC – 3BC[®] – ORON/China, cujo termosensor foi lubrificado com vaselina líquida e introduzido pelo reto (atingindo o cólon).

3.3.4.4 Glicemia

Durante as treze semanas de tratamento, foi avaliado quinzenalmente o nível glicêmico dos animais da seguinte forma: os ratos foram imobilizados em contensores plásticos e uma gota de sangue foi coletada na veia caudal e analisada em fita reativa para dosagem de glicemia. A leitura foi efetivada em monitor de glicemia Marca Advantage-Boehringer Mannheim[®], sendo observado jejum prévio de 12 horas.

3.3.4.5 Avaliação comportamental (Teste do campo aberto) e motora (Teste do Rota-rod)

Os animais foram divididos para a realização dos dois experimentos, ficando 5 machos e 5 fêmeas por dose para cada experimento, uma hora após a administração da droga em estudo. Os animais tratados e controles foram expostos, durante 180 segundos, aos aparelhos e foram determinados os parâmetros abaixo descritos. Estas avaliações foram feitas quinzenalmente (MANSUR et al., 1971).

Para avaliação comportamental dos animais foi utilizado o aparelho de campo aberto (CARLINI et al., 1986): os animais tratados e controle tiveram sua movimentação espontânea (ambulação) registrada pelo número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões de campo; o número de comportamentos de autolimpeza; de levantar; e o número de bolos fecais como índice de sua emocionalidade.

Os grupo de animais remanescentes, tratados e controle, foram colocados na barra giratória do aparelho de Rota-rod, com velocidade constante de 9,0 rpm, e o

tempo de permanência dos mesmos serão registrado, com três reconduções (DUNHAM; MIYA, 1957; MORAIS et al., 1998).

3.3.4.6 Avaliação laboratorial do sangue

Após as treze semanas de tratamento, no término do experimento para avaliação da toxicidade crônica, foram coletadas amostras de sangue, através de sangria do plexo braquial, de todos os animais, machos e fêmeas, dos grupos tratados com a droga e do grupo controle para a análise laboratorial do sangue, seguindo a metodologia descrita no ensaio agudo (4.3.3.1).

3.3.4.7 Exame anatomopatológico

Todos os animais tratados foram mortos por excesso de anestésico e autopsiados para observação de alterações macroscópicas. Exames histopatológicos seriam realizados nos animais tratados que apresentarem alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos, ou alterações macroscópicas, conforme metodologia detalhada no ensaio agudo (4.3.3.2). Na ausência de alterações macroscópicas, hematológicas e bioquímicas nos animais torna-se desnecessária a realização de exames histopatológicos.

3.3.5 Teste do Micronúcleo em células sanguíneas de Roedores *in vivo*

Grupos de três machos e três fêmeas receberão, por via oral, 0,2 mL de diferentes concentrações da amostra dos produtos teste. Um grupo controle (negativo) receberá apenas o dispersante da amostra e o outro (positivo) receberá 0,2 mL de ciclofosfamida (50 mg/Kg). Vinte e quatro horas após o tratamento os animais serão eutanaziados por tração cervical e, então, o sangue coletado para o preparo das lâminas e a pesquisa de micronúcleos (HAYASHI et al., 1994; HAYASHI et al., 2000).

3.3.6 Edema de pata induzido por carragenina

A atividade anti-inflamatória foi analisada segundo a metodologia descrita por Winter et al. (1962). Ratos Wistar receberam os seguintes tratamentos (v.o.), veículo (Solução salina 0,9%), o anti-inflamatório não esteroide padrão indometacina e 3 diferentes doses de Pg-EtOH (25, 50 e 100 mg/kg). Logo em seguida foi medido o volume da pata do animal (tempo zero). Após 60 minutos foi induzido o processo inflamatório pela administração de 0,1µL de carragenina (cg) a 1% na região subplantar da pata posterior direita de cada animal. O volume da pata foi medido logo após a injeção de carragenina (tempo zero) e nas 4 horas posteriores com intervalos constantes de 60 minutos com auxílio de um pletismômetro.

A inibição da indução do processo inflamatório das substâncias testadas foi estimada em termos de percentual de inibição, calculado de acordo com a equação: Atividade antiinflamatória (%) = $[(n-n')/n] \times 100$, onde n e n' indicam a média $\pm$ desvio padrão do volume do edema nos grupos controle e teste em uma determinada hora (PALASKA et al., 2002).

3.4. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão e empregando-se o teste estatístico de acordo com a normalidade, os resultados foram considerados significativos quando o $p < 0,05$.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1

**Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of ethanolic extract from
Pilosocereus gounellei (fac weber) in rats**

Publicado na revista International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical
Research (IJPPR). ISSN:0975-4873

**Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of ethanolic extract from
Pilosocereus gounellei (fac weber) in rats**

^{*1}Dias G.E.N, ¹Gorgonio I.F, ¹Ramalho J.A, ¹Oliveira K.M, ¹Guedes E.J.R.C.E, ¹Leite F.C, ¹Alves M.F, ¹Maciel J.K.S, ¹Souza M.F.V, ¹Lima C.M.B.L, ¹Diniz M.F.F.M.

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraiba, 58051-970
João Pessoa, PB, Brazil;

*Author for correspondence: E-Mails: diasgen@yahoo.com.br

Abstract:

Pilosocereus gounellei is traditionally used by Brazil's northeastern population for treatment of prostate inflammation, skin lesions, hydrops, and kidney infections. Toxicological and pharmacological studies of *P.gounellei* are of fundamental importance towards ensuring the safety and efficacy of this plant for the community. The aim of this study was to evaluate both acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of *P. gounellei* ethanol stem extract (Pg-EEtOH), through acute toxicity, and carrageenan induced paw edema models. The Pg-EEtOH showed an LC₅₀ of 547.3 ug / mL, an LD₅₀ > 2000 mg / kg; it did not cause behavioral changes, and yet caused significant decreases in the consumption of water and food. In females we observed an increase in serum urea levels, and decreased creatinine levels. In the paw edema model we observed that the dose of 25 mg / kg significantly reduced edema, and from the data we observed that despite changes in certain parameters, the Pg-EEtOH displayed low toxicity, this while having anti-inflammatory activity at a dose of 25mg / kg.

Keywords: *Pilosocereus gounellei*, acute oral toxicity; biochemic; hematology, Anti-inflammation.

Introduction

Since ancient times mankind seeks the aid medicinal plants to treat diseases at that time there was not enough information on using these herbal drugs as a cure. With the development of science gradually the use of medicinal plants to treat diseases became based on scientific studies. Medicinal plants were the main sources of treatment and prophylaxis of diseases until the advent of the chemical industry development in the 16th century, however, the decreasing effectiveness of synthetic drugs and the growing contraindications of these drugs bring back the interest in using herbal drugs (1,2).

Medicinal plants in Brazil have been used with little or no evidence of their pharmacological properties, they are often used for medicinal purposes different from those employed in ethnopharmacological use. The toxicity of medicinal plants and herbal medicines compared to allopathic medicines may seem trivial. However the adverse effects and the synergistic action of medicinal plants occur commonly (3). Many plant species used in therapy are still obtained by wild harvest; this is due to lack of information and to difficulties in cultivation (4). Despite the increase in plant studies, only 15 to 17% have been studied for their medicinal potential. Considering the great biodiversity of the Brazilian Northeast, this number could be much higher (5).

Pilosocereus gounellei, also known as “xique-xique” is a species from the family Cactaceae. The genre *Pilosocereus* Byles & Rowley belongs to the subfamily Cactoideae, of the Cereeae tribe. It is the largest genus with 35 species distributed from Mexico to Paraguay, yet with the greatest diversity of species in Brazil, where they occur in a number of different environments, including savannas, sandbanks (or salt marshes), and in rocky fields (6).

Although classical medicine (in a limited way) describes the medicinal potential of some cactus species, the inhabitants of Brazilian semiarid municipalities also possess this knowledge through information gathered during their continuing integration with the living environment, and they transmit it from generation to generation. The stem, root, and flowers of *P. gounellei* are popularly used to treat prostate inflammation, jaundice, hyperglycemia, and injuries. The macerated root is also used to treat inflammations in the urethra (7,8). In the “xique-xique” pulp, coumarins, flavonoids, and traces of saponins have been detected (9,10).

The information obtained from these communities converges with the literature, but much of it differs. This suggests the need for continuing research as to the degree of toxicity, and to the anti-inflammatory effects of *Pilosocereus gounellei* in order to ensure the safety and effectiveness of its use. The present paper aims to assess acute toxicity (oral), and the anti-inflammatory activity of *Pilosocereus gounellei* ethanolic extract.

Materials and methods

Preparation of (Pg-EEtOH) ethanol extract from *Pilosocereus gounellei* (FAC Weber) Stems of *Pilosocereus gounellei* species were collected in Boa Vista - PB in November 2010. Botanical identification was made by Prof. Dr. Leonardo Felix Person (DF / CCAUFPB), and a voucher specimen was deposited in the Prof. Jaime Coelho de Moraes - Center for Agricultural Sciences Herbarium, Federal University of Paraíba (CCA / UFPB) under code 15.437.

The collected material (stems) was dehydrated in an oven with circulating air at 40° C for 72 hours. The stems were then ground separately in a mechanical mill providing 2,080 g of stem powder. The powder was subjected to maceration for 72 hours at room temperature, using as 95% ethanol extraction liquid, and the process was repeated thoroughly, resulting in the respective extraction solutions which were filtered, and concentrated on a rotary evaporator, yielding 105.29 g of Pg-EEtOH.

Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) albino adult male rats, weighing between 180 and 250 grams, provided by Prof. vivarium Thomas George of the Biotechnology Center of the Federal University of Paraíba - UFPB were grouped in polyethylene cages containing six animals in each. They were kept under controlled temperature of 21° C +/- 1 without the use of any medications, with free access to feed (pellet type), and drinking water available in graduated polyethylene bottles with stainless steel nozzles and placed on the upper part of their metal grid cages. The research activities were developed at the Laboratory for Toxicological Testing (LABETOX), and at the Prof. Thomas George Bioterium of the Biotechnology Center of the Federal University of Paraíba - UFPB

Determination of Lethal Concentration 50% (LC50)

To perform this test, 25 mg of eggs (cysts) of *Artemia salina* were placed in saline water (pH 8-9, and 29° C), under artificial lighting for 24 hours for the eggs to hatch, and for the resulting release of nauplii. Then, 5 ml of the various concentrations of PG-EEtOH were placed in test tubes, and 15 nauplii were added. Each concentration was tested in triplicate and repeated in three experiments. A control group containing only solvent and larvae was also used. All were incubated for 24 hours under artificial light. After this period, the numbers of live and dead larvae were counted. The LC50 was determined according to the Probit statistical method (11,12,13) using the MicroCal Origin software. LC₅₀ values below 1000 g / ml indicate that the examined extract has biological activity (11).

Acute toxicological test

In the acute toxicity study, animals were treated with a single dose of extract. Groups of Wistar rats, 6 males and 6 females, 6 animals per box, received 2000 mg / kg body weight orally of Pg-EEtOH. After treatment, the general effects were observed in the experimental animals presented in intervals of: 30, 60, 90, 120, 180, and 240 minutes on the first day, and once daily thereafter, (always at the same time), for the following 13 days. This was done with the objective of mapping possible behavioral changes suggestive of activity on the central nervous system (CNS), or the Autonomic Nervous System (ANS) (14). Also a group of 12 animals (6 males and 6 females) was treated with the dilutive extract vehicle, as the control group.

Daily water consumption, food intake and weight gain were observed weekly. After day 14, the surviving animals, and control animals were sacrificed, and blood samples collected for laboratory analyses of hematological and biochemical parameters, as well as organs for macroscopic examination. If gross changes were observed, histopathological examinations were performed on the organs.

Laboratory blood analysis

The sample collection was performed by tapping the brachial plexus, and blood was collected in tubes with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for determination of hematological parameters, in tubes with separator gel - Microtainer Becton Dickson® - which was centrifuged for 10 minutes at 3500 rpm to obtain serum for the determination of the biochemical parameters.

Hematological

Hematological analyses appear in the study of red blood (erythrocyte), white (WBC), and platelet count. The red blood cell count (HEM), determination of hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were performed. The leukocyte count was done as the global leukocyte count, and cell differentiation; sedimentation, eosinophils, lymphocytes and monocytes.

Biochemical parameters

Biochemical analyses were performed on serum samples. Dosages of glucose, urea, total cholesterol, CHDL, triglycerides, uric acid (enzymatic method), creatinine, creatine kinase, amylase, transaminases, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (using the method kinetic), total protein, albumin, and globulin (by biuret method) were performed in an automated biochemical analyzer COBAS MIRA PLUS - ROCHE.

Paw edema induced by carrageenan

The anti-inflammatory activity was analyzed according to the methodology described by Winter et al. (1962). Wistar rats received the following treatments (p.o.), vehicle (0.9% saline.), the non-steroidal anti-inflammatory indomethacin standard, and three different doses of PG-EEtOH (25, 50, and 100 mg / kg). Shortly thereafter, animal paw volume was measured at (time zero). After 60 minutes, inflammation was induced by administration of 0,1µL carrageenan (cg) at 1% in the sub-plantar region of the right hind paw of each animal. Animal paw volume was measured after the

carrageenan injection (time zero), and during the 4 subsequent hours at constant intervals of 60 min with the aid of a plethysmometer.

Inhibition of the induced inflammatory process for the tested substances was estimated in terms of percent inhibition calculated according to the equation: Anti-inflammatory activity (%) = $[(n - n') / n] \times 100$, where n and n' indicates the mean $\pm$ standard deviation of edema volume in control and test groups at a given time (15).

Statistical analysis

For statistical analysis, the unpaired Student "t" test was used, using the Graph Pad Prism 6.0 software, and the results were considered significant when presenting values of $p < 0.05$.

Results

The crude ethanol extract showed an LC_{50} of 547.3 $\mu\text{g} / \text{mL}$, in biological activity analyses (using the *Artemia salina* model), doses less than 1000 mg / mL are indicative of potentially active molecules.

In the acute toxicity evaluation, after 14 days of an administration of 2000 mg / kg of PG-EEtOH, a significant reduction in the consumption of water and animal feed in both male and female rats (Table 1). Analysis of behavioral parameters showed no changes during the 14 days of evaluation.

Table 1 Effects of oral administration of PgEEtOH at 2000 mg / kg on rats for the consumption of water and feed for 14 days.

Treatment	Water Consumption (mL)	Feed Consumption (g)
Males		
Control	38.01 ± 5.037	25.11 ± 2.143
Treated	$35.00 \pm 2.87^*$	$22.03 \pm 1.941^{**}$
Females		
Control	35.00 ± 4.349	20.01 ± 3.616
Treated	$31.73 \pm 1.597^*$	$18.45 \pm 2.845^*$

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 7); Student Test "t". * p <0.05 and ** p <0.01

In the analysis data of the animal organ weights calculated based on the weight of the animals compared with the respective control group (Table 2). no change was observed, With macroscopic analysis of the organs, and in the weight evaluation of the animals, there were no significant changes in the organ weights of the animals.

Table 2. Effect of PgEEtOH oral administration at 2000 mg / kg on organs per body weight (%) in rats

Organs (g)	Males		Females	
	Control	Treated	Control	Treated
Heart	0.41 $\pm$ 0.11	0.39 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.08
Liver	3.77 $\pm$ 0.80	3.58 $\pm$ 0.14	3.30 $\pm$ 0.50	3.45 $\pm$ 0.35
Kidneys	0.79 $\pm$ 0.25	0.86 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.24
Spleen	0.42 $\pm$ 0.32	0.27 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.15
Lung	0.70 $\pm$ 0.23	0.63 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.10	0.75 $\pm$ 0.22

Index by body organ = (organ weight x 100) / body weight; a dose of 2000 mg / kg of PG-EEtOH was administered; values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n = 7) Test "t" Student test, and the level of significance was set at p <0.05

The analysis data of the animals' hematology parameters (Table 3). It can be seen that there were no significant changes in the evaluated hematologic parameters, when compared to the controls.

Table 3. Effect of Pg-EEtOH 2000 mg / kg oral administrations on the hematological parameters in rats

Hematologica	Males		Females	
I parameters	Control	Treated	Control	Treated
HEM ($10^6/\mu\text{L}$)	8.44 $\pm$ 0.29	8.02 $\pm$ 0.72	8.10 $\pm$ 0.30	8.10 $\pm$ 0.22
HGB (g/dL)	12.99 $\pm$ 0.22	12.70 $\pm$ 1.02	12.88 $\pm$ 0.24	12.93 $\pm$ 0.47
HCT (%)	43.10 $\pm$ 1.29	41.43 $\pm$ 4.19	41.03 $\pm$ 0.89	42.07 $\pm$ 2.47
MCV (fL)	51.29 $\pm$ 0.95	51.71 $\pm$ 1.97	50.83 $\pm$ 1.32	52.00 $\pm$ 2.58
MCH (pg)	15.40 $\pm$ 0.42	15.84 $\pm$ 0.29	15.92 $\pm$ 0.48	15.96 $\pm$ 0.58
MCHC (g/dL)	30.16 $\pm$ 0.61	30.70 $\pm$ 1.24	31.38 $\pm$ 0.34	30.81 $\pm$ 0.87
Leucocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	6057 $\pm$ 2307	6186 $\pm$ 2867	5733 $\pm$ 1371	4771 $\pm$ 2542
Sedimented (%)	20.00 $\pm$ 6.27	23.86 $\pm$ 7.38	17.50 $\pm$ 5.75	19.14 $\pm$ 5.36
Eosinophils (%)	0.85 $\pm$ 0.90	0.28 $\pm$ 0.75	1.16 $\pm$ 1.60	1.14 $\pm$ 1.07
Lymphocyte (%)	71.14 $\pm$ 7.70	68.71 $\pm$ 8.28	75.33 $\pm$ 4.08	75.57 $\pm$ 5.96
Monocytes (%)	7.85 $\pm$ 2.19	7.14 $\pm$ 3.80	6 $\pm$ 3.22	4 $\pm$ 2.30
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	731000 $\pm$ 8828	556143 $\pm$ 24558	545833 $\pm$ 21415	642571 $\pm$ 20412
	7	6	8	2

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 7); Student Test "t" test. * p <0.05

The biochemical analysis data obtained for the animals receiving a 2000 mg / kg dose of PG-EEtOH (Table 4), showed that there was a significant increase in urea levels and a significant decrease in creatinine levels in females. In male animals there were no significant changes in the parameters.

Table 4. Effect of oral administrations Pg-EtOH 2000 mg / kg on biochemical parameters of rats.

Biochemical parameters	Males		Females	
	Control	Treated	Control	Treated
Glucose (mg / dl)	169.6±83.6	169.1±60.4	169.6±50.63	187.4±38.24
Urea (mg/dL)	44.00±12.34	49.43±5.192	40.86±5.640	56.14±14.85*
Creatinine (mg/dL)	1.614±2.817	0.4143±0.1574	0.3286±0.1113	0.1429±0.05345**
Cholesterol (mg/dL)	57.00±18.68	78.29±61.95	60.00±23.24	73.57±11.21
cHDL	22.14±3.024	23.00±3.830	27.14±5.178	28.29±3.498
Uric acid (mg/dL)	0.7714±0.5251	0.9000±0.5715	1.414±1.326	1.017±0.7333
Amylase (U/l)	1.571±0.5345	13.43±20.94	27.86±14.87	16.86±10.59
AST (U/l)	192.4±45.74	177.7±47.70	183.7±81.16	144.8±80.73
ALT (U/l)	61.14±9.317	63.00±28.75	53.00±12.57	47.14±12.90
ALP (U/l)	232.4±51.24	226.9±136.3	133.6±12.90	222.1±210.3
CK (U/l)	1201±324.0	1059±479.6	749.7±348.3	725.1±269.5
Triglycerides (mg/dL)	173.0±223.3	105.7±93.87	55.86±40.42	282.8±560.0
Total Proteins (mg/dL)	6.457±0.2149	6.229±0.4608	6.086±0.6176	6.543±0.3994
Albumin (mg/dL)	2.857±0.1902	2.586±0.3436	2.843±0.4198	3.000±0.2757
Globulin (mg/dL)	3.600±0.1826	3.643±0.3952	3.243±0.2637	3.971±0.9517

Values are expressed as mean +/- SD (N = 7); Student Test "t" test. * p <0.05, p <0.001 **

The doses of 25 and 100 mg/kg PgEtOH significantly inhibited edema formation induced by carrageenan during the first hour, and that the known so as indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory known (table 5). In the second, third and fourth hours, only 25mg/kg of PgEtOH continued to significantly reduce edema formation, while the other doses showed no significant reductions.

Table 5. Paw edema induced by carrageenan in rats, effects of oral administration of doses at 25, 50 and 100 mg / kg of PG-EEtOH.

Time in (hours)	Paw edema volume (mL)				
	Control	Pg-EEtOH 25 mg/kg	Pg-EEtOH 50 mg/kg	Pg-EEtOH 100 mg/kg	Indomethacin 25mg/kg
1	0.41±0.18	0.11±0.10**	0.33±0.13	0.17±0.09*	0.13±0.04**
2	0.51±0.20	0.16±0.11*	0.53±0.28	0.31±0.11	0.32±0.05
3	0.58±0.18	0.19±0.08***	0.51±0.11	0.41±0.14	0.17±0.09***
4	0.49±0.15	0.13±0.11**	0.50±0.18	0.33±0.12	0.13±0.11**

Values are expressed as mean +/- SD (N = 7); Student Test "t" test. * p <0.05, ** p <0.001 and *** p <0.0001.

In the analyzing the results for percentage of edema inhibition (Table 6) demonstrated that Pg-EEtOH at 25 mg / kg reveals comparable activity to indomethacin assessed throughout time, it significantly reduced edema throughout the period evaluated. Indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) reduced the edema significantly, thus attesting to both its anti-inflammatory activity, and the reliability of the model used to evaluate this parameter.

Table 6. Percentage inflammation inhibition after oral administrations of Pg-EEtOH in doses of 25, 50, and 100 mg / kg in rats

Time (hours)	% inflammation inhibition			
	Pg-EEtOH 25 mg/kg	Pg-EEtOH 50 mg/kg	Pg-EEtOH 100 mg/kg	Indomethacin 25mg/kg
1	73.17%	19.51%	58.53%	68.29%
2	68.62%	0%	39.21%%	37.25%
3	67.24%	12.06%	29.31%	70.69%
4	73.47%	0%	32.65%	73.46%

Discussion

Due to the increased use of medicinal plants, experimental evaluation of toxicity, and pharmacological activities of these plants is needed. Such studies are

crucial to ensure their safety and effectiveness. In general, *in vivo* methods provide an early hint of toxicity in these compounds. In contrast, the application of *in vitro* methods provides important but more limited information regarding the toxicity of natural compounds. By applying *in vivo* assays one can observe real life signs of toxicity, such as pain, anxiety, allergic reactions, behavioral changes, and physical changes in the tested animals (16).

The acute oral toxicity of ethanol extract from the stems of *Pilosocereus gounellei* was determined in this study. There are no toxicological studies for this plant species. *In vivo* toxicity evaluations were performed qualitatively and quantitatively by conducting behavioral analyses and determining physiological, biochemical, and hematological parameters, as well as determining the LC_{50} , using the *Artemia salina* model.

The *Artemia salina* model is considered a preliminary study for detecting the presence of biologically active substances. The test (in this case) was based on the capacity of Pg-EEtOH to become lethal to nauplii of *Artemia salina* thus demonstrating the presence of bioactive substances. Extracts of natural products that have an $LC_{50} < 1000$ ug / mL are known to contain significantly toxic substances (16). In this study Pg-EEtOH showed an LC_{50} of 547.3 mg / mL indicating the presence of such bioactive substances.

An acute toxicological study is a first step when initiating a toxicological analysis of a natural product. Acute oral toxicity tests in rats can be used to assess the therapeutic action of natural products for various pharmacological activities; this is based on the premise that Pharmacology is simply, "Toxicology at a lower dose" (17). A normally toxic substance can have interesting pharmacological effects at a lower non-toxic dose. Results from animal toxicity tests are therefore crucial to definitively judge the safety of Pg-EEtOH for the potential development pharmacological products (18). A dose of Pg-EEtOH 2000 mg / kg was administered orally in the treated group of rats of both sexes, and control groups received the vehicle alone (0.9% saline). Shortly after administration, behavioral analysis was conducted for 4 h, and then every 24 hours; no behavioral changes were observed in the animals treated with Pg-EEtOH, and also no deaths occurred during the 14 days of evaluation. All rats gained weight during the experiment, and no significant differences between the treated and control groups were observed, although there was a decrease in feed and water consumption for the treated animals.

Table 1 and 2 bring an assessment of water and feed consumption, and the weights of organs in the animals, where it can be seen that there were decreases in water and feed consumption. However, there were no significant differences in the organ weights measured in the control group, and also there were no observed macroscopic changes in their organs, precluding the need for histopathological analyses of the organs. The animals showed no behavioral or physical changes, and as for the skin, fur, and eyes, all parameters remained normal, an indication that the extract did not affect the animals' growth. Thus, the analysis demonstrated that the Pg-EEtOH did not cause acute toxic effects, and has an LD₅₀ of greater than 2000 mg / kg, for it did not cause the death of any of the animals after administration of the extract.

The results of the biochemical studies demonstrated no significant differences in biochemical parameters for the treated male rats as compared to the control group (Table 4). However, in the females we observed an increase in the levels of urea, that may be a result of increased protein metabolism. A decrease in creatinine levels also occurred, that may be related to decreased muscle mass, or increased renal function. The hematopoietic system is very sensitive to toxic compounds, and serves as an important index for physiological and pathological changes in both humans and animals (19). After 14 days of treatment with Pg-EEtOH no changes in hematology parameters were noted (Table 3). Therefore, PG-EEtOH has low toxicity. This finding corroborates the safe use of this plant in traditional medicine by the population.

In assessing the anti-inflammatory activity of Pg-EEtOH we used the carrageenan induced paw edema model, which is widely used to assess this activity in many natural products. Species of the cactus family have been studied using this model, for example, *Opuntia dillenii* where the alcoholic extract of the flowers showed excellent anti-inflammatory activity, demonstrated with the use of this model (20).

Inflammation is a complex and essential process for the defense system of the organism. Excessive production of certain inflammatory mediators can lead to chronic diseases. Raw vegetable materials may have anti-inflammatory actions that affect various stages of the inflammation process, and inhibit the formation of eicosanoids, and cytokines, thus avoiding the onset of the inflammatory cascade (21).

In this study, since previous studies of this species do not exist, the initial dose to assess the anti-inflammatory activity was 25 mg / kg, based on the positive control (indomethacin 25 mg / kg), in order to compare the potency of the therapeutic extract with a commercial drug. From the initial dose, the dose was doubled to 50 mg / kg, and then again to 100 mg / kg in order to assess possible dose-dependent effects.

The results demonstrated that a dose of 25 mg / kg has anti-inflammatory activity comparable to indomethacin, for there were no significant differences between the two treatment groups, and the activity was not dose-dependent since in the other groups treated with Pg- EEtOH no significant effects were noted when compared to the control group. The dose of 100 mg / kg showed a significant effect only in the first hour. Many plant extracts and secondary metabolites inhibit the production of inflammatory mediators as well as the activity of second messengers, transcription factors, and expression of key pro-inflammatory molecules. (21). Some secondary metabolites provide relief from symptoms similar to allopathic medicines. Natural products and their derivatives are an attractive alternative for the treatment of various diseases such as acute inflammation, chronic asthma, and allergies (22).

Conclusions

The present study demonstrated that crude ethanol extract of the stems of *Pilosocereus gounellei* has low toxicity seeing that despite having observed some changes in the evaluated parameters in the treated animals, no deaths were caused in any of the treated animals. The extract displayed anti-inflammatory activity at a dose of 25mg / kg during the four hours assessed for the paw edema induced by the carrageenan model, thus confirming its popular use as anti-inflammatory. Despite the results, further studies are needed to assess the degree of toxicity with continued use of the extract in a chronic toxicity model, and also to confirm its anti-inflammatory activity, assessing the mechanism by which the *P. gounellei* extract acts.

Acknowledgments:

The authors would like to express their sincere thanks for the financial support provided by CAPES/CNPq of the Ministry of Education of Brazil.

Conflicts of Interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Reference

1. Petrovska, [B.B.](#) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* **2012**, 6, 1–5.
2. Kelly K. History of medicine. New York: Facts on file; **2009**. pp. 29–50.
3. Veiga-Junior, F.V.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Medicinal plants: safe cure? *Quím. Nova* **2005**, 2, 2-4.
4. Carvalho, L.M.; Costa, J.A.M.; Carnelossi, M.A.G. Qualidade em plantas medicinais. Aracaju. in Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1nd ed.; Rodrigues, R. F. A.; Cuinha, J. M.; Embrapa: Aracaju, Brazil, 2010; 1, pp. 36-43.
5. Fontenelle, R.O.S. Avaliação do potencial antifúngico de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro frente a diferentes cepas de dermatofitos e leveduras, master's degree, master of the State University of Ceara, Fortaleza Brazil, 2005.
6. Martins, L.S.T., Germinação de sementes de *Pilosocereus arrabidae* (Lem.) Byl. & Row (Cactaceae) de Arraial do Cabo, master's degree, master of Research Institute Botanical Garden Rio de Janeiro, Rio de Janeiro Brazil, 2007.
7. Albuquerque, U.P.; Medeiros, P. M.; Almeida, A. L. S.; Monteiro, J. M.; Neto, E. M. F. L.; Melo, J.G.; Santos, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil:A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* **2007**,114, 325–354.
8. Roque, A.A.; Rocha, R. M.; Loiola, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Rev. Bras. Pl. Med.* **2010**, 12, 31-42.
9. Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basílio, I.J.L.D.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 18, 472-508.
10. Meiado, M.V.; Albuquerque, L.S.C.; Rocha E.A.; Aréchiga M.R.; Leal I.R. Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. jamacaru

- (Cactaceae) to environmental factors. *Plant Species Biology* **2010**, 25, 120-128.
11. Lopes, W.B.; Moroni, F.T.; Brandeburgo, M.I.H.; Hamaguchi, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Rev. Eletr. Hor. Cient.* **2002**, 1, 1-11.
12. McLaughlin, J.L.; Rogers, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf. J.* **1998**, 32, 513-524
13. Parra, A.L.; Yhebra, R.S.; Sardiñas, I.G.; Buela, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* **2001**, 8, 395-400.
14. Almeida, R.N.; Falcão, A.C.G.; Diniz, R.S.T.; Quintans-Júnios, L.J.; Polari, R.N.; Barbosa-Filho, J.M.; Agra, M.F.; Duarte, J.C.; Ferreira, C.D.; Antonioli, A.R.; Araújo, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 80, 72-76.
15. Palaska, E.; Sahin, G.; Kelicen, P.; Durlu, N.T.; Altinok, G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *Farmaco* **2002**, 57, 101-107.
16. Syahmi, A.R.M.; Vijayarathna, S.; Sasidharan, S.; Latha, L.Y.; Kwan Y.P.; Lau, Y.L.; Shin, L. N.; Chen, Y. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (Oil Palm Leaf) Methanol Extract., *Molecules* **2010**, 15, 8111-8121.
17. Sasidharan, S.; Darah, I.; Jain, K. In vivo and in vitro toxicity study of *Gracilaria changii*. *Pharm. Biol.* **2008**, 46, 413-417.
18. Moshi, M.J. Brine shrimp toxicity evaluation of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* **2007**, 4, 219-225.
19. Adeneye, A.A.; Ajagbonna, O.P.; Adeleke, T.I.; Bello, S.O. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 105, 374-379.

20. Ahmed, M.S.; Tanbouly, N.D.; EL. Islam, W.T.; Sleem, A.A.; Senousy, A.S. EL. Antiinflammatory Flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. Flowers growing in Egypt, *Phytother. Res.* **2005**, 19, 807-809.
21. Seelinger, G.; Merfort, I.; Schempp, C.M. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med.* **2008**, 74, 1667-77.
22. Rogerio, A.P.; Nunes, A.S.; Faccioli, L.H. Review: The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation, *Pharmacol. Res.* **2010**, 62, 298–307.

ARTIGO 2

**Avaliação da toxicidade crônica e genotoxicidade do extrato etanólico de
Pilosocereus gounellei (fac weber) in rats**

A ser submetido na revista JOURNAL OF MEDICINAL FOOD ISSN 1096-620X

Avaliação da toxicidade crônica e genotoxicidade do extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei* (fac weber) in rats

^{*1}Dias G.E.N, ¹Gorgonio I.F, ¹Ramalho J.A, Ramalho, L.S.N.¹Oliveira K.M, ¹Guedes E.J.R.C.E, ¹Maciel J.K.S, ¹SouzaM.F.V, ¹Pessoa, H.L.F., ¹Diniz M.F.F.M.
Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraiba, 58051-970
João Pessoa, PB, Brazil;

*Author for correspondence: E-Mails: diasgen@yahoo.com.br

Abstract:

Pilosocereus gounellei é uma espécie tradicionalmente usada pela população do nordeste do Brasil para o tratamento de inflamações na próstata, lesões na pele, hidropsia e infecções renais. O estudo toxicológico e genotóxico da espécie *P.gounellei* é de fundamental importância para garantir a segurança e a eficácia do uso dessa planta pela comunidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade oral crônica e a genotoxicidade do extrato etanólico do caule de *P. gounellei* (Pg-EEtOH) através do modelo de toxicidade crônica e do modelo de pesquisa de micronúcleos em células sanguíneas de camundongos. O Pg-EEtOH não alterou a temperatura nem a glicemia dos animais de forma significativa, também não alterou o consumo de água e ração e nem a evolução ponderal. Na análise comportamental dos animais não foi encontrado nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados também não ocorreu nenhuma alteração no sistema motor autônomo desses animais. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos não ocorreram nenhuma alteração significativa quando comparado ao grupo controle. A análise histopatológica não foi necessária uma vez que não ocorreu nenhuma alteração macroscópica e nem sinais de alteração na fisiologia e no funcionamento dos órgãos. Na pesquisa de micronúcleos podemos observar que o extrato não induziu a formação de micronúcleos quando comparado com o grupo controle. Com base nos resultados obtidos observou-se que o extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei* possui uma baixa toxicidade e genotoxicidade.

Keywords: *Pilosocereus gounellei*, chronic oral toxicity; biochemic; hematology, Genotoxicity

Introdução

A espécie *Pilosocereus gounellei* também conhecida como xique-xique pertence a família cactácea, sendo o Brasil considerado o terceiro maior centro de biodiversidade dessa família(1), sendo composta por 37 gêneros e cerca de 233 espécies, dos quais 14 gêneros e 144 espécies são endêmicas do Brasil. As plantas da família *Cactaceae* estão distribuídas por todo o território Brasileiro (2).

Roque e colaboradores (3) em pesquisa sobre o uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil), verificou-se que a raiz do xique-xique (*Pilosocereus gounellei*), na forma de macerado é utilizada popularmente para tratar a inflamação na uretra. Albuquerque e colaboradores (4), por sua vez, citam que o caule, a raiz e as flores do xique-xique são utilizados para problemas de próstata, icterícia, hiperglicemia e em lesões. Já Almeida e colaboradores (5) citam que sua raiz é utilizada para problemas renais.

As Plantas podem possuir substâncias tóxicas que afetam amplamente os órgãos vitais ou apenas sistemas funcionais importantes, como o sistema nervoso central (SNC) interferindo assim com a coordenação das funções nervosas do corpo. As toxinas mais dominantes são neurotoxinas que afetam cérebro e sistema nervoso central, seguido por citotoxinas e toxinas metabólicas que afetam órgãos como rins, fígado, coração e pulmões. A gravidade de um efeito tóxico pode depender da via de administração, fase de crescimento ou parte da planta, a quantidade consumida, as espécies e suscetibilidade da vítima, Outros fatores que podem influenciar a severidade de toxinas incluem a solubilidade da toxina nos fluidos corporais, a frequência de intoxicação, bem como a idade da vítima (6). Essas toxinas das plantas a muito tempo vem sendo usada pelos seres humanos seja para caça, guerras, rituais, assassinatos, execuções, aborto, suicídio e eutanásia (7).

A citotoxicidade tem sido definida como os efeitos adversos resultantes da interferência dos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e funções comuns a todas as células do organismo (8). Os estudos de citotoxicidade fornecem informações a respeito da ação potencial tóxica de moléculas estudadas de forma mais rápida e com menos custo que os estudos *in vivo*. Neste tipo de ensaio, pode

ser avaliada a morte, a viabilidade, os aspectos morfológicos, a integridade da membrana celular, o crescimento e a proliferação das células (9).

A genotoxicidade é a área da genética que estuda os efeitos de determinadas substâncias sobre a estrutura do DNA, que pode resultar no processo denominado mutagênese. Neste sentido, os agentes que alteram a sequência do DNA são considerados “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de genotóxicos (10). Assim, as pesquisas sobre genotoxicidade podem vir a corroborar na avaliação da efetividade de algumas substâncias anticarcinogênicas, incluindo a grande variedade encontrada em produtos naturais (11). Como resultado, tais estudos complementam àqueles realizados na avaliação toxicológica de fitoconstituintes ou outras amostras obtidas de plantas.

Baseado nestes pressupostos e diante da necessidade de se encontrar novos agentes farmacologicamente ativos e seguros este trabalho visa avaliar a toxicidade crônica e a genotoxicidade do extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei*, com vistas ao melhor conhecimento da espécie e contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos e para uso seguro dessa planta medicinal.

Materiais e metodos

Preparação do extrato etanólico de *Pilosocereus gounellei* (FAC Weber)

A espécie *Pilosocereus gounellei* foi coletada no município de Boa Vista - PB, em novembro de 2010. Sua identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix (DF/CCAUFPPB) sendo uma exsicata depositada no Herbário Prof. Jaime Coelho de Moraes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB) sob o código 15.437.

O material coletado (caule) foi desidratado em estufa com ar circulante a 40 °C durante 72 horas. Em seguida, os caules foram triturados isoladamente em moinho mecânico fornecendo 2.080 g do pó do caule. O pó do caule (2.078,92 g) foi submetido à maceração durante 72 horas a temperatura ambiente, utilizando-se como líquido extrator etanol a 95 % sendo tal processo repetido exaustivamente, resultando nas respectivas soluções extrativas, que foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se 105,29 g do extrato etanólico bruto do caule.

Animais

Serão utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), albinos, adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 200 e 300 gramas e camundongos albinos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 20-30 g, fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM-UFPB) da UFPB. Todos serão agrupados em gaiolas de polietileno, contendo cinco animais em cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de $21 \pm 2^\circ \text{C}$, sem uso de qualquer medicamento, tendo livre acesso à comida (tipo pellets) e água. Todos os experimentos foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa animal do IPeFarM da UFPB e foi aprovado com o número de protocolo 0402/11.

Ensaio toxicológico crônico

Animais pré-selecionados foram distribuídos em cinco grupos de vinte animais cada (10 machos e 10 fêmeas). Três grupos foram tratados diariamente, no turno da manhã, por via oral (gavagem), com as seguintes doses do Pg-EEtOH: uma dose que produza o efeito terapêutico (menor dose), uma dose que produza um efeito adverso detectável (maior dose) e uma dose intermediária (média geométrica entre a maior e menor dose), por um período de 90 dias. O extrato será diluído em um veículo. Ao quarto grupo (controle), será administrado o veículo. O quinto grupo, satélite, receberá a dose máxima do Pg-EEtOH e só será sacrificado 30 dias após o fim do experimento, para a verificação da reversão de um possível quadro de intoxicação.

Serão feitas avaliações da administração prolongada do medicamento sobre a temperatura, glicemia, consumo de água e alimentos, evolução ponderal, atividade exploratória e motora dos animais, parâmetros hematológicos, bioquímicos, comparando-se com os padrões para roedores descritos por DINIZ (12), serão realizados exames histopatológicos de órgãos dos ratos que apresentarem indícios de toxicidade neste estudo. Os resultados serão comparados com os dados obtidos nos animais do grupo controle e com dados da literatura.

Consumo de água e alimento

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, nos 90 dias de tratamento. Colocar-se-á as mamadeiras graduadas cheias e, no dia seguinte, registrar-se-á o volume de água ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração será colocada diariamente, em caixas contendo cinco animais e, no dia posterior, será contabilizado o peso consumido de ração.

Peso corporal

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para cálculo da dose administrada. Para os cálculos da evolução da curva ponderal serão computados os pesos no fim de cada semana.

Temperatura

A medida da temperatura corporal foi realizada quinzenalmente em todos os animais, durante todo o período de tratamento. Será utilizado um termômetro digital modelo MC – 3BC® – ORON/China, cujo termo sensor será lubrificado com vaselina líquida e introduzido pelo reto (atingindo o cólon).

Glicemia

Durante os 90 dias de tratamento foram avaliados mensalmente o nível glicêmico dos animais da seguinte forma: os ratos serão imobilizados em contensores plásticos e uma gota de sangue será coletada na veia caudal e analisada em fita reativa para dosagem de glicemia. A leitura será efetivada em monitor de glicemia Marca Advantage-Boehringer Mannheim®, sendo observado jejum prévio de 12 horas.

Avaliação comportamental (Teste do campo aberto) e motora (Teste do Rotarod)

Os animais foram divididos para a realização dos dois experimentos, ficando 5 machos e 5 fêmeas por dose para cada experimento, uma hora após a administração da droga em estudo. Os animais tratados e controles serão expostos, durante 180 segundos, aos aparelhos e serão determinados os parâmetros abaixo descritos. Estas avaliações serão feitas quinzenalmente (13).

Para avaliação comportamental dos animais será utilizado o aparelho de campo aberto (14). Os animais tratados e controle terão sua movimentação espontânea (ambulação) registrada pelo número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões de campo; o número de comportamentos de autolimpeza; de levantar; e o número de bolos fecais como índice de sua emocionalidade.

Os grupo de animais remanescentes, tratados e controle, foram colocados na barra giratória do aparelho de Rota-rod, com velocidade constante de 9,0 rpm, e o tempo de permanência dos mesmos foram registrado, com três reconduções (15,16).

Análise laboratorial do sangue

A coleta das amostras será realizada através de sangria do plexo braquial, e o sangue será coletado em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e em tubos com gel separador – Microtainer Becton Dickson® – que será centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro para determinação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros hematológicos

As análises hematológicas constarão do estudo da série vermelha (eritrograma), branca (leucograma) e contagem de plaquetas. No eritrograma foi realizada a contagem de hemácias (HEM), determinação do hematócrito (HCT), da hemoglobina (HGB), do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), e da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma foi feito a contagem global dos leucócitos e contagem da diferenciação celular; sedimentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos.

Parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de soro. As dosagens da glicose, uréia, colesterol total, HDL, triglicerídios, ácido úrico (pelo método enzimático), creatinina, creatina kinase, amilase, transaminases: Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT), fosfatase alcalina (pelo método cinético), proteínas totais, albumina e globulina (pelo método do biureto) foram realizadas no analisador bioquímico automatizado COBAS MIRA PLUS® - ROCHE.

Análise estatística

Para análise estatística foi realizado análise de variância de uma via ANOVA, seguido pelo pos teste de Turkey, foi usado o software Graph Pad Prism 6.0, os resultados foram considerados significativos quando os valores de $p < 0.05$.

Resultados

Durante todo o período experimental, não foram observadas alterações na temperatura colônica média dos animais machos e fêmeas tratados com as doses de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 90 mg/kg bem como dos grupos controle que apresentou-se variando entre 36°C a 38°C (tabela 1).

Tabela 1: Temperatura corporal (°C) de ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio de toxicidade crônico.

Grupos tratados					
Temperatura (°C)	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Satelite
Fêmeas					
Basal ^a	37±0,8	37±0,5	37±0,8	37±0,4	37±0,6
1 ^a	37±1,0	37±0,6	37±0,4	37±0,4	37±0,2
2 ^a	37±1,1	37±0,8	37±0,6	37±0,6	37±0,6
3 ^a	38±0,4	37±1,2	37±0,8	37±0,6	37±0,6
4 ^a	37±0,7	36±0,6	37±0,9	37±0,7	37±0,7
5 ^a	37±1,1	36±0,7	36±0,7	36±0,7	36±0,7
Machos					
Basal	37±0,73	37±0,62	37±0,93	37±0,84	37±0,4
1	38±0,4	37±1,0	37±0,9*	37±0,7**	37±0,8
2	38±1,2	37±1,0	37±1,1	37±0,1	37±0,9
3	38±0,3	38±0,7	38±0,7	38±0,5	38±0,8
4	37±0,6	37±0,6	37±1,0	37±0,9	37±0,5
5	37±1,0	37±0,8	37±0,5	37±0,7	37±0,7

Os valores estão expressos em média ± d.p. (n=10). One-way ANOVA/ Tukey.*p<0,05.

Não foram constatadas alterações nos níveis glicêmicos mensais dos animais de ambos os sexos durante a administração das três doses de Pg-EEtOH nos 90 dias de administração (tabela 2).

Tabela 2: Efeito da administração crônica de diferentes doses do Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* sobre a glicemia dos animais.

Os	Grupos tratados					
	Glicemia	Controle	10	30	90 mg/kg	SATELITE
			mg/kg	mg/kg		
Fêmeas						
	Início	89±6	88±8	100±12	94±12	94±11
	Final	85±8	85±7	86±7	84±7	90±5
Machos						
	Início	94±11	88±6	86±6	95±9	89±9
	Final	87±6	91±8	86±9	89±6	84±9

valores estão expressos em média $\pm$ d.p. (n=10). One-way ANOVA/ Tukey.*p<0,05.

Os dados obtidos revelaram uma elevação estatisticamente significativa no consumo de água das fêmeas tratadas com a dose de 30 mg/kg de Pg-EEtOH na 7 semana e uma diminuição do consumo de água nas fêmeas tratadas com a dose de 90 mg/kg nas semanas 8, 9, 10 e 12 o que não ocorreu no grupo satélite. Nos Machos não foi detectada nenhuma alteração estatisticamente significativa no consumo de água durante os 90 dias de tratamentos.

Tabela 3 Consumo semanal de água por ratos durante os 90 dias de tratamento crônico com diferentes doses do Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei*.

Semanas	Grupos tratados				
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	SATELITE
Fêmeas					
1 ^a	356± 43	378± 52	339± 43	344± 51	358±41
2 ^a	384± 31	367± 40	346± 33	342± 39	340±32
3 ^a	364± 47	376± 41	333± 47	336± 32	338±40
4 ^a	402± 19	379± 31	375± 24	366± 24	356±21
5 ^a	403± 42	402± 46	411± 35	399± 42	383±44
6 ^a	389± 32	411± 51	395± 20	389± 48	378±47
7 ^a	368± 6	402± 39	444± 36***	370± 24	382±19
8 ^a	396± 30	353± 41	361± 36	316± 36**	361±43
9 ^a	424± 44	390± 55	407± 31	352± 39*	382±42
10 ^a	409± 30	405± 34	407± 21	349± 30*	371±42
11 ^a	406± 33	381± 52	389± 30	343± 44	393±49
12 ^a	411± 32	365± 39	400± 29	331± 30**	395±31
Machos					
1 ^a	302±43	291±38	295±38	275±44	305±43
2 ^a	316±36	301±25	304±31	289±37	304±35
3 ^a	291±33	274±51	326±56	287±47	292±38
4 ^a	305±24	317±19	331±21	314±25	309±16
5 ^a	322±28	318±38	323±37	316±26	329±39
6 ^a	321±36	333±41	321±35	315±31	334±37
7 ^a	331±31	332±18	317±22	331±26	337±18
8 ^a	316±42	281±39	298±50	319±58	336±46
9 ^a	306±34	295±21	319±27	313±24	341±26
10 ^a	331±37	311±28	316±21	306±34	329±23
11 ^a	297±32	281±42	286±43	294±28	306±36
12 ^a	328±16	312±32	303±24	297±17	318±42

Os valores estão expressos em média ±d.p. (n=10). One-way ANOVA/

Tukey.*p<0,05.

Os dados obtidos revelaram que não ocorreu alteração estatisticamente significativa no consumo de ração dos animais machos e fêmeas tratadas com as 3 doses do extrato durante todo o período experimental (tabela 4).

Tabela 4: Consumo semanal de ração por ratos durante os 90 dias de tratamento crônico com diferentes doses do Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei*.

Semanas	Grupos tratados				
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	SATELITE
Fêmeas					
1 ^a	222±28	251±29	255±52	241±29	261±25
2 ^a	233±20	256±15	238±24	239±15	250±20
3 ^a	224±25	244±11	222±11	238±16	240±12
4 ^a	217±12	240±18	227±21	236±15	240±18
5 ^a	215±44	236±40	229±12	226±23	240±20
6 ^a	208±13	225±13	222±11	219±18	237±12
7 ^a	189±46	221±53	213±48	208±46	242±41
8 ^a	212±13	227±15	217±12	213±18	232±14
9 ^a	229±32	253±39	235±29	228±30	251±39
10 ^a	229±30	256±30	240±23	223±30	253±32
11 ^a	219±16	253±20**	231±15	218±16	243±13
12 ^a	220±9	244±29	231±3	214±9	259±13
Machos					
1 ^a	168±34	164±28	177±58	163±36	170±34
2 ^a	198±52	188±58	190,2±56	186±59	191±63
3 ^a	174±16	160±11	166±9	166±16	166±12
4 ^a	184±17	162±13	175±11	164±20	177±27
5 ^a	164±26	152±49	157±44	151±16	171±31
6 ^a	152±15	150±19	150±12	152±13	157±21
7 ^a	155±26	162±43	154±41	174±30	184±31
8 ^a	166±19	152±10	164±12	158±11	156±8
9 ^a	174±24	158±22	169±25	175±26	178±18
10 ^a	162±26	161±20	162±22	167±29	170±24
11 ^a	161±14	163±28	155±19	168±14	161±12
12 ^a	175±20	166±26	159±11	168±8	163±10

Os valores estão expressos em média ±d.p. (n=10). One-way ANOVA/

Tukey.*p<0,05.

A avaliação ponderal não revelou alterações estatisticamente significantes para os machos e fêmeas tratadas com as doses de Pg-EEtOH durante os 90 dias de tratamento, Os resultados são mostrados na tabela 5.

Tabela 5: Variação da evolução ponderal de ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio crônico

Semanas	Grupos tratados				
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	SATELITE
Fêmeas					
1 ^a	43±19	51±20	52±9	33±16	49±13
2 ^a	21±9	31±23	29±7	26±24	28±8
3 ^a	14±5	21±5	17±5	19±20	16±4
4 ^a	16±8	19±4	16±6	21±8	19±4
5 ^a	9±8	12±10	16±4	14±9	15±4
6 ^a	-6±32	18±6*	13±8	11±14	18±19
7 ^a	25±35	17±6	16±10	22±9	15±14
8 ^a	6±9	12±7	6±11	10±7	9±5
9 ^a	13±9	16±19	16±8	15±8	19±15
Machos					
1 ^a	14±7	12±6	11±3	12±4	13±8
2 ^a	7±4	5±4	6±4	4±4	4±3
3 ^a	6±3	4±4	4±2	5±4	5±3
4 ^a	7±6	5±4	8±19	5±7	6±4
5 ^a	1±4	1±6	0,4±7	2±6	5±5
6 ^a	3±5	7±7	3±4	4±6	2±9
7 ^a	8±9	10±7	8±6	8±7	10±14
8 ^a	4±5	2±5	4±8	4±7	1±5
9 ^a	8±19	3±8	4±7	8±4	6±11

Os valores estão expressos em média ±e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/

Tukey.*p<0,05.

Na avaliação comportamental dentre os parâmetros avaliados houve diminuição da ambulação das fêmeas tratados com as doses de 10, 30 e 90 mg/kg

(3ª avaliação) e diminuição do número de bolos fecais para os machos que receberam as doses de 30 e 90 mg/kg na 4ª avaliação.

Os resultados são apresentados nas tabelas 6 a 9.

Tabela 6: Número de ambulações no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio crônico.

Ambulações	Grupos tratados							
	MACHOS				FÊMEAS			
	Control e	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
1ª	21±5	15±4	22±14	15±7	24±4	14±10	17±7	23±10
2ª	24±4	21±5	21±14	18±9	20±3	12±5*	16±2	14±5
3ª	17±5	15±6	19±18	12±8	21±6	8±4**	11±5*	6±5**
4ª	19±6	18±7	23±13	18±14	12±5	10±5	15±5	9±6

Os valores estão expressos em média ±e.p.m. (n=5). One-way ANOVA/

Tukey.*p<0,05.

Tabela 7: Número de levantamentos no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio crônico.

Levantar	Grupos tratados							
	MACHOS				FÊMEAS			
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
1ª	0,4±0,5	0,8±1,3	3,4±5	1,0±1,4	4,6±2,9	4,4±6,6	0,0±0,0	0,2±0,4
2ª	1,2±1,3	0,4±0,5	2,0±2,1	1,6±1,1	2,6±1,8	0,8±1,3	0,4±0,5	3,2±4,0
3ª	3,8±4,9	0,4±0,5	2,2±1,6	3,2±0,8	3,4±2,7	1,2±0,8	1,0±1,2	1,2±1,2
4ª	1,8±2,9	0,2±0,4	2,4±1,6	2,0±1,8	2,6±1,8	1,8±1,7	1,0±1,0	1,2±1,8

Os valores estão expressos em média ±d.p. (n=10). One-way ANOVA/

Tukey.*p<0,05.

Tabela 8: Número de auto limpeza no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio crônico.

Auto limpeza	Grupos tratados							
	MACHOS				FÊMEAS			
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
1 ^a	11±7	10±2	12±7	5±4	10±3	9±6	7±5	8±6
2 ^a	6±1	6±2	8±7	5±3	7±3	4±2	4±3	4±3
3 ^a	10±4	12±6	13±12	11±10	9±2	9±7	11±6	7±4
4 ^a	8±6	11±8	18±11	14±10	5±3	14±8	16±9	11±5

Os valores estão expressos em média $\pm$ d.p. (n=10). One-way ANOVA/Tukey.*p<0,05.

Tabela 9: Número de defecações no experimento de campo aberto, em ratos tratados com diferentes doses do Extrato Etanólico *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio crônico.

Defecação	Grupos tratados							
	MACHOS				FÊMEAS			
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
1 ^a	4±2	4±3	2±2	2±3	2±3	2±3	3±4	4±3
2 ^a	1±2	1±1	1±2	3±4	2±3	2±2	3±3	3±3
3 ^a	3±3	2±2	2±2	2±3	2±2	2±2	2±2	1±2
4 ^a	4±1	2±1	1±2**	1±1*	3±3	2±2	2±2	3±4

Os valores estão expressos em média $\pm$ d.p. (n=10). One-way ANOVA/Tukey.*p<0,05.

Na avaliação da atividade motora dos animais através do teste do de Rota Rod não houve qualquer alteração no tempo de permanência na barra giratória em ambos os sexos nas 3 doses de Pg-EEtOH testadas, sedo que todos os animais permaneceram por 180 segundos na barra (tabela 10).

Tabela 10: Tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do aparelho Rota –rod, de ratos durante o tratamento crônico com do Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei*.

Contagem	Grupos tratados							
	MACHOS				FÊMEAS			
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
1 ^a	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0
2 ^a	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0
3 ^a	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0
4 ^a	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0	180±0

Os valores estão expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=5). One-way ANOVA/Tukey.*p<0,05.

Os resultados da análise hematológica não demonstraram alterações significativas nos parâmetros avaliados em nenhum dos grupos tratados (tabela 11).

Tabela 11: Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de ratos wistar tratados com o Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio de toxicidade crônico .

Parâmetros hematológicos	Grupos tratados				
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Satelite
Fêmeas					
Hemacias (10e3/uL)	793±53	813±28	801±38	801±64	790±29
Hemoglobina (g/dL)	1,5±0,05	1,6±0,06	1,6±0,07	1,6±0,14	1,5±0,04
Hematocrito (%)	3,9±0,17	4,1±0,13	3,9±0,22	4,0±0,36	4±0,27
Volume Corpuscular Médio (fL)	49±2,1	50±1,0	50±1,1	50±1,5	51±1,8
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	19±1,18	20±0,67	20±0,68	20±0,80	20±0,7
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (g/dL)	39±1,18	39±0,78	40±1,13	40±0,63	40±0,77
Distribuição do tamanho das células vermelhas (%)	11±0,56	11±0,53	11±0,43	11±0,29	11±0,88
Plaquetas (10e3/uL)	59±6,4	55±4,5	64±9,6	53±9,0	57±7,8
Leucócitos (10e3/uL)	555±136	343±60	633±362	412±150	587±87
Neutrófilos (%)	45±9,0	51±9,7	51±10	51±8,1	40±8,6
Eosinófilos (%)	0,11±0,33	0,30±0,48	0,11±0,33	0,30±0,67	0,2±0,4
Monócitos (%)	4±1,8	6±2,9	4±2,9	5±2,8	5±2,4
Linfócitos (%)	50±9,9	42±8,3	45±10,0	44±6,6	55±8,1
Machos					
Hemacias (10e3/uL)	714±61	694±50	690±61	739±67	754±41
Hemoglobina (g/dL)	1,4±0,07	1,5±0,07	1,5±0,16	1,5±0,11	1,4±0,05
Hematocrito (%)	3,5±0,21	3,6±0,21	3,6±0,39	3,7±0,29	3,7±0,11
Volume Corpuscular Médio (fL)	50±1,7	52±1,4	53±2,3	51±1,6	50±2,6
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	20±0,75	21±0,75	22±0,82	21±0,83	19±1,4
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (g/dL)	40±0,59	41±0,83	41±0,49	41±0,67	39±1,1
Distribuição do tamanho das células vermelhas (%)	10±0,41	10±0,55	10±0,47	10±0,33	10±0,56

Plaquetas (10e3/uL)	50±5,5	52±4,5	54±9,4	53±7,5	64±11
Leucócitos (10e3/uL)	295±126	237±58	343±96	356±105	474,6±168,9
Neutrófilos (%)	41±7,2	54±7,4	43±15,4	55±6,6	40±10
Eosinófilos (%)	0,37±0,5 1	0,14±0,37	0,14±0,3 7	0,20±0,4 2	0,11±0,33
Monócitos (%)	2,6±1,2	3,6±1,5	3,2±1,9	4,1±1,6	3,4±1,8
Linfócitos (%)	56±7,4	42±6,1	53±16	41±6,3	56±11

Os valores estão expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Tukey.*
p<0,05.

Na análise dos parâmetros bioquímicos não foram encontradas alterações significativas em nenhum dos animais tratados com Pg-EEtOH (tabela 12).

Tabela 12: Parâmetros Bioquímicos obtidos do sangue de ratos wistar tratados com o Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio de toxicidade crônico .

Parâmetros Bioquímicos	Grupos tratados				
	Controle	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	Satelite
Fêmeas					
Glicose (mg/dL)	88±19	98±23	104±22	120±24	151±26
Ureia (mg/dL)	43±4	42±5	41±4	44±7	36±6
Aspartato Amino transferase (U/L)	158±31	143±31	173±77	143±28	96±21
Alanina Amino transferase (U/L)	59±9	52±10	53±11	51±13	45±8
Creatinina (mg/dL)	0,50±0,0 5	0,48±0,0 3	0,51±0,0 6	0,54±0,06	0,49±0,05
Colesterol (mg/dL)	46±7	53±8	53±9	54±12	58±9
Fosfatase alcalina (U/L)	160±62	118±34	118±40	121±28	99±35
Lipoproteína de alta densidade (mg/dL)	27±2,5	30±3,8	30±4,3	30±5,3	30±3
Proteína total (g/dL)	6,1±0,2	6,3±0,3	6,0±0,2	6,2±0,4	5,9±0,2
Albumina (g/dL)	2,9±0,3	3,1±0,1	2,9±0,2	3,0±0,1	3,0±0,1
Globulina (g/dL)	3,1±0,2	3,2±0,2	3,1±0,2	3,2±0,4	2,8±0,2
triglicerídeos (mg/dL)	55±30	107±36	109±53	89±30	102±32
Ácido úrico (mg/dL)	1,1±0,3	1,0±0,3	1,2±0,5	0,9±0,4	0,6±0,2
Fósforos (mg/dL)	5±0,6	6±0,6	6±0,8	6±0,7	5±0,4
Cálcio (mg/dL)	9±0,2	9±0,2	9±0,4	9±0,3	10±0,3
Sódio (mEq/L.)	139±2	143±2	138±2	139±2	139±2,3
Potássio (mEq/L.)	5±0,2	5±0,3	5±0,8	5±0,5	4±0,3
Machos					
Glicose (mg/dL)	93±9,5	88±9,0	97±22	95±16	91±10
Ureia (mg/dL)	43±3,0	43±3,0	46±7,6	39±3,7	43±8
Aspartato Amino transferase (U/L)	145±17	162±39	157±31	120±16	165±45
Alanina Amino transferase (U/L)	54±9,2	55±8,8	58±23	46±8,3	59±11
Creatinina (mg/dL)	0,56±0,0 3	0,53±0,0 9	0,55±0,0 6	0,52±0,05	0,51±0,04
Colesterol (mg/dL)	61±20	69±14	61±8	64±12	56±10
Fosfatase alcalina (U/L)	109±24	80±29	85±46	94±29	114±30
Lipoproteína de alta densidade (mg/dL)	32±7,5	36±5,0	33±4,2	33±3,8	29±5

Proteína total (g/dL)	6,0±0,3	6,5±0,2	6,3±0,2	6,2±0,3	6,2±0,3
Albumina (g/dL)	3,2±0,4	3,3±0,2	3,1±0,3	3,2±0,3	3,3±0,3
Globulina (g/dL)	2,9±0,2	3,2±0,1	3,2±0,3	3,1±0,2	2,8±0,3
triglicerídeos (mg/dL)	68±23	71±18	82±25	77±29	32±8
Ácido úrico (mg/dL)	1,5±0,3	1,1±0,1	1,6±0,8	1,0±0,2	0,9±0,2
Fósforos (mg/dL)	4,3±0,5	5,2±1,1	5,3±1,1	4,5±0,4	5,4±0,6
Cálcio (mg/dL)	8,9±0,2	9,2±0,1	8,9±0,3	8,9±0,3	9,8±0,2
Sódio (mEq/L.)	137±2,0	140±2,6	136±2,1	136±2,4	139±2,8
Potássio (mEq/L.)	4,7±0,3	4,7±0,3	5,1±0,9	4,7±0,4	4,0±0,5

Os valores estão expressos em média $\pm$ d.p. (n=10). One-way ANOVA/ Tukey.*p<0,05.

Na avaliação da genotoxicidade através do teste de pesquisa de micronúcleos observou-se que o extrato não induziu a formação de micronúcleos em nenhuma das doses testadas quando comparado ao grupo controle (gráfico 1).

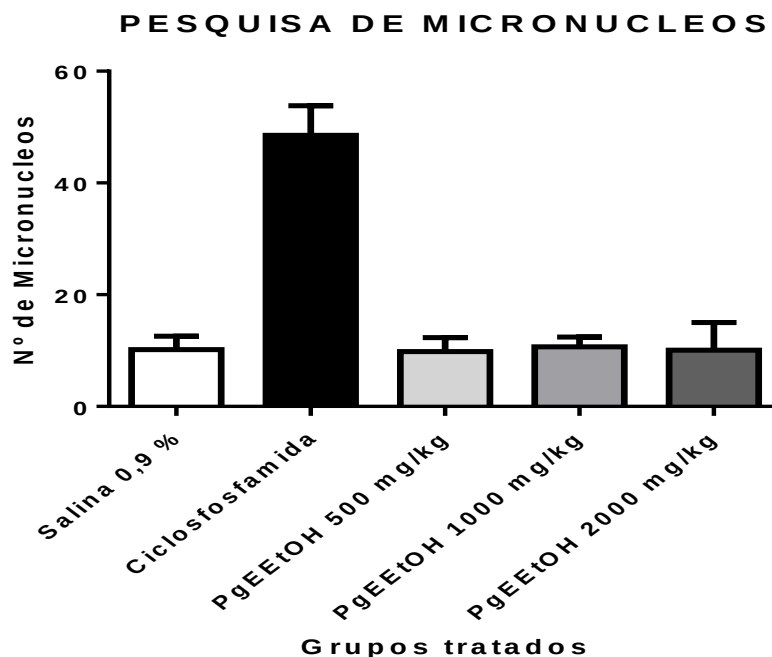


Grafico 01: Numero de micronúcleos em células sanguíneas de camundongos tratados com o Extrato Etanólico de *Pilosocereus gounellei* durante o ensaio de pesquisa de micronúcleos . Os valores estão expressos em média $\pm$ d.p. (n=6). One-way ANOVA/ Tukey.*p<0,05.

Discussão

As drogas que são consideradas eficazes possuem efeitos colaterais. Portanto acredita-se que os medicamentos fitoterápicos ou tem efeitos colaterais ou são ineficazes. No entanto, medicamentos à base de plantas são geralmente considerados como sendo agentes seguros e eficazes. Portanto, as pessoas todos os anos recorrem às plantas medicinais porque acreditam que os remédios a base de plantas são isentos de efeitos colaterais indesejáveis (17). O que torna os estudos toxicológicos de plantas medicinais de fundamental importância para garantir a segurança do uso dessas plantas e para o desenvolvimento de novos medicamentos.

No ensaio toxicológico crônico, os animais de ambos os sexos foram tratados com 3 diferentes doses por via oral que foi baseado em estudos anteriores de atividade antiinflamatória (18): dose menor (10 mg/kg), 3X a dose menor (30 mg/kg) e 9X a dose menor (90 mg/kg). A administração foi realizada diariamente durante 90 dias, sendo avaliados temperatura corpórea, glicemia caudal, parâmetros comportamentais e motores, evolução ponderal, consumo de água e ração e ao final do período experimental parâmetros bioquímicos, hematológicos e estudo anatomopatológico em caso de sinais de alterações macroscópicas ou nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nesse estudo avaliamos o efeito do uso contínuo de várias doses do extrato do caule de *Pilosocereus gounellei* sobre diversos parâmetros que indiquem sinais de toxicidade.

A temperatura colônica dos animais tratados, tanto machos quanto fêmeas, variou entre 36°C e 38°C (tabela 1), faixa considerada normal para ratos mostrando que o extrato não exerce efeitos sobre o centro de regulação térmica corporal. Nenhuma alteração foi constatada também na glicemia dos camundongos durante todo o experimento. Um efeito hipoglicemiante poderia ser esperado, uma vez que a espécie em questão é usada pela população para o tratamento de hiperglicemia (4).

A avaliação do consumo de água e alimentos durante estudos toxicológicos é utilizada como indicador de interferência das substâncias teste sobre o metabolismo (19). Neste estudo observamos que não ocorreu nenhuma alteração significativa nos animais tratados com as diferentes doses do extrato quando comparado aos seus respectivos controles (tabela 3 e 4).

A análise da variação da evolução ponderal (tabela 5) demonstrou que não ocorreu diferença estatística entre os grupos tratados e o controle tanto para os machos como para as fêmeas, o que corrobora com os resultados do consumo de água e ração demonstrando assim que não ocorreu alteração no metabolismo dos animais tratados.

O teste de campo aberto, realizado para a avaliação de parâmetros comportamentais, acusou diminuição na ambulação de ratos fêmeas nas doses de 10, 30 e 90mg/kg apenas na 3ª semana de tratamento, fato que poderia ser atribuído a uma possível ação depressora do Sistema Nervoso Central provocado pela administração do extrato. A redução no número de bolos fecais ocorrida nos machos nas doses de 30 e 90 mg/kg na 4ª avaliação, pode indicar uma diminuição no trânsito intestinal desses animais.

A avaliação da atividade motora através do aparelho Rota-rod, revelou ausência de qualquer efeito estimulante ou depressor do extrato sobre a atividade motora dos animais.

Ao final do ensaio crônico com EEB dos caules de *Pilosocereus gounellei*, foram analisados parâmetros bioquímicos e hematológicos dos ratos. Nenhuma alteração bioquímica ou hematológica foi encontrada após 90 dias de tratamento, o que indica que o extrato não alterou o funcionamento dos órgãos na análise macroscópica não foi detectado nenhuma alteração anatômica nos órgãos dos animais, baseado nesses dados não se fez necessária a análise histopatológica.

O teste do Micronúcleo avalia o efeito das substâncias frente ao conteúdo genético. Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo, resultantes da formação de partes cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos na mitose, consequências de quebras ou problemas de fuso, respectivamente. Quando a membrana nuclear é refeita, o DNA serve de catalizador para que seja originado um envelope nuclear em torno dele (20). Desta forma, qualquer fragmento ou cromossomo inteiro separados do núcleo principal formam um pequeno núcleo, denominado micronúcleo (MN) (21). A presença de micronúcleos está diretamente ligada a efeitos genotóxicos. Na análise de pesquisa de micronúcleos não foi observado nenhuma aumento significativo nos números de micronúcleos das células o que demonstra uma baixa genotoxicidade do extrato.

Conclusions

O presente estudo demonstrou que o extrato etanólico bruto dos caules de *Pilosocereus gonellei* possui baixa toxicidade mesmo com uso prolongado. Pois o mesmo não causou nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados. A espécie em estudo também não apresentou sinal de genotoxicidade o que demonstra que a planta pode ser considerada segura e usada pela população. Com base nesses resultados mais estudos devem ser realizados para avaliar a atividade farmacológica desse extrato tendo em vista que em trabalhos anteriores o extrato apresentou atividade antiinflamatória.

Agradecimentos:

Os autores gostariam de expressar os seus sinceros agradecimentos pelo apoio financeiro fornecido pela CAPES / CNPq do Ministério da Educação do Brasil.

Conflitos de interesse:

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. ABUD, H.F.; GONÇALVES, N. R.; REIS, R.G.E.; PEREIRA, D.S. & BEZERRA, A.M.E. Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter. *Revista Ciência Agronômica*, 41, n. 3, 468-474, 2010.
2. ZAPPI, D., TAYLOR, N., MACHADO, M. 2010. *Cactaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000070>).
3. ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M. & LOIOLA, M.I.B.. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.1, p.31 42, 2010.
4. ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; MELO, J.G. & SANTOS, J.P.. Medicinal plants of the

- caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology** 114, 325–354, 2007.
5. ALMEIDA, C.F.C.B.R. de; LIMA e SILVA, T.C. de; AMORIM, E.L.C. de; MAIA, M.B. de S. & ALBUQUERQUE, U.P. de. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments** 62, 127–142, 2005.
 6. Botha, C.J., Penrith, M.-L., 2008. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. *J. Ethnopharmacol.* 119, 549–558.
 7. Wink, M., Van Wyk, B.-E., 2008. *Mind-Altering and Poisonous Plants of the World*. Briza Publications, Pretoria.
 8. EKWALL, B. The basal cytotoxicity concept. In: GOLDBERG, A.M.; VAN ZUPTHEN, L. F. M. **The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing**. vol. 11. New York: Mary Ann Liebert, 1995, p. 721-725.
 9. CASTAÑO, A.; LECHÓN, M. J. G. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 695-705, 2005.
 10. SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003, 422 p.
 11. PAOLINI, M.; NESTLE, M. Pitfalls of enzymes-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. **Mutation Research**, v. 543, p. 181-189, 2003.
 12. DINIZ, M. F. F. M. **Ensaio Toxicológicos Pré-clínicos com as Folhas de Cissampelos sympodialis Eichl**; Tese de Doutorado; Universidade Federal da Paraíba, 147pp, 2000.
 13. MANSUR, J.; MARTZ, R. M. W.; URLINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-) Δ^9 - tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open-field arena. **Psychopharmacology**, v.9, p.388-97, 1971.
 14. CARLINI, Elisaldo A., et al. Pharmacology of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Effects of teas prepared from leaves on laboratory. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 17, p. 37-64. 1986.

15. DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A route on simple apparatus for detecting neurological déficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association Scientific** Edit, v. 16, n. 3. 1957.
16. MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.62, p. 57-61, 1998.
17. PHILOMENA G. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview. *J ApplPharmaceutSci* 2011; 01(6): 40-44.
18. DIAS, G. E. N.; GORGONIO, I.F.; RAMALHO, J.A.; OLIVEIRA, K.M.; GUEDES E.J.R.C.E.; LEITE, F.C.; ALVES, M.F.; MACIEL, J.K.S.; SOUZA, M.F.V.; LIMA, C.M.B.L.; DINIZ, M.F.F.M., Acute Oral Toxicity and Anti-inflammatory Activity of Ethanolic Extract from *Pilosocereus gounellei* (Fac Weber) in Rats, **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v.7, n.5. 2015.
19. MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 112, p. 138-144, 2007.
20. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Cell growth and division. In: **Molecular Biology of the Cell**. London: Graland Publishing, 1989, p. 727-790.
21. WILD, D. Cytogenetic effects on the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by micronucleus test. **Mutation Research**, v. 56, p. 319-327, 1978.

5-CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos com a realização dos ensaios toxicológicos e farmacológicos não clínicos com o extrato etanólico obtido do caule da espécie *Pilosocereus gounellei* (F. A. C. Weber) pode-se concluir que:

- ✓ O extrato possui moléculas bioativas, com uma CL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ no modelo de artemia salina;
- ✓ O Pg-EEtOH apresentou baixa toxicidade para os ratos quando administrado por via oral de forma aguda e crônica;
- ✓ O extrato não induziu genotoxicidade nos camundongos;
- ✓ O Pg-EEtOH administrado por via oral apresentou atividade antiinflamatória, corroborando com os dados etnofarmacológicos, porém é necessários estudos mais aprofundados.

6-Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº116/96, de 12 de agosto de 1996. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 90/2004, de 16 de março de 2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de mar. 2004 v.53, Seção 1, p.34-35.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de Estudos não clínicos de Toxicologia e segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 de Janeiro de 2013, versão 2.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOS, L. J.; POLARI, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. Rev. Bras. Farm. v.80, n.3-4, p.72-76. 1999.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; MESQUITA, R.K.K. Riscos na utilização de plantas para uso medicinal comercializadas em mercados de São Luís/Maranhão. Rev. Ciênc. Saúde. v. 3, n.1, p. 37-42, 2001.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C., Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos, Rev. Bras. Pl. Med., v. 8, n. 3, p. 36-42, 2006.

AGRA, M.F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos Paraíba. Cidade: PNE, 1996.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M., Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, pp. 472-508, 2008.

BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. Agroecología, cultivos y usos del nopal. Estudio FAO producción y protección vegetal. Roma: FAO, 1999

BARBERA, G.. História e importância econômica e agroecológica. In: Barbera, G.; Inglese, P.; Pimienta-Barrios, E. Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira. FAO/ Sebrae. pp.1-11, 2001

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA S. Fundamentos de Toxicologia. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 2003. p.57-67

BARTHLOTT, W.; HUNT, D.R. Cactaceae. In: Kubitzki, K. The families and genera of vascular plants. 2: 161-197. Berlin, Springer. 1993.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA S. Fundamentos de Toxicologia. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora. pp.57-67, 2003.

BORTOLETTO, M.E.; MARQUES, M.B.; BEZERRA, M.C.C.; SANTANA, R.A.L.; BOCHNER, R. Análise epidemiológica dos casos registrados de intoxicação humana no Brasil no período de 1985 – 1993. *Rev. Brás. Toxicol.* v. 9, n.2, p.1-12. 1996.

BRANDÃO, M.G.L.; OLIVEIRA, P.; MOREIRA, R.A.; ALVES, R.M.S.; VIEIRA, M.T.; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos: drogas inscritas na farmacopéia brasileira. *Infarma*. v. 13, n. 11/12, p. 60-61. 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: PNPIC**. Atitude de Ampliação de Acesso, 1º Edição, Série B, texto básico de saúde, Brasília, DF, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. CEME. **Seminário para seleção do 2º elenco de plantas medicinais, classificação das espécies por classes terapêuticas.** s.l. Ministério da Saúde, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **D.O.U. - Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 90 de 16 de março de 2004. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos. **D.O.U. - Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

CARLINI, Elisaldo A., et al. Pharmacology of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Effects of teas prepared from leaves on laboratory. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 17, p. 37-64. 1986.

CARLINI, E.A. Medicamentos, drogas e saúde. São Paulo: Hucitec/ Sobravime, 1995.

CALIXTO, João B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal Medical Biological Research*. v. 33. n.2. p. 179-189. 2000.

CENTRAL DE MEDICAMENTOS (CEME). Portaria nº 104 de 29/12/1982. Brasília, DF. 1983.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução normativa nº 01/78 da Câmara Técnica de Medicamentos. Brasília, DF. 1978.

DINIZ, M. F. F. M. Ensaios Toxicológicos Pré-clínicos com as Folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl; Tese de Doutorado; Universidade Federal da Paraíba, 147pp, 2000.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A route on simple apparatus for detecting neurological déficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association Scientific Edit*, v. 16, n. 3. 1957.

FERREIRA-MACHADO, S.C.; RODRIGUES, M.P., NUNES, A.P.M., DANTAS, F.J.S.; De MATTOS, J.C.P.; SILVA, C.D.; MOURA, E.G.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicology Letters*, v. 151, p. 481-487, 2004.

HAYASHI, M.; MacGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.D.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.*, v. 35, p. 234-52, 2000.

HAYASHI, M.; TICE, R.R.; MacGregor, J.T.; Anderson, D.; BLAKEY, D.H.; KIRSCH-VOLDERS, M. OLESON, F.B.JR; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut. Res.* v. 312, p. 293-304, 1994.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. El interesante mundo de las cactáceas, México: Fondo de Cultura Econômica, pp. 235, 1995.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. ; Plantas Medicinais Cura Segura ? *Quím. Nova*, v. 2, n.3, p. 2-4, 2005.

LARINI, LOURIVAL. Avaliação toxicológica. In: LARINI, LOURIVAL. *Toxicologia*. 3 ed., Editora Manole. São Paulo. p. 43-58, 1999.

LOEPER, J.; DESCATOIRE, V.; LETTERON, P.; MOULIS, C.; DEGOTT, C.; DANSETTE, P.; FAU, D.; PESSAYRE, D.; Hepatotoxicity of germander in mice, *Gastroenterol.* **1994**, 106, 464.

LING, L.J.; CLARK, R. F. ; ERICKSON, T.B.; TRESTAIL III, J. H. Segredos em toxicologia. Respostas necessárias ao dia-a-dia em rounds, no Serviço de Emergência, em exames orais e escritos. Porto Alegre: Artemed, 2005. 368p.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. Revista Eletrônica Horizonte Científico, v. 1, n. 1, 2002.

MANSUR, J.; MARTZ, R. M. W.; URLINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of Cannabis sativa and (-) Δ^9 - transtetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open-field arena. Psychopharmacology, v.9, p.388-97, 1971.

MARIZ, S. R.; LIMA, D.M.B. ; RABELO, M.F.A.; MORAES, O.K.D.N.; SILVEIRA, L.M.S. Avaliação Preliminar de Casos de Intoxicação Humana Registrados em Hospitais de São Luís-MA Cad. Pesq. v.12, n.1-2, p.18-27; 2001.

MARIZ, S. R; Estudo Toxicológico Pré-Clínico de Jatropha gossypifolia L.; Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, p2, 2006.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas Medicinais. Viçosa: MG. Ed UFV, 220p: 3. ed. 2000.

MARTINS, L. S. T., Germinação de sementes de Pilosocereus arrabidae (Lem.) Byl. & Row (Cactaceae) de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical, 2007.

MCLAUGHLIN, J.L. e ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. Disponível em: <[www.diahome.org/content/abstract/1998/dij991 .pdf](http://www.diahome.org/content/abstract/1998/dij991.pdf)>. Acesso em: 6 fev 2006.

MEIADO, M. V.; ALBUQUERQUE, L. S. C.; ROCHA E. A.; ARÉCHIGA§ M. R.; LEAL I. R., Seed germination responses of Cereus jamacaru DC. ssp. jamacaru

(Cactaceae) to environmental factors, *Plant Species Biology*, v. 25, pp. 120-128, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília- DF. 2006.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.62, p. 57-61, 1998.

Palaska, E.; Sahin, G.; Kelicen, P.; Durlu, N.T.; Altinok, G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *Farmaco* **2002**, 57, 101-107

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

QUEIROZ, L. P; RAPINI, A; GIULIETTI, A. M. (Eds). **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-Árido Brasileiro**. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília, 2006. Disponível em: <http://www.uefs.br/ppbio/cd/portugues/editorial.htm> Acesso em 07 nov. 2015

REBMAN, J.; D. PINKAVA. *Cylindropuntia delgadilloana*, a new cholla (Cactaceae) from Baja California, Mexico. *Journ. Ariz.-Nev. Acad. Sciences*. v. 33:, pp. 154-156, 2001.

Revista Brasileira Saúde da Família, Práticas Integrativas e Complementares em Saúde: Uma Realidade no SUS, Publicação do Ministério da Saúde – Ano IX – Maio de 2008, Edição Especial, Brasília 2008.

SANTOS, J. S. Levantamento etnobotânico da flora medicinal do município de Tacaratu, Pernambuco. Monografia (Especialização em Programação do Ensino de

Biologia)– Faculdade de Formação de Professores de Garanhuns, Universidade de Pernambuco, Garanhuns. 2002.

SAWAYA, W. N.; KHAN, P. Chemical characterization of prickly pear seed oil, *Opuntia ficus-indica*. Journal of Food Science, Chicago, v. 47, p. 2060-2061, 1982.

SILVA, J.; FREITAS, T.R.; HEUSER, V.; MARINHO, J.R.; BITTENCOURT, F.; CERSKI, C.T.; KLIEMANN, L.M.; ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. Mutation Research, v. 470, p. 39-51, 2000.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS (SINITOX). Tabela 10. Evolução dos casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e evolução, Brasil, 2003. Disponível em <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em: 12/10/2015.

TAYLOR, N.; D. ZAPPI. Cacti of Eastern Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew. Richmond, U. K., 2004.

ZAPPI, D., TAYLOR, N., MACHADO, M. 2010. Cactaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB001745>).