

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E TOXICOLÓGICOS DAS
CASCAS DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna EM RATOS**

**AUTOR:
THIANE MARTINS MESSINA**

**ORIENTADORA:
PROF^a. DR^a. FABIANE MOREIRA FARIAS**

Uruguaiana, 2017.

THIANE MARTINS MESSINA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E TOXICOLÓGICOS DAS
CASCAS DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Moreira Farias

Uruguaiana, 2017.

THIANE MARTINS MESSINA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E TOXICOLÓGICOS DAS
CASCAS DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dissertação defendida e aprovada em:

Profª Drª Fabiane Moreira Farias

Orientadora

UNIPAMPA

Profª. Drª. Jacqueline Escobar da Costa Piccoli

UNIPAMPA

Prof. Dr. Rodrigo José Freddo

UNIPAMPA

Uruguaiana, 2017.

Dedico este trabalho à minha família, meu alicerce, que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

AGRADECIMENTO

Agradeço sinceramente a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço:

À minha família, pela confiança e por sempre estarem ao meu lado, apesar da distância. Aos meus pais e avó, agradeço pelos mais belos e importantes ensinamentos sobre a importância de se viver com dignidade, simplicidade e amor ao próximo; me espelho em vocês e dedico-lhes todo meu amor.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Fabiane Moreira Farias, pelo exemplo de profissional que é, saibas que é minha admiração como profissional e como pessoa. Jamais esquecerei dos seus ensinamentos, seus preciosos conselhos, e sua confiança. Hoje levo comigo a certeza de que nesses dois anos conheci uma pessoa fantástica, que nos seus abraços transmite muito amor e carinho. Muito obrigada!

Aos meus colegas do laboratório 409, obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pelos trabalhos desenvolvidos e pelas trocas de conhecimentos. Obrigada pelo companheirismo, pelas conversas, e pelas risadas, tenho certeza que iniciamos uma amizade que levarei para a vida toda.

Aos colegas e amigos, Bruno, Jonathaline e Maria Fernanda que sempre estiveram ao meu lado nesses dois anos durante os experimentos e nos momentos de lazer. Obrigada pela amizade verdadeira e pelo carinho.

Ao grupo de pesquisa NUBIOTOXIM, aos professores Michel e Luis Flavio. Obrigada pela acolhida no laboratório e pelo auxílio durante os experimentos.

À professora Jacqueline, por toda disponibilidade demonstrada para a realização dos testes bioquímicos, pelos auxílios e pelas ideias trocadas durante a execução deste trabalho.

À professora Francielli Stefanello, orientadora no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da UFPel, agradeço imensamente por ter me recebido sem medir esforços para que tudo fosse como o planejado, obrigada por todo seu empenho e de sua equipe.

Ao professor Renato Záchia do Departamento de Biologia - Herbário SMDB (Universidade Federal de Santa Maria), pela identificação botânica da espécie estudada.

Agradeço a Deus todo-poderoso pelo dom de vida que me concedeu e por ter iluminado o meu caminho durante todos esses anos, por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir, crescer.

RESUMO

Ceiba speciosa (MALVACEAE) é uma espécie arbórea que ocorre nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, sendo empregada principalmente para fins ornamentais. O chá das cascas da espécie é amplamente consumido na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul para a redução dos níveis sanguíneos de colesterol e prevenção do aumento dos mesmos. Embora a planta tenha um amplo uso popular na região, não há relatos na literatura científica sobre as suas ações farmacológicas ou dados de toxicidade, impossibilitando a avaliação do risco/benefício no emprego terapêutico de *C. speciosa*. Assim, os objetivos deste trabalho foram verificar se o tratamento com extrato aquoso das cascas de *Ceiba speciosa* por 14 dias é capaz de prevenir o aumento dos níveis sanguíneos de colesterol em ratos com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol, avaliar a influência da administração do extrato aquoso (28 dias) em ratos normais e realizar a investigação preliminar da toxicidade da espécie. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Pelotas (CEEA 5747-2015). O extrato aquoso foi obtido por decocção em água destilada e posterior liofilização, obtendo-se o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* (EALCs). Primeiramente, ratos Wistar foram divididos em 4 grupos: controle negativo tratado com solução salina (CS), controle positivo (CP), grupo tratado com EALCs 200mg/Kg, e grupo tratado com EALCs 400mg/Kg. Os animais dos grupos tratados receberam o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* (200mg/Kg e 400mg/Kg), por gavagem, durante 14 dias. Posteriormente, a hipercolesterolemia foi induzida com uma única administração intraperitoneal de Tyloxapol, nos grupos tratados e no grupo controle positivo. Todos os animais foram eutanasiados 48 horas após a administração do Tyloxapol, tendo o sangue coletado para as análises bioquímicas (colesterol, glicose, triglicerídeos, ureia e creatinina). Na segunda parte do estudo, os ratos foram divididos em três grupos: grupo controle negativo (CS), grupo tratado com EALCs 200mg/Kg e grupo tratado com 400mg/Kg. O grupo controle negativo recebeu solução salina e os grupos tratados receberam o EALCs por gavagem durante 28 dias. O sangue coletado após a eutanásia dos animais foi empregado para a determinação dos níveis sanguíneos de colesterol e glicose. O fígado e o rim foram removidos e empregados para a avaliação preliminar da toxicidade da espécie (mutagenicidade e genotoxicidade). Os resultados obtidos neste estudo foram analisados através do software estatístico Graph Pad Prism 5.0. O extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* não foi capaz de impedir o aumento dos níveis sanguíneos de colesterol, mas a dose de 200mg/Kg reduziu significativamente os níveis de glicose em ratos com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol quando comparados ao controle positivo. O extrato da espécie não alterou os níveis sanguíneos de colesterol de ratos normais, porém aumentou significativamente os níveis de glicose nas duas doses testadas. *C. speciosa* não promoveu alterações mutagênicas em tecido hepático ou renal. Porém, o extrato EALCs 400mg/Kg induziu danos ao DNA no tecido hepático, sugerindo ação genotóxica. Os resultados deste trabalho não permitem confirmar ou descartar a atividade hipocolesterolêmica de *C. speciosa*, mas fornecem informações importantes no que diz respeito à segurança da população que consome regularmente a espécie.

Palavras chaves: *Ceiba speciosa*, colesterol, glicose, toxicidade, uso popular

ABSTRACT

Ceiba speciosa (MALVACEAE) is a tree species that occurs in the central-west, southeastern and southern regions of Brazil, being used mainly for ornamental purposes. The bark tea of the species is widely consumed in the northwest region of the State of Rio Grande do Sul for reducing blood cholesterol levels and preventing their increase. Although the plant is widely used in the region, there are no reports in the scientific literature about their pharmacological actions or toxicity data, making it impossible to evaluate the risk/benefit in therapeutic employment of *C. speciosa*. Thus, the objectives of this work were to verify if the treatment with aqueous extract of the barks of *Ceiba speciosa* for 14 days is able to prevent the increase of blood cholesterol levels in rats with hypercholesterolemia induced by Tyloxapol, evaluate the influence of aqueous extract administration (28 days) on normal rats and carry out preliminary investigation of the toxicity of the species. This work was approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation (CEEAA) of Universidade Federal do Pelotas (CEEAA 5747-2015). The aqueous extract was obtained by decoction in distilled water and subsequent lyophilization, obtaining the lyophilized aqueous extract of *C. speciosa* (EALCs). Firstly, Wistar rats were divided into 4 groups: negative control treated with saline solution (CS), positive control (CP), group treated with EALCs 200mg/kg, and group treated with EALCs 400mg/kg. The animals in the treated groups received *C. speciosa* lyophilized aqueous extract (200mg/kg and 400mg/kg) by gavage for 14 days. Subsequently, hypercholesterolemia was induced with a single intraperitoneal administration of Tyloxapol in the treated and positive control groups. All animals were euthanized 48 hours after administration of Tyloxapol, and blood was collected for biochemical analyzes (cholesterol, glucose, triglycerides, urea, and creatinine). In the second part of the study, the rats were divided into three groups: negative control group (CS), group treated with EALCs 200mg/kg and group treated with 400mg/kg. The negative control group received saline solution and the treated groups received the EALCs by gavage for 28 days. The blood collected after the euthanasia of the animals was used to determine blood levels of cholesterol and glucose. The liver and kidney were removed and used for preliminary evaluation of the species toxicity (mutagenicity and genotoxicity). The results obtained in this study were analyzed through the statistical software Graph Pad Prism 5.0. The lyophilized aqueous extract of *C. speciosa* was not able to prevent the increase of blood levels of cholesterol, but the dose of 200mg/kg significantly reduced the glucose levels in rats with Tyloxapol-induced hypercholesterolemia when compared to the positive control. The extract of the species did not alter the blood levels of cholesterol in normal rats, but significantly increased the glucose levels in the two doses tested. *C. speciosa* did not promote mutagenic changes both in hepatic and renal tissue. However, the extract EALCs 400mg/kg induced DNA damage in the hepatic tissue, suggesting genotoxic action. The results of this work do not confirm nor discard the hypocholesterolemic activity of *C. speciosa*, but provide important information regarding the safety of the population that regularly consumes the species.

Keywords: *Ceiba speciosa*, cholesterol, glucose, toxicity, popular use

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ceiba speciosa</i> (paineira).	21
Figura 2. Representação ilustrativa de imagens do ensaio cometa em leucócitos humanos.	25
Figura 3. Níveis de colesterol.....	27
Figura 4. Níveis de triglicerídeos	28
Figura 5. Níveis de glicose..	29
Figura 6. Níveis de creatinina.....	30
Figura 7. Níveis de ureia	30
Figura 8. Níveis de colesterol em ratos normais.	31
Figura 9. Níveis de glicose em ratos normais.....	32
Figura 10. Teste de Micronúcleo em tecido hepático de ratos normais.....	32
Figura 11. Teste de Micronúcleo em tecido renal de ratos normais.....	33
Figura 12. Teste Cometa em tecido hepático de ratos normais.....	33
Figura 13. Teste Cometa em tecido renal de ratos normais.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

CEEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal

CP – Controle positivo

CS – Controle saudável

DCV - Doenças Cardiovasculares

DM – Diabete Mellitus

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EALCs – Extrato Aquoso Liofilizado de *Ceiba speciosa*

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

HMG – CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

IDL – Lipoproteínas de densidade intermediária

IDN – Índice de Divisão Nuclear

ID – Índice de Dano ao DNA

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

SM – Síndrome Metabólica

SUS - Sistema Único de Saúde

VLDL – Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Doenças cardiovasculares	16
3.2 Toxicidade de espécies vegetais.	19
3.3 <i>Ceiba speciosa</i>	20
4 OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo geral.....	22
4.2 Objetivos específicos	22
5 MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1 Material Vegetal	23
5.2 Extrato Aquoso de <i>C. speciosa</i>	23
5.3 Animais de experimentação.....	23
5.4 Avaliação da capacidade de prevenção do aumento nos níveis de colesterol induzida por Tyloxapol em ratos.	24
5.5 Avaliação da influência do extrato aquoso <i>C. speciosa</i> sobre parâmetros bioquímicos e toxicológicos em ratos normais.	24
5.6 Avaliação da genotoxicidade pelo Teste Cometa.	25
5.7 Avaliação da mutagenicidade pelo Teste Micronúcleo.	26
5.8 Análises bioquímicas.	26
5.9 Análise estatística	26
6 RESULTADOS	27
6.1 Rendimento do extrato aquoso de <i>C. speciosa</i>	27
6.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos em ratos com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol.	27
6.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos e toxicológicos em ratos normais.	31
6.3.3 Análise bioquímica	31
6.3.4 Avaliação da mutagenicidade (Teste Micronúcleo).....	32
6.3.5 Avaliação da genotoxicidade (Teste Cometa)	33
7 DISCUSSÃO	35
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40

1 INTRODUÇÃO

A história do uso de plantas para fins medicinais é relatado em diferentes épocas da evolução humana, demonstrando assim, o seu emprego como instrumento de cura e prevenção para diversas patologias (LEITE, 2009; OZKAN *et al.*, 2016). Com isso, o interesse científico em estudos relacionados a atividade farmacológica, toxicidade e composição química das ervas medicinais tem aumentado nos últimos anos, já que muitas plantas são utilizadas pela população mesmo sem comprovação da sua eficácia e segurança. Por apresentarem um grande número de moléculas com potencial terapêutico, as espécies vegetais contribuem na busca de novos produtos biologicamente ativos, havendo relatos de produtos naturais com efeito hipoglicemiante, hipotensor, hipocolesterolêmico, entre outros, que estão amplamente relacionados com sua complexa composição química (PIZZIOLO, 2011; NTCHAPDA *et al.*, 2015).

O risco de doenças cardiovasculares tem aumentado no Brasil e ganhado atenção especial, principalmente pela morbimortalidade demonstrada na sociedade (MATOS *et al.*, 2005). A hiperlipidemia é uma das causas de doenças cardiovasculares, como o desenvolvimento de aterosclerose, infarto agudo do miocárdio ou hipertensão (DURAI PANDIYAN, 2016). Uma variedade de medicamentos é utilizada para o tratamento da hipercolesterolemia; porém, devido seu alto custo e os diversos efeitos adversos, pesquisadores têm se empenhado na busca por produtos de origem natural que tenham efeito na diminuição de níveis sanguíneos de colesterol (SCHNEIDER *et al.*, 2015; MUKTHAMBA e SRINIVASAN, 2016; GARCÍA *et al.*, 2016). Plantas utilizadas na medicina tradicional são consideradas seguras, baseadas no seu longo uso no tratamento de doenças e no conhecimento adquirido durante séculos. No entanto, pesquisas recentes demonstram que elas podem ser altamente tóxicas, mutagênicas e cancerígenas (EZURUIKE e PRIETO, 2014; PENG, ZHANG, ZHOU, 2016). Sendo assim é imprescindível investigar, além da composição química e avaliação farmacológica, os dados toxicológicos que garantam o uso seguro e eficaz de plantas medicinais.

Neste contexto, as cascas de *Ceiba speciosa* (paineira) são utilizadas no interior do estado do Rio Grande do Sul, na forma de chá ou adicionadas ao chimarrão, para a redução e/ou manutenção dos níveis sanguíneos de colesterol. Contudo, a

literatura não disponibiliza informações científicas a respeito de sua composição química, eficácia para esse fim e/ou dados sobre sua toxicidade.

2 JUSTIFICATIVA

A fitoterapia consiste no uso de espécies vegetais e seus derivados com finalidade terapêutica, constituindo uma prática adotada desde os primórdios da humanidade (LEITE, 2009). A Organização Mundial da Saúde acredita que cerca de 80% da população mundial tem como principal opção terapêutica o uso de plantas medicinais, sendo que os principais fatores que contribuem para sua utilização são: o alto custo dos medicamentos alopáticos, difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos naturais (NICOTELLI *et al.*, 2010).

No Brasil, a utilização destes produtos também é impulsionada por outros fatores, entre eles: a diversidade vegetal do país; pelo fácil acesso às diferentes espécies, quer seja pela de comercialização destes produtos em feiras livres e mercados públicos, quer seja pela possibilidade de cultivo nos quintais das residências; e, principalmente, pelas profundas raízes culturais da população brasileira, através de crenças populares vindas de curandeiros, raizeiros, médiuns e a própria tradição oral. Na maioria dos casos, plantas medicinais são consumidas na forma de chás, que constituem a forma de preparo mais comum e frequente, infusões e garrafadas (extratos alcoólicos ou xaropes obtidos de várias plantas) (FRANÇA *et al.*, 2008).

Erros de diagnósticos, identificação botânica incorreta, contaminação, uso irracional, plantio e armazenamento inadequado podem ser perigosos, levando a superdose, inefetividade terapêutica e reações adversas, podendo também comprometer a eficácia de tratamentos convencionais por conta de interações medicamentosas (BALBINO e DIAS, 2010).

No Brasil, foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), que tem por objetivo ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS. Na fitoterapia, tal política prevê incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país, elaboração da Relação de Plantas Medicinais e da Relação Nacional de Fitoterápicos, promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos no SUS, disponibilização de serviços relacionados com a segurança, eficácia e qualidade das plantas medicinais, entre outros (BRASIL, 2006).

A população em geral, tem a ideia errada de que as plantas medicinais não causam efeitos nocivos à saúde por serem produtos de origem natural. No entanto, tendo em vista que os princípios ativos das plantas medicinais são substâncias químicas complexas e que apresentam atividade farmacológica sobre o organismo, podem apresentar efeitos adversos, contra indicações, interações com fármacos convencionais e toxicidade (NICOLETTI *et al.*, 2010). Neste contexto, para assegurar a segurança dos medicamentos fitoterápicos (constituídos exclusivamente de matérias primas vegetais), a Resolução nº 90 de 16/03/2004, publicou o “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, com o objetivo de padronizar métodos para os estudos de toxicologia pré-clínica com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido (BRASIL, 2004).

Assim é evidente a importância da conscientização de pesquisadores, dos profissionais da saúde e da comunidade quanto a importância de estudos direcionados a investigação a respeito da composição química, atividade farmacológica, e principalmente da segurança e eficácia das plantas medicinais, já que seu uso muitas vezes é irracional e sem orientações da forma correta de uso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças cardiovasculares

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são uma preocupação mundial, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento, onde o seu crescimento significativo tem maior impacto nas classes menos favorecidas, havendo assim necessidade de intervenções eficazes, de baixo custo e principalmente de caráter preventivo (REIS *et al.*, 2016). Os principais fatores de risco que podem influenciar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares são: predisposições genéticas, idade, tabagismo, níveis elevados de colesterol, pressão arterial elevada, sedentarismo, dieta hipercalórica e diabetes (OZKAN *et al.*, 2016).

Os principais lipídios presentes no plasma humano são: colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos, fosfolipídios e os ácidos graxos não esterificados. Eles são transportados na forma de lipoproteínas, sendo classificados de acordo com sua densidade, sendo elas: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (KAJAL *et al.*, 2016).

Entre as DCV, a hipercolesterolemia é caracterizada como a elevação do colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) (CHEURFA e ALLEM, 2015; MOCELIN *et al.*, 2016).

O tratamento para indivíduos diagnosticados com hipercolesterolemia, envolve a prática de exercícios físicos, dieta equilibrada e terapia farmacológica baseada no uso de estatinas isoladas ou em associação. Tais fármacos inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, interrompendo assim a conversão de HMG-CoA em mevalonato, que é a etapa limitante da biossíntese do colesterol (DU SOUICH, ROEDERER, DUFOUR, 2017).

Entretanto as estatinas apresentam efeitos adversos e contraindicações, especialmente relacionados à elevação dos níveis de enzimas hepáticas (PEREIRA *et al.*, 2015). Muitas espécies vegetais têm sido empregadas popularmente para o tratamento e prevenção da hipercolesterolemia, visto que medicamentos sintéticos podem apresentar efeitos adversos e também um elevado custo (RATES, 2000;

MOCELIN *et al.*, 2016). Exemplo do uso de plantas com este efeito é apresentado por Vijayaraj e colaboradores (2013) que avaliaram o extrato de flores de *Cassia auriculata* em ratos e demonstraram efeito hipocolesterolêmico após 14 dias de tratamento. De modo semelhante Harnafi e colaboradores (2007) avaliaram a atividade hipolipidêmica do extrato rico em polifenóis de *Ocimum basilicum* (manjeriço) em ratos. Os resultados do estudo indicam que *O. basilicum* pode conter produtos polares capazes de reduzir as concentrações de lipídios plasmáticos, e sendo assim, ser benéfica para o tratamento de hiperlipidemia e aterosclerose. Ibrahim e colaboradores (2016) avaliaram as atividades hipercolesterolemiantes e hipertrigliceridemiante de quatro extratos de *Marrubium vulgare* utilizando hiperlipidemia induzida por Tyloxapol em camundongos. Após 7 e 24 horas de tratamento houve diminuição significativa dos níveis de colesterol total.

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, sendo considerada um problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas, e está associada a complicações mais graves, como hiperlipidemia, hipertensão e aterosclerose (BARKAOUI *et al.*, 2017). A maioria dos casos de DM ocorre em dois tipos: tipo I, em que não há produção e secreção de insulina pelas células beta do pâncreas, conhecido como diabetes mellitus dependente de insulina, e o tipo II, onde a insulina está presente na corrente sanguínea, mas sem exercer sua ação principal, diminuindo sua atuação em órgãos periféricos, conhecido como diabetes mellitus não dependente de insulina. O tratamento do DM tipo I, que é hereditário, envolve a administração insulina injetável. No DM tipo II, o controle da glicemia é obtido pela reeducação alimentar e uso de fármacos hipoglicemiantes orais (MARÍN-PEÑALVER *et al.*, 2016; SATHASIVAMPILLAI *et al.*, 2017). A hiperglicemia é a principal manifestação clínica da DM, mas também ocorrem diversas anormalidades no metabolismo de VLDL, LDL e HDL (KHATUNE *et al.*, 2016).

Atualmente fármacos são utilizados como hipoglicemiantes, porém, assim como os medicamentos utilizados no tratamento das hiperlipidemias, apresentam alguns efeitos adversos como hipoglicemia, distúrbios gastrointestinais e toxicidade hepática, que são os principais responsáveis pela falta de adesão ao tratamento. Nesse contexto, várias plantas têm sido estudadas como tratamentos alternativos com custo mais acessível, menor incidência de efeitos adversos e baixa toxicidade (KHATUNE *et al.*, 2016; KULKARNI e GARUD, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Rodrigues e colaboradores (2012) realizaram pesquisa para identificar as plantas que são mais utilizadas pela população no Rio Grande do Sul para a diminuição e/ou prevenção da diabetes. Foram mencionadas 81 espécies de 42 famílias de plantas, sendo que as mais citadas foram *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) e *Syzygium cumini* (jambolão).

Mais especificamente, alguns estudos avaliam a atividade hipoglicemiante das plantas induzindo a hiperglicemia em ratos, como é apresentado por Kulkarni e Garud (2016), que avaliaram a eficácia do tratamento de 28 dias com extrato aquoso das folhas de *Bauhinia variegata* em ratos com hiperglicemia induzida pela administração de estreptozotocina. Ao final do estudo, os autores concluíram que o extrato aquoso teve atividade hipoglicemiante para diabetes tipo I e tipo II. Kumar e colaboradores (2012) investigaram a atividade antidiabética, antihiperlipidêmica e antioxidante do extrato metanólico de *Amaranthus viridis* (caruru), a planta é utilizada popularmente nas Filipinas como laxante, analgésico, antiemético, diurético. Foram avaliadas as doses 200 mg/Kg e 400 mg/Kg do extrato metanólico da espécie por 15 dias em ratos com diabetes induzida com aloxano. Em ambas as doses do extrato houve diminuição significativa dos níveis de glicose e perfil lipídico em relação ao grupo controle, sugerindo assim possível atividade antidiabética e antihiperlipidêmica. Em estudo realizado por Chandran e colaboradores (2016), o extrato metanólico das cascas de *Syzygium calophyllifolium* apresentou atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina após tratamento de 15 dias. Confirmando assim o seu uso popular como antidiabético.

A Síndrome Metabólica (SM) é caracterizada como um conjunto de fatores de risco cardiovascular, geralmente associado à deposição central de gordura e à resistência à insulina. Para que um paciente seja diagnosticado com a SM, deve apresentar de dois ou três fatores relevantes como: obesidade central, hipertensão arterial, glicemia alterada (ou diagnóstico de diabetes) e dislipidemia (MONTAZERIFAR *et al.*, 2016). Ainda não se estabeleceu uma causa única ou múltiplas causas para o desenvolvimento da SM, a hipótese mais aceita para descrever sua fisiopatologia é a resistência à insulina e a obesidade. A resistência à insulina é quando há defeito na ação da insulina, resultando em uma hiperinsulemia compensatória para manter os níveis de glicemia normais. A insulina tem várias ações na regulação do metabolismo dos lipídios em indivíduos em condições normais, entretanto em obesos ocorrem diversas alterações na atuação de determinadas

enzimas e no metabolismo lipídico. As principais alterações são: níveis aumentados de VLDL, em consequência à maior produção de triglicerídeos pelo fígado e ao menor catabolismo, redução dos níveis e do tamanho de HDL (DEBOER e GURKA, 2017; EYZAGUIRRE *et al.*, 2011).

Segundo Vidigal e colaboradores (2013), a prevalência de SM no Brasil é de 29,6% entre a população adulta. Nos Estados Unidos, em 2010, a prevalência de SM em adultos era de 22,6%, enquanto no Chile, Colômbia, México, Peru e Venezuela revelou uma alta incidência de SM que variou de 12,3% a 42,7% (BELTRÁN-SÁNCHEZ *et al.*, 2013).

3.2 Toxicidade de espécies vegetais

As plantas e seus derivados são amplamente utilizados desde os primórdios da humanidade para diversas finalidades, principalmente para fins medicinais (OZKAN *et al.*, 2016). Um dos fatores que mais contribuem para o amplo uso popular dos produtos naturais é o conhecimento empírico, transmitido de geração em geração (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). O uso do termo “natural” contribui para o uso irracional das plantas medicinais, pois a população acredita que “não faz mal para a saúde porque é 100% natural”, porém esses produtos podem apresentar toxicidade, efeitos adversos e interação com outras substâncias (BALBINO e DIAS, 2010).

França e colaboradores (2008), relatam as principais plantas medicinais utilizadas na cidade de Campina Grande – PB, além de verificar se os herbolários atuantes na cidade oferecem as informações necessárias à utilização corretas dos produtos naturais, se orientam a população quanto a possibilidade de intoxicação ou interação com os medicamentos alopáticos. Os autores concluíram que os herbolários tem conhecimento da maioria das plantas utilizadas pela população, porém carecem de informações acerca da indicação correta desses produtos, dos efeitos colaterais e toxicidade. Oliveira e Gonçalves (2006) realizaram uma revisão bibliográfica e entrevistas com a população que faz uso de plantas medicinais que já tenham sido relatadas na bibliografia com potencial tóxico. A maioria dos entrevistados acreditam que plantas medicinais não são tóxicas, demonstrando que a ideia de que “produtos naturais não fazem mal a saúde” é uma realidade preocupante, sendo necessárias

medidas efetivas para orientar sobre o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.

Nos últimos anos, têm aumentado os estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliem os parâmetros toxicológicos das plantas medicinais, afim de proporcionar segurança e eficácia no seu uso. Sendo realizados ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, visando avaliar a viabilidade celular, mutação genética e danos no material genético (FONSECA e PEREIRA, 2004).

3.3 *Ceiba speciosa*

As árvores do gênero *Ceiba* pertencem à família Malvaceae e são geralmente encontradas em zona de floresta tropical e amplamente utilizadas na medicina tradicional da América do Sul, Oeste e Sul da Índia, Sri-Lanka e outros países do Sudeste Asiático (LADEJI *et al.*, 2003). No Brasil, são encontradas abundantemente nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (BELESKI-CARNEIRO *et al.*, 2002). Muitas espécies do gênero *Ceiba* apresentam uso popular. Há relatos científicos sugerindo o efeito das folhas de *Ceiba graziovii* para tratamento de anemia (CARTAXO *et al.*, 2010). De acordo com Sanz-Biset e colaboradores (2009) duas espécies são utilizadas na medicina popular da Amazônia peruana: *Ceiba insignis*, que é utilizada como diurético (para reduzir o peso), contra dores renais, doenças do fígado e reumatismo; e *Ceiba samauma*, usada para reumatismo. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar a atividade farmacológica e efetividade dessas espécies.

Entre as espécies mais amplamente utilizadas, é possível destacar *Ceiba pentandra*. Ladeji e colaboradores (2003) avaliaram a atividade hipoglicemiante do extrato aquoso das cascas desta espécie, administrado por via oral durante 28 dias em animais com hiperglicemia induzida com estreptozotocina, concluindo que o extrato aquoso de *C. pentandra* foi capaz de diminuir os níveis de glicose sanguíneos, sem apresentar toxicidade hepática. Outro estudo *in vivo* avaliou o efeito hipoglicemiante e anti-hiperglicêmico do extrato etanólico das cascas de *C. pentandra* nas doses de 200mg/kg e 400mg/kg em ratos diabéticos, por 21 dias. Segundo Satyaprakash e colaboradores (2013), a planta possui um efeito hipoglicemiante na dose de 200mg/kg e o extrato não foi considerado tóxico nesta dose.

Ceiba speciosa (A. St. Hill) é uma espécie arbórea, com ampla distribuição geográfica, nativa da região tropical e subtropical da América do Sul. No Brasil, é encontrada principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FANTI e PEREZ, 2004), sendo conhecida como paineira-rosa, paineira, barriguda, paineira-fêmea ou paineira-de-espinho (BELESKI-CARNEIRO *et al.*, 2002). Apresenta copa ampla, muito ramificada, provida de densas folhas durante o verão, flores de cor rósea e tronco revestido por acúleos cônicos (LORENZI, 1998). Pela sua rusticidade e beleza de floração, e devido ao tronco grosso, é muito utilizada para a ornamentação de parques e ruas (VELOSO *et al.*, 1997; CAPPELATTI e SCHMITT, 2009). Estudos preliminares a respeito da composição química da espécie é apresentada por Malheiros (2014), que analisou os constituintes majoritários do extrato aquoso das cascas de *C. speciosa* por CLAE/DAD, revelando a presença de flavonoides (quercetina, rutina e canferol) e ácidos fenólicos (gálico, clorogênico, elágico e caféico). No noroeste Rio Grande do Sul é encontrada na região da floresta do Alto Uruguai, onde há relatos de seu uso popular para a redução de níveis séricos de colesterol. Contudo não existem dados científicos que comprovem seu efeito terapêutico e relatos científicos acerca da segurança desta espécie.



Figura 1 - *Ceiba speciosa* (paineira). À esquerda visão completa da árvore. À direita, os acúleos presentes no caule, característico da espécie (Fonte: Google Imagens)

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do tratamento com extrato aquoso das cascas de *Ceiba speciosa* sobre a redução e prevenção do aumento dos níveis sanguíneos de colesterol em ratos e avaliar os efeitos mutagênico e genotóxico da espécie.

4.2 Objetivos específicos

Preparar extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa*;

Administrar o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* em ratos Wistar por 14 dias;

Induzir a hipercolesterolemia com Tyloxapol em ratos Wistar;

Avaliar a capacidade de *C. speciosa* em prevenir o aumento dos níveis de colesterol em ratos tratados, empregando a determinação laboratorial dos níveis de colesterol total, triglicérides, glicose, creatinina, ureia em ratos hipercolesterolêmicos

Administrar o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* em ratos normais por 28 dias;

Avaliar os níveis de colesterol e glicose em ratos normais através de exames laboratoriais;

Avaliar, *in vivo*, a genotoxicidade e a mutagenicidade do extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

O material vegetal foi coletado na área rural da cidade de Santo Antônio das Missões em Setembro de 2015. O material foi identificado pelo botânico Renato Aquino Záchia, e uma amostra autêntica foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria (SMDB 16.113).

5.2 Extrato Aquoso de *C. speciosa*

As cascas de *C. speciosa* fracionadas em pequenos pedaços foram secas em estufa de ar circulante (40°C) e trituradas em moinho de facas. O material resultante foi submetido à decocção (250 g de extrato vegetal e 1000mL de água destilada), com agitação periódica por 30 minutos após o ponto de fervura até o esgotamento, de forma semelhante ao preparo do chá no uso popular. Posteriormente, o extrato foi filtrado e o líquido coletado foi seco por liofilização, dando origem ao extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* (EALCs).

5.3 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 300g e 360g, mantidos em condições normais do biotério, sob temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas, ruídos mínimos, umidade relativa ($50 \pm 5\%$) e ração e água ofertadas *ad libitum*. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação, o rim e o fígado foram removidos e o sangue total coletado para as análises bioquímicas.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Pelotas (CEEA 5747-2015), onde os experimentos *in vivo* foram realizados, seguindo as normas éticas e técnicas de

experimentação animal determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e pela Lei nº 11.794, de 08 de Outubro de 2008.

5.4 Avaliação da capacidade de prevenção do aumento nos níveis de colesterol induzida por Tyloxapol em ratos

Os animais foram divididos em 4 grupos: controle saudável (CS) (n = 5), controle positivo (CP) (n = 5), e tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200 mg/Kg (n = 5) e 400 mg/Kg (n = 5). O tratamento foi administrado por gavagem, durante 14 dias. Os animais do grupo saudável receberam apenas administração diária de solução salina (0,9%). No 15º dia, a hipercolesterolemia foi induzida com uma única administração intraperitoneal de Tyloxapol 200 mg/Kg, nos grupos controle positivo e tratados. Os ratos do grupo saudável não receberam indução por Tyloxapol. Todos os animais foram eutanasiados 48 horas após a administração do Tyloxapol, o sangue foi coletado para análises bioquímicas.

5.5 Avaliação da influência do extrato aquoso *C. speciosa* sobre parâmetros bioquímicos e toxicológicos em ratos normais

Os animais de experimentação foram divididos em três grupos: grupo controle negativo (grupo salina - CS) (n = 10), grupo tratado com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200 mg/Kg (EALCs 200mg/Kg) (n = 9) e grupo tratado com 400 mg/Kg (EALCs 400mg/Kg) (n = 9). O grupo controle negativo recebeu solução salina e os grupos tratados receberam 200mg/Kg e 400mg/Kg de extrato liofilizado de *C. speciosa* por 28 dias. Posteriormente os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado e o rim e o fígado foram retirados.

5.6 Avaliação da genotoxicidade pelo Teste Cometa

Para preparação e análises do teste cometa foi adotado protocolo descrito por SINGH, 1995. Após eutanásia dos animais, o fígado e o rim foram retirados e fracionados. Uma pequena porção do fígado e rim foi lavada e armazenada em PBS por 24 horas. Após esse período, o tecido foi picado e transferido para tubos de ensaio com 900µl de PBS e 100µl de tripsina, essa mistura foi centrifugada por 10 minutos e retirado 10µl do sobrenadante obtido e adicionado 90 µl de agarose de baixo ponto de fusão. Essa mistura foi colocada em lâmina de microscópio pré-revestida com cobertura de agarose de alto ponto de fusão e em seguida foi coberta com uma lamínula. Depois deixou-se secar por 2 dias e então colocada em solução de lise por duas semanas. Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas em tampão NaOH 300mM e pH >13 e a corrida eletroforética foi realizada por 30 minutos, 300 mA, 25 V. Em seguida as lâminas foram neutralizadas e fixadas. Finalmente, o DNA foi corado com solução de nitrato de prata. As lâminas foram analisadas em microscópio com aumento de 400x, as células foram avaliadas visualmente e identificadas como, de zero (sem danos) a quatro (dano máximo), de acordo com o tamanho e a forma da cauda. Danos de DNA foram determinados como Índice de Dano ao DNA (ID). O dano ao DNA foi calculado a partir das células com diferentes classificações de danos (Figura 02); o índice de dano varia de 0 (100 células x 0 quando não ocorreu dano) a 400 (100 células x 4, quando ocorreu o máximo de dano).

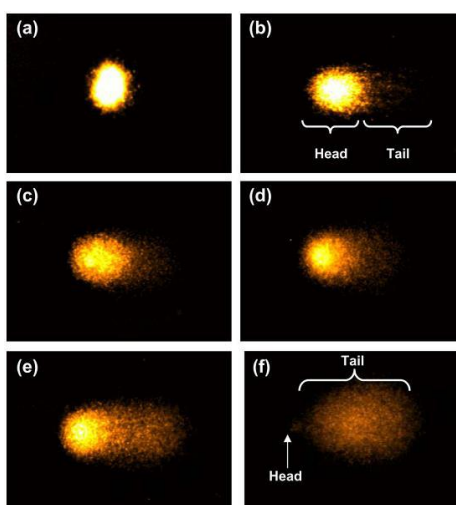


Figura 2 - Representação ilustrativa de imagens do ensaio cometa em leucócitos humanos. Figura (a) - célula intacta; (b) a (f) - célula com crescentes graus de dano ao DNA, classificadas de zero (dano mínimo) a quatro (dano máximo) (Fonte: Wan-Ibrahim, 2010).

5.7 Avaliação da mutagenicidade pelo Teste Micronúcleo

Para avaliar parâmetros mutagênicos, foi adotado o teste de micronúcleo, de acordo com a técnica descrita por SCHMID, 1975.

Através dessa técnica, as lâminas foram analisadas em microscópio com aumento de 1000x e classificadas de acordo com a presença de células mononucleadas com um, dois ou três micronúcleos, além de células em necrose e apoptose. Os resultados são apresentados como Índice de Divisão Nuclear (IDN), calculado de acordo com Fenech, 2000.

5.8 Análises bioquímicas

A determinação do colesterol total, triglicerídeos, glicose, uréia, creatinina, foram realizadas com kits comerciais das empresas Labtest® e Bioclin® em equipamento automatizado ChemWell Labtest®, conforme as orientações do fabricante e seguindo todos os critérios de controle de qualidade.

5.9 Análise estatística

Os resultados foram obtidos utilizando ANOVA de uma via com posterior teste de Bonferroni, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os resultados obtidos neste estudo foram analisados através do software estatístico Graph Pad Prism 5.0.

6 RESULTADOS

6.1 Rendimento do extrato aquoso de *C. speciosa*

O extrato aquoso liofilizado de *Ceiba speciosa* (EALCs) apresentou um rendimento de 2,06% em relação ao material vegetal seco.

6.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos em ratos com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol

Os níveis de colesterol dos grupos avaliados são apresentados na figura 3. Houve aumento significativo dos níveis de colesterol no grupo CP (controle positivo) e nos grupos tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* nas doses de 200mg/Kg e 400mg/Kg em relação ao grupo CS (controle saudável). Não houve nenhuma diferença significativa entre o grupo CP e os grupos tratados EALCs 200mg/Kg e EALCs 400mg/Kg.

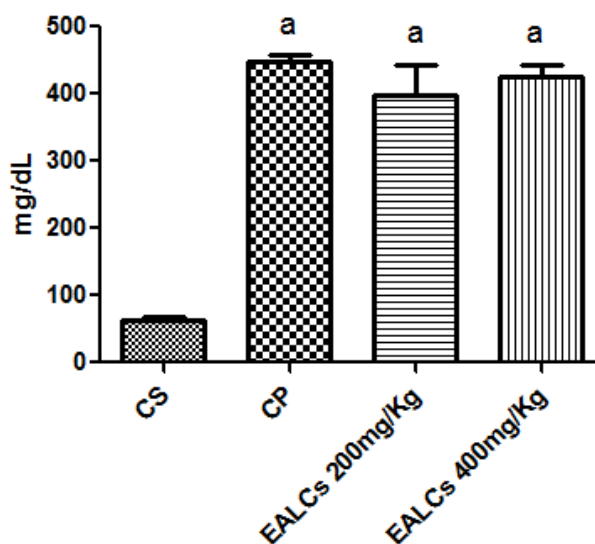


Figura 3 - **Níveis de colesterol**. CS (controle saudável) – animais tratados com solução salina, CP (controle positivo) – animais com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol 200mg/Kg, EALCs 200mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida, EALCs 400mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida. Onde $a < 0,0001$.

Na figura 4 são apresentados os níveis de triglicerídeos dos animais empregados no experimento. Foi possível observar que houve um aumento significativo no grupo CP e nos grupos EALCs 200mg/Kg e EALCs 400mg/Kg em relação ao grupo CS. Não houve nenhuma diferença significativa quando comparado o grupo CP com os grupos tratados (EALCs 200mg/Kg e EALCs 400mg/Kg).

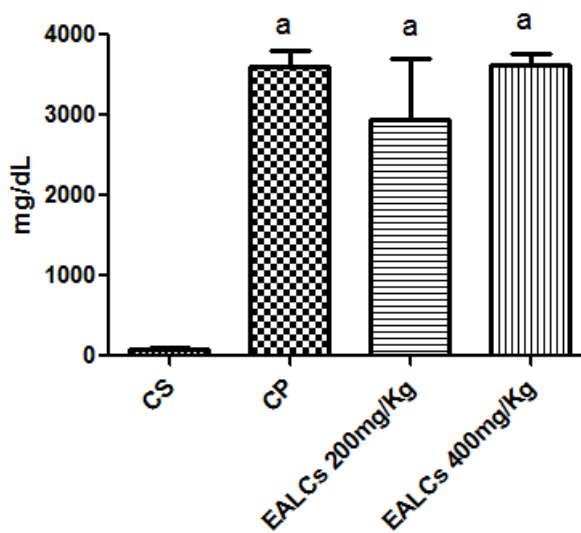


Figura 4. **Níveis de triglicerídeos.** CS (controle saudável) – animais tratados com solução salina, CP (controle positivo) – animais com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol 200mg/Kg, EALCs 200mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida, EALCs 400mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida. Onde $a < 0,0001$.

Na avaliação dos níveis de glicose, a figura 5 mostra que houve aumento significativo da glicemia no grupo CP e no grupo EALCs 400mg/kg em relação ao grupo CS. Entretanto, houve diminuição significativa dos níveis de glicose no grupo EALCs 200mg/kg em relação ao grupo CP.

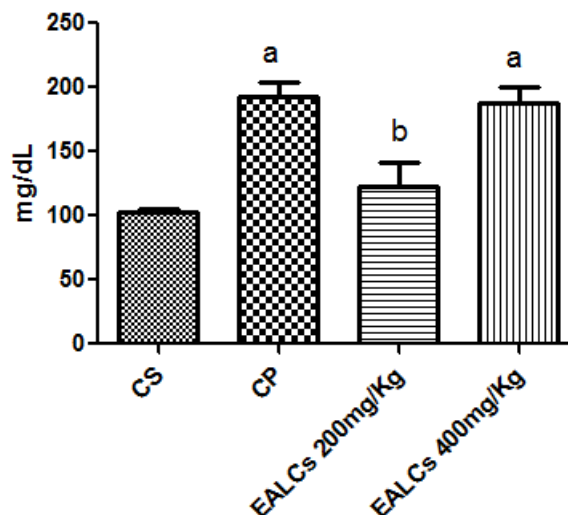


Figura 5. **Níveis de glicose.** CS (controle saudável) – animais tratados com solução salina, CP (controle positivo) – animais com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol 200mg/Kg, EALCs 200mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida, EALCs 400mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida. Onde $a < 0,0007$.

No que diz respeito aos níveis de creatinina, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (figura 6), demonstrando que o extrato aquoso de *C. speciosa* não alterou este parâmetro. Na figura 7 é possível observar que houve aumento significativo dos níveis de ureia nos grupos EALCs 200mg/kg e EALCs 400mg/kg em relação ao grupo CS e grupo CP.

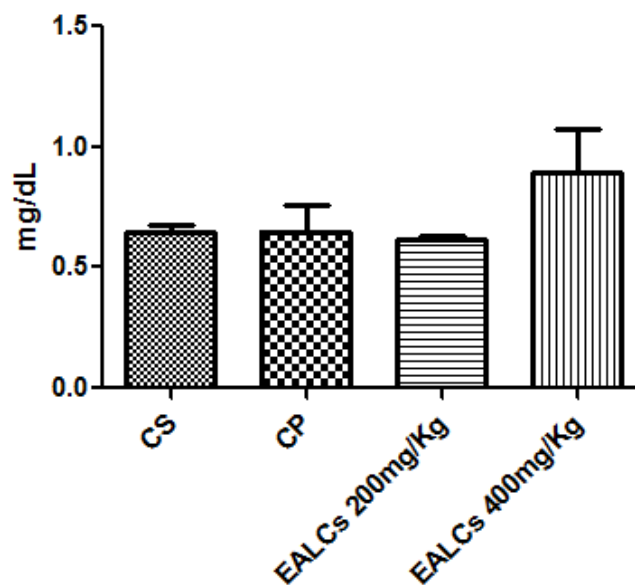


Figura 6. **Níveis de creatinina.** CS (controle saudável) – animais tratados com solução salina, CP (controle positivo) – animais com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol 200mg/Kg, EALCs 200mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida, EALCs 400mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida.

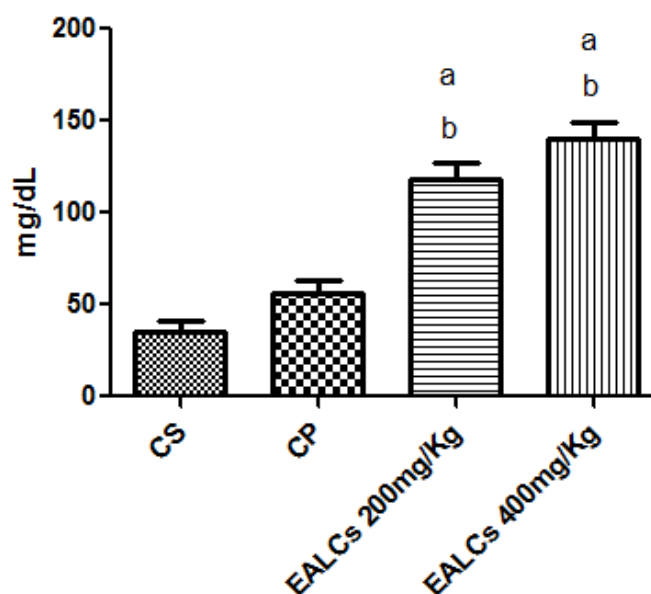


Figura 7. **Níveis de ureia.** CS (controle saudável) – animais tratados com solução salina, CP (controle positivo) – animais com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol 200mg/Kg, EALCs 200mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida, EALCs 400mg/Kg (grupo tratado) – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg por 14 dias e hipercolesterolemia induzida. Onde a,b<0,0001.

6.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos e toxicológicos em ratos normais

6.3.3 Análise bioquímica

Para avaliação bioquímica, foram avaliados os parâmetros colesterol total e glicose. Os níveis de colesterol são apresentados na figura 8, onde houve aumento significativo no grupo EALCs 200mg/Kg em relação ao grupo CS. Na dose de 400mg/Kg, não houve aumento estatisticamente significativo dos níveis de colesterol em relação ao grupo controle saudável, demonstrando uma relação não dose dependente no aumento nos níveis de colesterol em ratos normais.

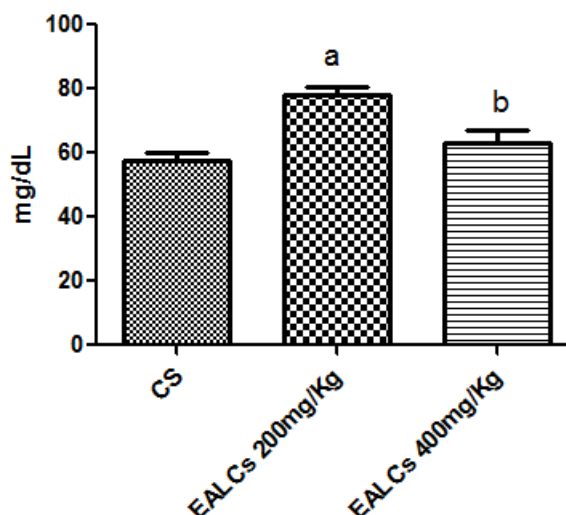


Figura 8. **Níveis de colesterol em ratos normais.** CS (controle salina) – animais tratados com solução salina, EALCs 200mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg, EALCs 400mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg. Onde a.b<0,0004.

A figura 9 mostra os níveis de glicose, onde houve aumento significativo nos grupos EALCs 200mg/Kg e EALCs 400mg/Kg em relação ao grupo CS, e aumento significativo do grupo EALCs 400mg/Kg em relação ao grupo EALCs 200mg/Kg, mostrando-se como concentração dependente, ou seja, conforme há o aumento da dose testada, há também o aumento dos níveis de glicose.

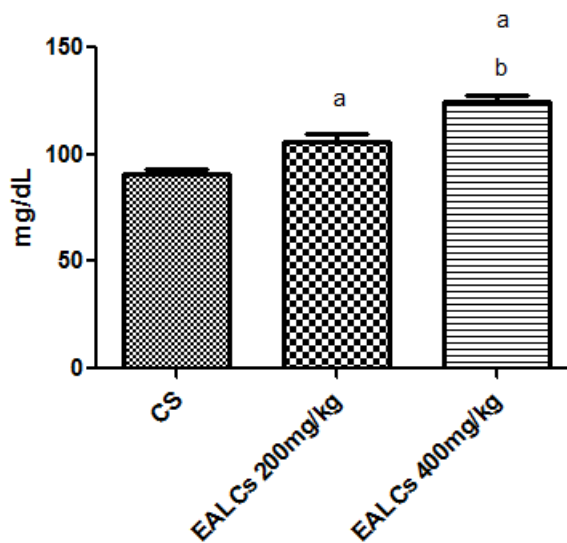


Figura 9. **Níveis de glicose em ratos normais.** CS (controle salina) – animais tratados com solução salina, EALCs 200mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg, EALCs 400mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400 mg/Kg. Onde a,b<0,0001.

6.3.4 Avaliação da mutagenicidade (Teste Micronúcleo)

A contagem de micronúcleos (figura 10) para os grupos testados no tecido hepático não apresentou diferença significativa entre os grupos, bem como não houve diferença entre as doses testadas. Resultado semelhante foi observado no Teste de Micronúcleo no tecido renal (figura 11), em que não houve diferenças significativas entre os grupos. Assim, sugere-se que não houve indução de aberrações cromossômicas nos tecidos hepático e renal dos animais testados.

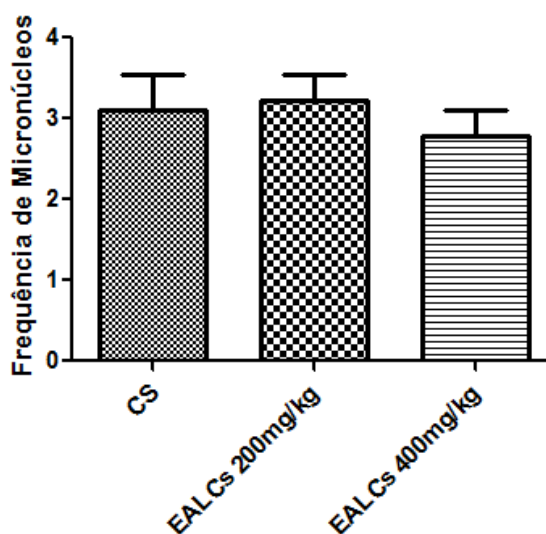


Figura 10. **Teste de Micronúcleo em tecido hepático de ratos normais.** CS (controle salina) – animais tratados com solução salina, EALCs 200mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg, EALCs 400mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg.

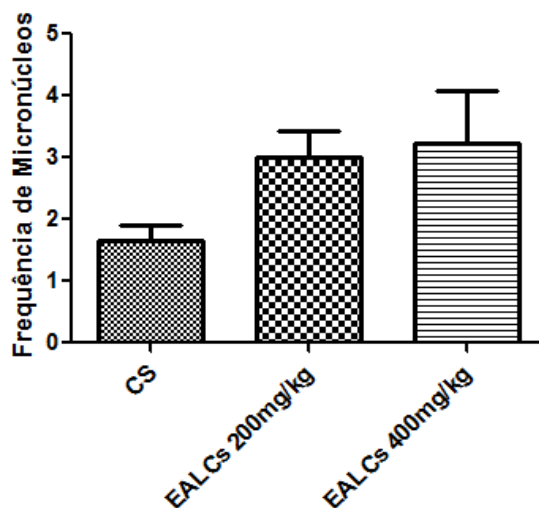


Figura 11. **Teste de Micronúcleo em tecido renal de ratos normais.** CS (controle salina) – animais tratados com solução salina, EALCs 200mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg, EALCs 400mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg.

6.3.5 Avaliação da genotoxicidade (Teste Cometa)

A partir do Teste Cometa (figura 12) no tecido hepático, o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* na dose de 400mg/kg apresentou índice de dano ao DNA 2x maior que o grupo saudável, sugerindo dano de grau 4.

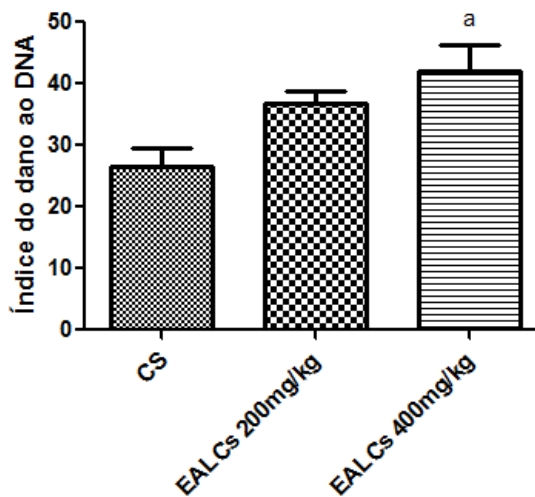


Figura 12. **Teste Cometa em tecido hepático de ratos normais.** CS (controle salina) – animais tratados com solução salina, EALCs 200mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg, EALCs 400mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg. Onde $a < 0,0103$.

Na figura 13 é apresentado os resultados do Teste Cometa no tecido renal e mostra que não houve dano ao DNA em nenhum dos grupos avaliados.

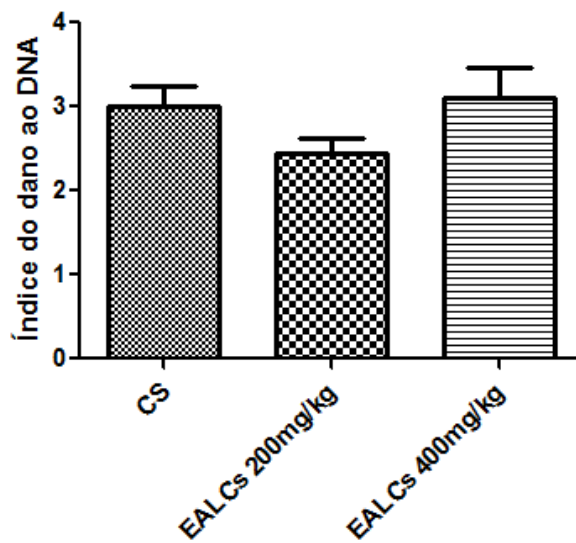


Figura 13. **Teste Cometa em tecido renal de ratos normais.** CS (controle salina) – animais tratados com solução salina, EALCs 200mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg, EALCs 400mg/Kg – animais tratados com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 400mg/Kg.

7 DISCUSSÃO

A hiperlipidemia é caracterizada pelo aumento dos níveis de colesterol e das lipoproteínas, sendo um dos maiores fatores de riscos das doenças cardiovasculares (BELGUITH-HADRICHE *et al.*, 2016; KAI *et al.*, 2015). Em função disso, há uma procura por novos fármacos e produtos naturais para prevenir ou diminuir os danos causados por problemas genéticos ou por dietas ricas em gorduras que levam à hiperlipidemia (CHEURFA e ALLEM, 2015; ZHAO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015).

Para isso, estudos com animais de laboratório tem sido realizados para compreender a relação entre as alterações do metabolismo dos lipídios e a aterogênese e testar possíveis tratamentos para a redução nos níveis de colesterol. Um dos métodos para induzir a hipercolesterolemia é a dieta suplementada com colesterol e ácido cólico, porém o tempo de indução não está bem esclarecido na literatura, podendo variar de 24 dias a 3 meses (MOCELIN *et al.*, 2016; BELGUITH-HADRICHE *et al.*, 2016; SAMOUT *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015; KAI *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013). Outro método utilizado é a administração, por via intraperitoneal, de Triton WR-1339[®], também conhecido como Tyloxapol, geralmente na dose 200mg/Kg, dissolvido em NaCl a 0,9%. Estudos relatam que os níveis de colesterol e triglicerídeos são aumentados em 48 horas após sua aplicação (VENKADESWARAN *et al.*, 2014; DOUGNON *et al.*, 2014; BERTGES *et al.*, 2011; PRIYADHARSINI, 2015). Pelo fato do Tyloxapol ter seu tempo de ação rápido e eficaz, optou-se por induzir a hipercolesterolemia com essa substância.

Sabe-se que há através de relatos populares, o uso das cascas de *C. speciosa* na região noroeste do Rio Grande do Sul para prevenir e/ou diminuir os níveis de colesterol, na forma de chás ou adicionado ao chimarrão. Na primeira parte deste estudo, foi avaliado a capacidade de prevenção no aumento dos níveis de colesterol em ratos submetidos ao tratamento com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* nas doses de 200mg/Kg e 400 mg/Kg por 14 dias e após indução da hipercolesterolemia. Foi possível verificar que nos grupos em que foi administrado o Tyloxapol, houve aumento significativo dos níveis de colesterol e triglicerídeos, confirmando assim sua ação descrita por Priyadharsini (2015). Na comparação entre o grupo controle positivo (hipercolesterolêmico) e os grupos hipercolesterolêmicos tratados (EALCs 200mg/Kg e EALCs 400mg/Kg), não houve diferenças significativas, sugerindo assim que o

extrato aquoso de *C. speciosa* não foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos.

No uso popular, as cascas de *C. speciosa* são frequentemente empregadas por indivíduos com diagnóstico de hipercolesterolemia, visando sua redução. Contudo, é comum nas famílias o consumo do chá também entre os indivíduos normais, pela crença de que o consumo da espécie impedirá que os níveis sanguíneos de colesterol sejam aumentados pela dieta familiar.

Nos resultados apresentados *C. speciosa* não impediu ou reduziu o aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos em animais com hipercolesterolemia induzida com Tyloxapol. Estudos citados anteriormente comprovam que o Tyloxapol aumenta os níveis de colesterol e triglicerídeos em 48 horas após sua administração de forma rápida e intensa (VENKADESWARAN *et al.*, 2014; DOUGNON *et al.*, 2014; BERTGES *et al.*, 2011; PRIYADHARSINI, 2015). Sugerimos que devido a esse brusca ação do Tyloxapol em aumentar os níveis dos parâmetros avaliados, o extrato de *C. speciosa* não conseguiu reverter esta rota metabólica. Talvez em induções com dieta suplementadas, que levam de 25 dias a 3 meses de duração, os níveis de colesterol e triglicerídeos aumentem de forma gradual, fazendo com que o extrato exerça sua ação gradativamente nos animais. Sendo assim, é necessário experimentos *in vivo* empregando outra metodologia, para então confirma ou descartar a atividade hipocolesterolêmica de *C. speciosa*.

Hipercolesterolemia e hiperglicemia estão associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e à síndrome metabólica (MONTAZERIFAR *et al.*, 2016). Nesse sentido foram avaliados também os níveis de glicose em ratos com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol. Houve aumento significativo dos níveis de glicose no grupo em que a hipercolesterolemia foi induzida e no grupo tratado com *C. speciosa* 400mg/Kg. Entretanto, no grupo tratado com extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* 200mg/Kg houve diminuição significativa em relação ao grupo hipercolesterolêmico. Resultados semelhantes foram apresentados por Venkadeswaran e colaboradores (2014) em que os níveis de glicose tiveram diminuição significativa em ratos com hipercolesterolemia induzida por Tyloxapol e tratados com extrato de *Piper betle* (pimenta bétela). O extrato das flores de *Cassia auriculata* foi capaz de diminuir os níveis glicêmicos em ratos hipercolesterolêmicos (VIJAYARAJ *et al.*, 2013).

Estudos com *C. pentandra*, espécie taxonomicamente relacionada a *C. speciosa*, demonstram que o extrato de suas folhas apresenta ação hipoglicemiante em ratos com hiperglicêmicos, sugerindo um efeito antidiabético (LADEJI *et al.*, 2003; SATYAPRAKASH *et al.*, 2013). O fato do extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* ter diminuído os níveis de glicose em animais com hipercolesterolemia induzida é um resultado importante, que deve ser mais bem avaliado, já que demonstra que a espécie também atua sobre os níveis de glicose, devendo ser investigada em modelos com animais hiperglicêmicos.

Para avaliar a função renal, foram determinados os níveis de ureia e creatinina. Foi possível observar que os níveis de creatinina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, houve aumento significativo dos níveis de ureia nos grupos tratados com *C. speciosa* e no grupo com hipercolesterolemia induzida em relação ao grupo saudável. Os níveis séricos de ureia e creatinina são os principais fatores para a determinação da eficácia da filtração glomerular e secreção tubular proximal, quando ambos estão aumentados, significa dano nas funções renais (KHAYYAT *et al.*, 2017). Nos resultados apresentados, houve aumento apenas nos níveis de ureia, sendo que, segundo Porto e colaboradores (2015), o marcador mais sensível para avaliar a função renal é a creatinina. Sendo assim, podemos sugerir que o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* não altera as funções renais dos animais testados.

Considerando que a espécie é utilizada por famílias compostas por indivíduos com hipercolesterolemia e indivíduos normais, além de investigar a possível ação das cascas de *C. speciosa*, é imprescindível conhecimentos sobre a sua eficácia e segurança, quando administrada pela população em geral. Com base nisso, a segunda parte do trabalho teve por objetivo verificar a influência de *C. speciosa* sobre os níveis de colesterol e glicose e parâmetros toxicológicos de ratos normais por 28 dias.

Nas análises bioquímicas, em relação aos níveis de colesterol, houve aumento significativo no grupo EALCS 200mg/Kg em relação ao grupo salina. Quando os grupos tratados foram comparados entre si, foi possível observar que o aumento nos níveis de colesterol foi maior no grupo EALCS 200mg/Kg. Sugerindo assim, que o extrato aquoso liofilizado de *C. speciosa* não tem atividade hipocolesterolemiantes.

Houve aumento significativo dos níveis sanguíneos de glicose nos grupos que receberam o EALCS 200mg/Kg e 400mg/Kg quando comparados ao grupo salina

(controle negativo) em animais normais. De acordo com experimento anterior, o EALCs, na dose de 200mg/Kg promoveu uma redução da glicemia em animais hipercolesterolêmicos, demonstrando que a espécie consegue reduzir níveis de glicose bastante aumentados, o que não ocorre quando o EALCs é administrado em ratos normais. Nesse sentido, são necessários estudos mais aprofundados para o esclarecimento desta mudança de comportamento dos níveis de glicose e estudos da ação hipoglicemiante da espécie, em virtude da proximidade quimiotaxômica com *C. pentandra* que há relatos científicos em relação à ação hipoglicemiante em animais diabéticos (LADEJI *et al.*, 2003; SATYAPRAKASH *et al.*, 2013).

Entre os parâmetros toxicológicos, foram avaliadas a mutagenicidade, através do teste de micronúcleo, e a genotoxicidade (Teste Cometa) em tecido hepático e renal de animais saudáveis. Os resultados da avaliação mutagênica (teste de micronúcleo) apontam que os tecidos hepático e renal dos ratos que receberam EALCs 200mg/Kg e 400mg/Kg não sofreram alterações significativas quando comparados ao grupo controle negativo (grupo salina - CS), sugerindo assim, que o extrato aquoso de *C. speciosa* não interferiu no processo mitótico a ponto de causar mutações.

Na avaliação da genotoxicidade no tecido renal, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados, sugerindo que não há indução de dano ao DNA. Entretanto, no tecido hepático dos animais tratados com EALCS 400mg/Kg houve aumento no índice de dano ao DNA 2x maior que o grupo salina. Isto pode estar relacionado à característica peculiar do fígado em ser o centro da biotransformação de xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo) (KHAYYAT *et al.*, 2017).

Outro fator que deve ser levado em consideração é a comparação entre as formas de preparo do extrato utilizado neste trabalho e o modo como o chá é utilizado popularmente ou como as cascas são adicionadas no chimarrão. Para a preparação do EALCs, as cascas passaram por um processo de trituração em moinho de facas, reduzindo o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, aumentando assim a área de contato com o líquido extrator, o que tornou a extração mais eficiente e, conseqüentemente, com maior rendimento. Além disso, as cascas foram extraídas até o esgotamento, o que aumenta o rendimento do extrato obtido (SIMÕES *et al.*, 2017). No uso popular, o chá é preparado com cascas fragmentadas com facão ou

machado fervidas em água durante mais ou menos 30 minutos ou pedaços de cascas são adicionados na garrafa térmica contendo a água quente para o chimarrão.

Embora a preparação do extrato tenha tentado simular a forma de preparo do chá, os processos de extração empregados em laboratório, foram muito mais eficientes, pois a fragmentação do material empregado pela população é menor, resultando em um extrato menos concentrado. Assim, mesmo com resultados que indicam toxicidade hepática, estudos toxicológicos mais aprofundados são necessários em modelos animais.

Malheiros (2014) avaliou o potencial antioxidante e a genotoxicidade do extrato aquoso liofilizado e do precipitado obtido do extrato etanólico de cascas *C. speciosa* *in vitro* e concluiu que a espécie não apresentou toxicidade nos parâmetros avaliados, bem como, mostrou efeito antioxidante frente a lipídeos e proteínas no precipitado do extrato etanólico. Sendo assim, pode-se considerar que o extrato aquoso das cascas de *C. speciosa* é relativamente seguro.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cascas de *Ceiba speciosa* são amplamente utilizadas pela população da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, para redução dos altos níveis sanguíneos de colesterol e, também para prevenção do aumento dos mesmos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, a espécie não foi capaz de impedir o aumento dos níveis de colesterol induzidos por Tyloxapol, que tem ação rápida, mas deve ser investigado em modelos animais onde os níveis de colesterol sejam aumentados de forma mais lenta e gradativa, como acontece no organismo humano. Entretanto, foi possível observar que a planta foi capaz de reduzir os níveis de glicose nos animais hipercolesterolêmicos, reforçando a necessidade de investigação mais profunda desta atividade. Considerando o uso popular de *C. speciosa* por indivíduos saudáveis com o objetivo de evitar o aumento do colesterol sanguíneo, este trabalho sugere que a espécie não é capaz de exercer tal efeito.

Os resultados deste trabalho, embora não conclusivos sobre as ações farmacológicas de *Ceiba speciosa* fornecem informações importantes sobre sua toxicidade que ainda não estavam disponíveis na literatura científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHAFA, A.O.T., SUNMONU, T.O., AFOLAYAN, A.J. Toxicological evaluation of aqueous leaf and berry extracts of *Phytolacca dioica* L. in male Wistar rats. **Food And Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, p.1886-1889, jul. 2010.

BALBINO, E. E., DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 20, n. 6, p.992-1000, out. 2010.

BARAKAOUI, M., KATIRI, A., BOUBAKER, H., MSANDA, F. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p.338-350, fev. 2017.

BELESKI-CARNEIRO E., SUQUI, J., REICHER, F. Structural and biological features of a hydrogel from seed coats of *Chorisia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 157–163, 2002.

BELGUTH-HADRICHE, O., AMMAR. S., CONTRERAS MDEL. M., TURKI, M., SEGURA-CARRETERO, A., EL FEKI, A., MAKNI-AYEDI, F., BOUAZIZ, M. Antihyperlipidemic and Antioxidant Activities of Edible Tunisian *Ficus carica* L. Fruits in High Fat Diet-Induced Hyperlipidemic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 2, p.183-189, 16 abr. 2016.

BELTRÁN-SÁNCHEZ, H., HARHAY, M.O., HARHAY, M.M., MCELLIGOTT, S.. Prevalence and Trends of Metabolic Syndrome in the Adult U.S. Population, 1999–2010. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 8, p.697-703, ago. 2013.

BERTGES, C. L., MOURÃO JR, A. C., SOUZA, B. J., CARDOSO, C.A.V.
Hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (Tyloxapol) em Ratos Wistar. **Rev Bras Cien Med Saúde**, Juiz de Fora, v. 1, n. 1, p.29-31, abr. 2011.

BRASIL. Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BRASIL. Resolução RE n. 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o “Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos”, de 18 de março de 2004.

CAPPELATTI, L., SCHMITT, L. J. Caracterização da flora arbórea de um fragmento urbano de floresta estacional semidecidual no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica** Nº 60:341-354 São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2009.

CARTAXO, S. L., SOUZA, M. M. A., ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semiarid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CHANDRAN, R., PARIMELAZHAGAN, T., SHANMUGAM, S., THANKARAJAN, S. Antidiabetic activity of *Syzygium calophyllifolium* in Streptozotocin-Nicotinamide induced Type-2 diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p.547-554, ago. 2016.

CHEURFA, M., ALLEM, R. Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p.142-144, mar. 2015.

DEBOER, M. D., GURKA, M. J. Clinical utility of metabolic syndrome severity scores: considerations for practitioners. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 10, p.65-72, fev. 2017.

DIAS, D., URBAN, S., ROESSNERU. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303–36, 2012.

DOUGNON, V. T., BANKOLÉ, H. S., KLOTOÉ R. J., SÈNOU, M., FAH, L., KOUDOKPON, H., AKPOVI, C., DOUGNON, J. T., ADDO, P., LOKO, F., BOKO, M. Treatment of hypercholesterolemia: screening of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) as a medicinal plant in Benin. **Avicenna J Phytomed**, v. 4, p.160-169, 2014.

DURAIKANDIYAN, V., AL-DHABI, N. A., IRUDAYARAJ, S. S., SUNIL, C. Hypolipidemic activity of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* in hyperlipidemic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p.89-93, jan. 2016.

DUSOUICH, P., ROEDERER, G., DUFOUR, R. Myotoxicity of statins: Mechanism of action. **Pharmacology & Therapeutics**, fev. 2017.

EYZAGUIRRE, F., SILVA, R., ROMÁN, R., PALACIO, A., COSENTINO, M., VEJA, V., GARCÍA, H. Prevalencia de síndrome metabólico en niños y adolescentes que consultan por obesidad. **Revista Médica de Chile**, v. 139, n. 6, p.732-738, jun. 2011.

EZURUIKE, U. F., PRIETO, J. M. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p.857-924, set. 2014.

FANTI, S. C., PEREZ, S. C. J. A. Processo germinativo de sementes de paineira sob stresses hídrico e salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 903-909, 2004.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v.455, (1-2): 81-95, 2000.

FONSECA, C.A., PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, p. 7-8, 2004.

FRANÇA, X. S. I., SOUZA, A. J., BAPTISTA, S. R., BRITTO, S. R. V. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GARCÍA, S. M., CASTRO, R. M., CARDOSO, E. N.G., CASTRO, P. N. Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxylla*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p.1-7, 2016.

HARNAFI, H., CAID, S. H., BOUANANI, H. N., AZIZ, M., AMRANI, S. Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. Marrocos, p.205-2012, out. 2007.

IBRAHIM, A. Y., HENDAWY, S. F., ELSAYED, A. A., OMER, E. A. Evaluation of hypolipidemic *Marrubium vulgare* effect in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 5, p.453-459, maio. 2016.

KAI, N.S., NEE, T.A., LING, E.L., PING, T.C., KAMARIAH, L., LIN, N.K. Anti-hypercholesterolemic effect of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed on high-fat diet Sprague dawley rats. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, v. 8, n. 1, p.6-13, jan. 2015.

KAJAL, A., KISHORE, L., KAUR, N., GOLLEN, R., SINGH, R. Therapeutic agents for the management of atherosclerosis from herbal sources. **Journal of Basic and Applied Sciences** University, v. 5, n. 2, p.156-169, jun. 2016.

KHATUNE, N.A., RAHMAN, B.M., BARMAN, R.K., WAHED, M.I. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant properties of ethanol extract of *Grewia asiatica* Linn. bark in alloxan-induced diabetic rats. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p.295-304, 18 ago. 2016.

KHAYYAT, L., ESSAWY, A., SOROUR, J., SOFFAR, A. Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects in vivo. **Peerj**, v. 5, p.3041-3047, 23 fev. 2017.

KULKARNI, Y. A., GARUD, M. S. *Bauhinia variegata* (Caesalpinaceae) leaf extract: An effective treatment option in type I and type II diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p.122-129, out. 2016.

KUMAR, A.B.S., LAKSHMAN, K., JAYAVEEA, K.N., SHEKAR, S.D., KHAN, S., THIPPESWAMY, B.S., VEERAPUR, V.P. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 1-2, p.75-79, jan. 2012.

KUMAR, R., KUMAR, N., RAMALINGAYYA, G.V., SETTY, M.M., PAI, K.S. Evaluation of *Ceiba pentandra* (L.) Gaertner bark extracts for in vitro cytotoxicity on cancer cells and in vivo antitumor activity in solid and liquid tumor models. **Cytotechnology**, v. 68, n. 5, p.1909-1923, 25 jul. 2016.

LADEJI, O., OMEKARAH, I., SOLOMON, M. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 139-142, 2003.

LEE, H.S., CHOI, J.H., KIM, Y.E., KIM, I.H., KIM, B.M., LEE, C.H. Effects of the *Cynanchum wilfordii* Ethanol Extract on the Serum Lipid Profile in Hypercholesterolemic Rats. **Preventive Nutrition And Food Science**, v. 18, n. 3, p.157-162, 30 set. 2013.

LEITE, J. P. V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia Bases Científicas e Tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP – Editora Plantarum, 2ª ed., 352p. 1998.

MALHEIROS, C. K. C. Avaliação preliminar in vitro do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (a. st.-hill) Ravenna (paineira). 2014. 52 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2014.

MARÍN-PEÑALVER, J.J., MARTÍN-TIMÓN, I., SEVILLANO-COLLANTES, C., DEL CAÑIZO-GÓMEZ, F.J. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 7, n. 17, p.354-395, 2016.

MATOS, L. S., DE PAULA, H., PEDROSA, M. L., DOS SANTOS, C. R., DE OLIVEIRA, E. L., CHIANCA JÚNIOR, A.D., SILVA, E. M. Dietary Models for Inducing Hypercholesterolemia in Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Ouro Preto, v. 48, n. 2, p.203-209, mar. 2005.

MIRANDA, A.M., RIBEIRO, G.M., CUNHA, A.C., SILVA, L.S., DOS SANTOS, R.C., PEDROSA, M.L., SILVA, M.E. Hypolipidemic effect of the edible mushroom *Agaricus blazei* in rats subjected to a hypercholesterolemic diet. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p.215-224, 8 nov. 2013.

MOCELIN, R., MARCON, M., SANTOS, D. G., ZANATTA, L., SACHETT, A., SCHÖNELL, P. A., BEVILAQUA, F., GIACHINI, M., CHITOLINA, R., WILDNER, M. S. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of *Cynara scolymus* in cholesterol-fed rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p.233-239, mar. 2016.

MONTAZERIFAR, F., BOLOURI, A., MOZAFFAR, M. M., KARAJIBANI, M. The Prevalence of Metabolic Syndrome in Coronary Artery Disease Patients. **Cardiology Research**, v.7, n. 6, p.202-208, 2016.

MUKTHAMBA, P., SRINIVASAN, K. Hypolipidemic and antioxidant effects of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and garlic (*Allium sativum*) in high-fat fed rats. **Food Bioscience**, v. 14, p.1-9, jun. 2016.

NICOLETTI, M.A., CARVALHO, K.C., OLIVEIRA, JR. M.A., BERTASSO, C.C., CAPOROSSI, P.Y., TAVARES, A.P.L. Uso popular de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e/ou plantas medicinais: principais interações decorrentes. **Revista Saúde**, v.4, n.1, p.25-39, 2010.

NTCHAPDA, F., DJEDOUBOUM, A., TALLA, E., DONGMO, S. S., NANA, P., ADJIA, H., NGUIMBOU, R.M., BONABE, C., GAIMATAKON, S., YANOU, N. N., DIMO, T. Hypolipidemic and anti-atherogenic effect of aqueous extract leaves of *Ficus glumosa* (Moraceae) in rats. **Experimental Gerontology**, v. 62, p.53-62, fev. 2015.

OLIVEIRA, F.Q., GONÇALVES, L.A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Rev. Eletron. Farm**, v.3, p. 36-41; 2006.

OZKAN, G., KAMILOGLU, S., OZDAL, T., BOYACIOGLU, D., CAPANOGLU, E. Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the Treatment of Various Diseases. **Molecules**, v. 21, n. 3, p.257-289, 25 fev. 2016.

PENG, K., ZHANG, S., ZHOU, H. Toxicological evaluation of the flavonoid-rich extract from *Maydis stigma*: Subchronic toxicity and genotoxicity studies in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p.161-169, nov. 2016.

PEREIRA, L. F., OLIVEIRA, B. V., VIANA, R. T. C., CAMPOS, P. P., SILVA, A. N. M., BRANDÃO, G. L. M. Antihyperlipidemic and antihyperglycemic effects of the Brazilian salsaparrilhas *Smilax brasiliensis* Spreng. (Smilacaceae) and *Herreria salsaparrilha* Mart. (Agavaceae) in mice treated with a high-refined-carbohydrate containing diet. **Food Research International**, v. 76, p.366-372, out. 2015.

PIZZIOLO, V. R., BRASILEIRO, B. G., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 98-109, 2011.

PORTO, L.C., DA SILVA, J., FERRAZ, A.B., ETHUR, E.M., PORTO, C.D., MARRONI, N.P., PICADA, J.N. The Antidiabetic and Antihypercholesterolemic Effects of an Aqueous Extract from *Pecan shells* in Wistar Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 4, p.414-419, 8 out. 2015.

PRIYADHARSINI, R. P. Animal models to evaluate anti-atherosclerotic drugs. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p.329-340, 29 jun. 2015.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. Porto Alegre, v..39, p.603-613, 2000.

REIS, J.F., MONTEIRO, V.V., DE SOUZA G. R., DO CARMO, M.M, DA COSTA, G.V., RIBERA, P.C., MONTEIRO, M.C. Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p.315-331, 15 nov. 2016.

RODRIGUES, M. T., ALVES, T. L., SOARES, G.L., RITTER, M.R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p.155-163, jan. 2012.

SAMOUT, N., BOUZENNA, H., ETTAYA, A., ELFEKI, A., HFAIEDH, N. Antihypercholesterolemic effect of *Cleome arabica* L. on high cholesterol diet induced damage in rats. **Excli Journal**, Tunisia, v. 14, p.791-800, jul. 2015.

SANZ-BISET, J., CRUZ, J. C., EPIQUIÉN-RIVERA, M., CAÑIGUERAL, S. A first survey on the medicinal plants of the *Chazuta valley* (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 333–362, 2009.

SATHASIVAMPILLAI, S.V., RAJAMANOCHARAN, P.R., MUNDAY, M., HEINRICH, M. Plants used to treat diabetes in Sri Lankan Siddha Medicine – An ethnopharmacological review of historical and modern sources. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 198, p.531-599, fev. 2017.

SATYAPRAKASH, R.J., RAJESH, M. S., BHANUMATHY, M., HARISH M. S., SHIVANANDA T. N., SHIVAPRASAD, H. N., SUSHMA G. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Ceiba pentandra* L. Gaertn in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Ghana Medical Journal**, Bengaluru, Karnataka, India, v. 47, n. 3, p.121-127, set. 2013.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**. v.31:09-15, 1975.

SCHNEIDER, M., SACHETT, A., SCHÖNELL, P. A., IBAGY, E., FANTIN, E., BEVILAQUA, F., PICCININ, G., SANTO, D. G., GIACHINI, M., CHITOLINA, R., WILDNER, M. S., MOCELIN, R., ZANATTA, L., ROMAN JUNIOR, A. W. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Solidago chilensis* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p.258-263, maio 2015.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E.P., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, N., MCCOY, M., TICE, R., SCHNEIDER, E., A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Exp. Cell Res.** v. 175, p.184–191, 1995.

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

VELOSO, D. P., PAULA, V. F., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J. A química da família Bombacaceae. **Química Nova**, v. 20, p. 627-630, 1997.

VENKADESWARAN, K., MURALIDHARAN, A.R., ANNADURAI, T., RUBAN, V.V., SUNDARARAJAN, M., ANANDHI, R., THOMAS, P.A., GERALDINE, P. Antihypercholesterolemic and Antioxidative Potential of an Extract of the Plant, *Piper betle*, and Its Active Constituent, Eugenol, in Triton WR-1339-Induced Hypercholesterolemia in Experimental Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-11, 2014.

VIDIGAL, C. F., BRESSAN, J., BABIO, N., SALVADÓ, J. S. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **Public Health**, v. 13, n. 1, p.1198-1208, dez. 2013.

VIJAYARAJ, P., MUTHUKUMAR, K., SABARIRAJAN, J., NACHIAPPAN, V. Antihyperlipidemic activity of *Cassia auriculata* flowers in triton WR 1339 induced hyperlipidemic rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1-2, p.135-141, jan. 2013.

WAN-IBRAHIMA, W.I., SIDIK, K., KUPPUSAMYA, U.R. A high antioxidant level in edible plants is associated with genotoxic properties. **Food Chemistry**, v. 122, p.1139–1144, 2010.

ZHAO, S., RONG, C., LIU, Y., XU, F., WANG, S., DUAN, C., CHEN, J., WU, X. Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p.39-45, maio 2015.