



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Estudo toxicológico e investigação da atividade antiliteásica do
extrato de *Dianthus caryophyllus***

LUIZ FERNANDO ANNUNZIATA TREVISAN

PATOS – PB

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Estudo toxicológico e investigação da atividade antiliteiásica do
extrato de *Dianthuscaryophyllus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal De
Campina Grande como parte dos requisitos exigidos
pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área
de concentração em Sistemas Agrossilvipastoris no
Semi-Árido para a obtenção do título de Mestre

Luiz Fernando Annunziata Trevisan

Orientador: Prof. DSc. Onaldo Guedes Rodrigues

PATOS – PB

2012

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE PATOS - PB

T814e
2012

Trevisan, Luiz Fernando Annunziata

Estudo toxicológico e investigação da atividade antilitiásica do extrato de *Dianthus caryophyllus*/ Luiz Fernando Annunziata Trevisan. - Patos: CSTR/PPGZ, 2012.

60 f.: il. Color.

Inclui bibliografia.

Orientador: Onaldo Guedes Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Farmacologia Veterinária. 2 – Pesquisa Clínica. 3 – Síntese de Produtos Naturais. 4 – Urolitíase. I – Título.

CDU: 615:619



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Estudo Toxicológico e Investigação da Atividade Antilistiásica do extrato de *Dhianthus caryophyllus*.”

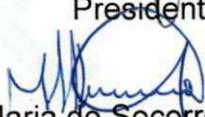
AUTOR: LUIZ FERNANDO ANNUNCIATA TREVISAN

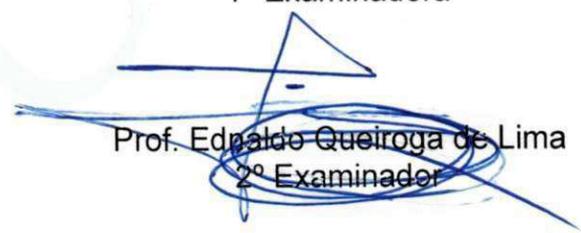
ORIENTADOR: Prof. Dr. ONALDO GUEDES RODRIGUES

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO


Prof. Onaldo Guedes Rodrigues
Presidente


Profa. Maria do Socorro Vieira Pereira
1º Examinadora


Prof. Ednaldo Queiroga de Lima
2º Examinador

Patos - PB, 29 de fevereiro de 2012


Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva
Coordenador

Dedico este trabalho aos meus pais, que antes de tudo, são meus heróis, que me apoiaram e incentivaram no caminhar desta minha pesquisa, querendo que eles saibam que se hoje posso sonhar com meu futuro é tão somente e apenas por tê-los ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Literatura Real e Literatura Aparente

Em todas as épocas, existem duas literaturas que caminham lado a lado e com muitas diferenças entre si: uma real e outra apenas aparente. A primeira cresce até se tornar uma leitura permanente. Exercida por pessoas que vivem para a ciência ou para a poesia, ela segue o seu caminho com seriedade e tranqüilidade...que, no entanto, permanecem. A outra, exercida por pessoas que vivem da ciência ou da poesia, anda a galope, com rumor e alarido por parte dos interessados, trazendo anualmente milhares de obras ao mercado. Após poucos anos, porém, as pessoas perguntam: Onde estão essas obras? Onde está a sua glória tão prematura e ruidosa? Por isso, pode-se também chamar esta última de literatura que passa, e aquela, de literatura que fica.

Arthur Schopenhauer em: "Da Leitura e dos Livros"

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Fitoterapia	15
2.2 Urolitíase	16
2.3 Produtos naturais no tratamento da urolitíase.....	18
2.4 <i>Dianthus caryophyllus</i>	20
a) Classificação científica	20
2.5 Avaliações de toxicidade: princípios teóricos e práticos	21
2.5.1 Informações preliminares	22
2.5.2 Testes <i>in vitro</i>	22
2.5.3 Testes <i>in vivo</i>	22
2.5.4 Principais testes toxicológicos pré-clínicos <i>in vivo</i>	25
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2.....	33
Análises toxicológicas com extratos fitoterápicos de <i>Dianthus caryophyllus</i>	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Local de execução da pesquisa	37
2.2 Obtenção do <i>Dianthus caryophyllus</i>	37
2.3 Obtenção do extrato bruto seco e determinação de sua concentração	37
2.4 Aquisição dos animais para experimentação	38
2.4.1. <i>Mesocricetus auratus</i>	38
2.4.2 <i>Mus musculus</i>	39
2.5 Testes de toxicidade e patogenicidade	39
2.5.1 Teste de toxicidade subcrônica em hamster sírios.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Testes de toxicidade e patogenicidade	41

3.1.1	Teste de toxicidade crônica em hamster sírios (<i>Mesocricetus auratus</i>)	41
3.1.2	Testes de toxicidade aguda e obtenção da DI 50 em camundongose hamsters	44
4	CONCLUSÃO.....	47
5	REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	48
	CAPÍTULO 3	49
	Extrato de <i>D. Caryophyllus</i> tem Atividade Protetora em Modelo de Urolitíase induzida Em Ratos	50
	RESUMO.....	Erro! Indicador não definido.
	ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2	MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
4	CONCLUSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1: Fluxograma do teste de dose Fixa 36

Figura 2: Extrato Bruto de *D. caryophyllus*(100%) desidratado e macerado em almofariz de porcelana 38

Figura 2: Corte Transversal de Ureter distal de Hamster macho (HE – 40x) sem alterações 42

Figura 3: Corte Transversal de Ureter proximal de Hamster macho (HE – 10x) sem alterações 43

Figura 4: Corte de vesícula urinaria de hamster fêmea (HE – 40x) sem alterações 43

Figura 5: Corte de vesícula urinaria de hamster macho (HE – 40x) sem alterações 43

Figura 6: Corte transversal de uretra de hamster macho (HE – 62x) sem alterações 44

Capítulo II

Figura 1: Dados bioquímicos de ureia (mmol/l) e creatinina ($\mu\text{mol/l}$) no soro, Valores representados em média \pm DP para seis animais de cada grupo. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 54

Figura 2: Dados bioquímicos de ureia e creatinina no soro, expressos em mmol/l. Valores representados em média \pm DP para seis animais de cada grupo. Foi aplicado o /Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade 55

Figura 3: Alterações, em porcentagem, no peso corporal em vários grupos de ratos durante os dez dias do experimento 56

Figura 4: Quantidade de cálcio no rim esquerdo. Valores representados em média \pm desvio padrão ($\mu\text{g/g}$) para seis animais de cada grupo. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios obtidos através de exame clínico de animais pertencentes ao C1 (grupo controle) durante os 30 dias de experimento.....	41
Tabela 2: Valores médios obtidos através de exame clínico de animais pertencentes ao G2 (2500 mg/kg) durante os 30 dias de experimento	41
Tabela 3: Valores médios obtidos através de exame clínico de animais pertencentes ao G3 (5000 mg/kg) durante os 30 dias de experimento	42
Tabela 4: Sumário de dados obtidos durante as 12 horas de observação pós-administração do extrato aquoso de flores de <i>Dianthuscaryophyllus</i>	45
Tabela 5: Sumário de dados obtidos durante as 12 horas de observação pós-administração do extrato aquoso de flores de <i>Dianthuscaryophyllus</i>	46

CAPÍTULO 1

1INTRODUÇÃO GERAL

Doenças obstrutivas do trato urinário, denominadas urolitíase, envolvem a presença de cálculos no sistema urinário. Os cálculos constituem depósitos de substâncias cristalinas (oxalato de cálcio, fosfato de cálcio, ácido úrico, etc) excretados na urina. Eles podem ser encontrados em qualquer lugar, desde o rim até a uretra distal, e variar de tamanho desde minúsculos depósitos granulares, chamados de areia, até cálculos vesicais do tamanho de uma laranja.

Os objetivos do tratamento da urolitíase são basicamente a erradicação do cálculo, determinação do seu tipo de composição, evitar a destruição do néfron, controlar a infecção e eliminar qualquer obstrução que possa estar presente. A infecção e a pressão retrógrada exercida pela urina obstruída podem chegar a destruir o parênquima renal.

O objetivo do tratamento da cólica renal e ureteral, caso não haja obstrução, é aliviar a dor até que seja eliminada a sua causa; analgésicos e espasmolíticos são administrados para prevenir o choque e a síncope resultante da dor intensa. A não ser que o paciente esteja apresentando êmese, deve-se estimulá-lo a ingerir líquido, pois essa conduta tende a aumentar a pressão hidrostática. Uma ingestão alta de líquidos, dia e noite, reduz a concentração de cristalóides urinários e assegura um alto débito urinário.

O tratamento por meio de dieta é bastante eficaz quando os cálculos têm como causa anormalidades metabólicas que resultam em maior excreção de componentes de cálculos ou propriedades físico-químicas da urina alteradas. Para esses pacientes, a dieta selecionada deve ser com baixo teor dessas substâncias e medidas devem ser tomadas para que o pH da urina seja corrigido.

A intervenção cirúrgica está indicada se o cálculo estiver causando uma obstrução, dor constante, infecção que não responde ao tratamento ou lesão renal progressiva, mas deve-se sempre estar alerta para o fato de que estas intervenções têm um baixo índice de sucesso, e se não aliadas a outras medidas há uma grande possibilidade de recidivas.

Hoje, tanto na medicina humana quanto na veterinária, há uma carência de medicamentos, alopáticos, homeopáticos ou fitoterápicos que sejam completamente eficazes no auxílio à eliminação destes cálculos, fazendo com que a abordagem de rotina seja a intervenção cirúrgica que, além dos riscos intrínsecos ao procedimento, pode causar a perda do valor reprodutivo dos animais machos.

Atualmente o estudo de princípios ativos de plantas vem se destacando em vários aspectos, utilizando-se do conhecimento empírico na busca de novos princípios ativos

biologicamente, pesquisadores de todo o mundo tentam isolar moléculas que representem alternativas viáveis e seguras para instituição de protocolos terapêuticos, mais eficazes e seguros, ao mesmo tempo em que sejam menos onerosos para a indústria farmacêutica.

Mesmo em se tratando de produtos naturais, sempre há um risco de um extrato apresentar diferentes graus de toxicidade. Por isso antes de se testar um novo medicamento fitoterápico se faz necessário a instauração de testes toxicológicos pré-clínicos, com o intuito de se determinar a toxicidade de um extrato e se necessário a determinação de uma dose terapêutica que pode ser considerada segura para estabelecimento de um protocolo terapêutico que seja eficaz não ponho em risco a vida do paciente.

Os principais testes toxicológicos do quais se lançam mão para se iniciar uma pesquisa com um novo medicamento são a determinação do seu grau de toxicidade aguda (24 horas) e crônica (de 15 a 30 dias), nos quais diferentes doses do extrato são administrada em cobaias, geralmente roedores, e conforme a dose e os sinais de toxicidade observados, se classifica a substancia em vários níveis de toxicidade que podem variar de não tóxico (> 5000 mg/kg) a extremamente tóxico (< 5 mg/kg).

O presente trabalho vem nesse sentido indicar um tratamento alternativo e eficaz para pacientes acometidos por urolitíases, através da utilização da planta *Dianthus caryophyllus*, proporcionando a eliminação dos cálculos, a recuperação da integridade do sistema urinário e ausência de danos ao sistema reprodutivo. É imprescindível que se estude as propriedades terapêuticas desta planta, assim como o nível de segurança com o qual pode ser administrada, possibilitando que no futuro venha a ser reconhecida como um fitoterápico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fitoterapia

Este método terapêutico utiliza plantas e derivados. A fitoterapia é bastante difundida em todo mundo. Atualmente, utiliza-se mais de 4000 plantas no tratamento de enfermidades (TREVISAN et al. 2009).

Dos métodos utilizados em terapia na Medicina Natural, a fitoterapia é, sem dúvida, um dos mais antigos. Dele já lançava mão o homem pré-histórico, que aprendeu como os animais a distinguir as plantas comestíveis daquelas que podiam ajudá-lo a sanar suas moléstias (YWATA et al. 2005).

O Brasil é um dos quatro países que apresenta maior biodiversidade em todo o mundo, sendo o primeiro em número total de espécies. Nos três milhões e quinhentos mil quilômetros quadrados de florestas, existe a mais diversificada reserva de plantas do planeta (MARQUES, 2003; MENDONÇA, 1997).

A cura através das plantas e seus produtos como medicina popular tem resistido às inovações que vem ocorrendo com o passar dos tempos, as ervas têm conseguido sustentar sua importância e a confiança das populações atuais. É importante ressaltar que, mesmo diante dos progressos tecnológicos atuais, existem locais em que a fitoterapia representa o único recurso de tratamento (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

No Brasil, as práticas naturais de utilização de ervas estão presentes em todo o território, independente das diferenças das regiões. As ervas têm sido muito utilizadas nos dias atuais por questões culturais e econômicas, por ser de baixo custo quando comparados aos remédios alopáticos (SILVA et al. 2007).

O reconhecimento da fitoterapia como forma de tratamento medicinal está declarada no Diário Oficial da União na Edição Número 84 de 04/05/2006 emitida pelo Ministério da Saúde através da PORTARIA Nº 971, DE 3 DE MAIO DE 2006:

A fitoterapia é uma "terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal". O uso de plantas medicinais na arte de curar é uma forma de tratamento de origens muito antigas, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações. Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diferentes doenças.

Desde a Declaração de Alma-Ata, a OMS (1978) tem expressado a posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em

conta que 80% da população mundial utiliza essas plantas, ou preparações destas, no que se refere à atenção primária de saúde. Paralelamente, destaca-se a participação dos países em desenvolvimento nesse processo, já que possuem 67% das espécies vegetais do mundo.

As vantagens conseguidas no tratamento com plantas medicinais são inegáveis. A excelente relação custo/benefício (ação biológica eficaz com baixa toxicidade e efeitos colaterais) deve ser aproveitada uma vez que a natureza oferece gratuitamente a cura para as doenças. O uso de plantas medicinais para tratamento de doenças passou também a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde desde 1978 (OZAKI; DUARTE, 2006).

O conhecimento sobre o uso de plantas forma hoje a fitoterapia popular, uma prática alternativa optada por milhares de brasileiros que não tem acesso às práticas médicas oficiais, devido aos altos custos, principalmente no que diz respeito às consultas médicas e aquisição de medicamentos (ALBUQUERQUE, 1989).

2.2 Urolitíase

Define-se urolitíase como a formação de cálculos em consequência da precipitação de minerais ou substâncias orgânicas no trato urinário. Quando há obstrução da passagem de urina, a alteração denomina-se urolitíase obstrutiva, ocorrendo acúmulo de urina na vesícula urinária e acarretando processo inflamatório, hidronefrose e uremia pós-renal. A nutrição e o manejo são os principais fatores predisponentes para o aparecimento da urolitíase (RADOSTITS, 2002; REBHUN, 2000; RIET-CORREA, 2008). A doença é comum entre os ruminantes criados em sistema de manejo em que a ração é composta principalmente de grãos (RADOSTITS, 2002) ou quando os animais consomem pastos que contêm grande quantidade de sílica ou oxalatos (REBHUN, 2000).

O balanço cátion-ânion da dieta é importante em vários aspectos do metabolismo, refletindo-se sobre o funcionamento neuromuscular, osteoarticular, função respiratória, função renal e cardiovascular (DIBARTOLA, 1992; KANEKO et al. 1997). A urolitíase, em algumas circunstâncias, leva a alterações nas necessidades de macro-elementos dietéticos, induzindo a animal a buscar uma dieta para compensar às alterações metabólicas (HAND et al. 2000).

A urina é uma solução complexa e um meio eficiente para a eliminação de produtos de excreção do organismo. É a principal rota pela qual se eliminam produtos do metabolismo protéico (uréia, amônia e creatinina), minerais e água. O pH urinário varia como consequência

da manutenção homeostática do equilíbrio ácido-básico (DIBARTOLA, 1992). Em função disso, as características da dieta irão determinar em grande parte o pH urinário de cães e gatos. A determinação e modulação dietética do pH urinário, por sua vez, tornam-se importantes devido a seu estreito relacionamento com as urolitíase (DAVIES, 1999; OSBORNE et al. 2000; YAMKA et al. 2006).

Com a gradativa profissionalização da ovinocultura, que deixou de ser apenas uma atividade de subsistência e começou a ganhar espaço como uma exploração rentável, várias mudanças ocorreram nos sistemas de produção. A principal delas foi a intensificação em busca da máxima produção e rápido retorno do capital investido. Isto, aliado à comercialização de animais de elite em exposições agropecuárias, acarretou profundas alterações no manejo dos ovinos, aumentando a incidência de doenças metabólicas. Dentre estas enfermidades está a urolitíase obstrutiva, que apesar de ser influenciada por diversos fatores, possui uma marcante relação com o manejo nutricional e tem especial importância nos sistemas de criação intensiva (GHELLER, 2008).

A urolitíase obstrutiva é uma enfermidade comumente encontrada em ovinos e caprinos confinados ou de “estimação”. Define-se o processo como a inabilidade do animal em urinar normalmente devido à obstrução do fluxo urinário por um ou mais cálculos (figura 2). A formação de um cálculo urinário resulta da interação de numerosos fatores fisiológicos, nutricionais e relacionados ao manejo (BELKNAP; PUGH, 2002).

Segundo Aquino Neto et al. (2007), a intensificação na produção de ovinos no Brasil foi uma tendência nos últimos anos, devido à profissionalização da atividade. Estas alterações no manejo dos animais foram responsáveis pelo aumento dos quadros de urolitíase obstrutiva. Diversos fatores nutricionais e de manejo têm sido implicados como predisponentes para o surgimento da doença.

Ainda não se compreendem bem os mecanismos envolvidos na formação de pedras. Existem três teorias principais: a hipótese matriarcal (que enfatiza a matriz protéica inorgânica como indicadora da formação urolítica); a hipótese do inibidor de cristalização (que enfatiza a importância dos inibidores de cristalização orgânicos e inorgânicos) e a hipótese da precipitação-cristalização (que enfatiza a importância da supersaturação salina). Independente do mecanismo, não se produzem cálculos a menos que: 1, ocorra concentração urinária suficientemente alta de constituintes formadores de cálculos; 2, ocorra um prolongamento do tempo de trânsito dos cristais dentro do trato urinário e 3, no caso de pedras selecionadas (estruvita, cistina e urato), que ocorra um pH favorável para cristalização.

Esses critérios podem ser afetados por infecções no trato urinário, dieta, absorção intestinal, volume urinário, frequência de micção e genética (MERCK, 2007).

A absorção de fósforo em ruminantes é realizada por transporte passivo, em direta relação ao consumo (BRAITHWAITE, 1985), ou seja, quanto maior a concentração intestinal maior a absorção e o transporte ativo pode ser determinado por uma maior demanda pelo animal. A homeostase de fósforo em ruminantes é conseguida através da secreção do fósforo pela saliva (fósforo endógeno) e excreção pelas fezes, de acordo com a demanda do animal (SCOTT et al. 1985). A excreção de fósforo pela urina é muito pouca, ou seja, menos que 1% (THOMPSON JUNIOR, 1978) e pode se elevar quando a ingestão deste excede a demanda do animal e os valores plasmáticos ultrapassam o limiar renal (FIELD et al. 1984).

Diferentes tratamentos foram descritos para esta enfermidade em ruminantes. A uretostomia perineal, cistotomia pré-púbica, fistulização da bexiga com celiotomia lateral e a amputação do processo uretral. A maioria dos tratamentos tem por finalidade salvaguardar a vida do animal até o momento do abate (MENESES et al. 2007).

O tratamento utilizado depende do estágio da doença, da natureza e extensão dos cálculos presentes, do destino futuro do animal e, frequentemente, das questões financeiras. Quando a intervenção cirúrgica torna-se necessária, a perspectiva de um prognóstico variando de reservado a pobre deve ser avaliada caso haja interesse em manter o animal por longos períodos (SMITH; SHERMAN, 1994).

2.3 Produtos naturais no tratamento da urolitíase

Diferentes recursos naturais vêm sendo empregados para tratar cálculos renais. Em sistemas tradicionais de medicina, grande parte desses recursos é obtida de plantas e comprovada ser útil no tratamento da nefrolitíase. No entanto, a racionalidade do uso não está bem estabelecida, ou seja, estudos farmacológicos e clínicos encontram-se inconclusivos ou ainda não foram realizados (PRASAD; SUJATHA; BHARATHI, 2007). Nesse contexto, uma avaliação crítica destas plantas assume grande importância. Singh e Sachan (1989) avaliaram em estudos farmacológicos e clínicos uma formulação composta por cinco ervas: *Desmostachyabipinnata*, *Saccharumofficinarum*, *Saccharumnunja*, *Saccharumspontaneum* e *Imperatacylindrica*. Esta formulação demonstrou eficácia tanto profilática, prevenindo a formação, como terapêutica, dissolvendo cálculos pré-formados em ratos albinos. A atividade antilitiásica foi atribuída ao efeito diurético das ervas.

As cascas de *Crataevanurvala* têm sido extensivamente estudadas por pesquisadores da Índia. Lupeol, um triterpeno isolado desta espécie, apresentou atividades profiláticas e curativas relacionadas à dose em ratos albinos (ANAND; PATNAIK; KULSHRESHTHA, 1994).

A atividade antilitiásica de compostos derivados de isoflavonas, isolados de *Eysenhardtia polystachya*, foi estudada em ratos, observando-se uma significativa redução no tamanho das pedras nos animais tratados com os compostos em questão (PEREZ et al., 2000).

Sannidi e colaboradores (1997) avaliaram a atividade de uma combinação contendo *Bergenia ligulata* e *Tribulus terrestris* em 14 pacientes com cálculo renal e 16 com cálculo no ureter. 28,57% dos pacientes com cálculo renal e 75% com cálculo no ureter eliminaram-nos completamente, enquanto que nos demais pacientes houve expulsão parcial dos cálculos e alteração em seu formato e tamanho.

Costus spiralis é extensivamente utilizada na medicina tradicional brasileira para eliminação de pedras no rim. Seu extrato aquoso, quando administrado nas doses de 0,25 e 0,5 g/kg/dia durante quatro semanas, reduz significativamente o crescimento de cálculos de oxalato de cálcio em bexiga de ratos (VIEL et al., 1994). Pesquisas realizadas com raízes de *Rubia tinctorum* permitiram verificar sua eficácia na eliminação de cálculos de oxalato, fosfato, carbonato de cálcio e ácido úrico. Esta atividade foi atribuída à presença de hidróxi-antraquinonas, as quais estimulam o músculo liso da bexiga e permitem que os cálculos sejam expelidos (SCHNEIDER et al., 1979).

Bensatal e Ouahrani (2008) verificaram que a fração ácida de *Tamarix gallica* L apresenta importante efeito inibitório na cristalização do oxalato de cálcio in vitro. Este fenômeno parece estar relacionado às funções ácidas de seus compostos, que podem complexar-se com íons de cálcio.

A avaliação do efeito profilático de sementes de *Trigonella foenumgraecum* L formação de pedras nos rins de ratos permitiu a confirmação do uso popular da planta quanto as suas propriedades antilitiásicas. Sugere-se que o extrato seja capaz de manter as partículas de oxalato de cálcio dispersas na solução e assim permitir que sejam eliminadas facilmente do rim. Além disso, seu mecanismo de ação parece estar também relacionado ao aumento da diurese e à atividade antioxidante do extrato devido à presença de flavonóides (LAROUBI et al., 2007).

Além dos extratos, um produto frequentemente utilizado por pacientes litiásicos é o Rowatinex®, uma mistura de óleos essenciais contendo pineno (31%), canfeno (15%),

borneol (10%), anetol (4%), fenchona (4%) e cineol (3%). Verificou-se em estudos preliminares que parece existir certo efeito benéfico do Rowatinex®, por aumentar a excreção de glucuronídeos, os quais poderiam reduzir a cristalização do oxalato de cálcio e exercer algum benefício em acelerar a passagem do cálculo na crise de cólica aguda (WILL et al., 1981).

Embora intensa pesquisa esteja sendo realizada a fim de estabelecer os mecanismos de formação dos cálculos, o papel da dieta e o potencial de plantas e de outros agentes no tratamento da nefrolitíase, ainda não existe um fármaco padrão disponível. As principais dificuldades em desenvolvê-lo correspondem à natureza multifatorial da doença, às diferentes disfunções bioquímicas que levam a ela e às diferentes variedades químicas dos cálculos (PRASAD; SUJATHA; BHARATHI, 2007).

Os produtos naturais e seus derivados poderão contribuir não somente no desenvolvimento de uma nova forma de tratamento, mas também, certamente, na redução da taxa de incidência dos cálculos renais (PRASAD; SUJATHA; BHARATHI, 2007).

2.4 *Dianthuscaryophyllus*

a) Classificação científica

O *Dianthuscaryophyllus* é conhecido pelos nomes populares de cravo ou craveiro, tendo sua origem na Europa, suas características gerais são de uma planta herbácea, perene, com porte de 60-90 cm de altura, caule reto com várias ramificações e folhagem ornamental com tonalidade verde-azulada. As flores são grandes e simples nas espécies silvestres e dobradas nas variedades cultivadas, variando entre as cores vermelha, branca, amarela e rosa.

Sua classificação científica é apresentada como:

Reino:	Plantae (HAECKEL, 1866)
Divisão:	Magnoliophyta (CRONQUIST et al 1966)
Classe:	Magnoliopsida (CRONQUIST; TAKHT; ZIMMERMAM, 1966)
Subclasse:	Caryophyllidae (TAKHT, 1966 apud THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003)
Ordem:	Caryophyllales (BENCH; HOOK, 1862 apud THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003)
Subclasse:	Caryophyllidae (TAKHT, 1966)
Família:	Caryophyllaceae (JUSSIEU, 17+-89)
Gênero:	<i>Dianthus</i> (LINNAEI, 1753)
Espécie:	<i>D. caryophyllus</i> (LINNAEI, 1753)

Não há relatos que indiquem que a espécie possua propriedades terapêuticas ou princípios ativos presentes que possam auxiliar em doenças do sistema urinário.

2.5 Avaliações de toxicidade: princípios teóricos e práticos

A toxicidade de uma substância é a capacidade que esta tem em causar algum desequilíbrio ao organismo com o qual entra em contato, ou seja, refere-se ao potencial de um toxicante em produzir o efeito tóxico (BARROS; DAVINO, 2003). A importância de avaliar tal propriedade reside no fato de que toda e qualquer substância química pode vir a ser tóxica, dependendo de vários fatores, já comentados, relacionados à exposição, tais como: dose; frequência e duração da exposição; condições fisiológicas e/ou patológicas do organismo exposto etc. Considerando-se que, na grande maioria dos casos, não é possível evitar por completo o contato do agente tóxico com o organismo, surge a necessidade de se conhecer ao máximo os riscos que a substância oferece, a fim de que sejam estabelecidas condições seguras de uso e/ou exposição. Assim, a necessidade de estudos de avaliação de toxicidade serem conduzidos de modo científico e padronizado estimulou uma crescente estruturação metodológica da Toxicologia Experimental. Os protocolos experimentais, nesse campo da ciência toxicológica, são muito importantes para o desenvolvimento de produtos tanto na fase investigativa quanto no momento do cumprimento das exigências legais para registro e comercialização. Tais estudos se desenrolam em duas grandes fases: a fase pré-clínica, realizada em espécies inferiores à humana na escala evolutiva e a fase clínica, onde os produtos que não demonstraram toxicidade significativa nos estudos pré-clínicos são então testados em humanos voluntários, sob rigorosos preceitos técnicos e éticos conforme comentado adiante (MARIZ, 2007).

As etapas de um estudo toxicológico pré-clínico são seqüenciais e estão atualmente bem definidas. Podem apresentar pequenas variações de acordo com as exigências legais de cada país e até mesmo conforme a obra de referência consultada; todavia, existe um consenso sobre os tópicos descritos a seguir (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949; CORRÊA; ALONZO; TREVISAN, 2003; PAPARELLA; FASSOLD, 2004).

2.5.1 Informações preliminares

Antes de proceder qualquer experimento com organismo, por mais simples que seja sua espécie ou estágio evolutivo, deve-se conhecer a substância a ser avaliada em aspectos como, por exemplo, estrutura e composição química (inclusive determinação qualitativa e quantitativa de eventuais impurezas), propriedades físico-químicas, aspectos toxicocinéticos, fontes e níveis de exposição, distribuição no ambiente etc. Atualmente, existem programas de informática que, a partir de algumas dessas informações, auxiliam na previsão de toxicidade da referida substância. Enfim, toda e qualquer informação sobre o produto (e/ou seus constituintes) pode auxiliar no delineamento experimental.

2.5.2 Testes *in vitro*

Tais testes são conhecidos como métodos alternativos para avaliação toxicológica. Esses testes surgiram basicamente em função da crescente preocupação ética com a utilização de animais em experimentação biológica. Podem ser citados a cultura de tecido ocular de bovinos para testes em cosmetologia, bem como o teste em membrana corioalantóica de ovos de galinha para avaliação de irritabilidade ocular, além de outros (ANDERSEN et al., 2004). Destaque especial merecem os ensaios utilizando larvas de camarão (MEYER et al, 1982) e de peixes (ictiotoxicologia) pelo baixo custo e praticidade de execução. O grande desafio nessa área é o desenvolvimento de testes que possam ser validados, ou seja, que demonstrem uma capacidade presuntiva para efeitos em animais, pelo menos, igual a do método que pretende substituir.

2.5.3 Testes *in vivo*

Apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação toxicológica, os melhores resultados em termos de preditibilidade de efeitos em humanos ainda são os obtidos em animais classicamente empregados em experimentação. As espécies mais usadas em investigações biomédicas são os roedores (95 %). Entre estes: ratos e camundongos (90 %) , cobaias (2 %), hamsters (2 %) e outros (1 %) (NETTO, 2006).

Entretanto, antes mesmo da definição da espécie animal a ser utilizada, é preciso estar atualizado sobre preceitos éticos do uso de animais de laboratório. A relevância desse tema tem crescido nas últimas décadas em função do grande número de animais empregados em experimentos diversos e das frequentes situações de sofrimento às quais eles são expostos. Segundo recente levantamento, o uso de animais em experimentação se dá, principalmente,

para desenvolvimento e/ou registro de produtos bioativos (40 a 50 %), mas também, para o ensino (25 %) e diagnóstico (menos de 5 %) (CAZARIN et al., 2003; CAZARIN et al., 2004).

A ética pode ser compreendida como “estudo do bem” não somente para com os semelhantes (humanos), como para com todas as formas de vida ao nosso redor (RODRIGUES, 2002). Quando esse estudo se debruça sobre os temas da grande área da saúde, nasce a bioética que se desenvolve, em todo o mundo, mediante as transformações sociais ocorridas após a Segunda Guerra Mundial e também em decorrência das descobertas científicas a partir dos anos 60. Hoje, a bioética tem se tornado cada vez mais como um discurso em prol da tolerância fugindo da tentativa de estabelecer absolutos morais (DINIZ; GUILHEM, 2002).

Um marco na longa e conturbada trajetória das discussões sobre o uso de animais em experimentação biológica foi a publicação, em 1959, por Willian Russel e RexBurch, de um estudo detalhado apresentando o programa 3R's. Contudo, essas reflexões só passaram a ser consideradas na elaboração de leis e convenções durante a década de 80. Esse programa foi assim denominado em função de cada uma das iniciais das palavras, em inglês, que denotam seus principais objetivos; *Reduction* (redução), *Refinement*(refinamento) e *Replacement*(substituição) (CAZARIN et al., 2004).

A redução propõe que cada experimento use o menor número possível de animais. Convém evitar repetições desnecessárias e o uso de modelos animais irrelevantes na extrapolação para humanos, além de maximizar o número de informações obtidas por animal utilizado. No refinamento o objetivo é aprimorar os métodos no intuito de minorar, cada vez mais, o sofrimento animal. Por fim, a substituição propunha a troca de ensaios *in vivo* por *in vitro* sempre que possível e eficaz. Recomenda ainda a priorização experimental de espécies consideradas inferiores na escala evolutiva, como por exemplo, vírus, bactérias e até mesmo larvas de algumas espécies de crustáceos e peixes (MARIZ, 2007).

Os que defendem o uso racional de animais em estudos experimentais têm produzido vários trabalhos relacionando os princípios que devem nortear tais estudos. Na quase totalidade dos casos, percebe-se que constam basicamente de um esmiuçar do programa 3R's (ANDERSEN et al. 2004; CAZARIN et al., 2004; ALMEIDA; CARLINI, 2006).

No Brasil, a disseminação de comitês de ética em pesquisa nas diversas instituições do país, com exigências cada vez mais rígidas, tem representado um significativo avanço nessa área. Entretanto, muito ainda precisa ser feito no sentido de que o zelo pelo bem-estar animal deixe de ser apenas uma bandeira de movimentos ativistas ou uma mera exigência burocrática

a ser cumprida em um projeto de pesquisa e passe a ser um dos principais itens de qualidade na execução experimental (MARIZ 2007).

Em ensaios para avaliação da eficácia e segurança de fitomedicamentos, deve-se considerar não somente os cuidados com os animais de experimentação como também a quantidade do recurso natural a ser explorado como insumo na preparação do medicamento fitoterápico e um eventual risco de escassez. Os cuidados éticos em experimentação toxicológica já devem começar na escolha da espécie animal a ser usada. Essa decisão depende tanto da substância avaliada quanto do(s) experimento(s) a serem realizados e isso é fundamental para a qualidade dos resultados no estudo toxicológico. Ainda convém considerar, na opção, aspectos diretamente ligados à espécie a ser escolhida como: disponibilidade, facilidade operacional, baixo custo, produção de resultados de fácil mensuração e fidedignos, e principalmente, capacidade preditiva, quer dizer, que seja capaz de antecipar eventos clínicos (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; VITAL, 2006).

Apesar de sabermos que não existe uma espécie ideal, é consenso que o rato (*Rattus norvegicus*), animal empregado neste estudo, tem se constituído como o principal em estudos de experimentação toxicológica em função de características como: fácil manejo e observação; baixo custo de manutenção; alta capacidade reprodutiva, período de gestação relativamente curto (21 dias) e ninhada numerosa (geralmente de 8 a 12 animais); volume de fluidos corporais adequado na avaliação de determinados parâmetros; grande número de cepas bem definidas; conhecimentos sobre diversos aspectos de sua biologia que são fundamentais na extrapolação para a condição humana; possibilidade de obtenção de linhagens especiais por meio de seleção genética e mutações as quais são muito úteis em pesquisas específicas (ANDERSEN et al. 2004; NETTO, 2006).

Uma outra espécie animal bastante usada em farmacologia e toxicologia é o cão. Entre os motivos do uso de cães destacamos a recomendação de obras de referência e da exigência da legislação brasileira de que medicamentos fitoterápicos sejam avaliados em pelo menos duas espécies animais (sendo uma não roedora) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)). Ainda pode-se destacar o fácil manejo, a grande disponibilidade e o baixo custo de manutenção desses animais e a grande semelhança genética com humanos (PARKINSON; GRASSO, 1993, BARBOSA, 2000). Parcerias de instituições de pesquisa com Centros de Controle de Zoonoses podem permitir a utilização de cães SRD (sem raça definida) apreendidos e que antes estavam nas ruas servindo como agentes transmissores de doenças diversas. Todavia, esses animais só podem ser usados após tratamento adequado e

ainda se forem submetidos a um rigoroso processo de triagem que selecione os indivíduos para estudo baseado não somente no estado de saúde quanto na observância de critérios de exclusão padronizados.

No que se refere ao desempenho do uso de cães, como segunda espécie em ensaios toxicológicos, não existem estudos específicos com medicamentos fitoterápicos. Avaliações de dados toxicológicos de medicamentos alopáticos e de pesticidas comprovam que os estudos em cães são essenciais na complementação daqueles feitos em roedores e que a duração de 13 semanas é ideal em termos de sensibilidade para efeitos tóxicos ainda não detectados (GERBRACHT; SPIELMANN, 1998; SPIELMANN; GERBRACHT, 2001).

2.5.4 Principais testes toxicológicos pré-clínicos in vivo

Nos aspectos que são consenso entre os autores e, fundamentalmente, naquilo que preconiza a legislação brasileira de medicamentos fitoterápicos (LU, 1992; LARI NI, 1993; BRITO, 1994; LAPA et al., 2000; FAUSTMAN; OMENN, 2001; JACOBSON-KRAM; KELLER, 2001; BARROS; DAVINO, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004 b; SÁ; ALMEIDA, 2006). Os Ensaio de Toxicidade Aguda correspondem a experimentos onde os organismos avaliados são submetidos a uma única dose (ou concentração) da substância (ou produto) avaliada (o) ou então, a doses múltiplas em um período inferior a 24 horas. Servem para estimar a toxicidade da substância, obter informações preliminares sobre mecanismos de ação e ainda, definir doses a serem usadas em estudos de longa duração. Tradicionalmente, esses estudos buscavam conhecer a dose ou concentração letal mediana (DL ou CL 50 respectivamente). Tal conceito corresponde à dose ou concentração capaz de matar a metade de uma população em estudo. A DL 50 é um parâmetro que tem sofrido várias críticas, inicialmente pelo alto número de animais usados. No Brasil, a regulamentação para determinação desse parâmetro em desenvolvimento de fitoterápicos diz que se use, no mínimo, 6 animais por dose e sexo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004 b). Tal parâmetro ainda é questionado por usar como critério analítico o evento morte que, sem dúvida, é o pior de todos os efeitos tóxicos. Atualmente, em vários países do primeiro mundo, apesar da DL50 ainda ser exigida para a classificação toxicológica, existe uma tendência em substituí-la por outras avaliações como, por exemplo, o teste da dose fixa. Nesse experimento se busca conhecer a maior dose da substância que não produz morte em um dado grupo experimental (BARROS; DAVINO, 2003).

No teste de dose fixa, trata-se um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) com uma dose inicial de 500 mg/kg de peso corpóreo. Se não houver sinais de toxicidade, a substância não recebe classificação toxicológica, mas o protocolo experimental deve ser repetido com 2.000 mg/kg para avaliação total de riscos. Caso apareça toxicidade sem mortes, com a dose de 500 mg/kg, a substância pode ser classificada como nociva, por correlação estatística com a DL 50. Segundo a comunidade européia, nessa categoria estão as substâncias que possuem uma DL 50 oral para ratos de 200 a 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Em caso de morte com 500 mg/kg, repete-se o teste com 50 mg/kg. Se produzir toxicidade sem morte considera-se que a substância é tóxica ($25 \text{ mg/kg} < \text{DL } 50 < 200 \text{ mg/kg}$). Caso haja mortalidade, repete-se o teste, agora com 5 mg/kg e se houver toxicidade e/ou mortalidade a substância é considerada como muito tóxica ($\text{DL } 50 < 25 \text{ mg/kg}$) (BARROS; DAVINO, 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 116/96, de 08 de Agosto de 1996. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterapêuticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12, ago. 1996.
- ALBUQUERQUE, J. M. Plantas medicinais de uso popular. **Ministério da Educação**, Brasília: 96p., 1989.
- ALMEIDA, R. N.; CARLINI, E. L. A. Aspectos éticos da experimentação com animais. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia**. Fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.62-75.
- ANAND, R.; PATNAIK, G. K.; KULSHRESHTHA, D. K. Antiuro lithiatic activity of lupeol, the active constituent isolated from *Crataeva nurvala*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 417-421, 1994.
- ANDERSEN, M. L. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP. 2004. 167 p.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M. A. B. F. Modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.53-61.
- AQUINO NETO, H. M. et al., Urolitíase obstrutiva em ovinos: revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v. 4, p. 191-202, 2007.
- BARBOSA, B. A invenção do cachorro. **Revista Veja**, ano 33, n. 18, maio, 2000.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA S. **Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora. 2003. p.57- 67.
- BELKNAP, E.B.; PUGH, D.G. Diseases of the urinary system. In: PUGH, D.G. (Ed). **Sheep & goat medicine**. Philadelphia: Saunders, 2002. p.267-271
- BENSATAL, A.; OUAHRANI, M. R. Inhibition of crystallization of calcium oxalate by the extraction of *Tamarix gallica* L. **Urological Research**, v. 36, p. 283-287, 2008.
- BRAITHWAITE, G. D. Endogenous faecal loss of phosphorus in growing lambs and the calculation of phosphorus requirements. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.105, n.1, p.67-72, ago. 1985.
- BRASIL, 2004. Resolução nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRASIL, 2006. Portaria n. 971, de 3 de Maio de 2006, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Edição n. 84 de 04/05/2006, **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. p. 1-10.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994. 122p.

CAZARI N, K.C.C.; C ORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Situação Internacional da Utilização de Animais em Estudos Toxicológicos frente ao Programa 3RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 13., 2003, Londrina, **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.16, n.1, p.204, 2003.

CAZARI N, K.C.C.; C ORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.3, p.289-299. 2004

TREVISAN, R. M. S., CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; Avaliação do risco In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.69-76.

CRONQUIST, A., TAKHTAJAN, A., ZIMMERMANN, W. The higher taxa of Embryobionta. **Taxon** 15: 129–134. 1966.

DAVIES, M. Tratamiento de la urolitiasis canina y felina. In: BAINBRIDGE, J. & ELLIOTT, **Journal Manual de Nefrologia y Urologia en Pequeños Animales**. Barcelona: Romanya/Valls, S.A., p.275-289, 1999.

DIBARTOLA, S. P. **Fluid therapy in small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 719p, 1992.

FIELD, A. C. et al., Animal and dietary variation in absorption and metabolism of phosphorus by sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.103, n.2, p.283-291, oct. 1984.

GERBRACHT, U.; SPIELMANN, H. The use of dogs as a second species in regulatory testing of pesticides. I. Interspecies comparison. **Archives of Toxicology**, V.72, n.6, p.319- 329, 1998.

GHELLER, M. Abordagens laparoscópicas em pequenos ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 11, suplemento 2, p. 52 – 55, nov., 2008.

HAECKEL, E. **Allgemeine Entwicklungsgeschi der Organismen**, Reimer, Berlin. 1866.

HAND, M. S. et al., Small Animal Clinical Nutrition. 4.ed. Kansas: **Mark Morris Institute**, 2000. 1192p.

JUSSIEU, A.L. **Genera Plantarum**. Herissant & Barrois, Paris. 1789.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5. ed. London: **Academic Press**, 932p., 1997.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) Clinical biochemistry of domestic animals. 5^a ed. New York: **Academic Press**, 1997.

KRAM, M.L., KELLER, A.A. ROSSABI, J. EVERETT, L.G. DNAPL characterization methods and approaches, Part I: Performance comparisons. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 21, no. 4: 109–123. 2001.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC. 2000. p.181-196.

LARINI L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**.3.ed. São Paulo: Manole. 1993. p.43-58.

LAROUBI, A.; TOUHAMI, M.; FAROUK, L.; ZRARA, I.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREL, A.; CHAIT, A. Prophylaxis effect of *Trigonella foenum-graecum* L seeds on renal stone formation in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 921-925, 2007.

LINNAEI, C. *Decandria Digynia*. in: *Species Plantarum, Exhibentes Plantas Rite Cognitas ad Genera Relatas*. Impressão: Laurentii Salvii, ed 1, p. 409 – 413, 1753.

LITCHFIELD J. T. WILCOXON, F. Simple method of fitting dose-effect curve. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 95, p. 99-113, 1949.

LU, F. C. Toxicologie –Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque .Paris: Masson, 1991. 361p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. A.; VEIGA, V. F. J. A necessidade de estudos multidisciplinares. *Plantas Mediciniais: Química Nova*, v.25, n.03, p. 429-438, 2002.

MARQUES, K. B. et al., Avaliação da atividade analgésica do extrato alcoólico de *Calotropis procera*. V Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária e V Seminário Nordeste de Caprino-ovinocultura. CAMPUS UFRPE, ANAIS, p. 283-285, 2003.

MENDONÇA, F. G. T. Trabalhos comunitários com plantas medicinais no Sertão paraibano: Enfocando os benefícios e riscos no uso. 80 p. Monografia apresentada ao Curso e Graduação em Engenharia Florestal – Universidade Federal da Paraíba. Patos, 1997.

MENESES, D. C. R. et al., Fistulização da bexiga para tratamento de urolitíase obstrutiva em caprinos. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.1, n.3, p.89-93, 2007.

MERCK, 2007

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v.45, p.31-34, 1982.

NETO, A. et al., Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**. v.88, n.2, p.141-7, 2007.

NETTO, S. M. Animais de laboratório. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia. fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.46-52

OMS. Declaração de Alma-Ata, Conferência Internacional Sobre Cuidados Primários de Saúde Alma-Ata, URSS, 1978.

OSBORNE, C. A. et al., Prevalence of cystine and urateuroliths in bulldogs and urateuroliths in dalmatians. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, n.12, p.1914-1918, 2000.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos Utilizados Na Medicina Veterinária em Cães e Gatos. **Infarma**, v.18, nº 11/12, p. 17 – 25, 2006.

PAPARELLA, M.; FASSOLD, E. The challenge to reduce animal testing in regulatory toxicology. Example: **The biocidal products directive (BPD) Pharmacology**, v.72, n.2, p.151, 2004.

PARKINSON, C.; GRASSO, P. The use of the dog in toxicity tests on pharmaceutical compounds. **Human & Experimental Toxicology**, v.12, n.2, p.99-109, 1993.

PEREZ, R. M.; VARGAS, R.; PEREZ, S.; ZAVALA, M. A.; PERZ, C. Antiurolithiatic activity of 7-hydroxy-2',4',5'-thimethoxyisoflavone and 7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone from Eysenhardtia polystachya. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 7, p. 27-34, 2000.

PRASAD, K. V. S. R. G.; SUJATHA, D.; BHARATHI, K. Herbal drugs in urolithiasis – a review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 175-179, 2007.

RADOSTITSO, M., GAY C.C., BLOOD D.C. & HINCHCLIFF, W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9ª ed. W.B. Saunders, London, p.441-447. 2002.

REBHUN, W. C. *Doenças do Gado Leiteiro*. São Paulo: Roca, 2000. RIET-CORREA, F. Urolitíase. In: RIET-CORREA, F. et al., Doenças de Ruminantes e Equinos. 2.ed. São Paulo: Varela, 2000.

RIET-CORREA, Franklin; SIMOES, Sara V.D.; VASCONCELOS, Jackson S.. Urolitíase em caprinos e ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 6, June 2008 .

RODRIGUES, L. D. **Fundamentos filosóficos** . João Pessoa: Idéia, 2002. 127p.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade aguda. In: ALMEIDA, R. N. (org.) **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.124-130.

SANNIDI, D. N.; KUMAR, A.; KUMAR, N. To evaluate the effect of Ayurvedic drugs Svetaparpati with pashanabheda and Gokshura in the management of Mutrasmari. *Proceedings of National Science Council, Part B. Life Sciences*, v. 21, p. 13-19, 1997.

SCHNEIDER, H. J.; UNGER, G.; ROSIER, D.; BOTHOR, C.; BERG, W.; ERNST, G. Effect of drugs used for the prevention of urinary calculi recurrence on the growth and metabolism of young experimental animals. **Zeitschrift für Urologie und Nephrologie**, v. 72, p. 237-247, 1979.

SCOTT, D.; WHITELAW, F.G.; BUCHAN, W.; BRUCE, L.A. The effect of variation in phosphorus intake on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and faecal endogenous phosphorus excretion in sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.105, n.2, p.271-277, 1985.

SILVA, C. G. R.; SILVA, J. L. L.; ANDRADE, M. Fitoterapia como terapêutica alternativa e promoção da saúde. Disponível em: <<http://www.uff.br/promocaodasaude/informe>>. Acesso em: 10 fev. 2008

SINGH, C. M.; SACHAN, S. S. Management of urolithiasis by herbal drugs. **Journal of Nepal Pharmaceutical Association**, v. 7, p. 81-85, 1989.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Urinary System. IN: Goat Medicine. Philadelphia, Lea &Febiger, P.387-409, 1994.

SPIELMANN, H.; GERBR ACHT, U. The use of dogs as second species in regulatory testing of pesticides. Part II: subacute, subchronic and chronic studies in dog. **Archives of Toxicology**, v.5, p.1-21, 2001.

TARTTELIN, M.F. Feline struvite urolithiasis: factors affecting urine pH may be more important than magnesium levels in food. **Veterinary Record**, v.121, n.11, p. 245-248, 1987.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II, **Botanical Journal of the Linnean Society**, n.141, p. 399-436, 2003,

THOMPSON JUNIOR, W. R. Phosphorus in animal nutrition. In: **PHOSPHORUS for agriculture: a situation analysis**. Atlanta: Potash/Phosphate Institute, p.126-158, 1978.

TREVISAN, L. F. A. ; Melo, M.A. ; Pereira, A. V. ; Lima, E. Q. ; Rodrigues, O. G. ; Pereira, M. S. V. ; Albuquerque. A.C.L. . Tratamento fitoterápico experimental em ovino acometido por urolitíase obstrutiva. **Agropecuária Técnica** (UFPB), v. 30, p. 96-101, 2009.

TSUJIHATA, M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. **International Journal of Urology**, v. 15, p. 115-120, 2008.

VIEL, T. A.; MONTEIRO, A. P. S.; LANDMAN, M. T. R. L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Evaluation of antiurolithiatic activity of the extract of *Costusspiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 193-198, 1994.

WILL, E. J.; BELL, G. D.; TAYLOR, M.; RICHMOND, C.; MIDDLETON, A.; JOHNSON, N.; DHILLON, B. Natural volatile oils in the management of renal calculi stone

disease. SMITH, L. H.; ROBERTSON, W. G.; FINLAYSON. Urolithiasis, Clinical and Basic Research. New York: Plenum Press, 1981. p. 293-296.

YAMKA, R. ; FRIESEN, K. G.; SCHAKENRAAD, H. The Prediction of urine pH Using Dietary Cations and Anions in Cats Fed Dry and Wet Foods. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.4, n.1, 2006.

YWATA, C; ANTÔNIO, J. CORDEIRO, R. **Medicina Natural**; São Paulo, editora Três, p.35, 2005.

CAPÍTULO 2

Análises toxicológicas com extratos fitoterápicos de *Dianthus caryophyllus*

[Toxicological tests with herbal extracts of *Dianthus caryophyllus*]

TREVISAN, Luiz Fernando Annunziata^{1*}; RODRIGUES, Onaldo Guedes¹;
OLIVEIRA, Edgar Nogueira de¹; MELO, Marcia Almeida de²; PEREIRA, Andréia Vieira³

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, CSTR, UFCG, Patos, PB

²Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, CSTR, UFCG, Patos, PB

³Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP

*Endereço para correspondência: UFCG / CSTR / Campus de Patos - PB Cx.P.: 64 - CEP: 58700-970, fone: +558396208280, fax: 11 41697013, e-mail: luiz.itanopan@uol.com.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade crônica e aguda de extratos de flores de *Dianthus caryophyllus*, uma espécie vegetal nunca antes utilizada com esse fim na medicina fitoterápica. Os protocolos experimentais utilizados seguiram o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Hamsters sírios foram tratados por via oral com o extrato seco nas doses de 100 e 200mg por dia durante 30 dias consecutivos, e foram estudados os efeitos tóxicos em hamsters sírios e camundongos Swiss com a dose limite de 5000 mg/kg do extrato aquoso. Nenhum animal veio a óbito e nenhum sinal de toxicidade foi detectado nos parâmetros observados, nas autópsias e na histopatologia, indicando atoxicidade do produto.

Palavras-Chaves: *Dianthus caryophyllus*, urolitíase, DITUIF, fitoterapia, toxicidade, terapêutica.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the acute and chronic toxicity of extracts from flowers of *Dianthus caryophyllus*, specie never used as phytotherapeutic. The experimental protocol followed the Guide for Studies of Pre-clinical Phytotherapeutic Toxicity of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2004). Syrians hamsters and Swiss mice, young and adults, were treated orally with dry extract, in doses of 100 and 200 milligrams per day and with the limit dose of 5000 mg / kg of aqueous extract, and observed for up to 30 consecutive days. No animal died and no sign of toxicity was detected in the clinical analysis, necropsy and histopathology, indicating atoxicity.

Keywords: *Dianthus caryophyllus*, urolithiasis, DITUIF, phytotherapy, toxicity, therapy.

1 INTRODUÇÃO

Ensaio de Toxicidade Aguda correspondem a experimentos onde os organismos avaliados são submetidos a uma única dose (ou concentração) da substância (ou produto) avaliada (o) ou então, a doses múltiplas em um período inferior a 24 horas. Servem para estimar a toxicidade da substância, obter informações preliminares sobre mecanismos de ação e ainda, definir doses a serem usadas em estudos de longa duração.

Tradicionalmente, esses estudos buscavam conhecer a dose (ou concentração) letal mediana (DL50 ou CL50, respectivamente). Tal conceito corresponde à dose (ou concentração) capaz de matar a metade de uma população em estudo. A DL50 é um parâmetro que tem sofrido várias críticas, inicialmente pelo alto número de animais usados. No Brasil, a regulamentação para determinação desse parâmetro em desenvolvimento de fitoterápicos diz que se use, no mínimo, 6 animais por dose e sexo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Tal parâmetro ainda é questionado por usar como critério analítico o evento morte que, sem dúvida, é o pior de todos os efeitos tóxicos. Atualmente, em vários países do primeiro mundo, apesar da DL50 ainda ser exigida para a classificação toxicológica, existe uma tendência em substituí-la por outras avaliações como, por exemplo, o teste da dose fixa. Nesse experimento se buscou conhecer a maior dose da substância que não produz morte em um dado grupo experimental (BARROS; DAVINO, 2003).

No teste de dose fixa, trata-se um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) com uma dose inicial de 500 mg/kg de peso corpóreo. Se não houver sinais de toxicidade, a substância não recebe classificação toxicológica, mas o protocolo experimental deve ser repetido com 5.000 mg/kg para avaliação total de riscos, não havendo mortalidade a substância é considerada como não tóxica. Caso apareça toxicidade sem mortes, com a dose de 500 mg/kg, a substância pode ser classificada como nociva, por correlação estatística com a DL50. Segundo a comunidade europeia, nessa categoria estão as substâncias que possuem uma DL50 oral para ratos de 200 a 2.000 mg/kg de peso corpóreo. Em caso de morte com 500 mg/kg, repete-se o teste com 50 mg/kg. Se produzir toxicidade sem morte considera-se que a substância é tóxica ($25 \text{ mg/kg} < \text{DL50} < 200 \text{ mg/kg}$). Caso haja mortalidade, repete-se o teste, agora com 5 mg/kg e se houver toxicidade e/ou mortalidade a substância é considerada como muito tóxica ($\text{DL50} < 25 \text{ mg/kg}$) (BARROS; DAVINO, 2003). Esse teste está ilustrado na figura 1.

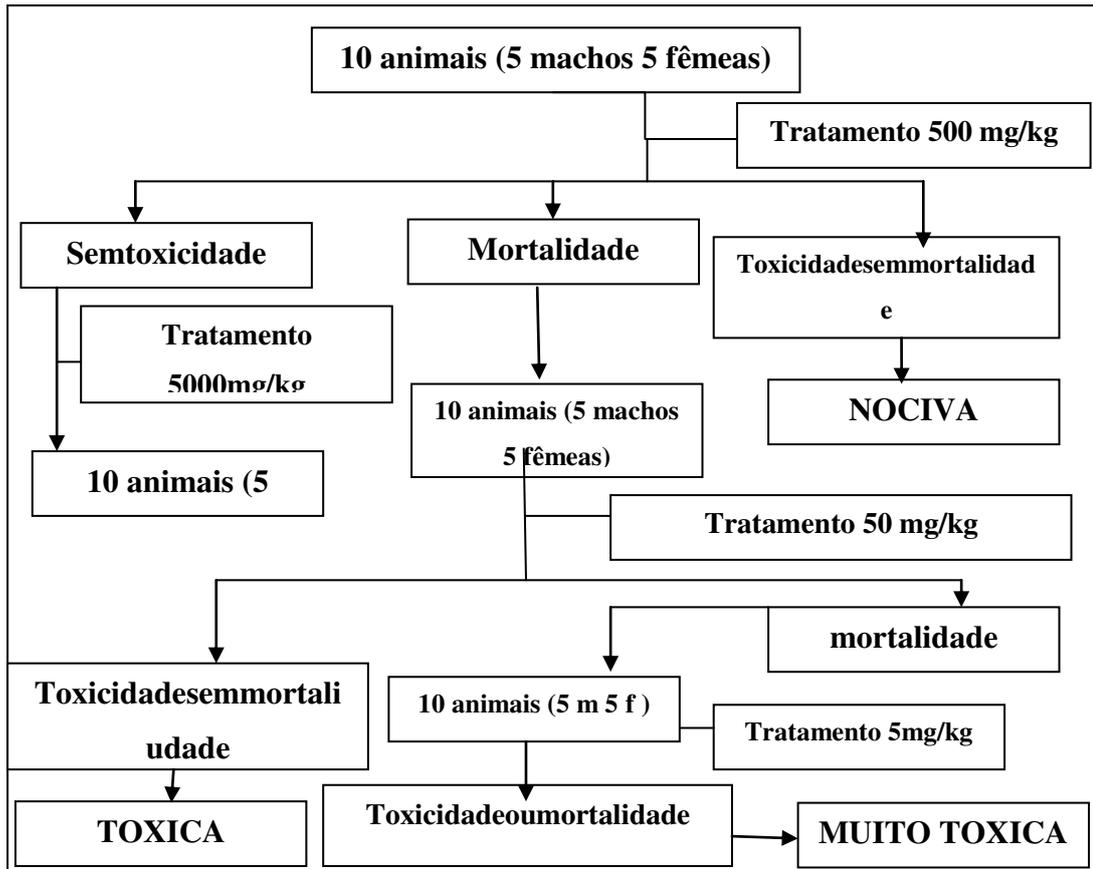


Figura 1: Fluxograma do teste de dose Fixa

Ensaio de Toxicidade Subcrônica segue as mesmas características dos protocolos da avaliação subcrônica, com a diferença de que são realizados em períodos superiores a 15 dias. Outro diferencial é a sua aplicabilidade para detecção de efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, desde que as doses experimentais tenham sido adequadamente selecionadas. Esses ensaios são realizados em um tempo correspondente ao tempo médio de vida da espécie animal.

Em relação aos estudos toxicológicos pré-clínicos de longa duração (toxicidades subcrônica e crônica), a legislação brasileira para fitoterápicos distingue dois tipos de estudos: os de 4 semanas, para produtos a serem usados por, no máximo, 30 dias por ano e os estudos de 12 semanas, para os medicamentos com proposta de uso acima de 30 dias por ano. Estabelece que o produto deva ser testado em pelo menos 2 espécies de mamíferos, sendo uma de roedor (5 animais por dose e sexo) e outra de não-roedor (3 animais por dose e sexo) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Destaque-se ainda, a realização de exames histopatológicos em vísceras como de suma importância por fornecerem suporte aos dados eventualmente encontrados em órgãos e/ou sistemas específicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução da pesquisa

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular, nas dependências do Hospital Veterinário do CSTR – UFCG.

2.2 Obtenção do *Dianthus caryophyllus*

As plantas foram adquiridas com recursos próprios na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) no Entrepósito Terminal de São Paulo - capital. Após separação das flores do caule e folhas, as flores foram postas para secagem em estufa de ventilação forçada a 55° C e em seguida maceradas e acondicionadas em reservatórios de vidro até seu uso.

2.3 Obtenção do extrato bruto seco e determinação de sua concentração

As amostras de flores desidratadas foram trituradas em moinho mecânico e homogeneizadas, obtendo-se assim o extrato seco concentrado.

O extrato bruto puro foi obtido através de uma adaptação do método descrito por Silva (1990).

Uma fração de 400 g do extrato seco concentrado foi colocada em um cartucho de papel de filtro, previamente tarado e costurado, e submetida a uma extração por fervura, durante 3 minutos em 2 litros de água destilada. O extrato obtido foi concentrado por evaporação, a uma temperatura de 45° C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), através de um evaporador rotativo. Em seguida, o extrato bruto concentrado foi levado a uma estufa de ventilação forçada a 55 °C, por 72 horas, até sua completa desidratação, obtendo o extrato bruto desidratado concentrado. O extrato bruto foi macerado manualmente em um almofariz de porcelana com pilão (figura 2) e acondicionado em recipientes previamente esterilizados em autoclave e estocado a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até seu uso.



Figura 2: Extrato Bruto de *D. caryophyllus*(100%) desidratado e macerado em almofariz de porcelana

Para cada extração de 400 g de extrato seco desidratado, através de decoção em 2 litros de água destilada, foram obtidos 7,5 g (\pm 0,3 g) de extrato bruto desidratado concentrado.

2.4 Aquisição dos animais para experimentação

2.4.1. *Mesocricetus auratus*

O hamster dourado, um roedor também conhecido como hamster da síria, é a espécie mais comum da subfamília Cricetidae a ser usada na pesquisa biomédica, sendo chamado, normalmente, de hamster de laboratório. O hamster sírio pertence à ordem Rodentia, família Cricetidae, gênero *Mesocricetus* e espécie *auratus*. É encontrado em estado selvagem no Oriente Médio, muito utilizado em pesquisas e como animal de estimação. Caracteriza-se pelo breve período de gestação (16 dias, o mais curto entre as espécies de laboratório), presença de amplas bolsas faciais e cauda curta. Esses animais possuem peso médio de 90 a 125 g e 95 a 140 g para machos e fêmeas adultas, respectivamente; temperatura corpórea média de 37,4°C, frequência respiratória média de 80 movimentos por minuto e frequência cardíaca que varia de 350 a 410 batimentos por minuto (ARRINGTON, 1972; FLEKNELL, 1992; HARKNESS; WAGNER, 1977).

Foram obtidos, com recursos próprios, 18 animais, sendo 12 fêmeas e 6 machos, em uma loja especializada em alimento vivo para aves e répteis em João Pessoa, PB. Estes animais foram mantidos em cativeiro, em caixas de polipropileno com tampa de grade, recebendo ração comercial para roedores e água fresca *ad libitum*, sendo vermifugados a cada

45 dias com fembendazole (50 mg/kg), sob protocolo de reprodução, até sua posterior utilização no experimento.

2.4.2 *Mus musculus*

Os camundongos conhecidos como da linhagem albino ou swiss são animais heterogênicos obtidos mediante cruzamentos ao acaso, existindo um índice de 99% de heterozigose entre os genes alelos. Ainda, são os animais que fazem parte da maioria das pesquisas laboratoriais.

Foram obtidos, 20 animais, sendo 6 fêmeas e 14 machos, no Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. Estes animais foram mantidos em cativeiro, em caixas de polipropileno com tampa de grade, recebendo ração comercial para roedores e água fresca *ad libidum*, até sua utilização no experimento.

2.5 Testes de toxicidade e patogenicidade

2.5.1 Teste de toxicidade subcrônica em hamster sírios

Foram usados 24 hamsters sírios (12 machos e 12 fêmeas) com aproximadamente 21 dias de idade, clinicamente sadios e em regular estado nutricional, pesando entre 23 à 27 g de peso vivo, divididos em três grupos com 4 machos e 4 fêmeas cada. Os grupos foram denominados: Grupo 1 (C1), grupo controle, Grupo 2 (G2) grupo experimental com administração de 100 mg/dia por animal e Grupo 3 (G3) grupo experimental com administração de 200mg/dia por animal, ambos do extrato seco concentrado.

Todos os animais permaneceram em jejum durante as 12 horas precedentes ao início do experimento e, durante a execução do experimento, cada animal pertencente ao G2 e G3 recebeu diariamente 100 g e 200 g do extrato seco concentrado, respectivamente, e após a ingestão deste, foi oferecido ração comercial para roedores e água *ad libidum*, sendo todos mantidos em caixas de polipropileno separados.

Efetou-se o exame clínico em todos os animais na manhã em que se iniciou o experimento (dia 0) registrando a temperatura retal, a frequência respiratória, a coloração das mucosas oculares e alterações comportamentais, repetindo-se estes exames no dia posterior e a cada 6 dias durante 30 dias do experimento (dias 6, 12, 18, 24 e 30). A frequência cardíaca não foi avaliada devido à impossibilidade de fazê-la sem o auxílio de monitores cardíacos.

O extrato foi oferecido espontaneamente por via oral. Foram oferecidos, em média, de 100 e 200mg por dia, estimando uma media total de 2500e5000 mg/kg de peso vivo por animal. Todos os animais receberam o extrato por um período de quinze dias, sendo observados clinicamente durante a noite, por serem uma espécie de hábito noturno.

Após o período de observação, dois animais de cada grupo (G2 e G3) foram encaminhados ao Setor de Patologia Animal do CSTR – UFCG a fim de serem submetidos à necropsia e a histopatologia de seu sistema urinário.

2.5.2 Testes de toxicidade aguda e obtenção da DI 50 em camundongos

O extrato bruto desidratado de *Dianthuscaryophyllus*(DC) foi dissolvido em água destilada e administrado por via oral a um grupo de 6 (seis) animais (3 machos e 3 fêmeas) (DC1) em jejum por 12 horas, na dose de 5000 mg/kg, num volume de 20 ml/kg. O grupo controle (CTRL1) com 3 machos e 3 fêmeas recebeu o mesmo volume de água destilada, todos em uma só dose.

Durante as primeiras 12 horas, com intervalos de 15, 30 e 60 minutos, e a cada 4 horas, os animais foram avaliados quanto ao aparecimento de sinais tóxicos de caráter geral, através dos seguintes parâmetros: atividade motora, respiração, reflexos corneal, de endireitamento e de retirada (cauda), tônus corporal, quantidade de bolos fecais, presença de cianose, piloereção, contorções, ptose palpebral, tremores, convulsões, ataxia, hipnose, urina vermelha e diarreia.

A quantidade de bolos fecais foi analisada quantitativamente. Os parâmetros cianose, piloereção, contorções, ptose palpebral, tremores, convulsões, ataxia, hipnose e urina vermelha foram avaliados através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 pontos. Os parâmetros atividade motora, respiração, reflexos corneal, de endireitamento e de retirada e tônus corporal foram avaliados através de escalas analógicas bipolares variando de 0 a 8 pontos, sendo 4 o valor representante da normalidade (BRITO, 1995).

Após 24 horas de observação foi contabilizado o número de mortes para cálculo da DL50 (LITCHFIELD e WILCOXON, 1949).

2.5.3 Testes de toxicidade aguda e obtenção da DI 50 em hamsters

O Extrato Bruto desidratado de *Dianthuscaryophyllus*(DC) foi dissolvido em água destilada e administrado, por via oral, a dois grupos de 6 (seis) animais (3 machos e 3 fêmeas) (DC2: *Mesocricetusauratus*jovens e DC3:*Mesocricetusauratus*adultos) em jejum por 12

Tabela 3: Valores médios obtidos através de exame clínico de animais pertencentes ao G3 (5000mg/kg) durante os 30 dias de experimento.

	Tempo (dias)					
	0	6	12	18	24	30
controle	0	6	12	18	24	30
Frequência respiratória/min	98	99	96	96	95	96
Temperatura retal (°C)	37,4	37,4	36,8	36,8	37,2	36,6
Coloração de mucosa	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Comportamento	típico	típico	típico	típico	típico	Típico

Dois animais do G1 e dois animais do G2 foram encaminhados ao setor de patologia animal para realização de necropsia e histopatologia do sistema urinário. Não foram encontradas alterações macroscópicas nem microscópicas (figuras 18 a 22).

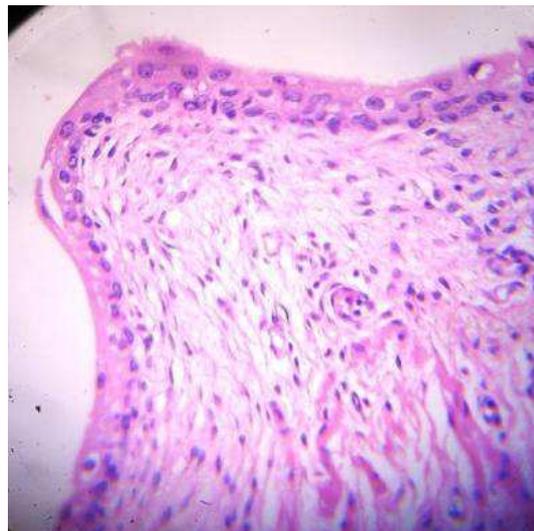


Figura 2: Corte Transversal de Ureter distal de Hamster macho (HE – 40x) sem alterações



Figura 3: Corte Transversal de Ureter proximal de Hamster macho (HE – 10x) sem alterações

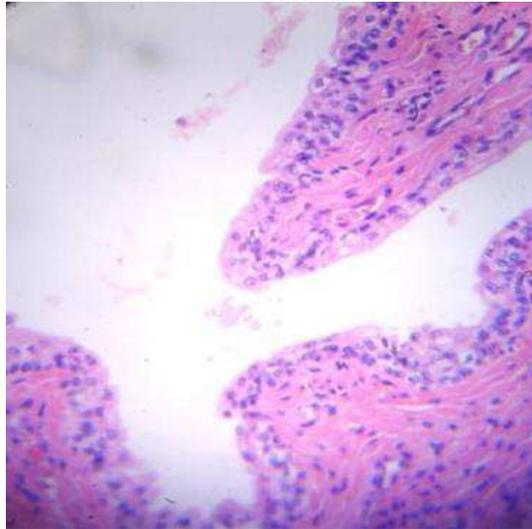


Figura 4: Corte de vesícula urinaria de hamster fêmea (HE – 40x) sem alterações

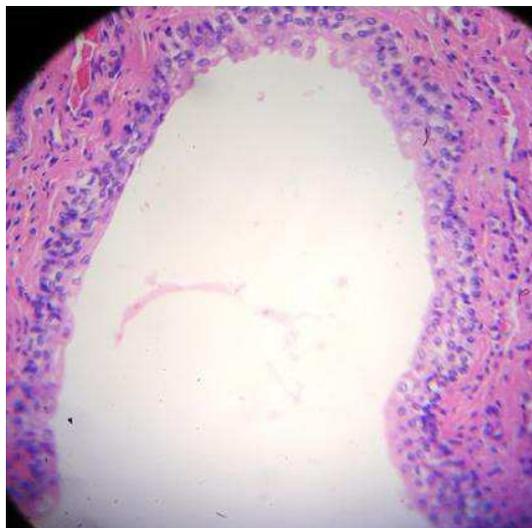


Figura 5: Corte de vesícula urinaria de hamster macho (HE – 40x) sem alterações

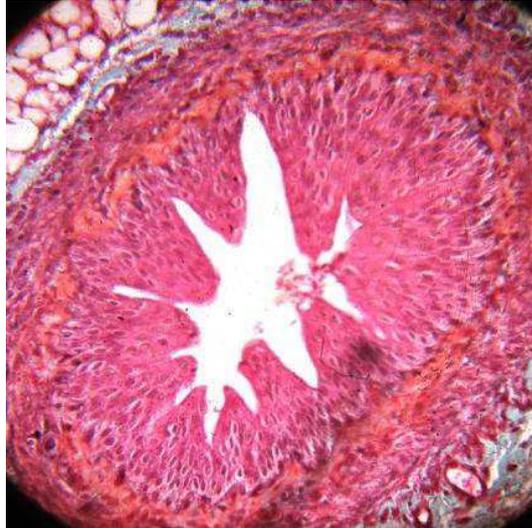


Figura 6: Corte transversal de uretra de hamster macho (HE – 62x) sem alterações

Pode-se concluir que a plantanão tem ação tóxica sobre o sistema urinário e digestório, não houve também alterações significativas nos sistemas respiratório e circulatório, bem como em relação à temperatura corpórea.

Concluiu-se também que a planta tem boa palatabilidade, facilitando assim a ingestão espontânea da mesma, portanto não se enquadra na definição de planta tóxica sob o ponto de vista veterinário (BRASIL, 2004).

3.1.2 Testes de toxicidade aguda e obtenção da DI 50 em camundongose hamsters

O objetivo do presente teste foi avaliar a toxicidade aguda do extrato bruto desidratado de flores de *Dianthuscaryophyllus*, em conformidade com as normas atuais da Anvisa (2004).

Não houve óbitos durante o período de observação de 24 horas em nenhum dos grupos avaliados após a administração do extrato aquoso de flores de *Dianthuscaryophyllus* na dose de 5000 mg/kg, considerada como dose limite para avaliação toxicológica aguda (BARROS; DAVINO, 2003; BRASIL, 2004;). Por esta razão, não houve cálculo de DL50.

Nas primeiras 12 horas pós-administração, nenhum animal apresentou cianose, piloereção, contorções, ptose palpebral, tremores, convulsões, ataxia, hipnose, urina vermelha ou diarreia. Também não existiram diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados para os parâmetros de atividade motora, respiração, reflexos corneal, de endireitamento e de retirada, tônus corporal e quantidade de bolos fecais (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Sumário de dados obtidos durante as 12 horas de observação pós-administração do extrato aquoso de flores de *Dianthus caryophyllus*

Parâmetro Grupos		Tempo de Observação					
		15 min	30 min	1 hora	4 horas	8 horas	12 horas
Bolos	CTRL1	6	2	0	1	0	0
Fecais	DC1	3	0	0	5	8	4
Atividade motora	CTRL1	4	4 (3,75-4)	4	4	4	4
	DC1	4 (3,75-4)	4 (3,75- 4)	4	4	4	4
Respiração	CTRL1	4	4	4	4	4	4
	DC1	4	4	4 (3,75-4)	4	4	4
Reflexo Corneal	CTRL1	4	4	4	4	4	4
	DC1	4	4 (3,5-4)	4	4	4	4
Reflexo de Endireitamento	CTRL1	4 (3,75- 4)	4 (3,75- 4)	4 (3,75- 4)	4	4	4
	DC1	3,8 (3,5-4)	4 (3,75- 4)	4	4	4 (3,75- 4)	4 (3,75- 4)
Tônus Corporal	CTRL1	4	4	4	4	4	4
	DC1	4	4	4	4	4	4
Reflexo de Retirada	CTRL1	4	4	4	4	4	4
	DC1	4	3,8 (3,5-4)	4	4	4	4

Tabela 5: Sumário de dados obtidos durante as 12 horas de observação pós-administração do extrato aquoso de flores de *Dianthus caryophyllus*

Parâmetro	Grupos	Tempo de Observação					
		15 min	30 min	1 hora	4 horas	8 horas	12 horas
Bolos Fecais	CTRL2	28	12	4	0	0	0
	DC2	14	8	5	16	10	32
	DC3	25	10	3	12	114	60
Atividade motora	CTRL2	4	4	4	4	4	4
	DC2	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4	4	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)
	DC3	4	4 (3,75-4)	4	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)
Respiração	CTRL2	4	4	4	4	4	4
	DC2	4	4	4	4	4	4
	DC3	4	4	4	3,8 (3 – 4)	4	4
Reflexo Corneal	CTRL2	4	4	4	4	4	4
	DC2	4	4	4	4	4	4
	DC3	4	4	4	4	4	4
Tônus Corporal	CTRL2	4	4	4	4	4	4 (3,75-4)
	DC2	4	4	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)
	DC3	4	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,5-4)	4 (3,5-4)
Reflexo de Retirada	CTRL2	4	4	4	4	4	4 (3,75-4)
	DC2	4	4	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)
	DC3	4 (3,5-4)	4 (3,5-4)	4 (3,5-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)	4 (3,75-4)

Os resultados obtidos, em ambas as espécies, indicam que o extrato aquoso de flores de *Dianthus caryophyllus*, administrado agudamente, é atóxico por via oral em roedores, uma vez que não foi observada mortalidade ou sintomas adversos após a administração da dose limite de 5000 mg/kg. Este resultado já era, de certa forma, esperado, já que em estudos prévios para determinação da DL50 realizado em hamsters também não foram observadas mortes em doses superiores (TREVISAN et al, 2009).

4 CONCLUSÃO

O extrato de flores de *Dianthus caryophyllus* é um excelente candidato para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico, não apresentando tóxico, de uso seguro no tratamento de animais domésticos, não apresentando toxicidade aguda ou subcrônica, até a dose de 5000 mg/kg, nos ensaios realizados. Fazem-se necessários estudos sobre seu mecanismo de ação, possibilidade de outras aplicações no sistema urinário e descrição do seu princípio ativo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n° 116/96, de 08 de Agosto de 1996. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterapêuticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12, ago. 1996.

ARRINGTON; L. R., Introductory Laboratory Animal Science. The breeding, care and management of experimental animals. Illinois, **The Interstate**. 203p., 1972.

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.

BRASIL, 2004. Resolução nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRITO; A.S. **Manual dos Ensaio Toxicológicos in vivo**. Editora da UNICAMP, 122p. 1995.

FLECKNELL, P. A. **Laboratory animal anaesthesia**, 3ª ed. San Diego, Academic Press.156p, 1992.

HARKNESS, J. E. WAGNER, J. E., The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. Philadelphia, **Lea &Febiger**.152p., 1977.

LITCHFIELD J. T. WILCOXON, F. Simple method of fitting dose-effect curve. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.95, p. 99-113, 1949.

TREVISAN, L. F. A. ; Melo, M.A. ; Pereira, A. V. ; Lima, E. Q. ; Rodrigues, O. G. ; Pereira, M. S. V. ; Albuquerque. A.C.L. . Tratamento fitoterápico experimental em ovino acometido por urolitíase obstrutiva. **Agropecuária Técnica** (UFPB), v. 30, p. 96-101, 2009.

-

CAPÍTULO 3

Extrato de *D. Caryophyllus* tem Atividade Protetora em Modelo de Urolitíase induzida Em Ratos

[Extract of *D. Caryophyllus* has protective action in a rat urolithiasis model]

TREVISAN, Luiz Fernando Annunziata^{1*}; RODRIGUES, Onaldo Guedes¹;
OLIVEIRA, Edgar Nogueira de¹

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, CSTR, UFCG, Patos, PB

*Endereço para correspondência: UFCG / CSTR / Campus de Patos - PB Cx.P.: 64 - CEP: 58700-970, fone: +558396208280, fax: 11 41697013, e-mail: luiz.itanopan@uol.com.br

RESUMO

Estudou-se a atividade do extrato de *Dianthus caryophyllus* (EDC), em um modelo de indução à urolitíase por oxalato de cálcio, em 30 ratos que receberam água potável com 0,75% de etilenoglicol (EG) e 2% de cloreto de amônia (AC). Além do tratamento EG/AC três grupos de ratos (n = 6 cada) também receberam soluções contendo EDC, nas doses de 4, 2 e 1 mg/kg. O grupo-controle-positivo (n = 6) foi tratado com EG/AC, mas não com EDC, enquanto o grupo-controle-negativo (n = 6) recebeu água potável normal. Depois de 10 dias, foram colhidas amostras de soro para análises bioquímicas. O rim esquerdo foi removido e avaliado para concentração de cálcio, e o rim direito foi seccionado para exame histológico. No grupo-controle-positivo observou-se a maior quantidade de cálcio nos rins, demonstrando que esse aumento foi inibido pela administração do EDC. Uréia e creatinina dos grupos que receberam 4 e 2 mg/kg de EDC se mantiveram normais. O extrato de *D. caryophyllus* apresentou atividade protetora na prevenção e combate a urolitíase.

Palavras-chave: urolitíase, modelo de indução, extrato vegetal, oxalato de cálcio

ABSTRACT

Was studied the activity of the extract of *Dianthus caryophyllus* (EDC), in a urolithiasis induction model by calcium oxalate, in thirty rats that received potable water with 0.75% ethylene glycol (EG) and 2% of ammonia chloride (AC). In addition to treatment EG/AC, three groups of rats (n = 6 each) were also given solutions containing EDC, in dosage of 4, 2 and 1 mg/kg. The positive control group (n = 6) was treated with EG/AC, but not with EDC, while the negative control group (n = 6) received normal potable water. After 10 days, were harvested serum samples for biochemical analyses. The left kidney was removed and assessed for calcium concentration and the right kidney was sectioned for histological analysis. In positive control group observed the largest amount of calcium in the kidneys, in comparison to the others, demonstrating that increase was inhibited by the administration of EDC. Urea and creatinine of groups that have received 4 and 2 mg/kg of EDC remained normal. The extract of *D. caryophyllus* presented protective activity in the urolithiasis prevention and treatment.

Keywords: vegetable extract, urolithiasis, induction model, calcium oxalate

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais, ou fitoterapia, recentemente vem ganhando popularidade, no entanto, os mecanismos exatos dos efeitos desses produtos ainda estão longe de ser claramente estabelecido, sendo tal conhecimento necessário para aplicar com sucesso terapias alternativas com finalidade de prevenir a formação de urólitos (Touhamiet *al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (World..., 2002), mais de 90% das classes terapêuticas atualmente utilizadas derivam de produtos naturais. Além disso, Newman e Cragg (2007) demonstraram que a área dos produtos naturais forneceu, direta ou indiretamente, aproximadamente 50% de novas micromoléculas lançadas entre 2000 e 2006.

A litíase urinária geralmente é o resultado de um desequilíbrio entre os inibidores e promotores nos rins e muitas vezes os cálculos renais são compostos de oxalato de cálcio (Daudon e Jungers, 2001) Existem vários estudos sobre o efeito de extratos vegetais na cristalização de sais de cálcio, mas geralmente, as conclusões desses estudos não são consistentes (Touhamiet *al.*, 2007).

A recorrência de urolitíase representa um sério problema, devido ao fato de pacientes que já formaram um cálculo serem mais propensos a recidivas, tornando assim, sua prevenção altamente recomendada (Atmaniet *al.*, 2003). Atualmente, cirurgia renal aberta para nefrolitíase é incomum e raramente usada desde a introdução da litotripsia extracorpórea, que revolucionou a prática urológica e quase se tornou o procedimento normal para eliminação de pedras nos rins. Entretanto a mais de vinte e cinco anos pesquisas já sugeriam que tais tratamentos provocam hemólise significativa e miólise desenvolvida devido a exposição a onda de choque, concluindo portanto que o rim é danificado de alguma forma (Kishimoto *et al.*, 1986). Tais efeitos colaterais devem ser levados em conta na determinação da dose e frequência de um tratamento, tornando terapias alternativas, uma alternativa segura para o combate e prevenção a urolitíase.

Em estudos anteriores com a utilização do extrato de *Dianthuscaryophyllus* pesquisadores obtiveram sucesso na expulsão de cálculos no tratamento de ovinos acometidos por urolitíase obstrutiva (Trevisan *et al.*, 2009). Assim o presente trabalho buscou, por meio de um modelo

de urolitíase induzida em ratos, determinar a eficácia extrato aquoso de *D. caryophyllus* na prevenção e combate a essa enfermidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 30 ratos, *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos com 220 ± 12 g. Os animais foram aclimatados durante três dias em gaiolas antes do início dos experimentos. Os ratos tinham acesso *ad libitum* ração industrial e água potável sendo mantidos sob um ciclo de claro-escuro de 12 h e temperatura controlada a $22 \pm 3^\circ\text{C}$.

Para o protocolo de indução a urolitíase os ratos foram divididos em cinco grupos, compostos por seis animais por grupo. Cada grupo passou por um protocolo de tratamento diferente por dez dias, os animais do grupo 1, controle-negativo, tiveram acesso *ad libitum* à alimentação regular e água potável, sendo administrados $8\mu\text{L}$ por 1g de peso corporal, de água destilada, por sonda gástrica; os grupos 2, 3, 4 e 5 tiveram acesso *ad libitum* à alimentação regular e à água potável contendo 0,75% de etilenoglicol e 2% de cloreto de amônia (EG/AC) para promover a hiperocalcemia e a deposição de oxalato de cálcio nos rins. E, ainda, nos grupos 2, 3 e 4 também foi administrado extrato aquoso de *D. caryophyllus* (EDC), obtido por decocção e concentrado em rotaevaporador, nas respectivas dosagens de 4, 2 e 1mg/kg ($\mu\text{g/g}$), diluídos em água destilada, até perfazer o volume total de $8\mu\text{L}$ por grama de massa corporal, por sonda gástrica. Assim como no grupo 1, nos animais do grupo 5, controle-positivo, foram administrados $8\mu\text{L}$ de água destilada por grama de massa corporal, por sonda gástrica. Todos os animais foram pesados diariamente.

Para se avaliar a atividade antilítiasca, após 10 dias de experimentação, foi realizada a eutanásia dos animais por luxação cervical, e imediatamente, realizou-se a coleta de seu sangue por punção cardíaca, sendo este centrifugado a 10.000 RPM durante 10 minutos, sendo os soros recolhidos e analisados para cálcio, fósforo, ureia e creatinina usando sistema de leitura automatizado. Abriu-se o abdômen removendo ambos os rins. Os rins esquerdos foram desidratado em estufa a 100°C durante 24 horas, após o qual foram pesados e, em seguida, macerados em recipiente contendo 7mL ácido nítrico 0,5 N. A mistura foi então aquecida até que o líquido se tornou transparente, seguindo protocolo descrito por Touhamiet al. (2007). Após calibração usando uma solução padrão de cálcio, o teor de cálcio da mistura

foi determinado por eletrodo Microlyte Mg, Konelab®. A quantidade de cálcio foi expressa em $\mu\text{g/g}$ de rins seco. O rim direito foi conservado no líquido de Bouin (Cuzzolin *et al.*, 1995; Nolte *et al.*, 1995), embebido em parafina, cortado em intervalos de 3-4 μm e as fatias coradas com eosina e hematoxilina e observada em microscopia ótica (Cuzzolin *et al.*, 1995).

A análise estatística foi apresentada como média \pm desvio-padrão, e análise de variância unidirecional foi usada para determinar as diferenças entre os grupos. Para avaliar a significância entre as diferenças das amostras utilizou-se o teste Tukey. O software Assistat versão 7.6 desenvolvido pelo DEAG – CTRN - UFCG foi utilizado para cálculos estatísticos, e $p < 0,05$ foi considerado para indicar alguma diferença significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de soro mostrou que a concentração de ureia não diferiu entre os grupos 1, 2, 3 e 4, e estes grupos apresentaram valores mais baixos relação ao grupo 5, controle-positivo (Fig. 1). Os valores de creatinina diferiram entre os grupos 1, 2 e 3, houve diferença significativa entre estes e os grupos 4 (EG/AC – EDC 1 $\mu\text{g/g}$) e 5, os grupos 4 e 5 diferiram entre si (Fig. 1). Estes dados indicam danos renais marcados no grupo 5, que foram amenizados pela administração do EDC nas dosagens de 2 e 4 $\mu\text{g/g}$.

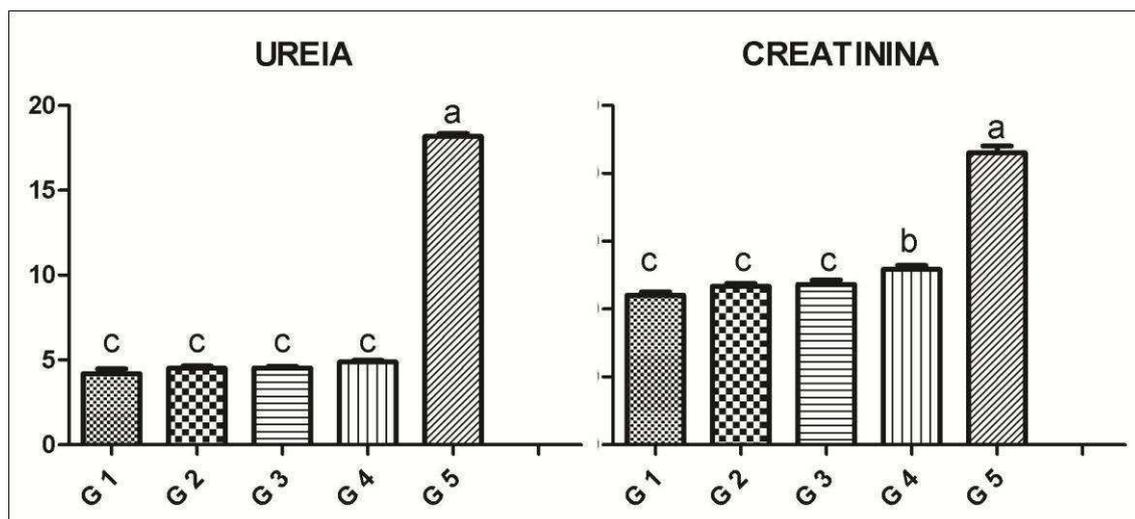


Figura 1. Dados bioquímicos de ureia (mmol/l) e creatinina ($\mu\text{mol/l}$) no soro, Valores representados pela média \pm DP para seis animais de cada grupo.

Os ratos são os animais mais utilizados nos modelos de deposição de oxalato de cálcio (CaOx) nos rins (Atmaniet *al.*, 2004), apesar de sua utilização como modelo experimental de litíase urinária ser bastante limitada, uma vez que a deposição de oxalato de cálcio não ocorre naturalmente nestes animais.

Outros estudos que utilizam ratos em modelo experimental de litíase empregam modificações genéticas, tais como ratos geneticamente hipercalcúricos (Bushinskyet *al.*, 1999), ou se utilizando de protocolos semelhantes ao apresentado neste estudo. Em estudos anteriores com o uso do etilenoglicol e cloreto de amônia por 10 dias (Khan e Glenton, 1995; Fanet *al.*, 1999; Touhamiet *al.*, 2007) foi determinado que os ratos de controlo positivo desenvolveram depósitos de CaOx, corroborando com os resultados aqui descritos.

De acordo com Wiessneret *al.* (2001), lesões celulares no epitélio tubular renal parecem constituir um processo importante na formação de cálculos renais, em seu trabalho é sugerido que as lesões aumentam a afinidade dos cristais pelo epitélio tubular, favorecendo a adesão dos mesmos às células epiteliais, estes cristais ancorados, crescem à medida que novas partículas cristalinas agregam-se a eles, com conseqüente formação de cálculos.

Os dados mostraram também que os níveis de cálcio e fósforo nos ratos dos grupos EG/AC tratados com EDC (Grupos 2, 3 e 4) foram significativamente inferiores em comparação aos grupos 1 e 5 (controlo-negativo e controlo-positivo) (Fig. 2), demonstrando a interferência do extrato na eliminação destes solutos.

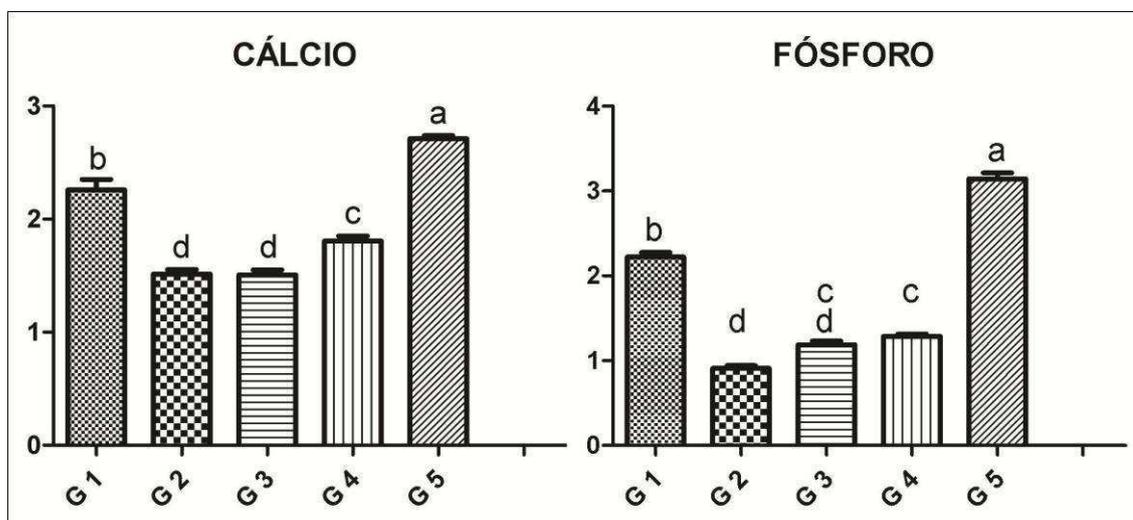


Figura 2. Dados bioquímicos de ureia e creatinina no soro, expressos em mmol/l. Valores representados pela média \pm DP para seis animais de cada grupo.

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Touhamiet *al.* (2003) que utilizaram suco de limão puro, na dose de 6 μ L/g, para estudar a prevenção da formação de cálculos em ratos induzidos à urolitíase, e obtiveram valores significativamente mais baixos para as concentrações séricas de cálcio e fósforo em comparação à do grupo-controle-positivo.

Na avaliação do peso corporal, os ratos dos grupos EDC (grupos 2, 3, 4) pesaram menos do que os do grupo controle-negativo (grupo 1) enquanto os animais do grupo 2 (EDC 4 μ L/g) pesaram mais que os do grupo 5, após 10 dias do experimento (Fig. 3).

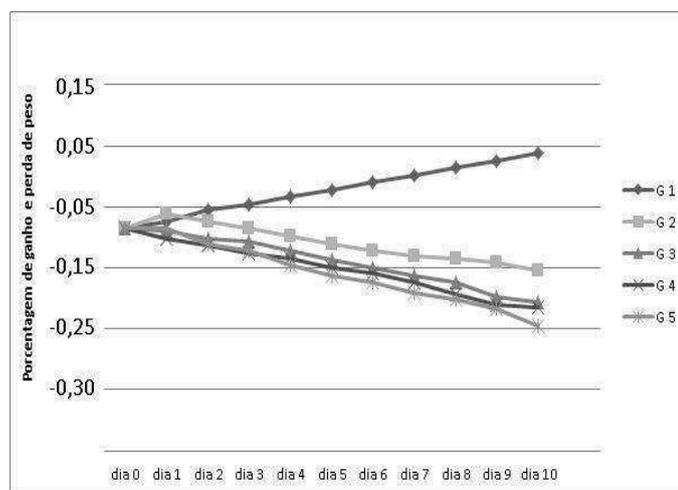


Figura 3. Alterações, em porcentagem, no peso corporal em vários grupos de ratos durante os 10 dias do experimento.

O rim esquerdo foi avaliado para concentração de cálcio. No tratamento de EG/AC sozinho (grupo 5) ocorreu aumento significativo da concentração de cálcio dos rins em comparação aos demais grupos (Fig. 4).

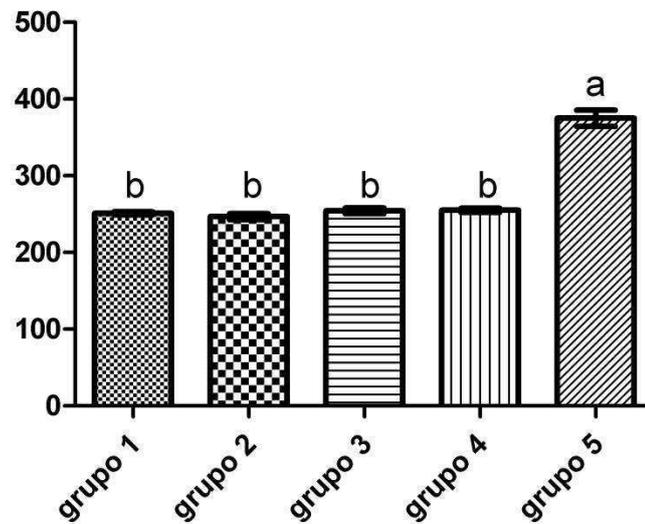


Figura 4. Quantidade de cálcio no rim esquerdo. Valores representados em média \pm desvio padrão ($\mu\text{g/g}$) para seis animais de cada grupo.

Esse resultado é semelhante ao descrito por Ito *et al.* (2005) ao pesquisar os efeitos antioxidantes do chá verde em urolitíases, concluindo que o uso deste diminuiu a formação de cálculos de oxalato de cálcio em tecidos renais de ratos. O mecanismo de ação envolvido parece estar relacionado com a prevenção de lesões renais, o que impediria a adesão de cristais. Segundo Tsujihata *et al.* (2008) diferentes substâncias são capazes de prevenir lesões no epitélio tubular renal, inibindo, desta forma, a formação de cálculos renais.

O exame das seções de parafina do rim direito demonstrou que o grupo 5 novamente apresentou quantidades consideráveis de deposição de CaOx nas três principais áreas dos rins, além de cristais intratubulares observados nos córtex renais. Nas lâminas dos demais grupos não foram encontrados achados histopatológicos significativos.

CONCLUSÃO

No ensaio *in vivo*, a média da massa total de cálcio nos rins foi significativamente menor nos grupos tratados com o extrato de *Dianthus caryophyllus* em comparação ao grupo controle-positivo, não diferindo da média obtida no grupo controle-negativo. Ainda a média do número de cálculos formados foi consideravelmente maior nos animais grupo controle-positivo do que nos animais que foram tratados com o extrato, não se observando nestes da formação de inclusões.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATMANI, F; SLIMANI, Y; MIMOUNI, M; AZIZ, M; HACHT, B; ZIYYAT, A. Effect of aqueous extract from *Herniariahirsuta* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *Journal of Ethnopharmacology*.vol. 95, p. 87-93, 2004.
- ATMANI, F; SLIMANI, Y; MIMOUNI, M; HACHT, B. Prophylaxis of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsute* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *British Journal of Urology International*.vol. 92, n. 1, p.137–140, 2003.
- BUSHINSKY, D. A; NEUMANN, K. J; ASPLIN, J; KRIEGER, N. S. Alendronate decreases urine calcium and supersaturation in genetic hypercalciuric rats. *Kidney International*, vol. 55(1), p. 234-243, 1999.
- CUZZOLIN, L; CONFORTI, A; ADAMI, A; LUSSIGNOLI, S; MENESTRINA, F; DEL SOLDATO,P; BENONI. G. Anti-inflammatory potency and gastrointestinal toxicity of a new compound Nitronaproxen. *Pharmacological Research*, vol. 31, p.61-65, 1995.
- DAUDON, M; JUNGERS, P. Epidémiologie de la lithiaseurinaire.*Eurobiologiste*.vol. 253, p. 5-15, 2001.
- FAN, J; GLASS, M.A; CHANDHOKE, P.S. Impact of ammonium chloride administration on a rat ethylene glycol urolithiasis model.*Scanning Microscopy International*, vol. 13, p. 299-306. 1999.
- ITO, Y; YASUI, T; OKADA, A; TOZAWA, K; HAYASHI, Y; KOHRI, K. Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. *Journal of Urology*, vol. 173, p. 271-275, 2005.
- KHAN, S.R; GLENTON, P. Deposition of calcium phosphate and calcium oxalate crystals in the kidneys.*Journal of Urology*, vol. 153, p. 811-817, 1995.
- KISHIMOTO, T; YAMAMOTO, K; SUGIMOTO, T; YOSHIHARA, H; MAEKAWA, M. Side effects of extracorporeal shock-wave exposure in patients treated by extracorporeal shock-wave lithotripsy for upper urinary tract stone. *European Urology*.vol. 12, n. 5, p. 308-313, 1986.
- NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.*Journal of Natural Products*, vol. 70, p. 461-477, 2007.
- NOLTE, T; HARLEMAN, J.H; JAHN, W. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats.*Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 47, p. 267-286, 1995.
- SACCO, S. R; LOPES, R. S. Urolitíase: estudo comparativo em bovinos Guzerá oriundos de propriedades com e sem o problema. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. vol. 31, n.3, p. 206-212, 2011

TOUHAMI, M; LAROUBI, A; ELHABAZI, K; LOUBNA, F; ZRARA, I; ELJAHIRI, Y; OUSSAMA, A; GRASES, F; CHAIT, A. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. BMC Urology. vol. 7, n. 18, 2007.

TREVISAN, L. F. A; MELO, M.A; PEREIRA, A. V; LIMA, E. Q; RODRIGUES, O. G; PEREIRA, M. S. V; ALBUQUERQUE. A.C.L. Tratamento fitoterápico experimental em ovino acometido por urolitíase obstrutiva. Agropecuária Técnica (UFPB), vol. 30, p. 96-101, 2009.

TSUJIHATA, M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. International Journal of Urology, vol. 15, p. 115-120, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional and Alternative Medicine. Geneva: World Health Organization, 2002. 271 p.

WIESSNER, J. H; HASEGAWA, A. T; HUNG, L. Y; MANDEL, G. S; MANDEL, N. S. Mechanisms of calcium oxalate attachment to injured renal collecting duct cells. Kidney International, vol. 59, p. 637-644, 2001.