

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

FABIANA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO GASTROTÓXICA E TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DA ALGA
*LITHOTHAMNION CALCAREUM***

**BELO HORIZONTE - MG
2009**

FABIANA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO GASTROTÓXICA E TOXICOLÓGICA PRÉ-
CLÍNICA DA ALGA
LITHOTHAMNION CALCAREUM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati

Belo Horizonte
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação gastrotóxica e toxicológica pré-clínica da alga *Lithothamnium calcareum*."

Fabiana de Almeida

Dissertação aprovada em 08/07/2009 pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros:


Prof. Dra. Marinez de Oliveira Sousa
Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG


Prof. Dra. Alessandra Giani Pinto Coelho
Departamento de Botânica do ICB da UFMG


Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati (Orientador)
Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais ao Prof. Carlos Tagliati, pela orientação.

Agradeço ao Leandro Schiavo, companheiro de laboratório, o melhor de todos, pelo excelente trabalho, sempre presente nas horas mais difíceis, “otimizando” o processo.

Agradeço à Andréa pela disponibilidade e ajuda a todo momento e ao resto dos amigos do laboratório: Marcus, Carol, Gláucia, Rogério e Imaculada que sempre estiveram presentes. À Flávia Dayrell pelas conversas e conselhos. À Elizângela e Etna pelo convívio e apoio.

Agradeço aos amigos Isabela e Daniel pelos constantes conselhos e incentivos. Ao amigo Leonardo por se mostrar sempre pronto em ajudar e à amiga Érika pela paciência. Ao Celso por todo auxílio desde o início.

Às amigas, Tamara, Claudinha e Raquel, por tornarem a jornada mais agradável.

Agradeço à Kátia por ensinar a coleta de sangue.

Agradeço à Prof^a. Fabíola pelas análises bioquímicas e hematológicas. À Renata pela boa vontade.

Agradeço à Prof^a. Ângela e ao Prof. Miguel pela ajuda nas análises estatísticas. Ao Danilo pela simpatia e auxílio nas interpretações dos dados.

Agradeço à veterinária Adelaide pela amizade e ensinamentos sobre como lidar com animais. Ao Batista pela dedicação.

À Prof^a. Edna por disponibilizar a centrífuga.

Ao Prof. Geovanne pelas análises histopatológicas.

Ao Prof. Mauro pelo projeto e a toda equipe do ICB.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À minha mãe Maria Lúcia e minha irmã Flávia pelos cuidados.

Ao Joubert pelo amor, apoio e compreensão.

E por último, porém mais importante: agradeço a Deus acima de tudo por permitir e proporcionar a realização desse trabalho e por ter colocado todas essas pessoas em meu caminho.

“É melhor tentar, ao invés de sentar-se e nada fazer; é melhor falhar, mas não deixar a vida passar; eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder; prefiro ser feliz, embora louco, do que viver infeliz em são conformismo.” (Martin Luther King)

RESUMO

Lithothamnion calcareum é uma alga vermelha que pertence à família das coralináceas. Essas algas têm como principal característica a precipitação de carbonato de cálcio e magnésio em suas paredes celulares, sob a forma de cristais de calcita. Além desses dois principais componentes, as algas calcárias são compostas por mais de 20 oligoelementos. *L. calcareum* é comercializada no Brasil e no exterior como suplemento nutricional de cálcio e outros minerais com o nome Vitalidade + 50[®] pela empresa Phoster Algamar. Devido ao potencial de utilização dessa alga na terapia na inflamação, foram realizados estudos de gastrotoxicidade, utilizando-se o produto acabado baseado em *L. calcareum* (nas doses de 30, 120 e 480 mg/kg), uma vez que um dos maiores efeitos colaterais que acometem usuários de anti-inflamatórios são os distúrbios gastrintestinais. Somado a isso, estudos com objetivo de se avaliar a toxicidade pré-clínica desse produto também foram conduzidos, visto que é uma exigência das agências regulatórias de todo o mundo. Foi realizado o teste de toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg, onde não foram observados sinais clínicos de toxicidade. O teste de toxicidade sub-crônica (90 dias) foi realizado nas doses de 1000 e 2000 mg/kg em ratos. Para esse modelo foi realizado ainda estudo com grupo satélite para verificação de reversibilidade de possíveis danos ocorridos. A alga *L. calcareum*, apesar de não ter exercido grande papel na proteção da mucosa gástrica em ratos, também não causou aumento da irritação gástrica, fato que ocorre com a utilização de anti-inflamatórios não esteroides. Quanto aos estudos de toxicidade de *L. calcareum* foi mostrado que essa alga pode causar algumas alterações nos parâmetros bioquímicos no teste de toxicidade sub-crônica. Houve redução sérica dos níveis de albumina e proteínas totais e cálcio e aumento da creatinina, sugerindo assim possível dano renal associado ou não a dano hepático, sendo que não houve reversibilidade para a maioria desses parâmetros. Entretanto, a maior parte das alterações foram observadas na dose de 2000 mg/kg que é uma dose excessivamente alta em relação à faixa de dose que está sendo estudada (10 a 100 mg/kg) para estudos anti-inflamatórios. Esses dados confirmam a segurança do produto, devendo, porém, o referido estudo ser continuado (ensaio crônico) para verificação da ocorrência de insuficiência renal ou hepatopatia e para possível elucidação dos mecanismos de toxicidade pré-clínica.

Palavras-chave: *Lithothamnion calcareum*, alga marinha, gastrotoxicidade, toxicidade pré-clínica, ratos.

ABSTRACT

Lithothamnion calcareum is a red alga that belongs to the family of coralinaceas. This family has as their main feature the precipitation of calcium carbonate and magnesium in their cell walls in the form of calcite crystals. Besides these two main compounds, the calcareous algae are composed of more than 20 oligoelements. *L. calcareum* is marketed in Brazil and abroad as a nutritional calcium and other minerals supplement under the brand name Vitalidade + 50[®] by the company Phoster Algamar. Because of the potential use of algae in the therapy of inflammation gastrotoxicity studies, were performed using the commercial product based on *L. calcareum* in doses of 30, 120 and 480 mg/kg, since the major side effects of the current anti-inflammatory drugs are gastrointestinal disorders. In addition, studies aimed to evaluate the pre-clinical toxicity of this product were also performed, since they are required from the regulatory agencies around the world. The acute toxicity test was performed at the dose of 2000 mg/kg, with no clinical sign of toxicity. The subchronic toxicity test (90 days) was performed at the doses of 1000 and 2000 mg/kg. A study with a satellite group was also carried out to evaluate whether it would occur reversibility of the potential toxic effect. Although it did not exercise a role in gastroprotection in rats, did not cause either an increase in gastric irritation, which occurs with the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Our studies have also shown that *L. calcareum* can cause changes on biochemical patterns in the subchronic toxicity test. Serum levels of albumin, total proteins and calcium were decreased, whereas serum levels of creatinine increased, suggesting kidney damage associated or not with liver damage, with no reversibility observed for most of these parameters. However, most of the biochemical changes mentioned above occurred at the dose of 2000 mg/kg, which is very high when compared to those (10 to 100 mg/kg) under study for anti-inflammatory action, indicating the safety of the product in the therapeutical doses. We believe that further studies should be done (chronic test) in order to verify the occurrence of renal failure and/or liver disease and to elucidate possible mechanisms of pre-clinical toxicity.

Keywords: *Lithothamnion calcareum*, marine algae, gastrotoxicity, pre-clinical toxicity, rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - A alga marinha <i>Lithothamnion calcareum</i>	14
FIGURA 2 - Fluxograma de classificação de substâncias a partir do estudo toxicológico agudo iniciando-se a partir da dose de 2000 mg/kg	25
FIGURA 3 - Medidas de lesões gástricas (nível 1), induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%).....	39
FIGURA 4 - Medidas de lesões gástricas (nível 2), induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%)	40
FIGURA 5 - Medidas de lesões gástricas (nível 3), induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%).....	40
FIGURA 6 - Medidas de lesões gástricas (totais), induzidas por etanol absoluto, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%). As doses são expressas em mg/kg	41
FIGURA 7 - pH mensurado no conteúdo gástrico, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg), e controle (Tween 80 a 5%) e posterior administração <i>p.o.</i> de etanol absoluto	41
FIGURA 8 - Volume do conteúdo gástrico mensurado, após administração <i>p.o.</i> de suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500	

mg/kg), e controle (Tween 80 a 5%) e posterior administração <i>p.o.</i> de etanol absoluto.....	42
FIGURA 9 - Avaliação da massa corporal de ratos Wistar (fêmeas) tratados com dose única de <i>Lithothamnion calcareum</i> 2000 mg/kg e observação por 14 dias	43
FIGURA 10 - Avaliação do consumo de ração por ratos Wistar (fêmeas) durante o teste de toxicidade aguda.....	43
FIGURA 11 - Avaliação do consumo de água por ratos Wistar (fêmeas) durante o teste de toxicidade aguda.	44
FIGURA 12 - Avaliação da massa corporal de ratos Wistar durante 90 dias (120 dias - grupo satélite) no teste de toxicidade sub-crônica	48
FIGURA 13 - Avaliação do consumo de ração por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias - grupo satélite) no teste de toxicidade sub-crônica.....	48
FIGURA - 14 - Avaliação do consumo de água por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias - grupo satélite) no teste de toxicidade sub-crônica.....	49

LISTA DE TABELAS

1 - Critérios para classificação de toxicidade adotados pela Comunidade Européia	22
2 - Efeitos da suspensão de <i>Lithothamnion calcareum</i> em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO ₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg), e controle (Tween 80 a 5%) na intensidade de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto	39
3 - Avaliação da massa dos órgãos (em gramas) de ratos Wistar (fêmeas) após a administração em dose única de <i>Lithothamnion calcareum</i> 2000 mg/kg e observação por 14 dias.....	45
4 - Efeito na massa dos órgãos (em gramas) após a administração <i>per os</i> de <i>Lithothamnion calcareum</i> durante 90 dias em ratos Wistar.....	50
5 - Efeito nos parâmetros hematológicos após a administração oral de <i>Lithothamnion calcareum</i> durante 90 dias em ratos Wistar	51
6 - Efeito nos parâmetros hematológicos após a administração oral de <i>Lithothamnion calcareum</i> durante 90 dias em ratos Wistar	52
7 - Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração oral de <i>Lithothamnion calcareum</i> durante 90 dias em ratos Wistar	53
8 - Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração oral de <i>Lithothamnion calcareum</i> durante 90 dias em ratos Wistar	54
9 - Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração oral de <i>Lithothamnion calcareum</i> durante 90 dias em ratos Wistar	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Irritação gástrica	15
1.2	Segurança pré-clínica	18
1.3	Aspectos toxicológicos	20
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Produto	27
3.2	Preparo das suspensões	27
3.3	Animais	28
3.4	Avaliação da irritação gástrica	28
3.4.1	Animais	28
3.4.2	Tratamento	28
3.4.3	Modelo farmacológico	29
3.4.4	Avaliação das lesões gástricas	29
3.4.5	Volume e pH gástricos	30
3.5	Avaliação da toxicidade	30
3.5.1	Estudo toxicológico agudo – Dose Letal 50% (DL ₅₀)	30
3.5.1.1	Animais	31
3.5.1.2	Tratamento	31
3.5.1.3	Critérios para avaliação dos resultados	32
3.5.2	Estudo toxicológico sub-crônico	33

3.5.2.1	Animais.....	34
3.5.2.2	Tratamento.....	34
3.5.2.3	Evolução ponderal e parâmetros comportamentais.....	35
3.5.2.4	Análises laboratoriais.....	36
3.6	Análise estatística.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Avaliação de irritação gástrica	37
4.2	Estudo toxicológico agudo	42
4.2.1	Sinais observados	42
4.2.2	Avaliação da massa corporal e do consumo de água e ração	43
4.2.3	Avaliação histopatológica e da massa de órgãos	45
4.3	Estudo toxicológico subcrônico	46
4.3.1	Sinais observados	46
4.3.2	Avaliação da massa corporal e do consumo de água e de ração	46
4.3.3	Avaliação histopatológica e da massa dos órgãos	46
4.3.4	Parâmetros bioquímicos e parâmetros hematológicos	47
5	DISCUSSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

As algas vêm sendo utilizadas há milênios pela sociedade como fonte de alimento e de matéria prima para produção de medicamentos, meios de cultura, suplementos alimentares entre outros. Além de realizar a manutenção do equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, ocasionando a continuidade da fauna existente, possuem grande importância econômica e social e ambiental para a humanidade. Anualmente, cerca de quatro milhões de toneladas de algas são colhidas em todo o mundo (ROCHA, 2001).

O interesse do Brasil bem como de outros países ocidentais sobre a exploração de algas marinhas começou durante a segunda guerra, uma vez que o Japão detinha o monopólio internacional de produção de substâncias a partir de algas e estava impossibilitado de exportar esses produtos. Atualmente, China e Japão são os principais produtores, com 98% da produção mundial, seguido dos Estados Unidos da América e da Noruega (ROCHA, 2001; VIDOTI; ROLLEMBERG, 2004).

A heterogeneidade dos organismos vegetais encontrados no grupo das algas é grande. As três divisões de algas, inteira ou parcialmente multicelulares compreendem as algas vermelhas (*phylum Rhodophyta*), as algas pardas (*phylum Phaeophyta*) e as algas verdes (*phylum Chlorophyta*) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

As algas vermelhas (*Rhodophyta*) formam um grupo de aproximadamente 6.000 espécies, sendo que mais de 4.000 (DAWES, 1981) são predominantemente marinhas. As células das rodófitas possuem pigmentos vermelhos que permitem a estas algas sobreviver a maiores profundidades que as demais, uma vez que lhes permite absorver a luz azul, que possui o comprimento de onda que penetra mais fundo nos oceanos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

As algas calcárias ou coralináceas ocorrem na zona entre-marés, com profundidade de até 200 metros, na extensão latitudinal da linha do Equador aos pólos (PEREIRA; GOMES, 2002). Essas algas são pouco estudadas quanto à sua composição em

substâncias orgânicas, estando disponíveis apenas dados relativos aos constituintes inorgânicos e aspectos geológicos (DIAS, 2000).

As formas livres das algas calcárias, como os rodolitos, nódulos e seus fragmentos são viáveis para exploração comercial, sendo depósitos sedimentares não consolidados que podem ser retirados por dragagem. O cultivo dessas algas é inviabilizado por seu crescimento lento, sendo necessário manter bancos intactos dessas algas para a preservação da espécie (DIAS, 2000).

A França se encontra em posição de destaque de exploração em seu litoral (600 mil toneladas/ano) (DIAS, 2000). O Brasil possui ampla ocorrência de depósitos de algas vermelhas calcárias na plataforma continental do Norte-Nordeste e do Sudeste. Essas algas são utilizadas como fonte de matéria prima em diversas aplicações como para agricultura para a produção de fertilizantes e corretivos para o solo (LIMA *et al.*, 2002; MELO, 2003), potabilização de águas para consumo, indústria de cosméticos, dietética, implantes em cirurgia óssea, nutrição animal e tratamento da água em lagos (DIAS, 2000).

Entre o Estado do Espírito Santo e a região de Búzios (Rio de Janeiro), uma característica marcante é a presença de vasta área coberta por fundos de algas calcárias, com teor em carbonatos superior a 90%, estendendo-se por várias dezenas de metros de profundidade (DIAS, 2000).

Lithothamnion calcareum – de sinonímia *Lithothamnion calcareum* e nome vulgar maerl - é uma alga vermelha que pertence à família das coralináceas. Essas algas têm como principal característica a precipitação de carbonato de cálcio (cerca de 80%) e carbonato de magnésio (cerca de 5%) em suas paredes celulares, sob a forma de cristais de calcita. Além desses dois principais componentes, as algas calcárias são compostas por mais de 20 oligoelementos, presentes em quantidades variáveis, principalmente ferro, manganês, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio e estrôncio, além de polissacarídeos sulfatados (DIAS, 2000; MELO, 2003). O grupo das algas calcárias possui 31 a 34 gêneros e cerca de 300 a 500 espécies (DIAS, 2000).



FIGURA 1 - A alga marinha *Lithothamnion calcareum*.

O litoral nacional constitui uma fonte praticamente inexplorada para a descoberta de novas substâncias bioativas, considerando sua extensão, com aproximadamente 8.000 km, e o número limitado de estudos nesse campo de pesquisa (BERLINCK *et al.*, 2004).

Apesar de estar entre os 17 países mais ricos em biodiversidade do mundo (ARNT, 2001; CANÇADO, 2001), o Brasil não se encontra em posição de destaque em se tratando de utilização e conhecimento de algas marinhas. Estudos direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais ainda são poucos quando comparados ao potencial promissor que o país apresenta (BRITO, 1996).

Atualmente, algas vermelhas são fontes de pesquisa para extração de moléculas bioativas, cujas principais encontradas são compostos terpênicos e polifenólicos (BLUNT *et al.*, 2006; FAULKNER, 2000). Existem na literatura estudos sobre a composição química dos metabólitos de algas vermelhas. Micromoléculas isoladas dessas algas apresentam atividades biológicas, tais como: antitumoral, antimalárica, anticoagulante, antibiótica, antiviral, anti-inflamatória entre outras (BLUNT *et al.*, 2006). Matsui *et al.* (2003) demonstraram que polissacarídeos sulfatados extraídos de microalgas vermelhas apresentam capacidade de diminuir a resposta inflamatória, em modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação de pele em humanos (MATSUI *et al.*, 2003).

Existe atualmente no Brasil um suplemento alimentar com o nome comercial Vitalidade 50[®] + comercializado pela empresa Phosther Algamar LTDA. Este produto é recomendado como fonte de cálcio para pessoas com idade acima de 50 anos. A partir de um edital veiculado pelo CNPq (MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT- Saúde – Nº 10/2006), a referida empresa em uma parceria com a UFMG, sob a coordenação do professor Mauro Martins Teixeira (ICB/UFMG), teve aprovado o projeto intitulado “Estudo da alga *Lithothamnion calcareum* no desenvolvimento de novos fármacos”. Nesse projeto, estão sendo realizados estudos com o objetivo ampliar o conhecimento em relação às propriedades químicas, farmacológicas, efeito anti-inflamatório entre as doses de 10 a 100 mg/kg e toxicológicas dessa alga.

O presente estudo é um sub-projeto do projeto citado anteriormente e tem como objetivo avaliar o potencial de irritação gástrica, assim como a segurança do produto Vitalidade 50 +[®] em ratos.

1.1 Irritação gástrica

Os anti-inflamatórios representam um dos grupos de medicamentos mais consumidos em todo o mundo (MCCARTHY, 1998). Porém, o uso desses medicamentos torna-se limitado por levar os pacientes a apresentar distúrbios gastrintestinais (CELLOTTI; LAUFER, 2001). Assim, a busca por medicamentos que podem diminuir a inflamação sem causar ou atenuar os efeitos colaterais é extremamente importante. O potencial anti-inflamatório que a alga *L. calcareum* apresenta motivou o presente estudo, uma vez que não existem na literatura dados sobre o efeito gastrotóxico de *Lithothamnion calcareum*. Nesse sentido é fundamental que todos os produtos com essas propriedades sejam submetidos a testes de irritação gástrica para a verificação da provável ocorrência desses efeitos.

A úlcera gástrica é considerada uma doença de etiologia pluricausal e complexa, sendo que o conhecimento fisiopatológico desta permanece não completamente elucidado. Muitos pacientes, que sofrem dessa condição patológica, secretam ácido

clorídrico e pepsina em níveis normais ou abaixo do normal, porém, muitas drogas anti-ulcerogênicas possuem como alvo o bloqueio ou a neutralização da secreção ácida. Cada um dos vários fatores que levam à formação de irritação e lesões gástricas é considerado alvo potencial para novos agentes terapêuticos (GLAVIN; SZABO, 1992).

A hipótese mais aceita sobre a formação das lesões gástricas descreve a interação ou o balanço entre os fatores agressivos e os defensivos presentes no estômago. Dentre os fatores agressivos existem os endógenos, que incluem secreção ácida, desencadeada pela liberação de gastrina, a presença de radicais livres e leucotrienos, aumento da mobilidade gástrica e os mecanismos exógenos, como a infecção por *Helicobacter pylori*, o estresse e o contato com agentes necrosantes como o etanol e os anti-inflamatórios não esteroides. Dentre os fatores de defesa existe a microcirculação da mucosa, a secreção de muco e bicarbonato, assim como de prostaglandinas, sulfidrilas e óxido nítrico. O dano é provocado quando a mucosa perde a habilidade de proteger-se através das secreções de bicarbonato e muco, bem como, de promover uma nova epitelização (GLAVIN; SZABO, 1992; MOJŽIŠ; HEGEDUSOVA; MIROSSAY, 2000; PERERA *et al.*, 2001; REPETTO; LLESUY, 2002; SAIRAM *et al.*, 2002; TSUKIMI *et al.*, 2000).

A difusão de retorno do ácido luminal para a mucosa é crucial na patogênese da lesão. A ação tóxica de muitos agentes endógenos e exógenos pode alterar os mecanismos de defesa, aumentando deste modo a permeabilidade da mucosa ao ácido (TWEDT; MAGNE, 1992). Com o aumento da entrada de ácido, ocorre uma cadeia de eventos, iniciando-se com lesão direta da mucosa e seguindo-se por destruição da submucosa (LIPTAK *et al.*, 2002). Os mastócitos na submucosa e na lâmina própria desgranulam e liberam histamina quando em contato com o ácido. A histamina liberada estimula a secreção celular parietal de ácido clorídrico, assim como inflamação local e edema agudo. O ácido pode ainda lesionar vasos sanguíneos e estimular nervos da parede gástrica, provocando contrações musculares exacerbadas (TWEDT; MAGNE, 1992).

A reconstituição epitelial é extremamente importante na manutenção da estrutura e funcionamento da barreira mucosa. A formação dos radicais livres, as citocinas inflamatórias e o estresse fisiopatológico reduzem a taxa de proliferação celular

dificultando o processo de reconstituição das células gástricas. Por outro lado, o epitélio gástrico é recoberto por um espesso muco que impede a retrodifusão dos íons H^+ . O rompimento da barreira mucosa pelo refluxo de bile, uremia e anti-inflamatórios não esteroides aumentam a permeabilidade da mucosa e permitem a retrodifusão do íon H^+ , aumentando a acidose tecidual (BEEJAY; WOLFE, 2000).

Alteração no fluxo sanguíneo da mucosa é outro fator de grande importância na gênese das injúrias gástricas. O fluxo sanguíneo pode ser severamente alterado por ação de drogas, como anti-inflamatórios, etanol e pela entrada de agentes luminiais, como ácido e pepsina. A cicatrização das lesões fica comprometida devido à redução do fluxo sanguíneo na mucosa causada por estes agentes (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1998).

Os modelos experimentais de indução de irritações e lesões gástricas atuam por diferentes mecanismos ulceratogênicos e representam o primeiro passo para se determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de substâncias (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2000).

O modelo de lesão gástrica, induzida por etanol absoluto, provavelmente se inicia por necrose leve nas células superficiais, provocando intensa perturbação dos mastócitos presentes na mucosa, que liberam leucotrienos e histamina. Esses mediadores químicos, juntamente com metabólitos do etanol, levam à constrição intensa e progressiva das vênulas murais até as veias maiores, seguido por dilatação marcante das arteríolas murais até artérias de maior calibre, aumentando a pressão capilar e levando a estasia no fluxo sanguíneo gástrico e formação de áreas hiperêmicas largas e visíveis, além de edema (GONZÁLES *et al.*, 2001; OATES; HAKKINEN, 1988; TAN *et al.*, 2002).

Segundo Oates e Hakkinen (1988) a hemorragia na mucosa deve ocorrer nos capilares, em decorrência da intensa pressão intracapilar, sendo que a hemorragia na sub-mucosa deve-se provavelmente pelo venoespasma violento que rompe as delicadas veias desta camada.

Outra hipótese proposta para explicar as irritações e lesões gástricas induzidas pelo etanol é o aumento de radicais livres derivados de oxigênio e/ou a ineficácia do sistema defensivo antioxidativo, que leva ao acúmulo dessas substâncias causando

injúria no tecido devido a peroxidação dos lipídios, provocando danos na membrana celular através da coagulação de proteínas, lipídios e ácidos nucléicos. As lesões histopatológicas mais evidenciadas são: congestão, edema, hemorragia, erosão e necrose, se o contato com agente necrosante permanecer (AL-SHABANAH *et al.*, 2000; LA CASA *et al.*, 2000; REPETTO; LLESUY, 2002).

Outro fato que predispõe a ocorrência de irritação e lesões gástricas é o uso de anti-inflamatórios. Isso ocorre através da inibição da atividade da ciclooxigenase-1 (COX-1: constitucional; encontrada nos vasos sanguíneos, estômago e rins) e da ciclooxigenase-2 (COX-2: induzida durante o processo inflamatório pelas citocinas e mediadores da inflamação) e, conseqüentemente, na inibição da formação dos produtos das mesmas, dentre esses as prostaglandinas. Esses eicosanoides inibem a secreção ácida gástrica, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa e estimulam a secreção do muco citoprotetor. Uma vez que os anti-inflamatórios causam a inibição dessas substâncias, distúrbios gastrintestinais ficam mais propícios a ocorrer (TAGLIATI, 2008).

A irritação gástrica atinge cerca de 15 a 30% dos pacientes usando anti-inflamatórios regularmente, representando aumento de 10 a 30 vezes do desenvolvimento desse sintoma em relação à população em geral. Sintomas de dispepsia ocorrem em cerca de 10 a 60% dos usuários desse grupo de fármacos, fazendo com que 5 a 15% dos portadores de artrite reumatoide abandonem a terapia. Lesões endoscópicas assintomáticas são observadas em 20 a 80% dos pacientes, dependendo da característica da população (TAGLIATI, 2008).

1.2 Segurança pré-clínica

Além do teste de irritação gástrica, o produto deve ser submetido a um teste de avaliação da segurança pré-clínica. Isso decorre do fato de que as agências regulatórias mundiais exigem que todo produto ou substância com potencial

terapêutico deve obrigatoriamente passar pelos testes de segurança preestabelecidos (OLSON *et al.*, 2000).

Tal exigência deveu-se, principalmente, a partir do evento da talidomida, entre 1955 e 1961, que provocou alto índice de teratogenicidade, e assim ficou evidenciada a necessidade de estudos detalhados de toxicidade pré-clínica, em animais, e estudos clínicos em humanos, anteriores ao uso na clínica (GEREZ, 1993).

As principais agências regulatórias mundiais são a *Food and Drug Administration* - FDA, *Organisation for Economic Cooperation and Development* - OECD e *World Health Organization* - WHO. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - é a agência responsável pelo estabelecimento de normas para o registro de medicamentos fitoterápicos, naturais e sintéticos. A Resolução RDC 17/2000, as Portarias 6/1995 e 16/1995 e mais recentemente a RDC 48/04 estabeleceram normas para a validação dos produtos naturais junto aos órgãos regulamentadores (BRASIL, 2000). Essa resolução preconiza que produtos utilizados para a saúde humana, devem, obrigatoriamente, apresentar comprovação de segurança de uso (estudos de toxicidade pré-clínica e clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e clínica). Assim, é importante nesse momento que o produto em estudo seja submetido aos protocolos exigidos pela ANVISA.

Apesar do amplo uso produtos sintéticos no mercado mundial, a utilização de produtos naturais vem aumentando de forma significativa, não somente pelo preço acessível, como também pela melhor aceitabilidade cultural (PAL; SHUKLA, 2003). Contudo, diversas pesquisas têm mostrado que produtos naturais não são desprovidos de toxicidade e que efeitos adversos podem ocorrer (FÉRES *et al.*, 2006). Existem relatos na literatura sobre toxinas presentes em algas vermelhas e intoxicação humana pela ingestão das mesmas, (YOUTSU-YAMASHITA *et al.*, 2004) o que justifica mais uma vez a necessidade de tais estudos.

Além disso, deve-se considerar que a maior parte dos produtos naturais comercializados, atualmente, não é submetida aos testes de eficácia e segurança (BAST *et al.*, 2002; FONG, 2002; PAL; SHUKLA, 2003; RASKIN *et al.*, 2002). Segundo Raskin *et al.* (2002) a necessidade de estudos de segurança com produtos naturais é imprescindível, em face, principalmente, de sua ampla utilização, não

somente no Brasil, mas em todo o mundo. A grande biodiversidade brasileira possui extraordinário potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, mas investimentos em pesquisas com produtos naturais ainda são restritos a poucos grupos (BRITO, 1996).

Ao se iniciarem os estudos de um produto ou substância é necessário comprovar sua eficácia terapêutica, a chamada prova-de-conceito. Após essa etapa, e se o produto ou substância apresentar atividade farmacológica é, em seguida, submetido aos testes de toxicidade. Caso os mesmos apresentem segurança adequada, os estudos relativos à eficácia têm continuidade.

O produto comercial Vitalidade +50[®] é comercializado no Brasil sob a forma de cápsulas contendo o granulado de *Lithothamnion calcareum*. É recomendado como fonte de cálcio além de outras indicações que não apresentam embasamento científico. Nesse sentido, esses estudos são necessários para comprovação da eficácia e segurança do produto analisado. Esses fatos somados à potencial atividade anti-inflamatória de substâncias presentes nessa alga motivaram a seleção de *Lithothamnion calcareum* para os estudos gastrotóxico e toxicológico pré-clínico.

Apesar do extenso uso deste produto no Brasil e em outros países, o conhecimento sobre sua segurança e toxicidade é incipiente. Ainda não foi realizado nenhum estudo científico avaliando possíveis efeitos metabólicos ou toxicológicos desse produto, fato que justifica a realização dos testes de segurança no presente estudo, exigidos pelas agências regulatórias.

1.3 Aspectos toxicológicos

O teste da dose letal 50% - DL₅₀ - foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de setenta, esse teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e

classificação da toxicidade de substâncias (GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005; KRYSIAK; RYDZYNSKI, 1997; STAMMATI *et al.*, 2005).

Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* - FDA, responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. Para a realização do teste da DL₅₀ eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada (normalmente ratos e camundongos) e para cada substância testada (GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005; KRYSIAK; RYDZYNSKI, 1997; STAMMATI *et al.*, 2005).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*) - OECD - uma organização intragovernamental composta por trinta países, sendo que seus protocolos são definidos como uma coleção de métodos utilizados para avaliar o risco de substâncias e preparações químicas - incorporou o Teste da DL₅₀ em suas diretrizes. Entretanto, a diretriz de 1981 para toxicidade aguda oral (OECD, 401) estabeleceu o uso de apenas 5 animais por sexo, por dose, por grupo, com 3 grupos de doses por teste, sendo estas doses escolhidas a partir de estudos prévios ou dados históricos, para estimar o valor da DL₅₀. Uma dose limite superior de 5.000 mg/kg foi também introduzida para substâncias consideradas atóxicas (VALADARES, 2006).

Em 1987, a diretriz 401 da OECD foi revisado essencialmente no que diz respeito às questões referentes ao bem-estar animal. Como consequência, os testes passariam a ser conduzidos utilizando apenas um sexo e a dose limite que antes era de 5.000 mg/kg foi reduzida para 2.000 mg/kg (VALADARES, 2006).

Em 1992, o Teste da Dose Fixa foi adotado pela OECD 420 como alternativa a OECD 401 e não, ainda, como uma substituição. Em 1996, surgiu uma segunda alternativa, a OECD 401, o método da Toxicidade Aguda de Classe - TAC - o qual foi adotado pela OECD 423 e, em 1998, surgiu o Teste "*Up and Down*" - TUD - sendo, também, posteriormente recomendado pela OECD 425. O Teste TAC também utiliza o conceito de dose fixas, porém o objetivo final seria a mortalidade. O TUD, como o nome sugere objetiva estimar o valor da DL₅₀ testando sequencialmente animais

individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior (VALADARES, 2006).

Desde 2000, concluiu-se que a OECD 401 seria banida e as diretrizes 420, 423 e 425, então revisadas, foram definitivamente adotadas e recomendadas. Em dezembro de 2002, em associação com a *Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods* - ICCVAM - e *United States-Environmental Protection Agency* - US-EPA, o teste da DL₅₀ foi finalmente reformulado. A partir daí, o teste passa a ser denominado de toxicidade aguda e as substâncias são classificadas de acordo com a Tabela 1. O maior foco dessa discussão, atualmente, reside no fato do estudo em animais ter valor preditivo à toxicidade humana (GUNDER-REMY; SONICH-MULLIN, 2002).

TABELA 1
Critérios para classificação de toxicidade adotados
pela Comunidade Europeia

Categoria	DL₅₀ oral para ratos (mg/kg peso corpóreo)
Muito tóxico	menor que 25
Tóxico	de 25 a 200
Nocivo	de 200 a 2.000

Fonte: BARROS; DAVINO, 2008, p. 62.

Tais fatos resultaram que, em abril de 1999, nos Estados Unidos, reuniram-se 12 indústrias farmacêuticas multinacionais, representantes de entidades regulatórias e de universidades. Neste encontro foi realizado um levantamento com as indústrias farmacêuticas, sobre a toxicidade relevante observada em pesquisas clínicas, como, por exemplo, aqueles que levaram ao fim do estudo, tiveram redução de dose ou essa foi indicada apenas para uma população específica. Foram selecionados 150 compostos com 221 eventos reportados. Os resultados mostraram concordância de 71% dos eventos adversos ocorridos em humanos e previamente identificados em animais, após o uso de um novo fármaco, quando nos estudos pré-clínicos se utilizam roedores e não-roedores. Desses eventos, 94% foram identificados em

estudos pré-clínicos de um mês ou menos de duração (GREAVES; WILLIAMS; EVE, 2004; OLSON *et al.*, 2000).

Esses estudos de toxicidade são obtidos por meio da realização de testes, que envolvem a aplicação de protocolos pré-estabelecidos, principalmente por órgãos como FDA, OECD e *International Conference on Harmonization - ICH* (SPINDLER; SJOBERG; KNUDSEN, 2000). Nos testes de doses múltiplas, os quais envolvem minuciosa avaliação pré-clínica, a eutanásia dos animais após o tratamento é realizada, e posteriormente análises bioquímicas, hematológicas, macroscópicas e microscópicas (BRITO, 1994). A avaliação conjunta desses fatores permite concluir e extrapolar para possíveis efeitos no homem (SCHWENK; WERNER; YOUNES, 2002).

Os objetivos da avaliação da segurança nos ensaios pré-clínicos incluem a caracterização dos efeitos tóxicos considerando órgão alvo, dose dependência, tempo de exposição, reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem (FDA, 2008).

Considerando os dados apresentados, o presente estudo fundamenta-se como forma de obtenção de subsídios científicos da toxicidade pré-clínica, viabilizando avançar os estudos desta alga, contribuindo para o uso seguro do referido produto que poderá vir a ser um novo fármaco.

No estudo de Toxicidade aguda atual, entende-se que toxicidade aguda é aquela produzida por um fármaco quando o mesmo é administrado em uma ou mais doses, durante um período que não exceda 24 horas em condições padronizadas (OECD, 2001).

Foram seguidas as diretrizes do guia OECD 420, que utiliza doses fixas para a avaliação da toxicidade aguda oral (OECD, 2001). Esse procedimento substitui o teste de DL₅₀ introduzido por Trevan em 1927, visando à utilização de um menor número de animais nos experimentos (BOTHAM, 2004).

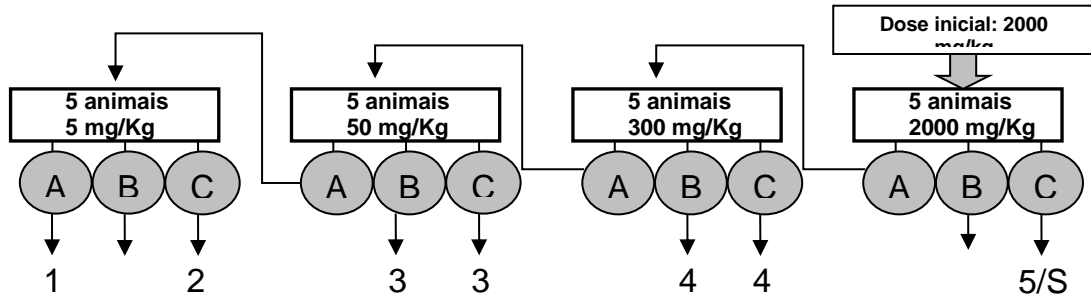
A toxicidade aguda serve ainda de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas com doses repetidas. O protocolo orienta a utilização de

animais do mesmo sexo, preferencialmente fêmeas, uma vez que as mesmas se mostraram ligeiramente mais sensíveis em estudos previamente realizados (OECD, 2001).

A toxicidade aguda fornece informações sobre as propriedades perigosas e permite a substância ser classificada de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado - GHS - para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (OECD, 2001).

O objetivo do GHS é identificar os perigos intrínsecos de substâncias e misturas químicas e transmitir informações sobre esses perigos. O GHS não se propõe a harmonizar procedimentos ou decisões de gerenciamento de riscos.

Medicamentos, aditivos alimentares, cosméticos e resíduos de pesticidas em alimentos, por exemplo, não são cobertos pelo GHS para as finalidades a que se destinam, mas serão cobertos em situações em que os trabalhadores possam ser expostos, como nos locais de trabalho e no transporte. Além disso, o uso medicinal humano ou veterinário de produtos farmacêuticos não constitui parte dos sistemas existentes de comunicação de perigos e é geralmente endereçado às bulas internas. Similarmente, os alimentos não são rotulados de acordo com os sistemas de comunicação de perigos existentes. Entretanto, esse sistema de classificação é de grande auxílio para a realização dos testes de toxicidade, uma vez que direciona e conduz a realização dos ensaios e nos permite de uma maneira objetiva, avaliar a segurança de um produto classificando-o de acordo com suas diretrizes.



CLASSIFICAÇÃO SISTEMA GHS

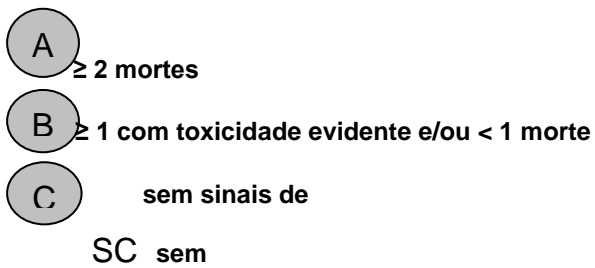


FIGURA 2 - Fluxograma de classificação de substâncias a partir do estudo toxicológico agudo iniciando-se a partir da dose de 2000 mg/kg. (OECD, 2001)

2 OBJETIVOS

A presente proposta tem o objetivo geral de aprofundar os conhecimentos avaliando a segurança pré-clínica do suplemento alimentar baseado em *Lithothamnion calcareum*, tendo em vista que essa é uma etapa fundamental para fornecer parâmetros a estudos prospectivos a partir dessa formação vegetal.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de irritação gástrica e a segurança pré-clínica do suplemento alimentar Vitalidade + 50[®] preparado a partir de *Lithothamnion calcareum*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a possível atividade gastrotóxica ou ação protetora do suplemento alimentar baseado em *Lithothamnion calcareum* em ratos;
- b) Avaliar a toxicidade aguda do suplemento alimentar baseado em *Lithothamnion calcareum* em ratos;
- c) Avaliar a toxicidade sub-crônica do suplemento alimentar baseado em *Lithothamnion calcareum* em ratos;
- d) Inferir propostas de mecanismos de ação de toxicidade com base nos resultados obtidos nos itens a, b e c.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produto

O *Lithothamnium calcareum* “in natura” - submetido a uma adequada pulverização, sem adição de quaisquer substâncias, resulta no produto final, que tem sido usado como suplemento alimentar comercializado com o nome de Vitalidade +50[®] - foi fornecido pela empresa Phoster Algamar LTDA. O produto possui registro aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (n^o 25003.040502/97 6.2119.0001.001-1). Segundo a empresa, a coleta foi realizada na região costeira do Espírito Santo.

3.2 Preparo das suspensões

As suspensões foram preparadas imediatamente antes da administração das doses. A administração foi feita por gavagem em todos os testes respeitando o limite de 2 mL/100 g de massa corporal para veículo aquoso (OECD, 1998, 2001). As suspensões foram agitadas vigorosamente antes de cada administração. Devido a sua insolubilidade em água, o suplemento alimentar foi disperso em solução de Tween (polissorbato) 80 a 5%. Grupos teste e controle receberam o mesmo veículo, para que as diferenças entre os efeitos observados entre esses grupos controle fossem atribuídos somente ao uso da droga. O cálculo da dose foi preconizado em mg da substância teste por kg de massa corporal dos animais.

3.3 Animais

Os protocolos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA - da UFMG sob o protocolo N° 072/07 (ANEXO).

3.4 Avaliação da irritação gástrica

3.4.1 Animais

Para os ensaios de gastrotoxicidade foram utilizados 36 (trinta e seis) ratos machos da linhagem Wistar, com massa corporal de 220 a 250 g, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos nas seguintes condições ambientais: ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 - 19:00), temperatura de 23 ± 2 °C e umidade de 50 a 60%, em gabinete Vidy[®]. Foram alimentados com ração comercial, em *pellet*, do tipo purina da marca Nuvilab[®] e água potável *ad libitum*. Durante as 24 h anteriores ao início do experimento os animais foram mantidos em gaiolas de contenção, sem maravalha e foram mantidos somente com água potável e leite condensado (proporção de 2:1), a fim de evitar o acúmulo de ração ou maravalha no estômago, o que dificultaria a leitura da irritação (JORGE, 2004).

3.4.2 Tratamento

Os 36 animais foram aleatoriamente subdivididos em 6 grupos, contendo 6 animais em cada grupo e climatizados 3 (três) dias antes de iniciar o experimento. Os

tratamentos recebidos foram: Grupo 1 solução controle (Tween 80 a 5%); Grupo 2: suspensão de sucralfato 500 mg/kg; Grupo 3: suspensão do produto 30 mg/kg; Grupo 4: suspensão do produto 120 mg/kg; Grupo 5: suspensão do produto 480 mg/kg; Grupo 6 suspensão de carbonato de cálcio (CaCO_3) 380 mg/kg. A presente dose foi escolhida pelo fato do *Lithothamnion calcareum* apresentar em sua composição carbonato de cálcio (CaCO_3), sendo aproximadamente 80% de seu peso seco (DIAS, 2000; MELO, 2003), e assim a quantidade de CaCO_3 seria correspondente à dose de 480 mg/kg de *Lithothamnion calcareum*. O volume administrado (1 mL) foi o mesmo para todos os animais por gavagem. O pH mensurado da suspensão administrada foi 7.

3.4.3 Modelo farmacológico

Foi utilizado o modelo de indução de lesões gástricas agudas por etanol absoluto, para se avaliar a presença ou não de efeito gastrotóxico do produto em estudo, administrado por via *p.o* em ratos (ALVAREZ *et al.*, 1999; SEITO; MAZARO; DI STASI, 2002; TAN *et al.*, 2002). Foi administrado, *p.o.*, 1 mL de etanol absoluto 60 minutos após a administração do produto ou carbonato de cálcio ou do sucralfato ou da solução controle. Os animais foram eutanasiados 60 minutos após a aplicação do etanol, em câmara de CO_2 , e tiveram seus estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e imergidos em solução salina para preservação.

3.4.4 Avaliação das lesões gástricas

A avaliação das lesões hemorrágicas foi realizada macroscopicamente a olho nu (LA CASA *et al.*, 2000; MAKOVEC *et al.*, 1999) e com auxílio de microscópio estereoscópio (PERERA; RUEDAS; GÓMEZ, 2001). Após a retirada do estômago, a

mucosa foi lavada suavemente com solução salina e fixada com o auxílio de alfinetes sobre a plataforma de isopor para leitura. As lesões foram classificadas de duas formas: de acordo com a gravidade nos níveis 1 (hiperemia e/ou petéquia); 2 (hemorragia com erosão moderada); 3 (hemorragia com lesões extensas e severas de acordo com Szelenyi e Thiemer (1978) e por índice de irritação gástrica.

O índice de ulceração foi calculado somando-se o maior diâmetro (em cm) de cada lesão (MAKOVEC *et al.*, 1999; PERERA; RUEDAS; GÓMEZ, 2001). As leituras foram realizadas pelo mesmo avaliador, sendo que este não teve conhecimento do tratamento recebido pelos animais. Após avaliações das lesões, os estômagos foram conservados em solução de formalina 10% e foram fixados em parafina e cortados a 5 µm. Os cortes foram corados pelo método da hematoxilina-eosina para exame histopatológico.

3.4.5 Volume e pH gástricos

Após a retirada dos estômagos, foi realizada uma pequena incisão próxima ao piloro para extração do conteúdo gástrico e posterior medida do volume. O pH foi medido utilizando fitas indicadoras Merck imediatamente após a abertura dos órgãos (JORGE, 2004).

3.5 Avaliação da toxicidade

As doses fixas preconizadas correspondem às doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo que excepcionalmente a dose adicional de 5000 mg/kg poderia ser considerada. A dose de escolha foi a de 2000 mg/kg pelo fato do produto ser um suplemento alimentar, já utilizado, e por esse motivo, sinais de toxicidade não eram esperados em doses menores.

3.5.1.1 Animais

Foram utilizados 10 (dez) ratos Wistar (185 g -214 g), fêmeas, com idade de 9 a 10 semanas provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, divididos em dois grupos de 5 (cinco), sendo um grupo teste e um controle. Estudos mostraram que há uma pequena diferença de sensibilidade entre os sexos para os testes de toxicidade aguda oral, sendo as fêmeas mais sensíveis que os machos (OECD, 2001). Os animais foram submetidos às seguintes condições ambientais: temperatura de 23 ± 2 °C, umidade de 50 a 60%, ciclo claro-escuro de 12 h (07:00-19:00), em gabinete Vidy[®], em caixas de PVC, sendo alimentados com ração do mesmo lote em *pellet* da marca Nuvilab[®] e água potável *ad libitum*. Esses animais foram climatizados por 5 (cinco) dias às condições do laboratório antes de iniciar o experimento.

3.5.1.2 Tratamento

Esta avaliação foi realizada a partir do protocolo de doses fixas nº. 420 da OECD (2001), com a escolha da dose de 2000 mg/kg (página 21 – Tabela 1). A dose de 2000mg/kg seria a mais alta a ser testada, independente do resultado obtido.

Os animais foram submetidos ao jejum, com água potável *ad libitum*, 12 h anteriores ao teste. Foram pesados e a administração do produto foi realizada por gavagem. A alimentação foi reiniciada 4 horas após o término da administração. Após administração das doses, realizou-se observação cuidadosa dos animais (grupo controle e grupo teste) aos 5, 15, 30, 45, 60 minutos e a cada hora até a 12^a hora no primeiro dia. O período de observação dos animais, após administração das doses,

foi de mais 13 dias (07:00 e 16:00 h – duas vezes/dia) com fornecimento de alimento e água *ad libitum*.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: locomoção, comportamento, respiração, alterações na pele e pêlos, olhos, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência, número de mortes e a forma de sua ocorrência. Os animais tiveram sua massa corporal avaliada em dias alternados. Foram atribuídos escores de 0 a 4, a partir daquele parâmetro de comportamento considerado normal. Após esse período, os animais foram eutanasiados por decapitação e os órgãos foram retirados para as análises macroscópica e histopatológica. Foram retiradas as seguintes vísceras: coração, pulmões, estômago, intestino delgado, fígado, baço, pâncreas, suprarrenais, rins, cérebro, timo, útero e ovários. Procedimentos a seguir:

- ✓ Retirada dos órgãos e pesagem dos mesmos (para posterior avaliação da relação massa corporal/peso órgãos);
- ✓ Exame macroscópico dos órgãos inteiros;
- ✓ Corte de aproximadamente 0,5 cm de cada órgão, tendo o cuidado de que esses cortes fossem de áreas sugestivas de alterações previamente identificadas no exame macroscópico. Estes cortes foram conservados em solução de formalina 10%;
- ✓ Realização do exame histopatológico, após a fixação dos cortes dos órgãos e inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5 μ m para coloração pelo método da hematoxilina eosina;
- ✓ Grupo teste foi avaliado em relação ao grupo controle.

3.5.1.3 Critérios para avaliação dos resultados

As notações de toxicidade foram avaliadas conjuntamente com a natureza e o caráter reversível ou não das respostas observadas. Os dados individuais são

inconsistentes para caracterizar a toxicidade de uma substância. Os parâmetros cujos valores iniciais recebem o escore quatro podem diminuir até zero, no caso da não observância da resposta analisada, ou aumentar até oito, no caso de aumento do efeito analisado. Para aquelas respostas com notação normal zero, só pode haver aumento do efeito analisado, que pode atingir o escore máximo de quatro. Sendo assim, a substância é mais tóxica quanto maior for a diferença entre o escore obtido e o valor normal inicial. O tempo necessário para que o parâmetro retorne ao seu escore normal, analisando-se conjuntamente o número de animais afetados, pode influenciar também o grau de toxicidade conferida à substância teste.

A interpretação dos resultados e a sua extrapolação dos efeitos tóxicos para seres humanos são internacionalmente aceitas, não dispensando avaliações em outras espécies animais e tampouco a realização de ensaios clínicos (EATON; KLASSEN, 1996).

3.5.2 Estudo toxicológico sub-crônico

Esse estudo teve como objetivo avaliar as propriedades tóxicas das substâncias resultantes de uma exposição de doses repetidas em um período de 90 dias. Foram seguidas as diretrizes do guia OECD 408 (1998).

A toxicidade sub-crônica fornece informações adicionais sobre órgãos-alvo e sobre efeitos cumulativos. Os dados assim obtidos fornecem estimativas do nível de exposição sem efeito, que servem de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas de toxicidade futuras. As doses descendentes foram escolhidas com o objetivo de demonstrar a menor dose onde não se observam efeitos adversos – NOAEL 9 (Nível de efeito adverso não observado) - e onde se observa efeitos mínimos – LOAEL (Nível do menor efeito adverso observado).

3.5.2.1 Animais

Foram utilizados 80 (oitenta) ratos Wistar (40 machos e 40 fêmeas) com massa corporal de: machos (180-232 g) e fêmeas (178-215 g) e idade entre 8 a 9 semanas, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos nas seguintes condições ambientais: ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 - 19:00), temperatura de 23 ± 2 °C e umidade de 50 a 60%, em gabinete Vidy[®]. Foi fornecida ração em *pellet* da marca Nuvilab[®] e água potável *ad libitum*, durante os 90 (noventa) dias de administração, sendo que a ração foi retirada 12 horas antes da eutanásia dos animais.

3.5.2.2 Tratamento

Esta avaliação foi feita a partir do protocolo de doses fixas nº. 408 da OECD (1998). Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo controle (com 10 animais machos e 10 fêmeas), dois grupos teste (com 10 animais machos e 10 fêmeas em cada grupo) e dois grupos satélites (com 5 animais machos e 5 fêmeas em cada grupo) para verificação da reversibilidade de possíveis danos observados, pois após os 90 dias de teste, esses animais foram submetidos a mais 30 dias de avaliação sem receber o produto. Esses animais foram climatizados 14 (catorze) dias antes de iniciar o experimento. Esse período corresponde ao basal, no qual, semanalmente, foram avaliados o consumo de água e ração, além da massa corporal dos animais. Foram mantidos 5 (cinco) animais por gaiola que receberam *p.o.*, doses das soluções em estudo e controle, durante 90 (noventa) dias (OLSON *et al.*, 2000; PRITCHARD *et al.*, 2003).

Considerando as variações da massa corporal, os animais foram pesados semanalmente, para que assim pudesse ser realizado o constante ajuste de dose (mg/kg massa corporal). Foram administradas duas doses (1000 mg/kg e 2000 mg/kg) e a solução controle (Tween 80 a 5 %), conforme protocolo 408 da OECD (1998), parágrafo 16 que permite que menos de três doses sejam testadas quando sinais de toxicidade não são observados em estudos prévios utilizando-se a dose de 1000 mg/kg. O grupo satélite-controle recebeu a solução controle e o grupo satélite 2000 recebeu a dose de 2000 mg/kg.

3.5.2.3 Evolução ponderal e parâmetros comportamentais

Diariamente foram avaliados o comportamento geral dos animais (07:00h e 09:00h) e o aparecimento de efeitos anormais como agitação, surgimento de lesões, alteração respiratória, diarreia, sonolência, regurgitamento durante a administração das soluções, pêlos arrepiados e observando se os mesmos foram reversíveis (com registro da duração) ou não. O consumo de água e ração, por caixa, foi computado semanalmente, assim como a massa corporal, para o ajuste de doses. Após os 90 (noventa) dias de tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), e aproximadamente 5 mL de sangue foi coletado por punção direta da veia cava abdominal (MELO *et al.*, 2008). As amostras de sangue foram divididas em duas alíquotas: uma em um tubo sem aditivo e uma em um tubo contendo EDTA (ácido etileno diamino tetracético) para exames bioquímicos e hematológicos, respectivamente, enquanto que os órgãos foram pesados e autopsiados através de exame macroscópico e histopatológico (HILALY; ISRAILI; LYOUSSI, 2004; KANJANAPOTHI *et al.*, 2004; PALMEIRO *et al.*, 2003).

3.5.2.4. Análises laboratoriais

As análises bioquímicas foram realizadas a partir do soro dos animais, após centrifugação durante 10 minutos a 2500 rpm. Foram utilizados conjuntos de reagentes padronizados da Synermed[®] e o aparelho Cobas Mira[®] para as leituras espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: Ácido úrico - AUR, pelo método enzimático (Uricase Azure D2); Albumina - ALB, Verde de Bromocresol (colorimétrico de ponto final); Alanina aminotransferase - ALT / TGP, enzimático UV; Amilase - AMI, Método enzimático; Alanina aspartatotransferase AST/TGO, enzimático UV; Bilirrubina Total, Bb total ; Bilirrubina direta – Bb D, Método colorimétrico (Jendrassik e Grof modificado) Cálcio – Ca, Método colorimétrico (Arsenazo III); Cloretos – Cl, Método colorimétrico; Colesterol total - COL, Enzimático de Trinder (enzimático colorimétrico de ponto final); Creatinina - CRE, Creatinina quinase – CK, Método enzimático UV, Fosfatase alcalina – FAL, enzimático UV; Glicose - GLI, Glicose oxidase (enzimático colorimétrico de ponto final), sendo dosada imediatamente após a coleta; Fósforo - P, colorimétrico/catalisado (Fofosmolibdato/PVP); Gama glutamil transferase – GGT, Método enzimático (Szasz modificado); Proteínas totais - PROT, Biureto (colorimétrico de ponto final), Triglicérides – TRI, Método enzimático (N-sulfopropil); Uréia - URE, Urease colorimétrico (enzimático colorimétrico de ponto final).

As análises hematológicas foram realizadas a partir do sangue total, coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA. Foi realizado o hemograma completo (hemoglobina - HB, hematócrito - HT, contagem de hemácias - HEM, contagem global de leucócitos - GL LEU e contagem de plaquetas - C PLAQ) no aparelho automatizado Abacus Junior Vet[®] (Escola de Veterinária – UFMG). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada manualmente, em esfregaço corado pelo May-Grunwald Giemsa.

Para a análise histopatológica foram retiradas as seguintes vísceras: coração, pulmões, estômago, intestino delgado, fígado, baço, pâncreas, supra-renais, rins, cérebro, timo, útero e ovários ou testículos e epidídimos. Após a retirada dos órgãos,

os mesmos foram pesados e submetidos ao exame macroscópico para identificação de possíveis áreas sugestivas de alteração patológica. Findo esse processo, foi realizado um corte de aproximadamente 0,5 cm de cada órgão, sendo os mesmos de áreas sugestivas de alterações identificadas no exame macroscópico (caso fosse identificado), e conservadas em solução de formalina 10%. Após a inclusão dos cortes dos órgãos em parafina, esses foram cortados a 5 μ m e corados pelo método da hematoxilina-eosina para exame histopatológico.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando-se o teste paramétrico de análise de variância, seguida pelos testes de *T Student* e *Student-Newman-Keuls*, através do programa informatizado SAS, para avaliar se há diferença significativa entre os grupos. Foi considerado o nível de significância de 5%. Para a análise dos resultados que não apresentarem distribuição normal foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (SAMPAIO, 2002).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da irritação gástrica

De acordo com a TAB. 2, entre todas as doses testadas, apenas o *Lithothamnion calcareum* 480 mg/kg e a suspensão de CaCO₃ 380 mg/kg foram capazes de promover a redução das lesões menos intensas (tipo 1) – além do grupo que recebeu sucralfato, que é um medicamento referência com eficácia comprovada. As menores doses não apresentaram efeito protetor nem irritante gástrico. Quanto às lesões mais intensas (tipo 2 e 3), nenhuma dose mostrou-se eficaz na proteção gástrica, mas também não intensificaram as lesões.

Em relação ao pH, verificou-se que os grupos que receberam *L. calcareum* 480 mg/kg e suspensão de CaCO₃ 380 mg/kg apresentaram aumento significativo. Apenas o grupo em que foi administrado sucralfato apresentou redução estatisticamente significativa do volume gástrico.

O índice de lesão total - IL total, que é o somatório do maior diâmetro de todas as três intensidades de lesões, foi menor apenas nos grupos que receberam a suspensão de CaCO₃ 380 mg/kg e sucralfato. Os demais grupos apresentaram índices de lesões gástricas estatisticamente iguais ao controle.

TABELA 2

Efeitos da suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO_3 - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg), e controle (Tween 80 a 5%) na intensidade de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto

Tratamento (mg/kg)	Medidas das lesões gástricas (cm)			IL total	Proteção (%)	pH*	Volume gástrico (mL)
	1	2	3*				
Controle	2,76 ± 1,02 ^a	5,08 ± 1,12 ^a	0,15 ± 0,37	7,99 ± 1,17 ^a	–	6 ± 1 ^{ab}	3,57 ± 0,50 ^a
Sucralfato (500)	1,03 ± 0,49 ^b	2,11 ± 0,17 ^b	0,00 ± 0,00	3,14 ± 0,49 ^b	60,70	5 ± 1 ^b	2,15 ± 0,36 ^b
<i>L. calcareum</i> (30)	3,26 ± 0,60 ^a	4,40 ± 0,71 ^a	0,32 ± 0,50	7,98 ± 0,83 ^a	0,13	6 ± 1 ^{ab}	3,45 ± 0,66 ^a
<i>L. calcareum</i> (120)	3,08 ± 0,60 ^a	4,55 ± 0,93 ^a	0,13 ± 0,33	7,77 ± 0,48 ^a	2,75	5 ± 2 ^{ab}	3,38 ± 0,26 ^a
<i>L. calcareum</i> (480)	1,94 ± 1,53 ^{ab}	4,94 ± 1,28 ^a	1,07 ± 2,01	7,95 ± 1,11 ^a	0,50	7 ± 1 ^a	3,33 ± 0,60 ^a
CaCO_3 (380)	1,73 ± 0,67 ^{ab}	4,43 ± 1,21 ^a	0,26 ± 0,63	6,42 ± 1,62 ^{ab}	19,65	7 ± 1 ^a	3,15 ± 0,66 ^a

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão. Letras minúsculas distintas diferem pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. ($p < 0,05$) ($n=6$). *variável com distribuição não normal, avaliada pelo teste de *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$). As medidas representam o índice de ulceração (soma dos maiores diâmetros das lesões).

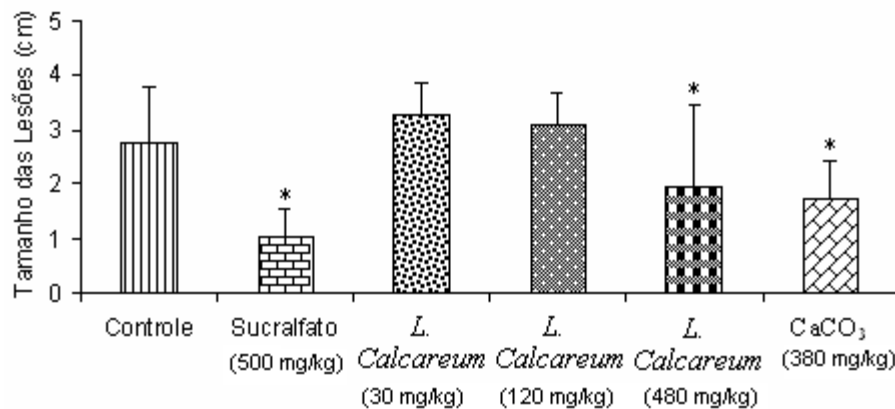


FIGURA 3 – Medidas de lesões gástricas (nível 1), induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO_3 - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%). * Significativamente diferente do grupo controle - Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

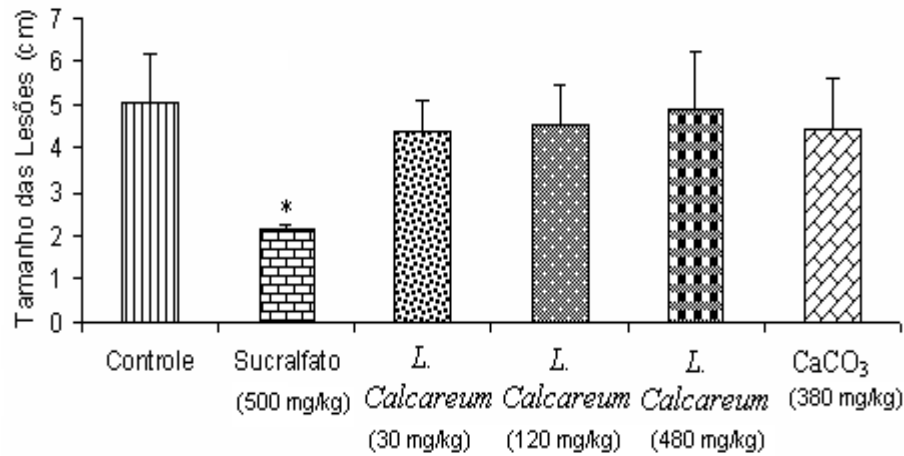


FIGURA 4 – Medidas de lesões gástricas (nível 2), induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%). * Significativamente diferente do grupo controle - Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

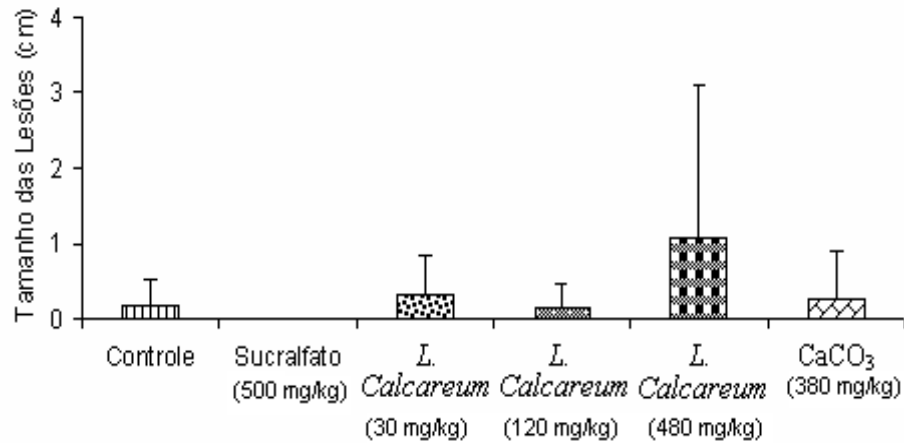


FIGURA 5 – Medidas de lesões gástricas (nível 3), induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%). Não houve diferença estatisticamente significativa - Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

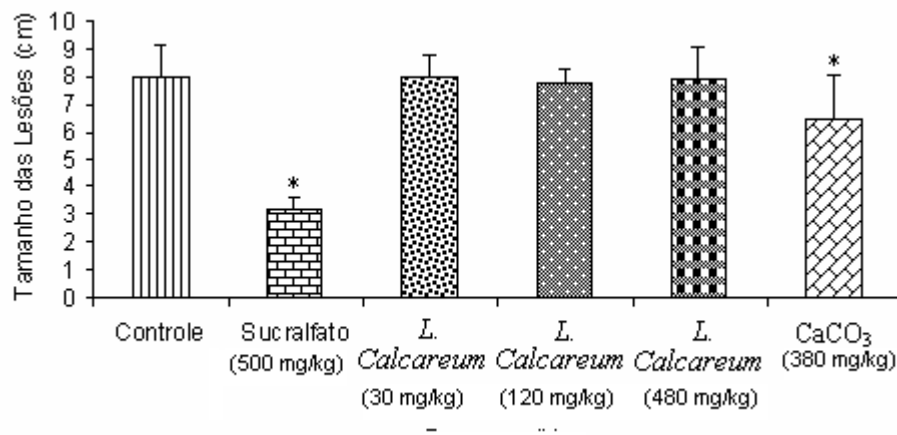


FIGURA 6 – Medidas de lesões gástricas (totais), induzidas por etanol absoluto, após administração *p.o.* de suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg) e controle (Tween 80 a 5%). As doses são expressas em mg/kg. * Significativamente diferente do grupo controle - Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

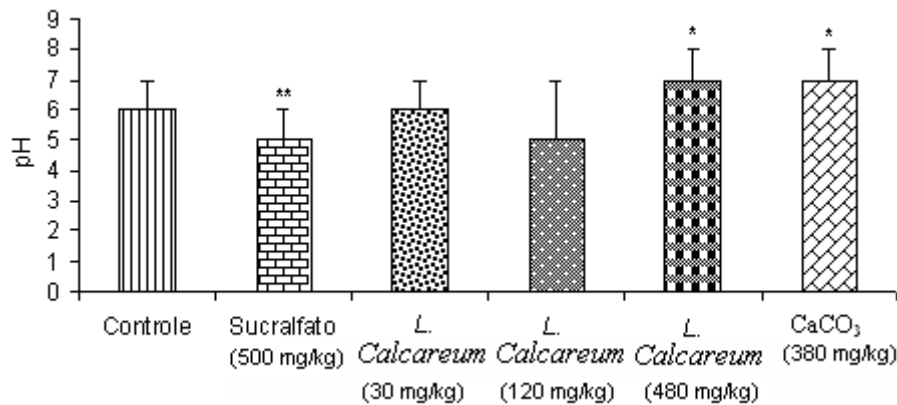


FIGURA 7 – pH mensurado no conteúdo gástrico, após administração *p.o.* de suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg), e controle (Tween 80 a 5%) e posterior administração *p.o.* de etanol absoluto. * Significativamente maior que o grupo controle. ** Significativamente menor que o grupo controle - Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

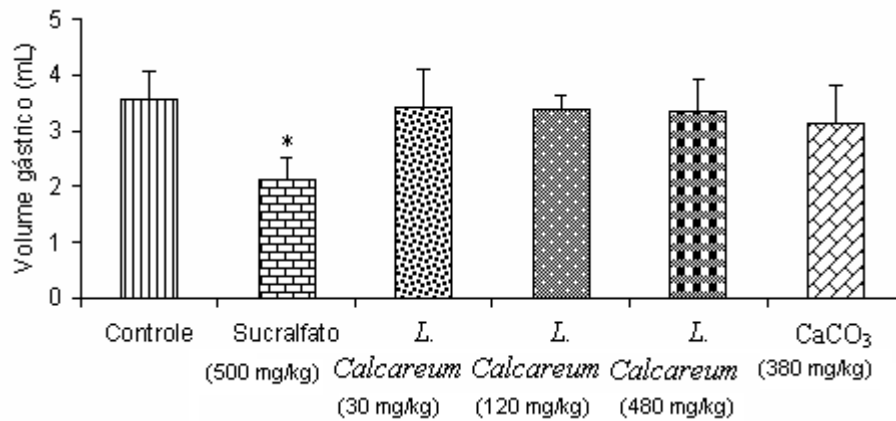


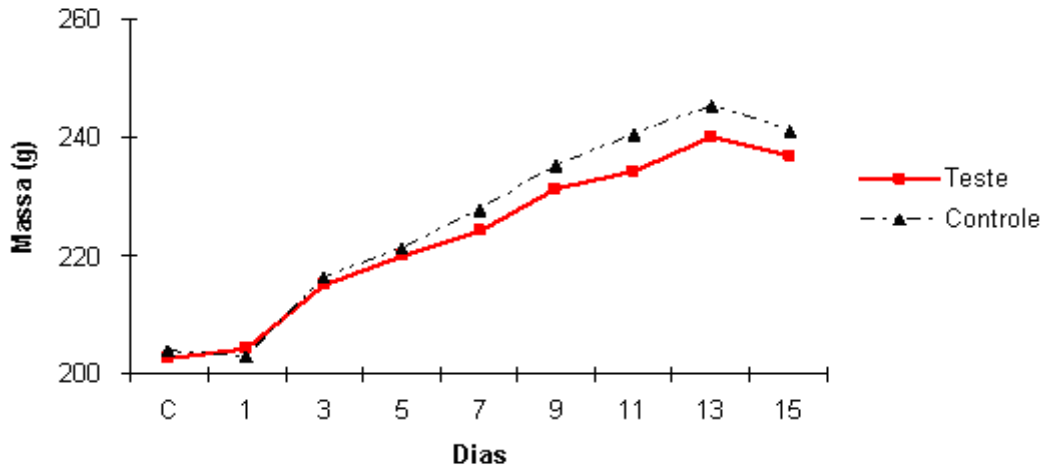
FIGURA 8 – Volume do conteúdo gástrico mensurado, após administração *p.o.* de suspensão de *Lithothamnion calcareum* em diferentes doses (30, 120 e 480 mg/kg), carbonato de cálcio (CaCO₃ - 380 mg/kg), medicamento referência (sucralfato 500 mg/kg), e controle (Tween 80 a 5%) e posterior administração *p.o.* de etanol absoluto. * Significativamente diferente do grupo controle - Teste *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

4.2 Estudo toxicológico agudo

4.2.1 Sinais observados

No presente estudo nenhum sinal de toxicidade foi observado durante os 14 dias de avaliação. Não houve perda de peso em nenhum animal após a administração do produto na dose de 2000 mg/kg. O consumo de ração (FIG. 10) e água (FIG. 11) foram estatisticamente iguais e não foi observada nenhuma mudança no comportamento dos animais. Não houve diferença estatística nos pesos dos ratos (FIG. 9) e nem nos pesos dos órgãos dos mesmos (TAB. 3). Exames macro e microscópicos confirmaram que não houve evidência de toxicidade.

4.2.2 Avaliação da massa corporal e do consumo de água e de ração



Grupo teste - dose 2000 mg/kg; grupo controle: veículo. Cada ponto é representativo da média de 5 animais. C- climatização. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no período (Teste de T student, $p < 0,05$).

FIGURA 9 – Avaliação da massa corporal de ratos Wistar (fêmeas) tratados com dose única de *Lithothamnion calcareum* 2000 mg/kg e observação por 14 dias.

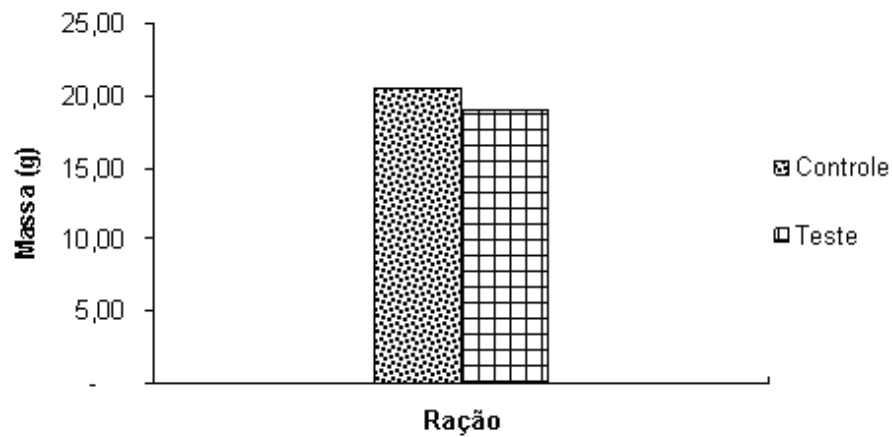


FIGURA 10 – Avaliação do consumo de ração por ratos Wistar (fêmeas) durante o teste de toxicidade aguda. Os valores são expressos em média diária por animal. Não houve diferença estatisticamente significativa pelo Teste de *T student* ($p < 0,05$).

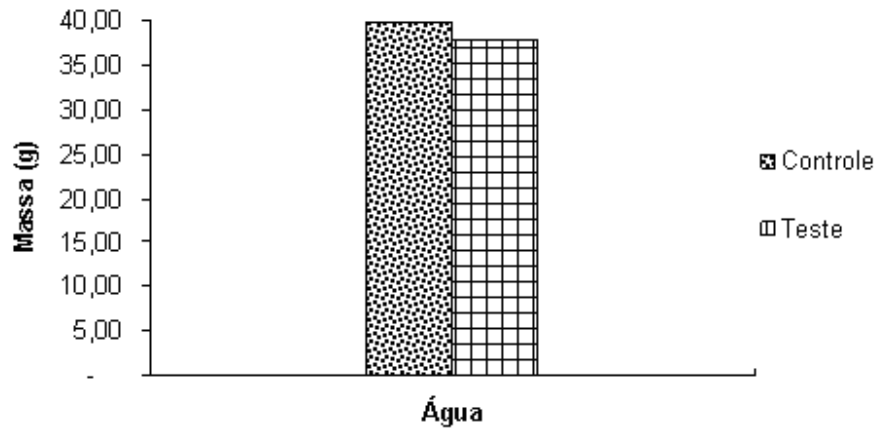


FIGURA 11 – Avaliação do consumo de água por ratos Wistar (fêmeas) durante o teste de toxicidade aguda. Os valores são expressos em média diária por animal. Não houve diferença estatisticamente significativa pelo Teste de *T student* ($p < 0,05$).

4.2.3 Avaliação histopatológica e da massa dos órgãos

TABELA 3

Avaliação da massa dos órgãos (em gramas) de ratos Wistar (fêmeas) após a administração em dose única de *Lithothamnion calcareum* 2000 mg/kg e observação por 14 dias

Dose	Tratamento	Coração	Pulmão	Fígado	Estômago	Rim e supra-renal*	Baço	Cérebro	Aparelho Reprodutor
2.000 mg/Kg	Controle	0,93 ± 0,06	1,97 ± 0,44	10,58 ± 1,41	1,38 ± 0,24	2,20 ± 0,16	1,11 ± 0,08	1,90 ± 0,02	0,63 ± 0,12
	Teste	0,97 ± 0,10	1,95 ± 0,46	10,23 ± 1,15	1,52 ± 0,16	2,11 ± 0,19	0,97 ± 0,13	1,90 ± 0,02	0,60 ± 0,10

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=5 por grupo. * Rim e supra-renal. Não houve diferença estatisticamente significativa na massa dos órgãos - Teste *T student* (p<0,05).

4.3 Estudo toxicológico sub-crônico

4.3.1 Sinais observados

Durante o experimento, não houve morte de nenhum animal ou sinais clínicos de toxicidade. Não foram observadas anormalidades nos pêlos, fezes e nem no comportamento dos animais.

4.3.2 Avaliação da massa corporal e do consumo de água e de ração

Não houve diferença estatisticamente significativa no ganho de peso dos animais (FIG. 12) e nem no consumo de água (FIG. 14), entretanto, o consumo de ração dos grupos que receberam a alga (1000 e 2000 mg/kg) foi estatisticamente maior em relação ao grupo controle (FIG. 13).

4.3.3 Avaliação histopatológica e da massa dos órgãos

Algumas diferenças foram constatadas na massa dos órgãos dos animais (TAB. 4). Análises histopatológicas não revelaram diferenças entre os grupos quando avaliados pelo teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

4.3.4 Parâmetros bioquímicos e parâmetros hematológicos

Ocorreram alterações bioquímicas nos seguintes parâmetros: creatinina, proteínas totais, albumina e cálcio.

Nenhuma diferença significativa foi observada nos parâmetros hematológicos.

Houve aumento da creatinina nas fêmeas que receberam a dose de 1000 mg/kg e em ambos os sexos na dose de 2000 mg/kg (TAB. 8), mas foi observada reversibilidade após o período de recuperação nos machos. Houve diminuição das proteínas totais nos animais que receberam a dose de 2000 mg/kg (TAB. 8), sendo que não foi observada reversibilidade para esse parâmetro, e sim a diminuição mais acentuada nos animais do grupo satélite.

Houve diminuição da albumina nos machos que receberam a dose de 1000 mg/kg e nos machos e fêmeas que receberam a dose de 2000 mg/kg (TAB. 8), sem reversibilidade após o período de recuperação, com diminuição ainda maior nos animais do grupo satélite. Houve diminuição do cálcio dos animais que receberam a dose de 2000 mg/kg sem reversibilidade observada no grupo satélite (TAB. 9). Os outros parâmetros bioquímicos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

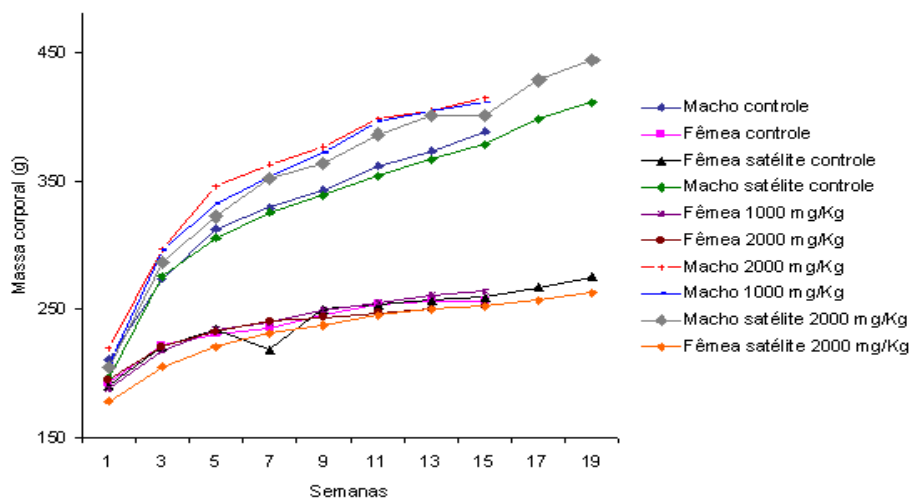


FIGURA 12 - Avaliação da massa corporal de ratos Wistar durante 90 dias (120 dias - grupo satélite) no teste de toxicidade sub-crônica. Os grupos teste receberam as doses de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (Tween 80 a 5%). Cada ponto representa a média de 10 animais (5 animais nos grupos satélite). Semanas 1 a 3 – climatização. Não houve diferença estatisticamente significativa pelo Teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$).

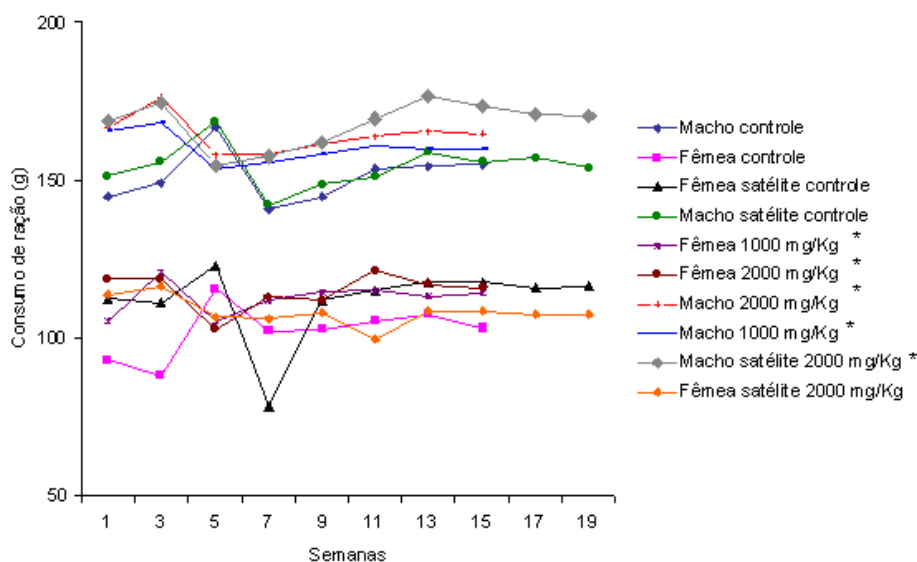


FIGURA 13 - Avaliação do consumo de ração por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias - grupo satélite) no teste de toxicidade sub-crônica. Os grupos teste receberam as doses de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (Tween 80 a 5%). Cada ponto representa a média de consumo por 10 animais (5 animais nos grupos satélite). Semanas 1 a 3 – climatização. * Consumo de ração estatisticamente maior pelo Teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$).

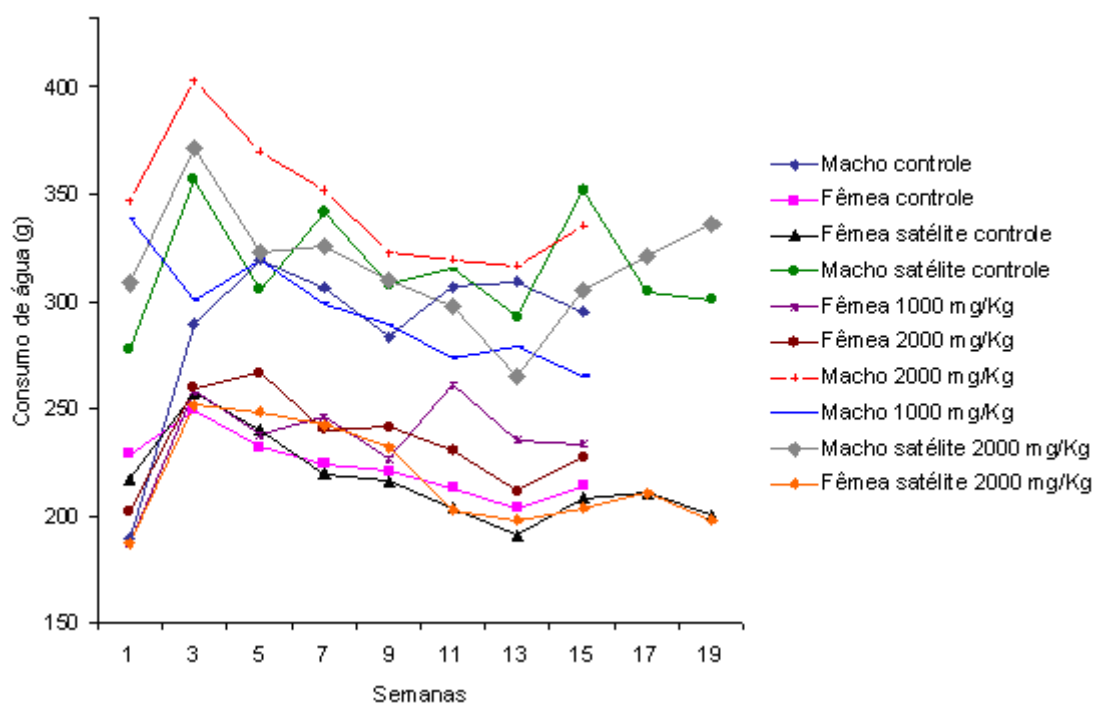


FIGURA 14 - Avaliação do consumo de água por ratos Wistar durante 90 dias (120 dias - grupo satélite) no teste de toxicidade sub-crônica. Os grupos teste receberam as doses de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg e o grupo controle recebeu o veículo (Tween 80 a 5%). Cada ponto representa a média de consumo por 10 animais (5 animais nos grupos satélite). Semanas 1 a 3 – climatização. Não houve diferença estatisticamente significativa pelo Teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$).

TABELA 4
Efeito na massa dos órgãos (em gramas) após a administração *per os* de *Lithothamnion calcareum* durante 90 dias em ratos Wistar

Grupos	Sexo	Coração***	Pulmão***	Rins e supra-Renal	Baço	Fígado	Aparelho Reprodutor	Cérebro	Estômago***
Controle	Macho	1,36 ± 0,18 ^{aA}	2,03 ± 0,39	2,96 ± 0,35 ^{bA}	1,14 ± 0,18 ^b	10,72 ± 2,3ab	5,52 ± 0,74	1,96 ± 0,25 ^{bA}	2,29 ± 0,61 ^{bA}
	Fêmea	0,87 ± 0,07 ^{aA}	1,37 ± 0,21	1,97 ± 0,19 ^{bB}	0,82 ± 0,19 ^b	7,35 ± 0,95 ^{ab}	0,83 ± 0,27	1,84 ± 0,12 ^{bB}	1,57 ± 0,28 ^{bB}
1000 mg/kg	Macho	1,40 ± 0,14 ^{aA}	2,06 ± 0,34	3,11 ± 0,49 ^{bA}	1,28 ± 0,31 ^{ab}	10,19 ± 1,56 ^b	5,98 ± 1,07	2,07 ± 0,22 ^{abA}	1,86 ± 0,23 ^{abA}
	Fêmea	0,97 ± 0,11 ^{aB}	1,55 ± 0,28	2,30 ± 0,37 ^{bB}	0,92 ± 0,17 ^{ab}	7,58 ± 0,51 ^b	1,07 ± 0,26	2,06 ± 0,17 ^{abB}	1,61 ± 0,15 ^{abB}
2000 mg/kg	Macho	1,48 ± 0,16 ^{aA}	2,02 ± 0,16	3,66 ± 0,42 ^{aA}	1,46 ± 0,12 ^a	12,48 ± 2,87 ^a	6,27 ± 0,32	2,25 ± 0,19 ^{aA}	1,91 ± 0,21 ^{aA}
	Fêmea	1,00 ± 0,06 ^{bA}	1,69 ± 0,21	2,32 ± 0,19 ^{ab}	0,91 ± 0,2 ^a	7,84 ± 0,79 ^a	0,93 ± 0,17	2,05 ± 0,15 ^{ab}	1,94 ± 0,44 ^{ab}
Satélite Controle	Macho	1,38 ± 0,10	1,99 ± 0,25	3,14 ± 0,3 [†]	1,27 ± 0,25 [†]	10,36 ± 0,72	5,62 ± 1,00	2,08 ± 0,20	1,86 ± 0,09
	Fêmea	0,96 ± 0,04	1,74 ± 0,28	2,64 ± 0,27 [†]	1,08 ± 0,15 [†]	8,05 ± 0,81	0,93 ± 0,11	2,21 ± 0,12	1,6 ± 0,06
Satélite 2000 mg/kg	Macho	1,51 ± 0,05	2,16 ± 0,22	3,38 ± 0,34 [‡]	1,27 ± 0,20 [‡]	12,35 ± 1,88	6,25 ± 0,28	2,20 ± 0,03 [‡]	2,02 ± 0,28
	Fêmea	1,00 ± 0,06	1,56 ± 0,09	2,29 ± 0,23 [‡]	0,78 ± 0,13 [‡]	7,63 ± 0,86	0,95 ± 0,21	2,12 ± 0,08 [‡]	1,69 ± 0,20

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10 por grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$). Letras maiúsculas – comparação entre doses no mesmo sexo. Letras minúsculas, comparação entre sexos na mesma dose. **Variável com distribuição não normal avaliada pelo teste de *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$). ***Variável com interação sexo x dose.

TABELA 5
Efeito nos parâmetros hematológicos após a administração oral de *Lithothamnion calcareum* durante 90 dias em ratos Wistar

Grupos	Sexo	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL ³)	Hematócrito (%)	Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)
Controle	Macho	10,72 ± 0,59 ^A	16,73 ± 0,63 ^A	49,11 ± 2,15	820,78 ± 278,03
	Fêmea	9,66 ± 0,55 ^B	16,16 ± 0,77 ^B	49,36 ± 3,34	748,78 ± 154,91
1000 mg/kg	Macho	10,58 ± 0,53 ^A	16,64 ± 0,95 ^A	48,9 ± 2,13	776,30 ± 146,13
	Fêmea	9,09 ± 0,39 ^B	15,97 ± 0,74 ^B	47,00 ± 2,35	709,89 ± 142,13
2000 mg/kg	Macho	10,19 ± 0,45 ^A	16,51 ± 1,12 ^A	47,70 ± 1,70	853,30 ± 174,52
	Fêmea	9,62 ± 0,67 ^B	16,20 ± 1,04 ^B	47,10 ± 4,12	761,40 ± 183,24
Satélite Controle	Macho	10,47 ± 0,43	17,16 ± 1,02	48,74 ± 1,16	1152,40 ± 175,65
	Fêmea	9,36 ± 0,54	15,28 ± 0,94	45,22 ± 2,57	738,80 ± 105,68
Satélite 2000 mg/kg	Macho	11,14 ± 0,83	16,64 ± 0,75	50,60 ± 3,71	897,40 ± 143,80
	Fêmea	8,85 ± 1,00	15,72 ± 0,74	46,00 ± 2,55	979,20 ± 159,01

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10 por grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$). Letras maiúsculas – comparação entre doses no mesmo sexo. Letras minúsculas, comparação entre sexos na mesma dose.

TABELA 6

Efeito nos parâmetros hematológicos após a administração oral de *Lithothamnion calcareum* durante 90 dias em ratos Wistar

Grupos	Sexo	Global de Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	Linfócitos (x10 ³ /mm ³)	Linfócitos (%)	Monócitos (x10 ³ /mm ³)	Monócitos (%)	Granulócitos** (x10 ³ /mm ³)	Granulócitos** (%)
Controle	Macho	8,93 ± 2,17	5,42 ± 2,44	67,22 ± 4,89	0,44 ± 0,29	5,78 ± 3,42	2,42 ± 0,74	27,11 ± 5,46
	Fêmea	7,43 ± 1,21	4,48 ± 1,82	67,22 ± 8,33	0,38 ± 0,32	5,33 ± 3,67	1,97 ± 0,72	26,78 ± 9,01
1000 mg/kg	Macho	10,23 ± 2,37	6,72 ± 1,57	66,00 ± 8,33	0,76 ± 0,32	7,50 ± 2,99	2,75 ± 1,28	26,50 ± 9,11
	Fêmea	5,75 ± 1,41	3,38 ± 0,59	60,56 ± 11,09	0,20 ± 0,19	3,33 ± 3,32	2,17 ± 1,24	35,89 ± 10,61
2000 mg/kg	Macho	8,53 ± 1,04	5,15 ± 0,76	60,2 ± 3,52	0,87 ± 0,51	10,00 ± 5,29	2,52 ± 0,37	29,80 ± 4,92
	Fêmea	5,55 ± 1,23	3,11 ± 1,07	55,30 ± 11,23	0,46 ± 0,23	8,40 ± 4,17	1,97 ± 0,67	36,30 ± 11,34
Satélite Controle	Macho	10,58 ± 2,93	6,61 ± 1,70	62,80 ± 5,31	0,67 ± 0,28	6,80 ± 3,63	3,30 ± 1,49	30,40 ± 5,41
	Fêmea	5,34 ± 1,32	3,06 ± 1,19	56,60 ± 11,63	0,46 ± 0,21	8,40 ± 2,19	1,82 ± 0,69	35,00 ± 12,63
Satélite 2000 mg/kg	Macho	8,96 ± 1,38	5,48 ± 0,95	61,60 ± 8,91	0,65 ± 0,38	7,20 ± 3,90	2,83 ± 0,77	31,20 ± 6,06
	Fêmea	6,06 ± 1,33	4,23 ± 1,11	69,60 ± 7,77	0,30 ± 0,11	4,80 ± 1,10	1,55 ± 0,66	25,80 ± 8,58

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10 por grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas – comparação entre doses no mesmo sexo. Letras minúsculas, comparação entre sexos na mesma dose. **Variável com distribuição não normal avaliada pelo teste de *Kruskal-Wallis* (p<0,05).

TABELA 7
Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração oral de *Lithothamnion calcareum* durante 90 dias em ratos Wistar

Grupos	Sexo	ALT** (U/L)	AST** (U/L)	GGT (U/L)	CK (U/L)	FAL (U/L)	Amilase (U/L)
Controle	Macho	67,9 ± 16,11	56,11 ± 1,90*	5,16 ± 5,08 ^{*A}	279,56 ± 304,89*	180,33 ± 65,04 ^{*A}	679,78 ± 181,57*
	Fêmea	72,70 ± 20,80	53,3 ± 4,52	1,10 ± 1,45 ^B	382,00 ± 381,66	147,4 ± 64,23 ^B	604,3 ± 117,62
1000 mg/kg	Macho	65,20 ± 12,29	56,00 ± 0,94	5,11 ± 4,70 ^A	205,70 ± 100,34	136,60 ± 45,43 ^A	665,30 ± 56,77
	Fêmea	65,00 ± 10,71	53,5 ± 4,33	5,15 ± 3,86 ^A	340,00 ± 415,84	93,20 ± 34,91 ^B	624,70 ± 137,33
2000 mg/kg	Macho	97,00 ± 94,44	54,70 ± 3,09	4,30 ± 9,44 ^A	234,10 ± 136,30	147,30 ± 19,10 ^A	652,10 ± 61,44
	Fêmea	130,20 ± 185,56	56,30 ± 2,83	2,20 ± 5,29 ^A	195,20 ± 67,15	133,80 ± 45,91 ^B	590,30 ± 94,16
Satélite Controle	Macho	67,60 ± 9,71	56,40 ± 2,97	8,20 ± 5,36	248,00 ± 109,05	183,00 ± 81,77	660,40 ± 49,58
	Fêmea	61,80 ± 12,87	55,20 ± 2,59	1,40 ± 1,14	156,40 ± 93,24	77,20 ± 31,85	517,00 ± 29,86
Satélite 2000 mg/kg	Macho	55,20 ± 5,54	42,00 ± 17,90	9,64 ± 2,43	174,80 ± 86,02	100,60 ± 12,72	634,40 ± 105,22
	Fêmea	61,40 ± 9,56	50,60 ± 1,67	14,50 ± 10,21	203,60 ± 76,66	105,80 ± 25,67	533,20 ± 20,32

Nota: AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, GGT – Gama glutamil transferase, CK creatinina quinase , FAL – fosfatase alcalina U – unidade internacional. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10 por grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste *Student-Newman Keuls* (p<0,05). Letras maiúsculas - comparação entre doses no mesmo sexo. Letras minúsculas, comparação entre sexos na mesma dose.* n=9 . ^(†) Difere do grupo controle. ^(‡) Difere do grupo 2000 mg/kg). **Variável com distribuição não normal avaliada pelo teste de *Kruskal-Wallis* (p<0,05).

TABELA 8
Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração oral de *Lithothamnion calcareum* durante 90 dias em ratos Wistar

Grupos	Sexo	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina*** (mg/dL)	Proteínas*** Totais (g/dL)	Albumina*** (g/dL)	Triglicérides (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
Controle	Macho	190,22 ± 49,49*	33 ± 3,61*	0,79 ± 0,15 ^{*bA}	8,89 ± 0,76 ^{*aA}	3,80 ± 0,24 ^{*aB}	44,78 ± 41,24*	112,78 ± 20,19 ^{*B}
	Fêmea	191,30 ± 52,81	33,7 ± 4,11	0,53 ± 0,20 ^{bA}	9,23 ± 0,86 ^{bA}	4,06 ± 0,44 ^{aA}	55,4 ± 18,46	127,1 ± 17,27 ^A
1000 mg/kg	Macho	157,20 ± 27,12	29,10 ± 4,86	0,86 ± 0,26 ^{bA}	8,21 ± 0,72 ^{bB}	3,36 ± 0,30 ^{bB}	98,50 ± 38,54	105,80 ± 19,28 ^B
	Fêmea	192,50 ± 77,45	31,30 ± 4,76	0,69 ± 0,20 ^{aA}	9,92 ± 0,67 ^{aA}	4,05 ± 0,24 ^{aA}	79,30 ± 49,09	129,30 ± 16,46 ^A
2000 mg/kg	Macho	159,60 ± 46,31	38,40 ± 7,06	1,15 ± 0,20 ^{aA}	7,62 ± 0,33 ^{cB}	3,12 ± 0,17 ^{bB}	37,50 ± 18,23	113,90 ± 9,16 ^B
	Fêmea	206,70 ± 59,24	34,20 ± 4,85	0,57 ± 0,16 ^{aB}	8,51 ± 0,31 ^{cA}	3,69 ± 0,19 ^{bA}	87,40 ± 82,83	111,90 ± 28,00 ^A
Satélite Controle	Macho	172,80 ± 30,16	32,80 ± 4,27	0,96 ± 0,18 [†]	7,50 ± 1,08 [†]	3,10 ± 0,37 [†]	24,40 ± 14,62	99,00 ± 18,97
	Fêmea	142,20 ± 13,70	34,40 ± 4,51	1,08 ± 0,27 [†]	8,40 ± 0,20 [†]	3,58 ± 0,08 [†]	51,20 ± 20,81	128,00 ± 10,93
Satélite 2000 mg/kg	Macho	147,20 ± 39,10	52,00 ± 6,00 [‡]	0,88 ± 0,16 [‡]	7,14 ± 0,15 [¶]	2,62 ± 0,11 [¶]	31,60 ± 20,53	83,6 ± 19,44
	Fêmea	136,20 ± 34,49	39,40 ± 6,80 [‡]	0,64 ± 0,05	8,36 ± 0,36 ^{¶‡}	3,08 ± 0,57 [‡]	50,40 ± 22,61	128,60 ± 18,16

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=10 por grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$). Letras maiúsculas – comparação entre doses no mesmo sexo. Letras minúsculas, comparação entre sexos na mesma dose. † Difere do grupo controle. ‡ Difere do grupo 2000 mg/kg. * n=9. ***Variável com interação sexo x dose.

TABELA 9
Efeito nos parâmetros bioquímicos após a administração oral de *Lithothamnion calcareum* durante 90 dias em ratos Wistar

Grupos	Sexo	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Ácido Úrico (mg/dL)	Cálcio (mg/dL)	Cloro mEq/L	Fósforo (mg/dL)
Controle	Macho	0,36 ± 0,19*	0,11 ± 0,06*	0,97 ± 0,13*	9,96 ± 0,98 ^a	103 ± 2,78*	9,49 ± 0,65*
	Fêmea	0,28 ± 0,15	0,07 ± 0,05	2,12 ± 2,02	11,24 ± 2,13 ^a	113,7 ± 25,35	8,88 ± 1,2
1000 mg/kg	Macho	0,24 ± 0,10	0,18 ± 0,33	1,11 ± 0,48	10,09 ± 1,23 ^a	102,20 ± 6,71	8,86 ± 1,09
	Fêmea	0,45 ± 0,20	0,08 ± 0,04	1,53 ± 2,20	9,84 ± 0,50 ^a	99,00 ± 1,49	8,66 ± 0,54
2000 mg/kg	Macho	0,28 ± 0,15	0,08 ± 0,06	1,85 ± 2,14	8,94 ± 0,88 ^b	107,60 ± 4,86	9,63 ± 1,25
	Fêmea	0,48 ± 0,27	0,11 ± 0,04	0,96 ± 0,22	9,37 ± 0,80 ^b	110,70 ± 4,27	8,90 ± 1,70
Satélite Controle	Macho	0,27 ± 0,10	0,10 ± 0,05	1,28 ± 0,32	10,38 ± 2,15	111,80 ± 3,35	9,72 ± 0,87
	Fêmea	0,22 ± 0,04	0,08 ± 0,03	1,42 ± 0,82	9,80 ± 0,67	108,20 ± 3,03	9,08 ± 1,67
Satélite 2000 mg/kg	Macho	0,46 ± 0,09	0,12 ± 0,02	1,10 ± 0,29	8,54 ± 0,25	83,80 ± 10,64 [¶]	9,80 ± 1,48
	Fêmea	0,38 ± 0,09	0,08 ± 0,05	1,26 ± 0,55	10,10 ± 0,44	100,00 ± 8,60 [‡]	8,88 ± 0,83

Nota: Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n = 10 por grupo. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de *Student-Newman Keuls* ($p < 0,05$). Letras maiúsculas – comparação entre doses no mesmo sexo. Letras minúsculas, comparação entre sexos na mesma dose. * n = 9. († Difere do grupo controle) ¶ Difere do grupo 2000 mg/kg

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado efeito de protetor de *Lithothamnion calcareum* sobre a mucosa gástrica na dose de 480 mg/kg de *Lithothamnion calcareum* e 380 mg/kg de carbonato de cálcio (CaCO_3) em lesões de menor intensidade (lesões tipo 1). Observou-se também aumento do pH gástrico nessas duas doses. Porém, nas demais doses testadas (30 e 120 mg/kg) e em lesões mais intensas (2 e 3) não foi observada irritação e proteção, assim como alteração do pH em relação ao controle. As doses menores parecem não terem sido suficientes para atenuar a irritação gástrica.

Pesquisas sugerem que a etiologia do dano da mucosa gástrica etanol-induzida é devido à perda excessiva de cálcio intracelular (KOO; CHO; OGLE, 1986). A habilidade do cálcio em diminuir o efeito prejudicial do etanol na mucosa gástrica pode ser devido ao efeito de estabilização de membrana (KOO, 1994). Além disso, segundo Koo (1994), o cálcio pode se ligar em local específico na membrana da célula para reduzir a permeabilidade da membrana da mucosa gástrica e também fortalecer a barreira da mucosa.

Também existem relatos de que o cálcio aumenta a regeneração de lesões gástricas etanol-induzidas, devido ao fato de que secreções de bicarbonato também são induzidas pela presença de cálcio, promovendo ambiente favorável para a recuperação (KOO; CHO; OGLE, 1986). Tal fato pode explicar o aumento do pH com a administração das doses no presente estudo.

Sabe-se que *Lithothamnion calcareum* tem em sua composição alta concentração de CaCO_3 (DIAS, 2001; MELO; FURTINI NETO, 2003). Dessa forma, podemos sugerir que o efeito de proteção gástrica na maior dose (480 mg/kg) seja em função do cálcio, visto que as mesmas alterações também ocorreram quando administrou-se CaCO_3 . Considerando que os efeitos anti-inflamatórios observados foram nas doses de 10 a 100 mg/kg (*in press*) os resultados obtidos no presente estudo foram satisfatórios para esse efeito.

Quanto à segurança do produto, devido ao fato de não haver diferença entre o grupo controle e o grupo teste, verificou-se que *Lithothamnion calcareum*, na dose de 2000 mg/kg não apresentou risco toxicológico agudo (OECD, 2001). Na avaliação dos parâmetros comportamentais, também não foram observados alterações ou sinais de toxicidade nos animais. O consumo de água e de ração do grupo teste foram estatisticamente iguais aos do grupo controle durante os 14 dias de avaliação.

Os estudos pré-clínicos têm como objetivo a caracterização dos efeitos tóxicos considerando órgão alvo, dose dependência, tempo de exposição, reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem ou desaparecem. Existem órgãos com grandes diferenças na capacidade regenerativa de suas células, como por exemplo, o fígado. Outros sistemas apresentam baixa capacidade de regeneração, como o sistema nervoso central (EATON; KLASSEN, 1996). Essas informações são importantes para a estimativa da dose segura inicial para os ensaios clínicos e identificação de parâmetros para a monitorização clínica dos efeitos adversos potenciais (FDA, 2008).

De acordo com o Programa Nacional de Toxicologia - NTP - dos Estados Unidos, é importante que os animais sobreviventes não percam mais do que 10% da massa corporal inicial (EATON; KLAASSEN, 1996), uma vez que mudanças na massa corporal são indicativos de efeitos adversos (RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002). No presente estudo, não houve diferença estatística entre a massa corporal (relação massa corporal/peso órgãos) dos animais do grupo teste em relação ao grupo controle.

Somado a isso, o peso dos órgãos e análises histopatológicas do presente estudo comprovaram que a dose única de 2000 mg/kg do produto não causou danos no organismo dos animais.

No teste de toxicidade subcrônica, para a escolha das doses a serem usadas, observação clínica no ensaio de toxicidade aguda é importante, associado também aos estudos de atividade farmacológica em animais (HASUMURA *et al.*, 2004; JANBAZ; SAEED; GILANI, 2002). A seleção das doses é um ponto crítico, uma vez que a perda de mais de 10% dos animais invalida o estudo (EATON; KLAASSEN,

1996). No presente estudo, o ensaio de toxicidade aguda forneceu subsídios para o sub-crônico.

No teste de toxicidade sub-crônica não houve diferença no consumo de água. Não houve também alteração na massa corporal dos animais, apesar dos grupos que receberam doses de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg terem consumido mais ração que o grupo controle. Isso pode ser explicado pelo consumo elevado de cálcio favorecer a mobilização de lipídios (MELANSON *et al.*, 1993).

Estudos mostram que existe relação entre consumo de cálcio e adiposidade em ratos e humanos. Dietas ricas em cálcio provocaram menor ganho de massa corporal em ratos, apesar de não haver diferença no consumo de ração (ZEMEL, 2004). Relatos na literatura têm demonstrado ainda, relação inversa entre o consumo de produtos lácteos (ricos em cálcio) e a incidência da síndrome metabólica que inclui obesidade, hipertensão, hipertrigliceridemia e resistência à insulina (PEREIRA; GOMES, 2002). Um mecanismo proposto seria de que o consumo de produtos com alto teor de cálcio aumentaria a lipólise por promoverem a oxidação da gordura (ZURLO *et al.*, 1990).

Esses fatos dão suporte ao maior consumo de ração dos animais que receberam a alga durante 90 dias não apresentarem aumento da massa corporal em relação ao grupo controle.

Quanto ao peso dos órgãos, houve aumento do coração, rim e glândulas supra-renais, baço, fígado, estômago e cérebro, entretanto, essa diferença de peso encontrada não apresentou significado clínico, como confirmado pela avaliação histopatológica.

Em relação aos parâmetros bioquímicos que sofreram alteração, encontram-se o cálcio, albumina, proteínas totais e creatinina, todos relacionados à função renal. Os demais permaneceram estatisticamente iguais ao controle. Esse quadro pode ter ocorrido devido à quantidade de cálcio ingerida pelos animais. Estudos revelam que a ingestão de cálcio em grandes quantidades pode causar hipercalcemia (CARCIOFII *et al.*, 2006; LOCATELLI *et al.*, 2002; MOE, 2008) e esse quadro pode gerar insuficiência renal (MOE, 2008).

A insuficiência renal pode ocorrer em poucas horas ou dias ou, ao contrário, instalar-se gradativamente, evoluindo ao longo de vários anos até alcançar os estágios terminais. Assim, a existência de dois tipos de insuficiência renal, cujas características são específicas de cada um, sendo que a insuficiência renal aguda pode evoluir para as formas crônicas da doença (COSTA; YU, 1997; THADHANI; PASCUAL; BONVENTRE, 1996).

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos do presente estudo constatou-se diminuição do cálcio nos animais que receberam a dose de 2000 mg/kg. Entretanto, as alterações bioquímicas e hematológicas ocorridas e que podem ser visualizadas nos resultados e a composição da alga utilizada sugerem a ocorrência de hipercalemia. A hipercalemia pode apresentar níveis de cálcio séricos normais ou diminuídos na tentativa do organismo de manter equilibrado o metabolismo do mineral, a chamada fase compensatória. Quando ocorre aumento diminuto na concentração de íon cálcio no sangue, aumenta acentuadamente a excreção de cálcio e diminui a absorção intestinal (BOURDEAU; ATTIE, 1994; JOHNSON; KUMAR, 1994), o que explica a diminuição sérica dos níveis de cálcio no presente estudo. Depois de instalado o dano renal é comum a ocorrência da perda de cálcio, diminuindo assim sua concentração sérica (HENRY, 1995).

O cálcio ionizado representa a fração biologicamente ativa do cálcio total. A hipercalemia acontece quando os níveis de cálcio ionizados (não total) aumentam no soro. A intensidade dos sintomas causados pela hipercalemia depende da magnitude da mesma e da taxa de elevação do cálcio ionizado no soro (MOE, 2008), o que explica a ausência de sinais clínicos de toxicidade nos animais do presente estudo.

Devido à poliúria causada pela elevação do cálcio ionizado no soro, ocorre grande depleção de volume. Assim a hipercalemia pode conduzir um quadro de complicações renais à falência renal aguda. A patogênese da insuficiência renal na hipercalemia está relacionada à hipercalemiúria, que se caracteriza por hiperexcreção de cálcio na urina, que pode acarretar aumento da diurese por osmose e conseqüentemente depleção volêmica e insuficiência renal (MOE, 2008). Esse fato também pode estar relacionado à diminuição do cálcio sérico nos animais do presente estudo.

Houve diminuição também da albumina e proteínas totais no soro dos animais que receberam a dose de 2000 mg/kg. Sabe-se que os níveis de proteínas no soro podem sofrer diminuição devido à proteinúria em casos de complicações renais. A proteinúria é um marcador de doença renal e constitui um fator de risco independente para a sua progressão (HENRY, 1995).

Somado a isso, houve aumento da creatinina sérica dos animais que receberam a dose de 2000 mg/kg. A creatinina é o principal marcador de nefrotoxicidade. Isso decorre em virtude da creatinina ser de produção endógena e liberada nos líquidos corporais em taxa constante e seus níveis plasmáticos permanecerem dentro de limites estreitos, assim, sua depuração pode ser indicadora da taxa da filtração glomerular. Quando ocorre a patologia renal, há início da perda progressiva da filtração glomerular e conseqüentemente a elevação da creatinina no plasma. Durante o curso da insuficiência renal ocorrem incrementos discretos, mas constantes de creatinina plasmáticas (BALBI *et al.*, 2005; HSU; CHERTOW, 2002; KAMEL *et al.*, 2000; PACHECO *et al.*, 2005).

Pelo fato de ser lenta e progressiva, a perda da função dos nefrões resulta em processos adaptativos que, até certo ponto, mantêm o quadro assintomático (LEVEY, 2002). Esse fato está de acordo com os sinais clínicos normais observados nos animais.

Entre todos os parâmetros discutidos acima e comparados aos grupos satélites, apenas a creatinina sérica dos machos foi reversível. Os outros parâmetros bioquímicos não apresentaram reversibilidade. Diante desses fatos, pode-se observar que o organismo dos animais não foi capaz de recuperar o dano causado pela alga, quando se trata de alterações bioquímicas nas doses utilizadas.

Além disso, a doença renal pode progredir independentemente da presença do fator inicial. Estudos em animais de laboratório mostram que a remoção cirúrgica de grandes porções do rim causa alterações adaptativas dos néfrons remanescentes, aumentando o fluxo sanguíneo, a filtração glomerular e o débito urinário (BREGMAN, 2004). Os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações não são bem compreendidos, mas envolvem a hipertrofia dos néfrons remanescentes, bem como as alterações funcionais que diminuem a resistência vascular, a

reabsorção tubular nos néfrons sobreviventes e a vasodilatação de suas arteríolas aferentes (BRENNER; MEYER; HOSTETTER, 1982). Essa hiperperusão leva a uma hipertensão glomerular com conseqüente hiperfiltração glomerular e lesão das estruturas glomerulares (BRENNER; MEYER; HOSTETTER, 1982). Isso explica a irreversibilidade dos parâmetros que sofreram alteração no presente estudo.

A reversibilidade dos efeitos tóxicos indica a capacidade de reação do organismo ao receber a droga (EATON; KLAASSEN, 1996). Além disso, vale a pena ressaltar que as doses utilizadas no presente estudo são muito superiores à faixa de doses que está sendo estudada (10 a 100 mg/kg) para eficácia anti-inflamatória.

Cabe ainda ressaltar que alguns parâmetros bioquímicos que sofreram alterações parecem de certa forma estar relacionados não somente aos rins, mas também ao fígado. As proteínas séricas, entre elas a albumina, são sintetizadas por esse órgão. As doenças hepáticas podem diminuir as proteínas séricas por alterar sua síntese, pela degradação aumentada ou por promover a perda extravascular (HENRY, 1995).

Ainda em relação ao fígado, observou-se que não houve alterações das transaminases (ALT e AST). Isso indica que provavelmente não houve dano celular hepático (comprovado pela análise histopatológica), pois essas enzimas têm sido utilizadas como marcadores de danos hepatocelulares há décadas (HENRY, 1995), entretanto, a diminuição sérica da albumina e proteínas totais pode ter ocorrido devido à diminuição da síntese das mesmas. A partir desses dados podemos sugerir que essa perda protéica pode ter ocorrido devido ao dano renal ou devido à diminuição na síntese de proteínas pelo fígado, não descartando a hipótese de haver relação entre os dois fatores citados, visto que doença renal com albuminúria pode ser causa de hipoalbuminemia em pacientes com doença hepática (HENRY, 1995).

Sabe-se também que em casos de lesão hepática já estabelecida, foi evidenciado aumento na excreção urinária do cálcio (HENRY, 1995). O que também pode ter causado a diminuição sérica dos níveis de cálcio no presente estudo. Entretanto, as outras enzimas relacionadas à função hepática não apresentaram alterações e as análises histopatológicas também confirmaram a ausência de dano celular hepático. Por outro lado, os marcadores da função renal apresentaram alteração. Esses dados

servem de base para atribuir as alterações ocorridas ao dano renal, que pode estar associado ou não a um leve dano hepático.

Vale, porém, ressaltar que a hepatotoxicidade apresenta baixo valor preditivo quando comparada aos humanos. Em animais, os biomarcadores de hepatotoxicidade são relativamente insensíveis, mas esta correlação é aumentada quando estudos de histopatologia são realizados (OLSON *et al.*, 2000).

A avaliação de risco de um produto farmacêutico é estudada devido as suas condições de uso serem mais facilmente monitoradas em relação aos agrotóxicos ou contaminantes ambientais, que não possuem uma exposição determinada. Produtos farmacêuticos são rotineiramente avaliados, principalmente durante a triagem clínica, pois permitem a avaliação de possíveis riscos levantados na fase pré-clínica, baseando-se na exposição relativa e nos efeitos (STEVES; MYLECRAINE, 1994).

Normalmente, o processo de manejo de xenobióticos consiste em quatro etapas (DESCOTES, 2003; STEVES; MYLECRAINE, 1994;). A primeira é a identificação do risco, em que a comparação de dados clínicos e dados obtidos com animais podem ser usados em várias ocasiões, em caso de uso inadvertido em pacientes ou voluntários, que são expostos a altas doses de determinado xenobiótico (STEVES; MYLECRAINE, 1994).

A segunda etapa é a avaliação da relação dose-resposta, a partir da interação de resultados pré-clínicos e dados clínicos. A terceira consiste na avaliação da exposição, que não pode ser feita apenas pela determinação do xenobiótico em fluidos biológicos. Devem ser determinados através de biomarcadores, sendo essa fase de extrema importância. A identificação e a validação dos biomarcadores requerem a interação entre pesquisa científica, estudos em animais e clínicos (DESCOTES, 2003; STEVES; MYLECRAINE, 1994).

A quarta e última fase é a de caracterização do risco, com base nos dados obtidos nas fases anteriores, associados a fatores de incerteza e dados epidemiológicos, que podem auxiliar em relação à exposição humana ao xenobiótico, quando existir. Para isso, necessita-se incluir dados clínicos mais extensivamente (DESCOTES, 2003; STEVES; MYLECRAINE, 1994).

Estudos para avaliar a segurança de produtos naturais são essenciais, uma vez que existem na literatura relatos de vários desses produtos popularmente utilizados que predispõem à nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (CORNS, 2003; PITTLER; ERNEST, 2003; STEDMAN, 2002). A alga *Lithothamnion calcareum* apesar de não ter exercido grande papel na proteção da mucosa gástrica em ratos, também não causou aumento da irritação gástrica, fato que ocorre com a utilização de anti-inflamatórios não esteroides. Esse é um importante dado a ser analisado, pois essa alga pode ser uma alternativa na terapia da inflamação, conforme resultados (em estudos pelo grupo) em doses menores que as utilizadas no presente estudo.

Quanto aos estudos de toxicidade de *Lithothamnion calcareum* foi mostrado que essa alga pode causar algumas alterações nos parâmetros bioquímicos, entretanto, a maior parte das alterações foram observadas na dose de 2000 mg/kg, que é uma dose excessivamente alta em relação à faixa de dose que está sendo estudada (10 a 100 mg/kg). Esses dados confirmam a segurança do produto, devendo, porém, o referido estudo ser continuado (ensaio crônico) para verificação da ocorrência de insuficiência renal e para possível elucidação dos mecanismos de toxicidade pré-clínica.

O produto Vitalidade 50 +[®] tem sido utilizado na dose de 1 g/dia por indivíduo (14 mg/kg/dia), ou seja, a dose utilizada no presente estudo (2000 mg/kg) que causou alterações nos parâmetros bioquímicos foi cerca de 140 vezes maior. Esses dados confirmam a segurança do produto nas doses utilizadas, justificando a continuidade dos estudos de segurança pré-clínica.

Concluindo, sugere-se, porém, que as funções renal e hepática em usuários desse produto por longo prazo e em indivíduos portadores de nefropatia e hepatopatia pré-existentes devam ser avaliadas frequentemente.

REFERÊNCIAS

Al-SHABANAH, O. A. *et al.* Effect of ninhydrin on biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. *Life Sciences*, v. 67, n. 5, p. 559-566, 2000.

ALVAREZ, A. *et al.* Gastric antisecretory and antiulcer activities of an ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schult. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, n. 3, p. 333-340, 1999.

ARNT, R. Tesouro verde. *Exame*, p. 52-64, 2 maio 2001.

BALBI, A. L. *et al.* Mortalidade e prognóstico específico em pacientes com insuficiência renal aguda. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 51, n. 6, p. 318-322, 2005.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Fundamentos de toxicologia. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Ateneu, p. 1-115, 2008.

BAST, A. *et al.* Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environmental Toxicology and Pharmacology*., v. 12, p. 195-211, 2002.

BEEJAY, U.; WOLFE, M. M. Acute gastrointestinal bleeding in the intensive care unit: the gastroenterologist's perspective. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 29, n. 2, p. 309-336, 2000.

BERLINCK, R. G. S. *et al.* Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 3, p. 510-522, 2004.

BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 23, n. 1, p. 26-78, 2006.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity: prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro*, Oxford, v. 18, n. 2, p. 227-230, 2004.
BOURDEAU, J. E.; ATTIE, M. F. Calcium metabolism. In: MAXWELL.; KLEEMAN'S, *Clinical disorders fluids and eletrolites metabolism*. 5. ed. McGraw Hill, 1994. p. 243-306.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução RDC n. 48*, 16 mar. 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução RDC n. 134*, 29 maio 2003. Dispõe sobre adequação de medicamentos já registrados. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. *Resolução n.1*, 13 jun. 1988. Aprova normas de pesquisa em saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 14 jun. 1988.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Portaria n. 116*, 8 ago. 1996. Aprova norma para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. *Diário Oficial*, Brasília, 12 ago. 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Resolução RDC n. 17*, 24 fev. 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial*, Brasília, 25 fev. 2000.

BREGMAN, R. Prevenção da progressão da doença renal crônica (DRC). *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 26, n. 3, p. 11-14, 2004.

BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular sclerosis in aging, renal ablation and intrinsic renal disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 307, n. 11, p. 652-659, 1982.

BRITO, A. R. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *Journal of Ethnopharmacology*, Chicago, v. 54, n. 2-3, p. 131-138, 1996.

CANÇADO, P. Empreendedores: toque de midas. *Forbes Brasil*, s/v, s/n, p. 64-69, 2001.

CARCIOFI, A. C. *et al.* Nutritional composition and label evaluation of dry dog foods sold in Jaboticabal-SP. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 3, p. 421-426, 2006.

CELOTTI, F.; LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem: the dual inhibition concept. *Pharmacological Research*, Nanjing, v. 43, n. 5, p. 429-436, 2001.

COLMAN, R. W. *et al.* Hemostasis and thrombosis. In: LIPPINOCTT, J. B. 3. ed. Philadelphia: 1994. p. 837-860.

CORNS, C. M. Herbal remedies and clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 40, n. 5, p. 489-507, 2003.

COSTA, M. C.; YU, L. Insuficiência renal aguda. *Ars Curandi*, v. 30, p. 115-121, 1997.

DAWES, C. J. *Marine botany*. New York: John Wiley & Sons Inc. 1981.

DESCOTES, J. From clinical to human toxicology: linking animal research and risk assesment in man. *Toxicology Letters*, Lyon, v. 140-141, n. 11, p. 3-10, 2003.

DIAS, C. T. M. Granulados bioclásticos: algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*, v. 8, p. 307-318, 2000.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1996. Chapter 2, p.13-33.

FAULKNER, D. J. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek*, San Diego, v. 77, n. 2, p. 135-145, 2000.

FDA (Food and Drug Administration). Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for industry: Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs*. Editora, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: dez. 2008.

FÉRES, C. A. *et al.* Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *Journal Ethnopharmacology*, v. 108, n. 3, p. 450-456, 2006.

FONG, H. H. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. *Integratives Cancer Therapies*, v. 1, n. 3, p. 287-293, 2002.

GEREZ, J. C. Indústria farmacêutica: histórico, mercado e competição. *Ciência Hoje*, v. 15, n. 89, p. 21-30, 1993.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *The FASEB Journal*, Winnipeg, v. 6, n. 3, p. 825-831, 1992.

GONZALEZ, F. G. *et al.* Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilcifolia*. *Jornal of Ethnopharmacology*, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001.

GREAVES, P.; WILLIAMS, A.; EVE, M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 3, p. 226-236, 2004.

GUBBELS-VANHAL, W. M. *et al.* An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals: an exercise in integrated testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 42, n. 3, p. 284-295, 2005.

GUNTER-REMY, U.; SONICH-MULLIN, C. The use of toxicokinetic and toxicodynamic data in risk assessment: an international perspective. *The Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 288, n. 1-2, p. 3-11, 2002.

HASUMURA, M. *et al.* Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 3, p. 439-444, 2004.

HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos de Tratamento por métodos laboratoriais*. 18 ed. São Paulo: Mande, 1995. 261 p.

HILALY, J. E. L.; ISRAILI, Z.; LYOUSSI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004.

HIRUMA-LIMA, C. A. *et al.* Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* benth. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HSU, C.; CHERTOW, G. M. Elevations of serum phosphorus and potassium in mild to moderate chronic renal insufficiency. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.17, n. 8, p. 1419-1425, 2002.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protetive effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, v. 73, n. 7-8, p. 557-563, 2002.

JOHNSON, J. A.; KUMAR, R. Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent binding proteins. *Seminars in Nephrology*, v. 14, n. 2, p. 119-128, 1994.

JONES, B. H. *et al.* Upregulation of adipocyte metabolism by agouti protein: possible paracrine actions in yellow mouse obesity. *American Journal of Physiology*, v. 270, n. 1, p. 192–196, 1996.

JORGE, R. M. *et al.* Avaliação anti-inflamatória, antinociceptiva e antiulcerogênica da *Maytenus ilicifolia* in vivo. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 14, n. 2, p. 102S-102S, 2004.

KAMEL, K. S. *et al.* Disorders of potassium balance. In: BRENNER, B. M. *The kidney*. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.

KANJANAPOTHI, D. *et al.* Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, n. 2-3, p. 359-365, 2004.

KOO, M. W. L. The effects of milk and calcium on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Hong Kong Pharmacological Research*, v. 29, n. 3, p. 217, 1994.

KOO, M. W. L.; CHO, C. H.; OGLE, C. W. Verapamil worsens ethanol-induced gastric ulcers in rats. *European Journal of Pharmacology*, Hong Kong, v. 120, n. 3, p. 355-358, 1986.

KRYSIK, B.; RYDZYNSKI, K. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. *Medycyna Pracy*, v. 48, n. 5, p. 561-578, 1997.

LA CASA, C *et al.* Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.

LEVEY, A. S. Clinical practice: nondiabetic kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 19, p.1505-1551, 2002.

LIMA, L. M. L. *et al.* Doses de *Lithothamnion calcareum* sobre o desenvolvimento de plantas de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Uberlândia, v. 20, n. 2, 2002.

LIPTAK, J. M. *et al.* Gastroduodenal ulceration in cats: eight cases and a review of the literature. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 4, n. 1, p. 27-42, 2002.

LOCATELLI, F. *et al.* Management of disturbances of calcium and phosphate metabolism in chronic renal insufficiency, with emphasis on the control of hyperphosphatemia. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 17, p. 723-731, 2002.

MAKOVEC, F. *et al.* Characterization of antisecretory and antiulcer activity of CR 2945, a new potent and selective gastrin/CCK_B receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, v. 369, n. 1, p. 81-90, 1999.

MATSUI, M. S. *et al.* Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 104, n. 1, p. 13-22, 2003.

McCARTHY, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastrointestinal toxicity: definitions and epidemiology. *American Journal of Medicine*, v. 105, n. 5, p. 3S-5S, 1998.

MELANSON, E. L. *et al.* Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders*, v. 27, n. 2, p. 196-203, 2003.

MELO, J. U. S. *et al.* Efeitos do dimetilsulfóxido no estresse oxidativo e na regeneração hepática pós-hepatectomia em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*, v. 35, n. 2, p. 103-108, 2008.

MELO, P. C.; FURTINI NETO, A. E. Avaliação do Lithothamnion como corretivo da acidez do solo e fonte de nutrientes para o feijoeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n.3, p. 508-519, 2003.

MOE, S. M. Disorders involving calcium, phosphorus and magnesium. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, Indianapolis, v. 35, n. 2, p. 215-237, 2008.

MELANSON, E. L. *et al.* Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *International Journal of Obesity Related Metabolism Disorder* v. 27, p. 196-203, 2003.

OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology*, Connecticut, v. 94, n. 1, p. 10-21, 1988.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 401. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1987

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1998.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 425. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OLSON, H. *et al.* Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, n. 1, p. 56-67, 2000.

PACHECO, L. R. *et al.* Insuficiência renal aguda associada ao uso de aciclovir endovenoso. *Revista da Associação Médica Brasileira* v. 51, n. 5, p. 275-278, 2005.

PAL, S. K.; SHUKLA, Y. Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pacific Journal of Cancer prevention*, Thailand, v. 4, n. 4, p. 281-288, 2003.

PALMEIRO, N. M. S. *et al.* Oral subchronic toxicity of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 88, n. 1, p. 15-18, 2003.

PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: Interciencia, 2002. Cap. 11, p. 229-248.

PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D.; GÓMEZ, B. C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, n. 1, p. 1-3, 2001.

PIHAN, G.; ROGERS, C.; SZABO, S. Vascular injury in acute gastric mucosal damage: mediatory role of leukotrienes. *Digestive Diseases and Sciences*, Boston, v. 33, n. 5, p. 625-632, 1988.

PITTLER, M. H.; ERNEST, E. Systematic review: hepatotoxic events associated with herbal medicine products. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 18, n. 5, p. 451-471, 2003.

PRITCAHRD, J. F. *et al.* Decision gates in non-clinical drug development. *Nature Reviews*, v. 2, n. 7, p. 542-553, 2003.

RASKIN, I. *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, v.20, n.12, p. 522-531, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Algas verdes, vermelhas e pardas. 1996. Disponível em: <<http://www.cienciasbiologicas.hpg.ig.com.br/algasciano.htm>>. Acesso em: 27 mar. 2008.

RAZA, M. *et al.* Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, v. 70, p. 135-145, 2002.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. *Pathologic basics of disease*. 6. ed. New York: W.B. Saunders Company, 1998. 1425p.

ROCHA, I. P. Aqüicultura: um excelente negócio. *Revista Brasileira de Agropecuária*, São Paulo, v. 1, n. 11, p. 6–12, 2001.

SAIRAM, K. *et al.* Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinallis*: an experimental study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2002.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SCHEWENK, M.; WERNER, M.; YOUNES, M. Regulatory toxicology: objectives and tasks defined by the working group of the German society of experimental and clinical pharmacology and toxicology. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v.126, n.3, p.145-153, 2002.

SEITO, N. L.; MAZARO, R.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of the *Austroplenckia populnea* extracts in mice. *Phytotherapy Research*, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 193-196, 2002.

SPINDLER, P.; SJOBERG, P.; KNUDSEN L. E. First exposure in man: toxicological considerations. *Pharmacology and Toxicology*, Copenhagen, v.86, n. S1, p. 8-12, 2000.

STAMMATI, A. *et al.* Thirteenth international workshop on *in vitro* toxicology. *Toxicology In Vitro*, v. 19, n. 7, p. 843-844, 2005.

STEDMAN, C. Herbal hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease*, v. 22, n. 2, p. 195-206, 2002.

STEVENS, K. R.; MYLECRAINE, L. Issues in chronic toxicology. In: HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*. 3 ed. New York: Raven Press, 1994. p. 673-695.

SUN, X. C.; ZEMEL, M. B. Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-agouti transgenic mice. *Journal of Nutrition*, Knoxville, v. 134, n. 11, p. 3054-3060, 2004.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. *Archives of Toxicology*, Frankfurt, v. 41, n. 1, p. 67-71, 1978.

TAGLIATI, C. A. Analgésicos e Anti-reumáticos. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 4, p. 325-563

TAN, P. V. *et al.* Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, n. 2-3, p. 69-74, 2002.

TEO, S. *et al.* A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague Dawley rats. *Toxicology*, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J. V. Acute renal failure. *The New England Journal of Medicine*, v. 334, n. 22, p. 1448, 1996.

TSUKIMI, Y. *et al.* Endogenous nitric oxide proves not to be involved in the inhibition by IL-1beta of TGF-alpha-stimulated proliferation of RGM1 cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 51, n. 3, p. 411-419, 2000.

TWEDT, D. C.; MAGNE, M. L. Moléstias do estômago. In: ETTINGER, S.J. *Tratado de medicina interna veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. Cap. 85, p. 1353-1386.

VALADARES, M.C, Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a

“era do teste DL₅₀”. *Revista eletrônica de farmácia*, Goiânia, v.3(2), p.93-98, 2006.

VIDOTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100024>. Acesso em: 12 mar. 08.

XUE, B. *et al.* Mechanism of intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *The FASEB Journal*, Winnipeg, v. 15, n. 13, p. 2527-2529, 2001.

XUE, B. Z. *et al.* The agouti gene product inhibits lipolysis in human adipocytes via a Ca²⁺-dependent mechanism. *The FASEB Journal*, Winnipeg, v. 12, n. 13, p. 1391-1396, 1998.

YOTSU-YAMASHITA, M. *et al.* Identification of polycavernoside A as the causative agent of the fatal food poisoning resulting from ingestion of the red alga *Gracilaria edulis* in the Philippines. *Chemical Research in Toxicology*, v. 17, n. 9, p. 1265-1271, 2004.

ZEMEL M. B. *et al.* Regulation of adiposity by dietary calcium. *The FASEB Journal*, Winnipeg, v. 14, n. 9, p. 1132-1138, 2000.

ZEMEL, M. B. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *American Journal of Clinical Nutrition*, Knoxville, v. 79, n. 5, p. 907S-912S, 2004.

ZEMEL, M. B. Role of dietary calcium and dairy products in modulating adiposity. *Lipids*, Knoxville, v. 38, n. 2, p. 139-146, 2003.

ZEMEL, M. B. The role of dairy foods in weight management. *Journal of the American College of Nutrition*, Knoxville, v. 24, n. 6S, p. 537S-546S, 2005.

ZURLO, F. *et al.* Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. *American Journal Physiology*, v. 259, n. 1, p. E650-E657, 1990.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 72/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação gastrotóxica e toxicológica do *Lithothamnion calcareum***", que tem como responsável **Carlos Alberto Tagliati**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/08/2007**.

Este certificado expira-se em **8/08/2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 72/2007**, related to the project entitled "**Gastrotoxic and toxicology evaluation of *Lithothamnion calcareum***", under the supervision of **Carlos Alberto Tagliati**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 8, 2007**.

This certificate expires in **August 8, 2012**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br