

Avaliação da toxicologia clínica do xarope Melagrião® em voluntários saudáveis

Clinical toxicology of Melagrião® syrup in healthy volunteers

Ismenia Osório Leite Viana^{1,4}, Maria Elisabete Amaral de Moraes², Manoel Odorico de Moraes Filho², Fernando Antônio Frota Bezerra², Francisco Vagnaldo Fechine Jamaru², Demétrius Fernandes do Nascimento², Fernando André Campos Viana³, Sérgio Luís da Silva Pereira³

¹ Centro de Ciências da Saúde, Curso de Enfermagem, Universidade de Fortaleza

² Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará

³ Centro de Ciências da Saúde, Curso de Odontologia, Universidade de Fortaleza.

⁴ Autor para Correspondência (*Author for correspondence*): ismeniaosorio@yahoo.com

Resumo

O expectorante Melagrião® é um fitoterápico composto de seis plantas medicinais com ação no trato respiratório. O objetivo deste estudo foi avaliar a segurança e o potencial genotóxico do Melagrião® em voluntários saudáveis, por meio de um estudo duplo-cego, controlado, randomizado e paralelo, com 48 voluntários adultos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Melagrião® (n=24) e Placebo (n=24). Os voluntários foram tratados durante 28 dias ininterruptos com 120 mL de Melagrião® ou Placebo dividido em 4 doses diárias. Avaliações clínicas e laboratoriais foram realizadas no pré-estudo, durante o período de tratamento e ao término do estudo. A genotoxicidade do Melagrião® foi investigada mediante o emprego do teste do cometa. A idade média dos voluntários foi de $19,37 \pm 17,36$ anos para o grupo Melagrião® e de $24,70 \pm 23,50$ para o grupo Placebo. O índice de massa corpórea (IMC) foi de $24,49 \pm 1,11$ kg/cm² para o grupo Melagrião® e de $25,34 \pm 1,03$ para o grupo Placebo. As funções hematológica, hepática, renal e metabólica foram analisadas antes, durante (7º, 14º e 28º dia) e 7 dias após o estudo através dos exames laboratoriais, os quais não evidenciaram sinais de toxicidade. Cefaleia, vômito, dor abdominal, tosse seca, sonolência, diarreia, flatulência, pirose e insônia foram os eventos adversos atribuídos aos dois grupos. Pelo teste do cometa não foram observados danos nos linfócitos periféricos dos voluntários tratados com o Melagrião® ($p < 0,05$). Os estudos de toxicologia clínica e genotoxicidade não evidenciaram nenhuma toxicidade nos voluntários tratados por 28 dias ininterruptos com o Melagrião®.

Palavras-chave: Fitoterápico, Toxicologia clínica, Estudo clínico controlado.

Abstract

The expectorant Melagrião® is a phytotherapeutic medicine composed of six medicinal plants with action in the respiratory tract. The aim of this study was to evaluate the safety and the genotoxic potential of Melagrião® in healthy volunteers and consisted of a double-blind, placebo-controlled, randomized, parallel, with 48 adults subjects, randomly divided into two groups: Placebo (n=24) and Melagrião® (n=24). The subjects were treated for 28 uninterrupted days with 120 mL of Melagrião® or Placebo, divided into four daily doses. Clinical and laboratory evaluations were performed in the pre-study, during the treatment period and after the end of the study. The genotoxicity of Melagrião® was investigated through the comet assay. The mean age of the subjects was 19.37 ± 17.36 years for the Melagrião® group and 24.70 ± 23.50 for the placebo group. The body mass index (BMI) in the pre-study was 24.49 ± 1.11 kg/cm² for Melagrião® group and 25.34 ± 1.03 for the Placebo group. The hematological, hepatic, renal and metabolic functions were analyzed before, during (7th, 14th and 28th day) and 7 days after the study through laboratory findings, which did not evidence signs of toxicity. Headache, vomiting, abdominal pain, dry cough, drowsiness, diarrhea, flatulence, heartburn and insomnia were the found adverse events attributed to both groups. No damage was observed ($p < 0.05$) in peripheral lymphocytes of the subjects treated with Melagrião® by the comet assay. The clinical toxicology and genotoxicity studies showed no toxicity in the volunteers treated with Melagrião® for 28 uninterrupted days.

Key-words: Phytoterapic, Clinical toxicology, Controlled clinical study.

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, o homem vem desenvolvendo e experimentando o tratamento de doenças através do uso de plantas. Numerosas etapas marcaram a evolução da arte de curar, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve longamente associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas (Li & Brown, 2009). A utilização de plantas na prevenção e cura das doenças, condicionadas a um processo de experimentação empírica que vem se desenvolvendo desde os tempos mais remotos, constitui a base da medicina popular.

O uso e o comércio destes recursos foram estimulados pelas necessidades de uma crescente população que demanda cada vez mais das plantas medicinais para o cuidado de sua saúde e para seus cultos e tradições religiosas; em especial pela facilidade de acesso, devido aos custos elevados da medicina ocidental, aos efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, além do crescente interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico e econômico que representam e a demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica (Simões et al., 1999; Capasso et al., 2000; Holetz et al., 2002).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, Resolução RDC, Nº 48 de 16 de março de 2004, considera-se como medicamento fitoterápico aquele obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnicas e científicas em publicações ou ensaios clínicos de eficácia terapêutica, além disso, sua reprodutibilidade e qualidade devem ser garantidas. Não é considerado medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (Carvalho et al., 2008; Rodriguez-Fragoso et al., 2008).

Apesar de muitos dos fitoterápicos utilizados no nosso país se mostrarem eficazes ao longo de anos de utilização, uma boa parte dessas substâncias são isentas de estudos que comprovem sua segurança e eficácia, e aquelas indústrias que as comercializam e almejam continuar com seu registro no Ministério da Saúde deverão comprovar cientificamente em animais e em seres humanos tais propriedades (Capasso et al., 2000; Funari & Ferro, 2005; Bent, 2008).

A segurança deve ser o principal critério na escolha de um fitoterápico. Ensaios clínicos controlados devem confirmar se esses medicamentos são realmente seguros para uso em curto, médio e longo prazo. Não é eticamente aceitável, nem moralmente justificável prescrever fitoterápicos sem a evidência científica de sua qualidade, eficácia e segurança. Portanto, a pesquisa clínica cientificamente conduzida é necessária para proporcionar informações adicionais aos pacientes (Veiga Júnior & Mello, 2008; Bent, 2008; Silveira et al., 2008).

O expectorante Melagrião[®] apresenta-se como um líquido xaroposo, levemente turvo, de coloração amarela, levemente acastanhada, com odor melífero e sabor adocicado. É um fitoterápico composto de seis plantas medicinais com conhecida ação antitussígena e anti-inflamatória no trato respiratório: *Mikania glomerata* S., *Cephaelis ipecacuanha* R., *Aconitum napellus* L., *Polygala senega* L., *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, e *Nasturtium officinale* W.T. Aiton (Panda & Debnath, 2010; Carvalho & Silveira, 2010).

O Melagrião[®] Xarope atua nas terminações emético sensitivas da mucosa gástrica aumentando a fluidificação da secreção brônquica, responsável pela expectoração e descongestionamento das vias respiratórias. O mel presente na formulação é um coadjuvante, pois tem reconhecidas propriedades demulcentes, agindo como emoliente das vias respiratórias afetadas pela bronquite e suas manifestações. As indicações do Melagrião[®] estão relacionadas como antitussígeno e expectorante, no tratamento das bronquites alérgicas e estadas gripais com

comprometimento das vias respiratórias, com tosse, seca ou produtiva (Panda & Debnath, 2010; Carvalho & Silveira, 2010).

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

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicologia clínica e a segurança do Melagrião[®] em voluntários saudáveis, por meio de análises laboratorial e parâmetros clínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo

O estudo foi desenvolvido na UNIFAC do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Delineamento experimental

O ensaio clínico realizado foi do tipo duplo cego, onde tanto investigador quanto o paciente não sabiam o que estava sendo administrado, controlado por placebo, randomizado e paralelo, com 48 voluntários saudáveis, adultos, de ambos os sexos.

Após a seleção, os voluntários receberam o xarope Melagrião[®] ou Placebo por 28 dias consecutivos. A cada semana de tratamento, bem como uma semana após a suspensão do fitoterápico, os voluntários passaram por uma completa avaliação clínica e laboratorial. O estudo foi delineado de forma a permitir a obtenção de parâmetros clínico-laboratoriais relevantes para a identificação de possíveis efeitos toxicológicos.

Os projetos de pesquisa, com os protocolos clínicos dos estudos de Toxicologia Clínica e

Eficácia Terapêutica juntamente com os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, credenciado pelo Conselho Nacional de Saúde/MS (Protocolo 255/07). Nenhuma das etapas dos ensaios clínicos foi iniciada antes da aprovação do protocolo experimental pelo Comitê de Ética e todos os consentimentos dos voluntários e sujeitos da pesquisa foram obtidos por escrito após orientação sobre riscos e benefícios dos estudos.

Os ensaios clínicos realizados foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996), Edimburgo (2000), Washington (2002), Tóquio (2004), Seul (2008), assim como as regulamentações locais (Resolução 196/96 do CNS-MS).

O Ensaio Clínico foi registrado em base internacional com o número: ISRCTN 15486061

Produtos avaliados

Todas as formulações empregadas nos estudos de toxicologia e eficácia terapêutica foram enviadas a UNIFAC pelo Laboratório Catarinense S.A. (Lote 15323). Composição do xarope Melagrião[®]: Alcoolatura de Agrião (0,04666 mL); Extrato Fluido de Guaco (0,00830 mL); Extrato Fluido de Polígala (0,00830 mL); Solutos Concentrados de Bálamo de Tolú (0,00800 mL); Extrato Fluido de Ipecacuanha (0,00042 mL); Extrato Fluido de Acônito (0,00008 mL); Excipientes: Açúcar, mel, benzoato de sódio, metilparabeno e água purificada. Composição do placebo: Excipientes: Açúcar, mel, benzoato de sódio, metilparabeno e água purificada.

Método de Randomização e Mascaramento

Os 48 voluntários selecionados para participar do estudo, foram divididos randomicamente em dois grupos: o grupo Melagrião[®] (n=24), e o grupo Placebo (n=24). Para que houvesse uma uniformidade dos grupos os voluntários foram randomizados por meio de sorteio, utilizando-se envelopes lacrados. Tanto os investigadores responsáveis pelas avaliações

quanto os voluntários desconheciam qual tratamento foi aplicado. Somente a Enfermeira e o Farmacêutico responsável pela randomização e administração dos produtos tinham conhecimento acerca dos tratamentos.

Seleção dos Voluntários

Os voluntários foram aceitos no estudo somente quando considerados saudáveis, como determinado pela história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecederam o início do estudo. Os voluntários realizaram eletrocardiograma (ECG), na avaliação inicial (pré-estudo); nas avaliações semanais (1^a, 2^a, 3^a, e 4^a) e sete dias após o término do estudo (pós-estudo). Após confirmação da higidez, os voluntários foram esclarecidos de todas as dúvidas restantes e, os que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação no estudo.

Critérios de Inclusão

Os seguintes critérios foram satisfeitos para que os voluntários participassem do estudo: homens e mulheres com idade entre 18 a 50 anos; índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 19 e menor ou igual a 30; boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no Protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico, ECG e exames laboratoriais complementares; capacidade de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o Investigador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do TCLE.

Critérios de Exclusão

A resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios excluiu o voluntário do estudo: hipersensibilidade aos componentes da formulação estudada ou história de reações adversas sérias, história ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo do fármaco; uso de terapia de manutenção com qualquer fármaco, exceto anticoncepcional

oral; história de doença hepática, renal, pulmonar, gastrointestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca; fumantes (mais que 10 cigarros por dia); ingestão de mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia; uso de álcool ou drogas ilícitas; uso de medicação regular dentro das 4 semanas que antecederam o início do tratamento deste estudo; uso de qualquer medicação dentro de uma semana antes do início do tratamento deste estudo; internação por qualquer motivo durante as oito semanas que antecederam o início do tratamento deste estudo; voluntária grávida ou amamentando; tratamento dentro dos três meses prévios ao estudo com qualquer fármaco conhecido de ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos; participação em qualquer estudo experimental; ingestão de qualquer fármaco experimental dentro dos três meses que antecederam o início deste estudo; doação ou perda de 450 mL ou mais de sangue dentro dos três meses que antecederam o início do tratamento deste estudo ou doação de mais de 1500 mL dentro dos 12 meses anteriores ao início do tratamento deste estudo.

Critérios para retirada do estudo

Os voluntários poderiam ser retirados do estudo caso apresentassem efeitos adversos sérios ao produto sob investigação; por razões outras como indisponibilidade ou intolerância aos procedimentos adotados; doença intercorrente requerendo medicação que alterasse a atividade respiratória ou pela simples razão do voluntário não desejar continuar no estudo por razões pessoais bem como qualquer condição que o impeça de continuar pelo julgamento do investigador.

Restrições aos voluntários

Medicamentos

Todos os voluntários do estudo foram informados de que qualquer medicamento, incluindo aqueles vendidos sem prescrição médica, não pode ser tomado de forma regular por no mínimo catorze dias antes do início do estudo. Na ocorrência do uso irregular de

medicação nos últimos sete dias, o investigador com base na meia-vida do fármaco ou de seus metabólitos ativos, deve decidir se esses produtos já foram eliminados e, portanto, não irão interferir com a condução do estudo. Caso o processo de seleção se inicie menos de 14 dias antes da data programada para o primeiro período do estudo, esta restrição deverá ser cuidadosamente verificada através de questionamento ao voluntário.

Durante a fase de tratamento também não foi permitida qualquer medicação concomitante, inclusive aquelas vendidas sem prescrição médica. Na ocorrência de ingestão de medicamentos, o investigador clínico deverá avaliar se, com base na meia-vida do fármaco e/ou metabólitos ativos, pode ser assumida a completa eliminação da medicação e, por conseguinte, a não-interferência com a condução do estudo. Todavia, em caso de emergência, incluindo eventos adversos, o Investigador Clínico pode decidir administrar medicações, as quais considerem absolutamente necessárias para o bem-estar dos voluntários. Neste caso, o uso da medicação deve também ser registrado apropriadamente no Formulário de Relato de Caso (CRF) individual.

Dieta

Não foi permitido, durante todo o estudo, o consumo de bebidas que contenham xantina (chá, café, cola) ou alcoólicas. A não observância destas restrições deveria ser informada ao Investigador Clínico, o qual iria decidir se seria permitido que o voluntário permanecesse no estudo. O fato e suas características deverão ser registrados no CRF.

Tratamento

Administração do Produto

Os voluntários compareceram diariamente, exceto aos domingos, duas vezes por dia entre 7:00 e 7:30 horas da manhã e entre 17:00 e 17:30 da tarde, ao Ambulatório da UNIFAC - Faculdade de Medicina - UFC, onde o produto sob investigação foi administrado por um dos investigadores. A administração das demais doses ficou sob a responsabilidade dos próprios voluntários, que foram treinados quanto à dose que deveria ser administrada,

além de receberem orientações sobre a importância de respeitar os horários de ingestão pré-estabelecidos e registrá-los em um Diário do Voluntário para posterior registro no CRF.

A cada administração de Melagrião[®], foram verificados os sinais vitais (pressão arterial, pulso radial e temperatura). Durante todo o período de administração do medicamento, os voluntários tiveram acompanhamento e assistência médica especializada. Os voluntários permaneceram em suas atividades rotineiras, mantendo, também, sua dieta de acordo com orientações anteriores.

Posologia

Os quarenta e oito voluntários participantes do estudo receberam 30 mL do Melagrião[®] ou do Placebo administrados por via oral, quatro vezes ao dia, perfazendo um total de 120 mL por dia durante 28 dias consecutivos. A administração foi acompanhada de 150 mL de água mineral sem gás. Foi solicitado ao voluntário que devolvesse todos os frascos utilizados durante todo o período do estudo. Os horários de administração, sinais vitais, bem como todas e quaisquer intercorrências durante o estudo, foram devidamente registrados nos Formulários para Relato de Caso.

Avaliação clínica e laboratorial

Sinais Vitais

Antes de iniciado o estudo, nos momentos da administração ambulatorial do produto e no pós-estudo foram aferidas a temperatura, pressão arterial e a frequência de pulso dos voluntários. Os responsáveis pelas medições dos sinais vitais foram devidamente treinados para a realização de todos os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs). Todos foram treinados quanto à padronização das técnicas com o intuito de que fossem minimizadas as diferenças nas medições e com isso a obtenção de resultados mais precisos.

Os equipamentos utilizados para a obtenção e registro dos parâmetros eletrocardiográficos, dados referentes à altura, peso, temperatura, pressão arterial e pulso radial, receberam manutenção anual e quando requerido, por lei,

foram certificados por instituições acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) - Rede Brasileira de Calibração (RBC), como forma de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Exame clínico

Antes de iniciado o estudo, a cada 7 dias durante o período de tratamento e no pós-estudo, os voluntários foram submetidos às avaliações médicas (anamnese e exame físico) e eletrocardiográficas.

Exames laboratoriais

Antes de iniciado o estudo, os voluntários foram submetidos a exames laboratoriais, incluindo análise hematológica, análise bioquímica, urina e sorologia. No sétimo, décimo quarto e vigésimo oitavo dias de administração da medicação, e sete dias após o término das administrações (pós-estudo), os exames foram repetidos, excluindo as análises sorológicas. As coletas de sangue para a realização dos exames laboratoriais foram realizadas na UNIFAC e as amostras encaminhadas para análise ao Laboratório Louis Pasteur, que tem certificação da Anvisa.

Eventos adversos

Qualquer evento adverso ocorrendo durante o período de estudo, foi registrado em detalhes na página apropriada para relato de evento adverso, independentemente de estarem ou não relacionadas com a administração do fitoterápico. As perguntas realizadas para saber se os voluntários tiveram algum evento adverso foram limitadas a perguntas gerais, tais como: "Como vai você?" Foi solicitado ao voluntário que relatasse qualquer evento adverso, o dia da manifestação e se foi necessário usar medicação adicional.

Os eventos adversos foram classificados quanto à intensidade como leve, quando facilmente tolerado; moderado, desagradável o bastante para interferir nas atividades cotidianas; e severo, se impossibilita a realização das atividades cotidianas normais.

Genotoxicidade *Teste do Cometa*

O Ensaio Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula Única é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras da fita (Belpaeme et al., 1998). O desenho experimental do estudo do cometa é determinado pela proposta da análise levando em consideração a investigação do dano após a administração do Melagrião[®], em 14 voluntários selecionados de forma aleatória e respeitando os critérios da metodologia deste teste, por 28 dias ininterruptos.

Protocolo do teste do cometa

Coleta do Material

A coleta do sangue periférico dos voluntários foi realizada nas dependências da UNIFAC, por profissionais treinados, utilizando seringa descartável com volume de 5 mL. O material obtido foi transportado para o Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN) da UNIFAC.

Isolamento dos Linfócitos

Os linfócitos foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 5 mL de tampão fosfato de sódio (PBS). As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1500 rpm. Foi realizada a aspiração dos linfócitos, presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro ("nuvem de linfócitos"). A suspensão de linfócitos foi transferida para outro tubo, o qual foi acrescido com PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de linfócitos foi ressuscitado em 2 mL de PBS.

Preparo das Amostras

Foi utilizado, como controle positivo, doxorrubicina 3 µg/mL, incubada com linfócitos durante 40 minutos. Como controle negativo, foram utilizados linfócitos sem exposição a nenhuma droga. Das amostras dos linfócitos expostos ao Melagrião[®] e dos controles positivo e negativo, foi retirada uma alíquota de 10 µL de linfócitos, a qual foi adicionada a 110 µL de agarose 1,5%.

Preparo das Lâminas

1° PASSO: As lâminas foram previamente cobertas com 110 µL de agarose *Normal melting point* (NMP) a 60 °C, sendo mantida a temperatura ambiente, por 24 horas, até a solidificação da agarose.

2° PASSO: As amostras estudadas foram colocadas sobre a lâmina, sendo, em seguida, cobertas com lamínulas e mantidas a 4 °C para solidificação da agarose.

Lise Celular

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

Neutralização e Eletroforese

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

Fixação e Coloração

As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, aplicou-se 50 µL da solução de Brometo de Etídio (20 µg/mL) e foram cobertas com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência.

Escores das Lâminas

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contadas 100 células/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, nas seguintes categorias: **0** = sem danos (<5%); **1** = baixo nível de danos (5 - 20%); **2** = médio nível de danos (20 - 40%) **3**

= alto nível de danos (40 - 95%); **4** = dano total (95%).

Análise estatística

As variáveis quantitativas foram, inicialmente, analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão. Comparações intergrupos (Melagrião® *versus* Placebo) em cada tempo foram realizadas mediante o uso do teste *t* para variáveis não emparelhadas. Comparações intragrupo, ou seja, entre os diversos tempos num mesmo grupo, foram feitas pela Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas (dados paramétricos) associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnett (para verificar diferenças entre um dado tempo e o pré-estudo, considerando o valor basal) (Armitage & Berry, 1994).

No ensaio de genotoxicidade, as comparações entre os grupos controle positivo, controle negativo e colônia foram feitas pela ANOVA complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois (Armitage & Berry, 1994). As variáveis qualitativas, por sua vez, foram expressas como frequência absoluta e relativa (proporção) e analisadas pelo teste exato de Fisher (Armitage & Berry, 1994).

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor de $P < 0,05$. O *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos bem como para a elaboração dos gráficos.

RESULTADOS

População Estudada

Na Tabela 1 estão relacionadas as características dos voluntários incluídos no estudo.

Tabela 1: Características dos pacientes estudados, obtidas na fase de pré-tratamento. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os grupos Placebo e Melagrião® em relação à idade e IMC. Comparações entre os grupos em relação ao gênero foram feitas pelo teste exato de Fisher. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para nenhum dos parâmetros.

Table 1: Characteristics of the patients studied, obtained in the pre-treatment phase. The t-test for unpaired variables was used to compare the Placebo and Melagrião® groups in relation to age and BMI. Comparisons between groups regarding gender were made by Fisher's exact test. There were no statistically significant differences between the groups for any of the parameters.

Características	Grupo Placebo	Grupo Melagrião®
Tamanho da amostra	24	24
Idade (anos) ^a	24,70 ± 23,50	19,37 ± 17,36
Gênero ^b	M (37,21%) F (62,79%)	M(34,88%) F (65,12%)
IMC pré-tratamento (kg/m ²) ^c	25,34 ± 1,03	24,49 ± 1,11

a) Média ± desvio padrão. P = 0,23 (teste *t*).

b) M: masculino; F: feminino. P = 1,00 (teste de Fisher).

c) Média ± desvio padrão. P=0,50 (teste *t*).

Exame Cardiológico

O ECG convencional de todos os voluntários foi considerado normal ou anormal sem significado clínico, antes do tratamento. Este padrão foi mantido em todos os voluntários durante os vinte e oito dias e no pós-estudo.

não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à proporção de voluntários com esta queixa (p=0,73). Na maioria dos casos, esses episódios não necessitaram de intervenção farmacológica para sua resolução.

Sinais Vitais

Não foi evidenciada nenhuma alteração clinicamente significativa na pressão arterial, no pulso radial e temperatura nos voluntários que participaram do estudo.

Em segundo lugar ficaram os episódios de dor abdominal e sonolência, relatados por seis voluntários, que classificaram os episódios como sendo de intensidade leve para a grande maioria em ambos os quesitos avaliados. A análise comparativa, destes eventos, entre os grupos Placebo e Melagrião® não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à proporção de voluntários com estas queixas (p = 0,37).

Descrições de eventos adversos

A formulação foi bem tolerada para os voluntários, entretanto, alguns eventos adversos foram relatados durante o período de tratamento. Para o grupo Placebo houve 13 relatos, sendo 8 categorizados como leve e 5 como moderado; no grupo Melagrião® houve 22 relatos, sendo 17 leve e 5 moderado. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles (p = 0,44).

Diarreia foi referida por cinco voluntários, tendo sido quatro dos relatos de intensidade leve e apenas um de intensidade moderada, todos sem necessidade de intervenção terapêutica. A análise comparativa, deste evento, entre os grupos Placebo e Melagrião® não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à proporção de voluntários com esta queixa (p=0,37).

Dos eventos adversos relatados ao longo do tratamento, os mais referidos foram os episódios de cefaleia, de intensidade leve e moderada. A análise comparativa, desse evento, entre os grupos Placebo e Melagrião®

Também foram referidos os eventos vômito e flatulência que obtiveram apenas dois relatos cada um, e os eventos adversos tosse seca, pirose e insônia, relatados apenas uma vez ao longo do tratamento empregado. Não tendo sido constatada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à proporção de voluntários com essas queixas ($p = 0,51$).

Descrição de alterações laboratoriais

Exames hematológicos e bioquímicos foram realizados antes, durante (7°, 14°, 21° e 28° dias) e no pós-tratamento, para avaliar as funções: hematológica, renal e metabólica. Para avaliar a função hematológica, foram analisados importantes parâmetros como: contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e o TAP.

Com relação às plaquetas, na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Placebo e Melagrião® em nenhum dos tempos. Ademais, na análise intragrupo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre o pré-tratamento e os tempos subsequentes em nenhum dos grupos. O mesmo ocorreu para a dosagem de hemoglobina e contagem total de plaquetas.

Nas comparações intergrupos, do parâmetro hematócrito, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos períodos. Porém, quando realizadas comparações intragrupo, verificou-se que, no grupo Melagrião®, o hematócrito no pós-tratamento foi significativamente maior que no pré-tratamento ($***p < 0,001$). (Figura 1)

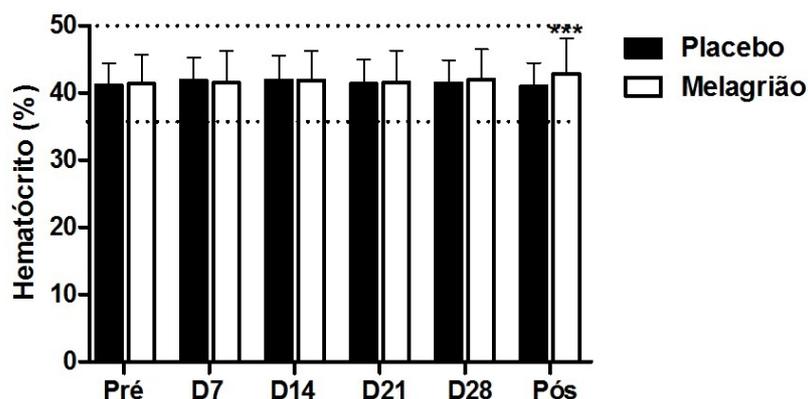


Figura 1. Valores do hematócrito verificados no pré-tratamento, nos dias 7, 14, 21 e 28 e no pós-tratamento nos sujeitos dos grupos Placebo e Melagrião®. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os grupos Placebo e Melagrião® em cada tempo avaliado (análise intergrupos). Comparações entre os diferentes tempos num mesmo grupo (análise intragrupo) foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet, para verificar diferenças entre cada tempo e o pré-tratamento. Na análise intergrupos não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Placebo e Melagrião® em nenhum dos tempos. Todavia, na análise intragrupo, verificou-se que, no grupo Melagrião®, o hematócrito verificado no pós-tratamento foi significativamente maior que o observado no pré-tratamento ($***p < 0,001$).

Figure 1. Hematocrit values in subjects of the Placebo and Melagrião® groups. ($***p < 0.001$).

Na avaliação do tempo de ativação de protrombina (TAP), verificou-se que nas comparações intergrupos, foi constatado que, no dia 28 e no pós-tratamento, o TAP verificado no grupo Melagrião® foi significativamente menor que o observado no

grupo Placebo. Na análise do TAP intragrupo, verificou-se que, no grupo Melagrião®, este se apresentou significativamente menor que o verificado no pré-tratamento no dia 28 e no pós-tratamento (Figura 2).

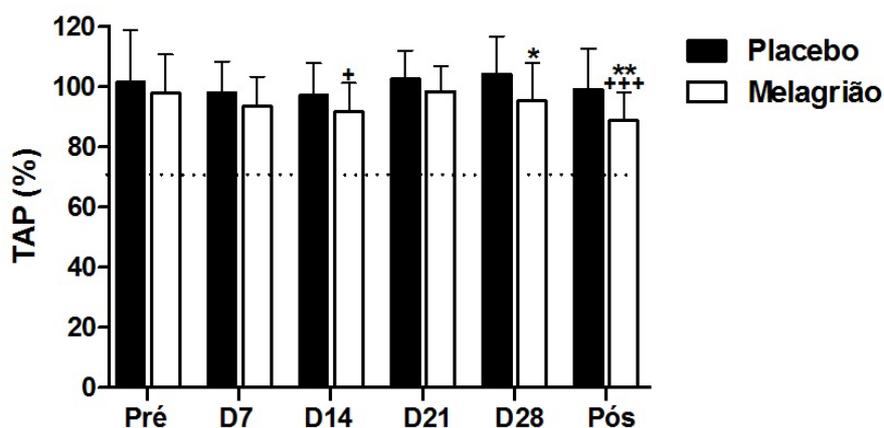


Figura 2. Valores do TAP, expressos como percentual do controle, verificados no pré-tratamento, nos dias 7, 14, 21 e 28 e no pós-tratamento nos sujeitos dos grupos Placebo e Melagrião[®]. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os grupos Placebo e Melagrião[®] em cada tempo avaliado (análise intergrupos). Comparações entre os diferentes tempos num mesmo grupo (análise intragrupo) foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet, para verificar diferenças entre cada tempo e o pré-tratamento. Na análise intergrupos, constatou-se que, no dia 28 (**p* = 0,029) e no pós-tratamento (***p* = 0,005), o TAP verificado no grupo Melagrião[®] foi significativamente menor que o observado no grupo Placebo. Ademais, na análise intragrupo, verificou-se que, no grupo Melagrião[®], o TAP mensurado no dia 28 (+*p* < 0,05) e no pós-tratamento (+++*p* < 0,001) foi significativamente menor que o verificado no pré-tratamento. No grupo Placebo, todavia, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos.

Figure 2. TAP values, expressed as a percentage of the control, were verified in the pretreatment on days 7, 14, 21 and 28 and in the post-treatment in Placebo and Melagrião[®] subjects. (**p* = 0.029)(***p* = 0.005)(+*p* < 0.05)(+++ *p* < 0.001).

As comparações, dos leucócitos totais, realizadas entre os grupos Placebo e Melagrião[®] mostraram que houve manutenção do padrão da resposta leucocitária nos voluntários estudados, o que também foi verificado nas comparações intragrupo.

A avaliação da função hepática foi realizada através da dosagem das enzimas hepáticas TGO e TGP, da bilirrubina total, fosfatase alcalina e albumina. Na análise das transaminases, observou-se que nas dosagens da TGO e TGP, não foi observado alterações significativas do ponto de vista estatístico

dentro das análises intergrupo e intragrupo nos para os voluntários do estudo dentro dos tempos avaliados. O mesmo ocorreu para as dosagens de fosfatase alcalina e bilirrubina.

Na dosagem de albumina foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, no pós-tratamento, no qual o grupo Melagrião[®] mostrou níveis séricos superiores a formulação placebo. Nas comparações intragrupo não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos avaliados em nenhum dos grupos (Figura 3).

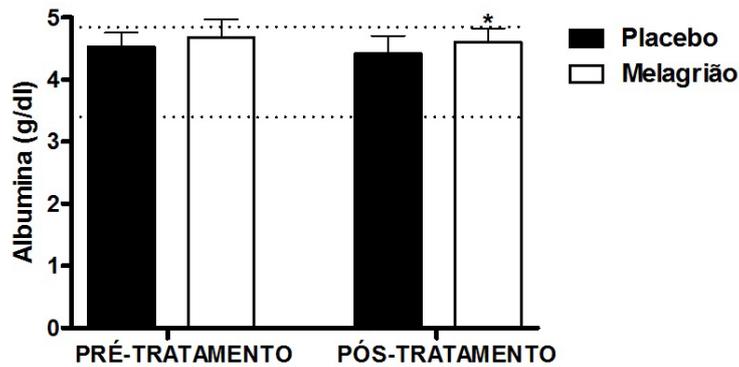


Figura 3. Concentração sanguínea de albumina mensurada nos pacientes dos grupos Placebo e Melagrião[®] nas fases de pré e pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os dois grupos em cada fase (análise intergrupos). Comparações entre as duas fases do estudo num mesmo grupo (análise intragrupo) foram feitas pelo teste *t* para dados emparelhados. Nas comparações intergrupos, verificou-se que, no pós-tratamento, a albumina mensurada no grupo Melagrião[®] foi significativamente maior (**p*= 0,024) que a observada no grupo Placebo. Todavia, na análise intragrupo, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos avaliados em nenhum dos grupos.

Figure 3. Blood concentration of albumin measured in Placebo and Melagrião[®] patients in the pre and posttreatment phases. (* *p* = 0.024).

A função renal foi avaliada através da análise dos parâmetros ureia e creatinina. Na dosagem de ureia foram constatadas diferenças estatisticamente significantes na comparação intragrupo, uma vez que as dosagens deste

parâmetro se mostraram significativamente maiores no pós-tratamento do que no pré-tratamento para o grupo Melagrião[®] (Figura 4).

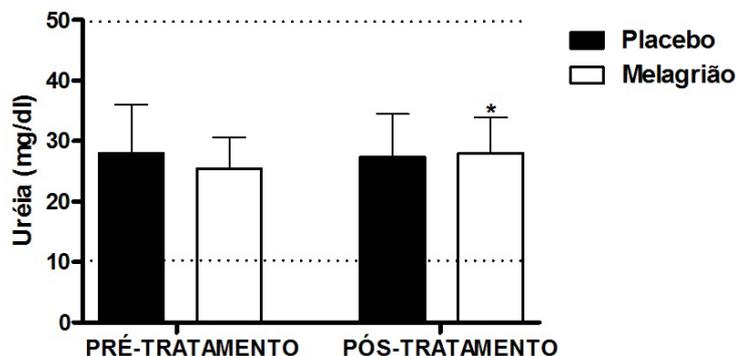


Figura 4. Concentração sanguínea de ureia mensurada nos pacientes dos grupos Placebo e Melagrião[®] nas fases de pré e pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os dois grupos em cada fase (análise intergrupos). Comparações entre as duas fases do estudo num mesmo grupo (análise intragrupo) foram feitas pelo teste *t* para dados emparelhados. Nas comparações intergrupos, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhuma das fases estudadas. Todavia, na análise intragrupo, constatou-se que, no grupo Melagrião[®], a ureia mensurada no pós-tratamento foi significativamente maior que a verificada no pré-tratamento (**p*= 0,044).

Figure 4. Blood urea concentration measured in Placebo and Melagrião[®] patients in the pre- and post-treatment phases (* *p* = 0.044).

A determinação da concentração de creatinina sérica não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos períodos. Na avaliação do grupo Melagrião[®], verificou-se que a creatinina mensurada no

pós-estudo foi significativamente maior que a observada no pré-estudo. No grupo Controle, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos (Figura 5).

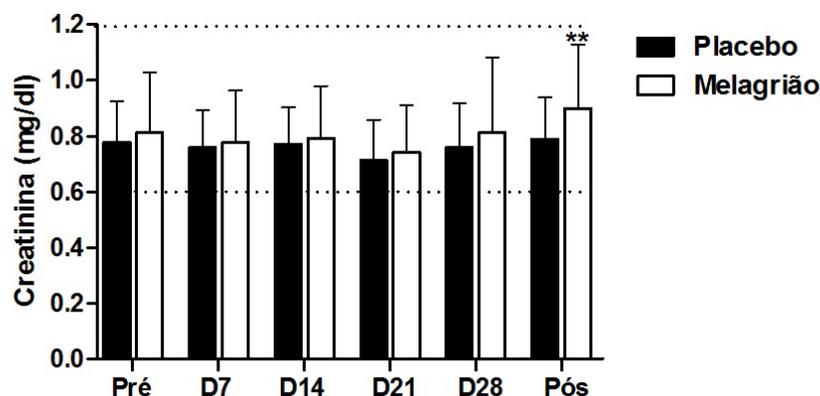


Figura 5. Concentração sanguínea de creatinina mensurada no pré-tratamento, nos dias 7, 14, 21 e 28 e no pós-tratamento nos sujeitos dos grupos Placebo e Melagrião[®]. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os grupos Placebo e Melagrião[®] em cada tempo avaliado (análise intergrupos). Comparações entre os diferentes tempos num mesmo grupo (análise intragrupo) foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet, para verificar diferenças entre cada tempo e o pré-tratamento. Na análise intergrupos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Placebo e Melagrião[®] em nenhum dos tempos. Na análise intragrupo, verificou-se que, no grupo Melagrião[®], a creatinina mensurada no pós-tratamento foi significativamente maior que a observada no pré-tratamento (***p* < 0,01). No grupo Placebo, todavia, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos.

Figure 5. Blood creatinine concentration measured at pre-treatment on days 7, 14, 21 and 28 and posttreatment in Placebo and Melagrião[®] subjects. (** *p* < 0.01).

Na análise dos parâmetros bioquímicos, nenhuma alteração significativa no colesterol total foi evidenciada nos voluntários que receberam o Placebo ou o Melagrião[®]. Na análise intergrupos, constatou-se que, no dia 14, a glicose mensurada no grupo Melagrião[®] foi significativamente menor que a observada no grupo Placebo. Na análise intragrupo, verificou-se que, para ambos os grupos estudados, a glicose mensurada foi

significativamente menor que a observada no pós-tratamento, nos dias 7, 14 e 28 para o grupo Melagrião[®] e 7, 14, 21 e 28 para o grupo Placebo (Figura 6). Nas comparações intergrupos e intragrupo, dos triglicerídeos, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos, tanto no grupo Placebo como no grupo Melagrião[®].

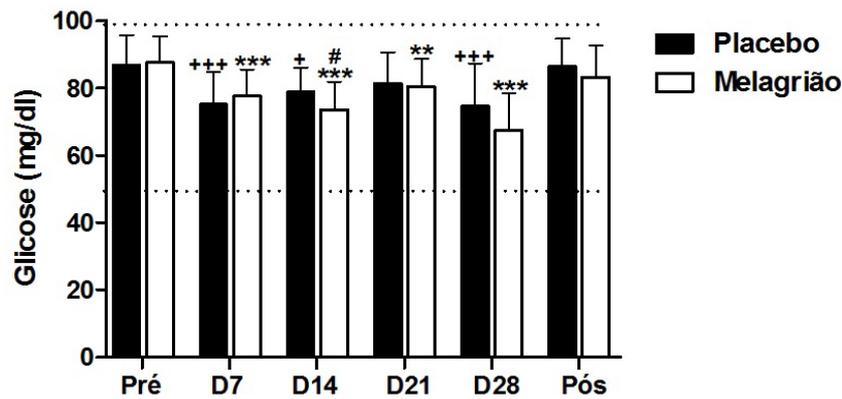


Figura 6. Concentração sanguínea de glicose mensurada no pré-tratamento, nos dias 7, 14, 21 e 28 e no pós-tratamento nos sujeitos dos grupos Placebo e Melagrião[®]. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os grupos Placebo e Melagrião[®] em cada tempo avaliado (análise intergrupos). Comparações entre os diferentes tempos num mesmo grupo (análise intragrupo) foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Dunnet, para verificar diferenças entre cada tempo e o pré-tratamento. Na análise intergrupos, constatou-se que, no dia 14, a glicose mensurada no grupo Melagrião[®] foi significativamente menor (#*p* = 0,040) que a observada no grupo Placebo. Na análise intragrupo, verificou-se que, no grupo Placebo, a glicose mensurada nos dias 7 (+++*p* < 0,001), 14 (+*p* < 0,05) e 28 (+++*p* < 0,001) foi significativamente menor que a observada no pós-tratamento. Similarmente, no grupo Melagrião[®], a glicose verificada nos dias 7 (***)*p* < 0,001, 14 (***)*p* < 0,001, 21 (**)*p* < 0,01) e 28 (***)*p* < 0,001) foi significativamente menor que a mensurada no pós-tratamento.

Figure 6. Glucose values in subjects of the Placebo and Melagrião[®] groups. (#*p* = 0.0396)(+++*p* < 0.001)(+*p* < 0,05)(+++*p* < 0,001)(***)*p* < 0.001)(***p* < 0,01).

Genotoxicidade

A genotoxicidade foi avaliada pelo teste do cometa. Os resultados obtidos demonstram que na fase de pré-tratamento foi observado maiores danos, com diferença estatística, nos linfócitos expostos à Doxorrubicina quando comparado ao grupo dos linfócitos não expostos (*p* = 0,003). Dados referentes ao período do pós-tratamento permitem evidenciar que os danos em linfócitos expostos à Doxorrubicina associado ao Xarope de Melagrião[®] foram significativamente maiores do ponto de vista estatísticos ao grupo de linfócitos expostos exclusivamente ao

Melagrião[®] (*p* = 0,008). Não houve diferenças estatisticamente significantes nos danos genéticos observados nos linfócitos, ao longo das duas fases do estudo, no grupo exposto à Doxorrubicina e o grupo que recebeu Doxorrubicina associado ao Xarope de Melagrião[®] (*p* = 0,778) e nos grupos dos linfócitos não expostos (Controle e Xarope de Melagrião[®]: *p* = 0,609) à Doxorrubicina, dados estes que mostram que o xarope não foi genotóxico nos linfócitos dos voluntários (Figura 7).

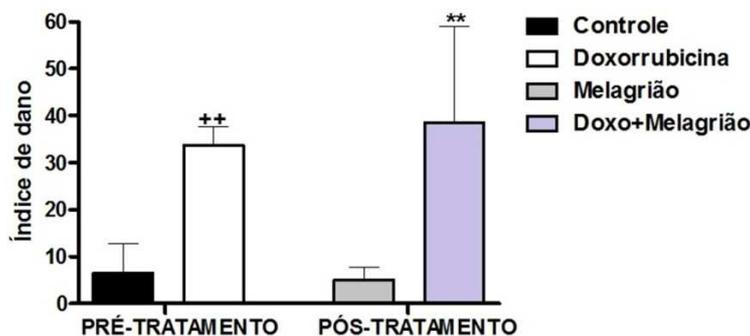


Figura 1. Teste do cometa realizado em linfócitos expostos (Doxorrubicina e Doxo+Melagrião[®]) ou não (Controle e Melagrião[®]) à doxorubicina (doxo) antes (pré-tratamento) e após (pós-tratamento) o tratamento com Melagrião[®]. Dados expressos como média e desvio padrão. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os grupos Controle e Doxorubicina na fase de pré-tratamento e os grupos Melagrião[®] e Doxo+Melagrião[®] na etapa de pós-tratamento. Comparações entre as duas fases do estudo nos grupos expostos (Doxorrubicina e Doxo + Melagrião[®]) e não (Controle e Melagrião[®]) à doxorubicina foram feitas pelo teste *t* para dados emparelhados. Constatou-se que, no pré-tratamento, o índice de dano observado no grupo Doxorubicina foi significativamente maior que o verificado no grupo Controle ($++p = 0,002$). Similarmente, no pós-tratamento, o índice de dano relativo ao grupo Doxo+Melagrião[®] foi significativamente maior que o referente ao grupo Melagrião[®] ($**p = 0,008$). Todavia, não houve diferenças estatisticamente significantes entre as duas fases do estudo nos grupos expostos (Doxorrubicina versus Doxo + Melagrião[®]: $p = 0,778$) e não expostos (Controle versus Melagrião[®]: $p = 0,609$) à Doxorubicina.

Figure 7. Comet test performed on exposed lymphocytes (Doxorubicin and Doxo + Melagrião[®]) or not (Control and Melagrião[®]) to doxorubicin (doxo) before (pretreatment) and after (posttreatment) treatment with Melagrião[®]. ($++p = 0.002$). ($**p = 0.008$). However, there were no statistically significant differences between the two study phases in the exposed groups (Doxorubicin versus Doxo + Melagrião[®]: $p = 0.778$) and not exposed (Control versus Melagrião[®]: $p = 0.609$) to Doxorubicin.

DISCUSSÃO

A fisiopatologia das doenças respiratórias está relacionada com aquelas que afetam as vias condutoras, o parênquima pulmonar e a musculatura respiratória, onde estão envolvidos diversos mediadores químicos. Essas doenças afetam de maneira obstrutiva, interferindo com a resistência à passagem do ar pelas vias aéreas. Como consequência pode ocorrer espasmos da musculatura lisa, hiperprodução de secreção viscosa, edema de mucosa e tosse. Para o tratamento das afecções das vias respiratórias são usadas drogas broncodilatadoras como os agonistas beta-adrenérgicos, as metilxantinas, cromoglicato de sódio e os glicocorticóides. O tratamento da tosse pode ser feito através de medidas não medicamentosas, de substâncias que deprimem o reflexo da tosse (antitussígenos), de substâncias que facilitam o fluxo do muco (expectorantes) e/ou de substâncias que

diminuem a viscosidade do muco (Barnes, 1998). É bastante comum o uso de plantas pela população para o tratamento de afecções das vias respiratórias, na forma de chás e xaropes utilizados isoladamente ou associados a medicamentos tradicionais como anti-inflamatórios, analgésicos e antitérmicos (Simões et al., 1999; Matos, 2000).

Entre as opções terapêuticas de que dispomos para combater a tosse estão a Codeína (analgésico narcótico que inibe a tosse a nível central, podendo causar sedação, náuseas, vômitos e constipação) e o Dextrometorfano (também de ação central, mas com menos reações adversas). Os expectorantes e mucolíticos visam expulsar e fluidificar o muco bronquial, respectivamente, e entre eles estão os iodados, a Guaiaifenasina, o Ambroxol e outros. Os anti-histamínicos são úteis nas fases iniciais do resfriado comum e principalmente quando há componente

atópico, sendo contra-indicados nos demais casos por aumentarem a viscosidade da expectoração. Os broncodilatadores, como os beta-adrenérgicos, glicocorticóides, cromoglicato de sódio e as metilxantinas, são indicados nos casos de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, mas também apresentam uma gama de reações adversas (Gilman et al., 2006).

Uma alternativa de tratamento que deve ser considerada como opção terapêutica para casos de bronquite aguda não complicada é a troca ou associação dos anti-inflamatórios por substâncias fitoterápicas que tenham como compostos básicos, plantas sabidamente broncodilatadoras, antitussígenas, anti-inflamatórias naturais, mucolíticas dentre outras. Inúmeros estudos vêm mostrando a eficácia de formulações fitoterápicas, porém, a grande maioria necessita de estudos prévios para comprovação de sua eficácia terapêutica e de sua segurança (Chuchalin et al., 2005; Matthys et al., 2003).

A Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará (UFC) detém larga experiência de mais de 10 anos de colaboração com a indústria farmacêutica nacional e multinacional através da realização de ensaios pré-clínicos e clínicos. Essa interação mostra uma experiência profícua para ambos os setores. Os resultados deste estudo repassados à população possibilitarão o seu uso terapêutico com um baixo custo, mas dentro dos padrões de segurança e eficácia farmacológica, que é de grande importância prática e social.

No Brasil, a legislação de fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Anvisa elaborou normas para regulamentação desses medicamentos, desde a Portaria N° 6 de 1995 (Brasil, 1995), onde prazos foram estabelecidos para que dados de segurança e eficácia dos fitoterápicos comercializados fossem fornecidos pela indústria farmacêutica, passando pelas RDC N° 17 de 2000 (Brasil, 2000) e N° 48 de 2004 (Brasil, 2004), atualmente em vigor. Essa preocupação dos órgãos regulatórios com a normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a

avaliação de quesitos importantes, como o controle de qualidade do produto, além de estudos de eficácia e segurança desses medicamentos (Nishioka, 2006).

De acordo com a norma em vigor, além da realização do controle de qualidade "*in vitro*", a eficácia e segurança terapêutica de um fitoterápico devem ser determinadas através de avaliações não somente em animais experimentais, mas também em humanos. Essas medidas visam evitar ou pelo menos minimizar o risco de surgirem efeitos adversos graves ou fatais após a liberação para a comercialização.

Estudos de toxicologia clínica visam estabelecer o grau de segurança da substância em teste. Em se tratando, portanto, de estudos de Fase I, trata-se da fase mais dramática e a mais nobre de acesso aos efeitos de nova molécula em seres humanos, pois, com frequência, não existe correspondência bem firmada entre a segurança em animais e em seres humanos (Oliveira, 2006). Devem ser desenvolvidos em voluntários saudáveis e, juntamente com o respectivo protocolo clínico, seguir a regulamentação específica vigente no país, além das demais normas do Conselho Nacional de Saúde, a Resolução N° 196/96, que regulamenta a pesquisa em seres humanos. Esta Resolução fundamenta-se na declaração de Helsinque e nas diretrizes internacionais sobre pesquisas, no que se refere aos princípios éticos, científicos e técnicos (Brasil, 1996b).

De acordo com as Resoluções N° 196/96 (que revogou a Resolução N° 01/88 MS/CNS), N° 251/97 MS/CNS (Brasil, 1997), RDC N° 48, de 16 de março de 2004 (Brasil, 2004), da Anvisa e a Portaria 116/96 da Secretaria de Vigilância Sanitária, um estudo toxicológico deve seguir um protocolo com parâmetros o mais próximo possível dos usados na prática clínica (Brasil, 1996a). A metodologia necessária deverá abranger entre outros critérios: 1) a seleção de, no mínimo, 14 voluntários saudáveis; 2) técnicas de administração do fármaco: as doses usadas devem variar entre 50 e 200% da usada popularmente; 3) critérios éticos envolvidos;

4) avaliação dos efeitos adversos que, por ventura, possam ocorrer no decorrer do estudo.

Apesar de não ser exigido um grupo controle nos estudos de segurança clínica, optamos por utilizar um controle com o intuito de eliminar ou reduzir os efeitos de variáveis não relacionadas à substância em teste, e, por conseguinte, dar uma maior relevância científica ao estudo, pois além das comparações intragrupo foram realizadas comparações entre os grupos.

O índice terapêutico (IT) por definição representa a relação entre a dose letal para 50% dos indivíduos (DL50) e a dose eficaz para 50% dos indivíduos (DE50). Para uma maior segurança farmacológica, uma definição mais conservadora é a que relaciona a dose letal para 1% dos indivíduos com a dose eficaz para 99% dos indivíduos, ou ainda a dose capaz de provocar efeitos adversos em relação à maior dose incapaz de produzir efeitos adversos. A relação de 10 vezes, representa uma relativa segurança para a substância química ou para o fitoterápico, ou baixa toxicidade. Considerando que para o teste de toxicidade subcrônica, a utilização de doses diárias de 120 mL divididos em 4 administrações, compreendendo a dose máxima recomendada para o tratamento da debilidade física, considera-se que no período de utilização de 28 dias o fitoterápico pode ser considerado atóxico (Rauber et al., 2006).

Portanto, a avaliação da relação risco/benefício é a finalidade dos estudos pré-clínicos e clínicos de medicamentos. Nesse sentido, este estudo avaliou a possível natureza tóxica do Xarope Melagrião[®] quando administrado em voluntários sadios. A avaliação desta possível toxicidade deu-se através da realização de parâmetros laboratoriais hematológicos, hepáticos, renais e metabólicos.

Sob a forma terapêutica de Xarope foi possível a avaliar os aspectos relacionados com a segurança terapêutica da associação da *Mikania glomerata*, da *Cephaelis ipecacuanha*, do *Aconitum napellus*, da *Polygala senega*, do *Myroxylon balsamum* e do *Nasturtium officinale*. Esta é a forma

usualmente utilizada pela população, e que, portanto, deve ser avaliada quanto a possíveis efeitos toxicológicos. Neste caso, por se tratar de um fitoterápico de uso tradicional já utilizado pela população, resolvemos adotar a dose máxima diária indicada pelo fabricante da formulação que correspondia a 120 mL por 28 dias ininterruptos.

Na análise dos exames laboratoriais comparados ao período antes do tratamento não foi observado significância estatística que indicasse toxicidade nos diversos órgãos e sistemas avaliados. As variações dos exames laboratoriais observadas nas avaliações semanais apresentaram-se dentro da faixa de normalidade para cada parâmetro, tampouco apresentaram sinais de toxicidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde (Nascimento et al., 2009; WHO, 2003).

O hemograma é um importante aliado dos estudos de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes e que podem limitar a utilização de fármacos e medicamentos; alterações hematológicas podem refletir, também, na atividade imunológica (Lima et al., 2002; Lorenzi, 2003).

A interpretação dos parâmetros hematológicos mostra que não houve alteração estatisticamente significativa para contagem de hemácias, hemoglobina e contagem total de plaquetas. Apesar do aumento significativo do hematócrito no grupo Melagrião[®] durante o pós-tratamento esse parâmetro se manteve nos limites de normalidade.

Quanto à análise do TAP, no dia 28 e no pós-estudo, verificou-se que a diminuição apresentada no grupo Melagrião[®], comparando com o período do pré-tratamento e com o mesmo período do grupo Placebo, manteve-se dentro dos limites da normalidade, portanto sem significado clínico. A presença de substâncias com conhecida ação sobre inibição da coagulação sanguínea como é o caso dos

compostos cumarínicos em plantas como a *Mikania glomerata*, não foi capaz de gerar nenhuma alteração clinicamente significativa durante o período de tratamento nessa função. Provavelmente se deve as baixas concentrações desses compostos cumarínicos na formulação (Soares et al., 2006).

No quadro leucocitário a contagem total de leucócitos no grupo Melagrião[®], não diferiu significativamente quando comparados ao grupo Placebo e se mantiveram dentro dos limites normais. O aumento dos basófilos no grupo Melagrião[®] e dos monócitos no grupo Placebo, observada no período de pós-estudo e no dia 14 respectivamente, mantiveram-se dentro dos valores de referência para cada analito. Variações na contagem dos leucócitos pode ser resultado de leves alterações que ocorrem como resposta da medula óssea normal a inflamações ou infecções, estresse físico ou emocional (Soares et al., 2002). Além disso, não foi encontrado na literatura, nenhum indício de que as plantas componentes da formulação Melagrião[®] provocassem alterações nas células sanguíneas em indivíduos adultos saudáveis (Paulo et al., 2009).

Entre os parâmetros bioquímicos utilizados, as provas de função hepática desempenham importante interesse, pois diversas substâncias são extensamente biotransformadas pelo fígado. As bilirrubinas são resultantes do catabolismo da hemoglobina, após a destruição normal ou patológica das hemácias. As transaminases (ALT/TGP e AST/TGO) e a fosfatase alcalina são bons marcadores, pois ocorre seu aumento em 90% dos casos de doença hepática (Lima et al., 2002).

O parâmetro albumina mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, no pós-tratamento, aonde o grupo teste indicou níveis séricos superiores a formulação placebo. Quanto da análise dos demais aspectos relacionados à função hepática, não houveram variações estatisticamente significantes observadas, entre os grupos Placebo e Melagrião[®], permitindo concluir que, para a população estudada, a formulação não apresenta características hepatotóxicas mesmo em doses máximas.

A análise sérica de ureia do grupo Melagrião[®] diferiu nas comparações intragrupo, em relação ao valor basal, estatisticamente significativo de acordo com os testes utilizados, e estariam de acordo com o estudo de Paulo et al. (2009), visto que o uso contínuo de plantas medicinais provoca alterações nefropáticas nos seres humanos. Mas, apesar destas alterações terem sido identificadas, estes valores permaneceram dentro do padrão de normalidade para os adultos.

A dosagem de creatinina é um importante sinalizador clínico, já que a queda da filtração glomerular com consequente elevação da taxa de creatinina plasmática implica na perda da função renal (Berne & Levy, 2006). Além disso, o valor plasmático da creatinina sofre influências da massa muscular, nutrição e ocorrência de edema (Soares et al., 2002). O aumento dos níveis de creatinina, ocorridos no pós-tratamento foi verificado no grupo Melagrião[®], não sendo estas alterações consideradas como relevantes, para este ensaio toxicológico clínico, porque permaneceram dentro dos valores normais (Paulo et al., 2009).

Ao se avaliar as dosagens de glicose nos voluntários dos grupos Placebo e Melagrião[®] verificou-se que houve um aumento significativo no pós-tratamento. Os valores da glicemia variam, dentro da faixa de normalidade, de acordo com a dieta e/ou tempo de jejum. O aumento da glicose observado tanto no grupo tratado com fitoterápico quanto no grupo controle, em comparação com os valores fisiológicos, pode ser explicado pela presença de mel no veículo do fitoterápico. Logo, deve-se ressaltar que nenhuma das alterações apontou para a presença de qualquer distúrbio, já que estas oscilações ocorreram dentro da faixa de valores esperados (Jacobus et al., 2006).

A redução nos níveis de triglicerídeos no grupo Melagrião[®], observada na avaliação do pós-tratamento, pode ter ocorrido por modificação na dieta dos voluntários, já que não houve nenhuma restrição quanto aos hábitos alimentares. Para o analito colesterol não houve diferença estatisticamente

significante entre os grupos estudados. Vale ressaltar que as diferenças estatisticamente significantes que ocorreram tratam-se, de fato, de um preciosismo estatístico, uma vez que correspondem a variações pequenas nos valores médios, que se mantiveram dentro dos limites de normalidade e que, portanto, não têm relevância clínica.

A avaliação clínica constituiu-se, também, um aspecto de investigação importante, utilizando os parâmetros de pressão arterial, frequência de pulso, temperatura e outros. Todos estes aspectos foram avaliados pela equipe de pesquisadores, envolvidos na pesquisa, e permaneceram dentro do padrão de normalidade para os indivíduos de ambos os sexos.

Durante os vinte e oito dias de estudo, ocorreram alguns eventos adversos que foram atribuídos ao uso da formulação. O evento adverso mais proeminente no estudo foi a cefaleia, porém, os dados analisados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à proporção de voluntários com queixa de cefaléia. Atribui-se a possibilidade de surgimento da cefaleia devido à formulação teste apresentar *Mikania glomerata* S. que frequentemente está relacionada com a presença de cumarina (1,2-benzopirona). A literatura aponta atividade vasodilatadora podendo assim explicar a ocorrência de cefaléia (Aboy et al., 2002). Todavia pela avaliação clínica dos relatos é passível de se observar ausência de prevalência significativa entre os dois grupos, pois, a diferença entre eles é de apenas um relato a mais para o grupo Melagrião®.

A sonolência também foi um dos eventos bastante referido pelos voluntários, porém, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à proporção de voluntários com essa queixa. Clinicamente estes eventos foram mais relatados pelos voluntários do grupo Melagrião®. A sonolência pode ser explicada pela presença do *Aconitum napellus* que em um estudo clínico realizado por Panda & Debnath (2010) atribui a esta planta a

capacidade de desencadear indicativos de depressão do sistema nervoso central como sonolência, tontura, visão turva e parestesia.

Quanto aos eventos adversos citados pelos voluntários de ambos os grupos aqueles que tinham como base do sistema digestório foram os mais relatados, sendo que em nenhum deles foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à proporção de voluntários com essas queixas. Foram encontrados dados, na literatura, que atestam que a *Mikania glomerata* S., a *Cephaelis ipecacuanha*, o *Aconitum napellus*, a *Polygala senega* e o *Nasturtium officinale*, componentes do Melagrião® são capazes de provocar os eventos tais como: náusea, vômito, flatulência, diarreia e dores abdominais mesmo em baixas concentrações (Soares et al., 2006; Souza et al., 2006; Freitas et al., 2008; Panda & Debnath, 2010; Carvalho & Silveira, 2010; Paul et al., 2011).

Tosse seca e pirose foram relatadas somente uma vez cada, sendo a primeira por um voluntário do grupo Placebo, portanto não relacionado a nenhum dos componentes ativos da medicação em teste e sem relevância do ponto de visto clínico e estatístico. A ocorrência de pirose também não se mostrou significativa entre os grupos em relação à proporção de voluntários com essas queixas. Em um artigo de relato de caso de intoxicação por *Aconitum napellus*, realizado por Panda & Debnath (2010), referência que na sobredosagem pode haver o desencadeamento de sensação de ardência e queimação em lábios, língua, boca, trato respiratório superior e digestório superior, o que justifica a pirose relatada por um voluntário do grupo Melagrião®.

Essa etapa clínica mesmo se mostrando segura não garante ausência de reações adversas das formulações testadas, especialmente aquelas de baixa incidência que somente seriam observadas após utilização por centenas ou milhares de pacientes. A detecção de reações adversas deverá continuar sendo monitorada no período pós-comercialização pelos programas de farmacovigilância.

Outro aspecto avaliado foi o potencial genotóxico do Xarope de Melagrião[®]. Quando o material genético de uma célula é lesado, esta pode reparar este dano, sofrer apoptose (morte celular programada) ou não reparar este dano sendo chamada de célula transformada (Vasconcelos, 2004). A exposição a agentes físicos, químicos, e biológicos podem resultar em alterações no DNA que podem desencadear doenças como o câncer.

Estudos de genotoxicidade devem ser efetuados quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado de medicamentos em humanos. De maneira geral, as plantas medicinais são usadas pela população durante longos períodos para o tratamento de doenças, tendo em vista que não possuem ação terapêutica imediata. Apesar do vasto uso a maioria dessas plantas não foi suficientemente estudada, no que se refere ao seu potencial genotóxico. Vicentini et al. (2001) relataram que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos.

Diante disso, o estudo avaliou a genotoxicidade do Xarope de Melagrião[®] em quatorze voluntários. Os resultados obtidos mostraram que houve no período do pós-tratamento o grupo tratado com Doxorubicina associado ao Xarope de Melagrião[®] desencadearam danos muitos superiores, do ponto de vista estatístico, quando comparado com grupo tratado exclusivamente com Melagrião[®] (p=0,008). Não houve diferenças estatisticamente significantes nos danos genéticos observados nos linfócitos, ao longo das duas fases do estudo, no grupo exposto à Doxorubicina e o grupo que recebeu Doxorubicina associado ao Xarope de Melagrião[®] (p = 0,778) e nos grupos dos linfócitos não expostos (Controle e Xarope de Melagrião[®]: p = 0,609) à Doxorubicina.

O caráter genotóxico negativo observado pode ser atribuído ao fato de dois dos componentes (*Cephaelis ipecacuanha* e *Polygala senega*) estarem relacionados a características antitumorais como: diminuição do dano em DNA, aumento da expressão do gene supressor de tumor p53, diminuição do stress

oxidativo, diminuição da mutagenicidade e aumento do efeito antimitótico (Souza et al., 2006; Paul et al., 2011).

CONCLUSÃO

O estudo de Toxicologia Clínica mostrou que o Melagrião[®] é seguro na dose empregada e não demonstrou atividade genotóxica frente a linfócitos humanos.

REFERÊNCIAS

- ABOY, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; LANGELOH, A.; BASSANI, V. L. Atividade Antiespasmódica de Soluções extrativas de Folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2002.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. 1994. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell.
- BARNES, J. B., RODGER, I. W., THOMSON, N. C. 1998. **Asthma - Mechanisms and Clinical Management**. 3. ed. London, Academic Press.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; VOLDERS, M. K. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.
- BENT, S. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation. **Journal of General Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 854-859, 2008.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. 2006. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- BRASIL. Resolução N° 6, de 31 de janeiro de 1995. **Instituir e normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 31 de janeiro de 1995.
- BRASIL. Resolução N° 116, de 08 de agosto de 1996. **Publica proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (anexos I e II). Estabelece o prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da publicação desta Portaria, para que interessados apresentem sugestões, junto à Secretaria de Vigilância Sanitária**. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 12 de agosto de 1996a.

BRASIL. Resolução Nº 196, de 10 de agosto de 1996. **Publica diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 10 de agosto de 1996b.

BRASIL. Resolução Nº 251, de 07 de agosto de 1997. **Publica normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 07 de agosto de 1997.

BRASIL. Resolução Nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 25 de fevereiro de 2000.

BRASIL. Resolução Nº 48, de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

CAPASSO, R., IZZO, A. A., PINTO, L., BIFULCO, T., VITOBELLO, C., MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 58-65, 2000.

CARVALHO A. C. B. & SILVEIRA, D. Drogas vegetais: um a antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Med.**, v. 48, n. 2, p. 219-237, 2010.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E., MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHUCHALIN, A. G.; BERMAN, B.; LEHMACHER, W. Treatment of Acute Bronchitis in Adults With a Pelargonium Sidoides Preparation (EPs® 7630): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Explore**, v. 1, n. 6, p. 437-445, 2005.

FREITAS, T. P.; SILVEIRA, P. C.; ROCHA, L. G.; REZIN, G. T, ROCHA, J.; CITADINI-ZANETTE, V.; ROMÃO, P. T.; DAL-PIZZOL, F.; PINHO, R. A.; ANDRADE, V. M.; STRECK, E. L. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 761-766, 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GILMAN, G. A.; HARDMAM, J. G.; LIMBIRD, L. E. 2006. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed, International Edition.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, A. G., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for treatment of Infectious Diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JACOBUS, D.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação da toxicidade oral aguda e em doses repetidas de fitoterápico contendo *Roripa nasturtium* Rusby, *Musa spp.*, *Ficus carica* Linné, *Tagetes minuta* Linné e mel (Xarope de Agrião Composto Cibecol®) em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 3, p. 295-300, 2006.

LI, X. M.; BROWN, L. Efficacy and mechanisms of action of traditional Chinese medicines for treating asthma and allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. 297-308, 2009.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. 2002. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

LORENZI, T. F. 2003. **Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi.

MATOS, F. J. A. 2000. **Plantas Medicinais: Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC.

MATTHYS, H.; EISEBITT, R.; SEITH, B.; HEGER, M. Efficacy and safety of an extract of Pelargonium sidoides (EPs 7630) in adults with acute bronchitis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Phytotherapy**, v. 10, n. 4, p. 7-17, 2003.

NASCIMENTO, D. F.; SANTANA, A. P. M.; LEITE, I. O.; VIANA, F. A. C.; LEITE, A. L. A. S.; MORAES, R. A.; JAMACARU, F. V. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Clinical toxicology study of an herbal medicine with *Passiflora incarnate* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. in healthy volunteers. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 261-268, 2009.

NISHIOKA, S. A. 2006. **Como é Feito o Registro de Medicamentos Novos no Brasil**. 1. ed. Prática Hospitalar.

OLIVEIRA, G. G. 2006. **Ensaios Clínicos: princípios e prática**. 1. ed. Brasília: Editora ANVISA.

- PANDA, A. K. & DEBNATH S. K. Overdose effect of aconite containing Ayurvedic Medicine ('*Mahashankha Vati*'). International Journal of Ayurveda Research, v. 1, n. 3, p. 183-186, 2010.
- PAUL, S.; BHATTACHARYYA, S. S.; SAMADDAR, A.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Anticancer potentials of root extract of *Polygala senega* against benzo[a]pyrene induced lung cancer in mice. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 3, p. 320-327, 2011.
- PAULO, P. T. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. M.; MORAIS, L. C. S. L.; ANDRADE, F. B.; SANTOS, H. B. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1^a, p. 68-76, 2009.
- RAUBER, C.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 15-21, 2006.
- RODRIGUEZ-FRAGOSO, L.; REYES-ESPARZA, J.; BURCHIEL, S.; HERRERA-RUIZ, D.; TORRES, E. Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 15, n. 227, p. 125-135, 2008.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 1999. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 1. ed. Florianópolis: Editora da UFSC.
- SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTA, D. P. L.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 447-454, 2006.
- SOARES, J. L. M. F.; PASQUALOTTO, A. C.; ROSA, D. D.; LEITE, V. R. S. 2002. **Métodos diagnósticos - consulta rápida**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora.
- SOUZA, M. M.; MARTINS, E. R.; PEREIRA, T. N. S.; OLIVEIRA, L. O. Reproductive studies on ipecac (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich; Rubiaceae): meiotic behavior and pollen viability, **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1A, p. 151-159, 2006.
- SPRIET, A.; DUPIN-SPRIET, T.; SIMON, P. 1994. **Methodology of clinical drug trials**. 2. ed. London: Karger.
- VASCONCELOS, M. C. **Estudo de toxicologia clínica e genotoxicidade do fitoterápico Tamaril® cápsula, em voluntários sadios**. 2004. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.
- VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.
- WHO. 1993. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. **World Health Organization**. 1. ed. Geneva.
- WHO. 2003. Toxicity criteria by grade. **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/onctools/whotox.cfm>. Acesso em 15/07/2003.