



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GIOVANI RODRIGUES CORDEIRO MARIANO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (AUBLET)**

MACAPÁ

2012

GIOVANI RODRIGUES CORDEIRO MARIANO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (AUBLET)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ensaios Biológicos

Orientadora: Profa. Dr.^a Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros

MACAPÁ

2012

GIOVANI RODRIGUES CORDEIRO MARIANO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DAS SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (AUBLET)**

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros (Orientadora)
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP

Prof.^a Dr.^a Maria Izabel Tentes Côrtes
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP

Prof.^a Dr.^a Jocivânia Oliveira da Silva
Universidade Federal do Amapá-UNIFAP

Prof. Dr. Marcos Tavares Dias
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA

MACAPÁ

2012

Dedico: Aos meus Pais (Paulo e Terezinha Mariano) e irmãos (Serioja, Yuri, Nayana, Danuza e Janina) que sempre me ensinaram a viver dignamente em todas as situações da vida.

A minha esposa Paolle e filha Giovana, pelo apoio incondicional durante todo este trabalho.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pelo seu infinito amor e bondade na condução sempre para o melhor caminho das nossas vidas.
- A minha Orientadora, Prof.^a Dr.^a Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros, pela criteriosa orientação ao longo deste trabalho, pelo incentivo à busca constante da sabedoria, por toda ajuda, conselho e conhecimento dados a mim e pela paciência em me atender.
- Ao meu grande amigo Dr. Fernando Antonio de Medeiros, pelos seus valorosos ensinamentos na construção e concretização deste sonho.
- Aos Professores do Curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, que contribuíram direta e/ou indiretamente para o meu aperfeiçoamento profissional.
- À Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização deste trabalho.
- Aos colegas da Pós-graduação, pela agradável companhia, as trocas de informações e os debates.
- A todos os funcionários do Biotério do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá-LACEN; em especial ao Veterinário Dr. Aurélio Pinheiro Rodrigues Burmann por suas contribuições específicas e fundamentais ao presente estudo.
- Ao Conselho Regional de Farmácia do Amapá-CRF pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos professores do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).
- A aluna de iniciação científica Cleiziane Melo Alves por toda a ajuda técnica na condução dos experimentos.
- Em especial aos funcionários AntôniaNeura Oliveira Nascimento (Secretária Geral da Pós-graduação), Luciléia Santos Ayres da Silva e Flaviano Pereira Cardoso pela atenção e apoio ao longo deste trabalho.

- Ao meu amigo e parceiro de lutas na sala de aula, laboratório, coleta e pela sua imprescindível ajuda na formatação deste trabalho, Edson F. B. Ribeiro.
- A minha sempre compreensiva e solidária amiga Simoni L. da Silva, pela paciência na leitura e correções do artigo e dissertação.
- A André Mendonça pela grande e indispensável ajuda na tradução do resumo.
- A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste projeto.

“A melhor maneira de alcançar o conhecimento não é pela contemplação, mas pela ação”.

Goethe

RESUMO

A *Vatairea guianensis* (Fabaceae), conhecida popularmente como “faveira”, “fava-impigem”, é uma espécie originária da região amazônica e bastante utilizada na medicina tradicional no tratamento de dermatoses superficiais. Para avaliar a segurança no uso desta espécie e também visando cumprir etapas obrigatórias para o registro de um possível fitoterápico, o objetivo deste trabalho foi estimar a toxicidade pré-clínica aguda do extrato hidroalcoólico das sementes de *V. guianensis* (EHVG). Para tanto realizou-se um teste preliminar de citotoxicidade do extrato frente a *Artemia salina* Leach para obtenção da concentração letal mediana (CL₅₀) e em seguida avaliou-se a toxicidade aguda conforme preconizado na RE90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Para o estudo de toxicidade aguda, foram utilizados 24 ratos Wistar de ambos os sexos (*Ratos Norvegicus Albinus*) os quais receberam agudamente o EHVG (2000 mg/kg, v.o). Sinais gerais de toxicidade, bem como a evolução ponderal, consumo de água e ração e evidenciamento do poder letal do extrato foram observados durante 14 dias após a exposição. No 15º dia o sangue dos animais foi coletado com a finalidade da determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, sendo posteriormente sacrificados para análise macroscópica, cálculo da massa relativa e exame histopatológico de órgãos vitais (coração, fígado, pulmões e rins). A CL₅₀ determinada através do bioensaio em *A. salina* foi de 2692,39 µg/mL, sugerindo que o EHVG tem baixa toxicidade. O extrato de *V. guianensis* não induziu morte nos animais, alterações comportamentais evidentes nem modificações significativas no consumo de água e ração quando comparados com o grupo controle. A evolução ponderal mostrou-se diferenciada entre os machos do grupo teste em relação ao controle, bem como as massas relativas do coração (**p < 0,01), fígado (*p < 0,05) e rins (*p < 0,05). O perfil hematológico apresentou apenas uma diminuição significativa na contagem diferencial dos segmentados dos animais machos (20,17±1,51; 8,83±1,70- p=0,0005***) e fêmeas (26,00±2,39; 13,17±1,25- p=0,0008***) e aumento dos linfócitos em machos (76,33±1,20; 87,83±2,09- p=0,0008***) e fêmeas (70,00±2,45; 83,17±1,62- p=0,0012**) do grupo teste. Dos parâmetros bioquímicos analisados a enzima alanina aminotransferase (ALT), apresentou-se reduzida tanto em machos (115,7±18,9; 65,3±6,5- p=0,0440*) como em fêmeas (139,7±20,7; 80,3±10,2- p=0,0424*) a fosfatase alcalina (168,3±32,9; 80±10,3- p=0,0416*), bilirrubina total (0,6±0,04; 0,8±0,03- p=0,0061**) e bilirrubina indireta (0,33±0,03; 0,55±0,04- p=0,0025**) mostraram-se alteradas apenas nas fêmeas que receberam o EHVG e a glicose mostrou-se reduzida nos machos tratados (161,7±5,0; 125,4±8,92- p=0,0238*). A avaliação macroscópica com características normais, ocorreu redução da massa relativa (%) do coração, fígado e rins dos machos tratados e as análises histopatológicas apresentaram-se com alterações não significativas para fígado e rins. De acordo com o conjunto dos resultados obtidos neste experimento, notou-se uma sensibilidade diferenciada entre os sexos para o EHVG em variados parâmetros, porém podemos inferir que tal extrato apresenta baixa toxicidade quando da exposição aguda via oral (2000mg/kg). Entretanto, estudos complementares de toxicidade sub-crônica e crônica são necessários para uma melhor elucidação do perfil toxicológico da espécie.

PALAVRAS CHAVES: Plantas Medicinais, Toxicidade Pré-Clínica, *Vatairea guianensis*.

ABSTRACT

Vatairea guianensis (Fabaceae), popularly known as “faveira” and “fava-impigem”, is an original species of the Amazon region and widely used in folk medicine in the treatment of superficial dermatoses. For evaluating the safe use of this species and also in order to comply steps required for the registration of a possible herbal medicine, the aim of this study was to estimate the preclinical acute toxicity of the hydroalcoholic extract of the seeds of *V. guianensis* (EHVG). Therefore, a preliminary cytotoxicity test of the extract using *Artemia salina* Leach was conducted to obtain the median lethal concentration (LC₅₀). Then it was evaluated the acute toxicity as established in the RE 90/2004 of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). For the acute toxicity study, it was used 24 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), which acutely received the EHVG (2000 mg/kg, po). General signs of toxicity, as well as weight gain, water intake, feed intake and disclosure of the lethal power of the extract were observed for 14 days after exposure. On the 15th day, blood samples of the animals were collected for the purpose of determination of hematological and biochemical parameters, and then they sacrificed for macroscopic analysis, calculation of the relative mass and histopathological examination of vital organs (heart, liver, lungs and kidneys). LC₅₀ determined by bioassay using *A. salina* was 2692.39 µg/mL, suggesting that the EHVG has low toxicity. The extract of *V. guianensis* did not induce death in the animals, behavioral changes or significant changes in water intake and feed intake when compared with control groups. The weight gain proved to be different between males of the test and control groups, as well as the relative masses of the organs (heart **p < 0.01, liver *p < 0.05 and kidneys * p < 0.05). The blood profile showed significant decrease in the differential counting of segmented cells of males (20.17 ± 1.51; 8.83 ± 1.70 – p = 0.0005***) and females (26.00 ± 2.39; 13.17 ± 1.25 – p = 0.0008***) and increase in lymphocytes of males (76.33 ± 1.20; 87.83 ± 2.09 – p = 0.0008***) and females (70.00 ± 2.45; 83.17 ± 1.62 – p = 0.0012**) in the test group. Biochemical parameters of the enzyme alanine aminotransferase (ALT) appeared reduced in both males (115.7 ± 18.9; 65.3 ± 6.5 – p = 0.0440*) and females (139.7 ± 20.7; 80.3 ± 10.2 – p = 0.0424*). Alkaline phosphatase (168.3 ± 32.9; 80 ± 10.3 – p = 0.0416*), total bilirubin (0.6 ± 0.04; 0.8 ± 0.03 – p = 0.0061**) and indirect bilirubin (0.33 ± 0.03; 0.55 ± 0.04 – p = 0.0025**) were changed only in females that received the EHVG. Changes in the macroscopic and histopathological examination were not evident. According to the overall results obtained in this experiment, it was noticed a differential sensitivity between the genders for the EHVG in various parameters, but we can infer that the extract has low acute toxicity when administered orally (2000 mg/kg). However, further sub-chronic and chronic toxicity studies are needed to elucidate the toxicological profile of the species.

Keywords: herbal medicine. preclinical toxicity. *Vatairea guianensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagem de <i>V. guianensis</i> : (A) Copa mostrando folhas e flores; (B) e (C) Espique.....	29
Figura 2-	Imagem das folhas e flores de <i>V. guianensis</i>	30
Figura 3-	A.Imagem do frutoe B.semente seca de <i>V. guianensis</i>	31
Figura 4-	Imagem da exsicata de <i>V. guianensis</i>	32
Figura 5-	Estrutura química do Crisofanol.....	37
Figura 6-	Estrutura química da Emodina.....	37
Figura 7-	Estrutura química da Fisciona.....	37
Figura 8-	Estruturas químicas do Apiol e Safrol.....	50
Figura 9-	Imagem de Ratos Wistar agrupados em gaiola.....	56
Figura 10-	Imagem de <i>Artemia salina</i> L.....	57
Figura 11-	Mapa de localização geográfica da vila de Mazagão velho, município de Mazagão, Estado do Amapá (Mapa elaborado por Edson Ribeiro, PPGCS, UNIFAP. (com autorização).....	58
Figura 12-	Fluxograma do processo de obtenção do EHVG.....	62
Figura 13-	Fluxograma do Bioensaio com <i>Artemia salina</i> L.....	64
Figura 14-	Peso da ração.....	66
Figura 15-	Peso dos animais.....	66
Figura 16-	Fluxograma do ensaio da toxicidade aguda.....	69
Figura 17-	Percentual (%) de larvas sobreviventes da exposição a diferentes concentrações do EHVG.....	73
Figura 18-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a evolução ponderal de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. O teste utilizado para comparação entre médias foi o <i>t student</i>	75

Figura 19-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a consumo de ração de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m	76
Figura 20-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a consumo de água de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m.....	77
Figura 21-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) do coração de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. O teste utilizado para comparação entre médias foi o <i>t student</i>	78
Figura 22-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) dos pulmões de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m.....	78
Figura 23-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) do fígado de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. O teste utilizado para comparação entre médias foi o <i>t student</i>	79
Figura 24-	Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) dos rins de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. O teste utilizado para comparação entre médias foi o <i>t student</i>	79
Figura 25-	Secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina da musculatura cardíaca exibindo fibras levemente distendidas demonstrando características de normalidade em um animal macho que recebeu o número 1 e de uma fêmea que recebeu o número 1 em gaiolas separadas (dos grupos tratados com EHVG (A) e (B). Detalhe da fibra muscular exibindo rbdomioblastos com núcleos fusiformes com cromatina tipicamente dispersa (setas delgadas) e citoplasma apresentando estriações transversais características em macho-1 e fêmea-1 do grupo tratado com EHVG (C) e (D).....	83
Figura 26-	Secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina de tecido pulmonar. Observar alvéolos pulmonares (ap) com características usuais em um animal macho-1 (A) e uma fêmea-1 (B) do grupo tratado com EHVG. (C) Bronquíolos pulmonares (bp) típicos em um animal macho-1 (C) e uma fêmea-1 (D) tratados com EHVG. Agregados linfóides dos sistemna BALT (<i>Bronchiolar Associated LymphoidTissue</i>) em um macho-1 e uma fêmea-1 do grupo tratado (E) e (F).....	84

Figura 27- Secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina do tecido renal. (A) Cótex renal exibindo glomérulo (gr) típico e (B) glomérulo com espessamento da cápsula de Bowman, ambos no animal-1 macho tratado com EHVG. (C) Túbulos proximais mostrando acúmulo de material eosinofílico amorfo de aspecto proteináceo no animal-2 macho tratado com EHVG. (D) detalhe da figura anterior, destacando túbulo contendo material proteináceo (setas delgadas)..... 85

Figura 28- Secções histológicas hepáticas coradas em Hematoxilina e Eosina mostrando hepatócitos bem corados, com citoplasma finamente granuloso, organizados em cordões, no animal-1 macho (A) e um animal-1 fêmea (B) do grupo tratado com EHVG. Destaque para corpo apoptótico (seta) no animal-2 macho do grupo tratado (C) e área focal de discreta perda de eosinofilia citoplasmática consistente com edema intracelular moderado no animal-4 fêmea do grupo tratado (D)..... 86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação Sistemática da Espécie <i>V. guianensis</i>	33
Quadro 2	Constituintes químicos isolados do gênero <i>Vatairea</i>	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Efeito da administração aguda de EHVG sob o perfil hematológico dos ratos machos (n=6) e fêmeas (B n=6) quatorze dias após a exposição, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (média±EPM), **p>0,01 e ***p<0,001 *versos* controle (teste “t” de Student) 80
- Tabela 2-** Efeito da administração aguda de EHVG sob o perfil bioquímico dos ratos machos (n=6) e fêmeas (B n=6) quatorze dias após a exposição, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (média±epm), *p<0,05 e **p<0,01 *versos* controle (teste “t” de Student) 81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS, UNIDADES E SIGLAS

%	Porcento
<	Menor (que)
>	Maior (que)
µg/mL	Micrograma por mililitro
ABIFISA	Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde
ABIFITO	Associação Brasileira de Indústria Fitoterápica
ALS	Aspartatoaminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BT	Bilirrubina total
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CDL	Contagens Diferencial de Leucócitos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração Hemoglobina Corpuscular Média
CL50	Concentração Letal Mediana ou Concentração Letal 50%
CTL	Contagens Total de Leucócitos
DL50	Dose letal 50%
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EHVG	Extrato Hidroalcoólico de <i>Vataireaguianensis</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAL	Fosfatase alcalina
fL	Fentolitros
g	Gramas(s)
g/dL	Gramas por decilitro
g/Kg	Gramas por Kilograma
G-GT	Gama-glutamyltransferase
Hb	Hemoglobina
Hc	Hemácias
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito
IEPA	Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Amapá
kg	Quilograma(s)
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá
mg	Miligrama (s)
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro(s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Nível de significância (intervalo de confiança)
PDW	Amplitude de Distribuição das Plaquetas
pg	Picograma
PLT	Plaquetas
RCGP	Razão de Células Grandes de Plaquetas
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RDW	Red blood cell Distribution Width
RE	Resolução Especial
rpm	Rotações por minuto
SNFMF	Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia
U/dL	Unidade por decilitro
U/L	Unidade por litro
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
V	Volume
v.o	Via oral
VCM	Volume Corpuscular Médio
VMP	Volume Médio das Plaquetas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS <i>V. guianensis</i> (AUBLET)	26
2.2 SUBFAMÍLIA FABOIDEAE	27
2.3 GÊNERO <i>Vatairea</i>	28
2.4 DESCRIÇÕES DA ESPÉCIE <i>V. guianensis</i> (AUBLET)	28
2.5 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>V. guianensis</i> (AUBLET)	33
2.6 SINONÍMIA DA ESPÉCIE <i>V. guianensis</i> (AUBLET)	33
2.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E USOS DA ESPÉCIE <i>V. guianensis</i> (AUBLET).....	34
2.8 ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA <i>V. guianensis</i> (AUBLET).....	34
2.9 HISTÓRICO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	39
2.10 REGULAMENTAÇÃO DOS FITOTERÁPICOS.....	42
2.11 TOXICIDADE RELACIONADA AO USO DE PLANTAS.....	48
2.12 VALORIZAÇÃO MONETÁRIA DO MERCADO DOS FITOTERÁPICOS	52
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 LOCAL DA PESQUISA	55
4.2 MATERIAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	55

4.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	55
4.4 MATERIAL BOTÂNICO	57
4.5 SOLUÇÕES E REAGENTES	59
4.6 APARELHAGEM.....	59
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....	60
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	60
4.9 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS SEMENTES DE <i>V. guianensis</i> (AUBLET).....	61
4.10 BIOENSAIO COM <i>Artemia salina</i>L.....	63
4.11 TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA	65
4.12 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA.....	65
4.13 EXAME LABORATORIAL DO SANGUE	70
4.14 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	70
4.15 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	71
4.16 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO	71
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
5 RESULTADOS	73
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EHVG EM <i>Artemia salina</i>.....	73
5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO EHVG EM RATOS..	74
5.2.1 Observação clínica dos animais	74
5.2.2 Desenvolvimento ponderal dos animais.....	74
5.2.3 Consumo de ração	75
5.2.4 Consumo de água	76

5.2.5 Exame macroscópico e massa relativa (%) dos órgãos	77
5.2.6 Análise do perfil hematológico.....	80
5.2.7 Análise do perfil bioquímico	81
5.2.8 Exame Histopatológico.....	82
6 DISCUSSÃO	87
6.1 AVALIAÇÃO DO EHVG FRENTE AO BIOENSAIO DE <i>Artemia salina</i>	87
6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA (DOSE ÚNICA).....	87
7 CONCLUSÃO	96
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais com finalidades terapêuticas remonta ao momento em que o homem através da observação empírica dos efeitos estranhos produzidos pelos vegetais e da observação da natureza começou a descobrir os diversos usos do reino vegetal. A partir deste momento ocorreu um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para o seu próprio benefício (DISTASI, 1996; MARTINS; CASTRO; CASTELLANI, 1994). Esta prática milenar ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo de evolução da humanidade e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recursos terapêuticos eficazes (DISTASI, 1996).

De acordo com Heinrich e Gibson (2004), em muitos países em desenvolvimento, as pessoas utilizam um sistema de medicina tradicional onde o conhecimento a respeito da maioria das plantas medicinais está baseado somente no uso popular (etnofarmacológico), sem qualquer investigação científica de seus constituintes químicos ativos (metabólitos secundários) e efeitos biológicos.

O Brasil, com seu território continental e clima tropical, inclui-se entre os países de maior biodiversidade do mundo, abrigando mais de 50 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em grandes biomas: a Amazônia com 25-30 mil espécies, a Mata Atlântica com 16 mil, o Cerrado com 7 mil e as demais espécies distribuídas na Caatinga e na Floresta Subtropical (EMBRAPA, 2010).

Nosso país, devido às suas características relacionadas às variações climáticas e composição diversificada de solo nos vários ecossistemas que compõem sua flora, possibilitam com que no reino vegetal se desenvolva uma rica diversidade de metabólitos secundários; produtos químicos estes que garantem vantagens para sobrevivência e perpetuação das espécies vegetais (WINK, 1990), com possíveis atividades terapêuticas. Isto é, são os responsáveis pelas propriedades farmacológicas (farmacocinéticas e farmacodinâmicas), existentes nas plantas (SCHENKEL et al., 2007).

No Brasil historicamente a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta fundamentalmente, influências das culturas indígena, africana e européia (MARTINS et al., 1994).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14 de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológico, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Os fitoterápicos são uma classe de medicamentos largamente utilizados no país e constituem um mercado em franca expansão.

No âmbito mundial, o uso de medicamentos fitoterápicos, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde em 1978, com o advento da conferência em Alma-Ata, antiga União da República Socialista Soviética (URSS), que teve como finalidade, estimular sua utilização (BRAGANÇA, 1996).

No entanto, um fator que ainda impede o crescimento e uso de fitoterápicos é que a maioria das plantas em uso não se encontram descritas em códigos oficiais (formulários e farmacopéias), não havendo inclusive estudos sobre as elas (YUNES et al., 2001). Por outro lado, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA JUNIOR, 2008). E, muitas vezes as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas ou apresentarem suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos.

Segundo Turolla e Nascimento (2006), apenas uma pequena parcela das plantas medicinais possui dados científicos que comprovam sua eficácia e seu espectro toxicológico, bem como a garantia de qualidade do produto. Isto é, tem seus níveis de segurança de uso definidos em testes normatizados cientificamente.

Para Barros e Davino (2003), a toxicidade de uma substância é a capacidade que esta tem de causar algum desequilíbrio ao organismo com o qual entra em contato. Refere-se assim ao potencial de um toxicante em produzir o efeito tóxico.

A exigência de estudos científicos de segurança e eficácia para medicamentos fitoterápicos tem sido uma tendência mundial na última década, levando diversos países à edição de normas legais nesse sentido (ASCHAWANDEN, 2001).

Em todo mundo várias pesquisas tem comprovado a ocorrência de efeitos adversos com o uso de medicamentos a base de plantas. Estudos realizados no Reino Unido sugerem uma incidência de evento adverso atribuído aos fitoterápicos em torno de 7% em pacientes que procuraram os serviços de saúde com sintomatologia relacionada a estes efeitos

(ABBOTT, 1988; PINN, 2001). Outros estudos realizados em hospitais de Taiwan e Hong Kong mostraram uma significativa admissão hospitalar de pacientes ocasionada por plantas, variando entre 0,2 a 0,5% (PINN, 2001).

No Brasil, em 2008, segundo dados do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico- Farmacológicas), foram registrados 85.925 casos de intoxicação por uso indevido de plantas e desses, 441 indivíduos foram a óbito.

Contribuindo negativamente para o crescimento da problemática que envolve o uso indiscriminado de plantas medicinais, segundo Marques (1992), em média 50% dos produtos fitoterápicos usados no Brasil apresentam algumas irregularidades devido à presença de matéria orgânica estranha, insetos, problemas de identificação botânica, teores de fitocompostos abaixo do especificado e adulteração.

Para evitar problemas desta natureza, diversas normas regulamentam a produção de medicamentos, incluindo os fitoterápicos. Os medicamentos a base de plantas podem ser manipulados ou industrializados, conforme a legislação brasileira.

De acordo com Carvalho (2005), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) avalia diversos critérios de qualidade, segurança e eficácia para os fitoterápicos, exigindo requisitos similares aos requeridos para os medicamentos convencionais; desta maneira, fitoterápicos não podem ser produtos de qualidade inferior, nem associados à falta de risco de toxicidade.

No entanto, a toxicidade de plantas medicinais constitui hoje um problema sério de saúde pública, sendo um motivo de preocupação crescente nos meios científicos que envolvem estudos com fitoterápicos, pois tem sido comum a ocorrência de adulterações e toxidez dos mesmos. Assim, a investigação do potencial tóxico de produtos de origem vegetal pode elucidar importantes aspectos farmacológicos de seus princípios ativos, permitindo uma utilização segura, respeitando seus possíveis riscos toxicológicos de utilização.

A espécie *V. guianensis* é uma planta da família Fabaceae (CHASE et al., 1993; DOYLE, 1994; CHAPPILL, 1995), subfamília Faboideae (BARROSO et al., 1991), gênero *Vatairea* (CAVADA et al., 1998; BARROSO et al., 1991; LIMA, 1982) e espécie *V. guianensis* (REVILLA, 2000; LIMA, 1982).

Popularmente conhecida como “faveira”, “fava-impingem”, “fava bolacha”, “fava mutum”, “faveiro” e “Angeim do igapó” (PIEIDADE, 1988); cujas sementes são utilizadas no tratamento de micoses superficiais. Tem seu uso muito difundido no estado do Amapá, principalmente, nas cidades de Mazagão, Porto Grande e Arquipélago do Bailique (SANTOS et al., 2003).

No médio e baixo Amazonas a população utiliza as sementes de *V. guianensis* contra diversos tipos de problemas de pele, sob a forma de tintura alcoólica ou por aplicação direta na pele de suas sementes maceradas. A literatura relata também que as cascas do caule e das raízes são utilizadas pela população contra fungos, no período em que esta espécie não está em fase de frutificação (PIEDADE; WOLTER 1988; REVILLA, 2000).

Vários estudos descrevem o isolamento de substâncias químicas em várias partes desta espécie. Do cerne de *V. guianensis*, Simatupang et al. (1967) relataram a ocorrência do ácido 9-antronacrisofânico, 9- antronafisciona e 10- antronafisciona; do Tronco, Formiga(1975) e Piedade (1988) isolaram a emodina; cascas do caule, Piedade e Filho (1988) isolaram Fisciona, Ácido oleanólico e a Lactona do ácido diidromacaerinico.

Piedade e Wolter (1988) realizaram estudo químico, no qual relataram a ocorrência do isolamento das antraquinonas crisofanol, fisciona e emodina das cascas do caule da espécie *V. guianensis*.

Otobelli et al. (2009) isolaram do extrato hexânico das semente duas substâncias que denominaram FAB 05 e FAB 07.

Poucos estudos foram encontrados em levantamento bibliográfico sobre ações farmacológicas da espécie *V. guianensis*. Atividades antiparasitária com o extrato hexânico das cascas do fruto de *V. guianensis* foram testadas frente ao protozoário *Leishmania amazonenses* (OTOBELLI et al., 2009). E de acordo com o estudo de Araújo (2010), a avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana do extrato das sementes *V. guianensis* foi demonstrada ação na Lesão de Mucosite Oral.

Como também, a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos hidroetanólico, hexânico, clorofórmico e metanólico das sementes de *V. guianensis* (SILVA, 2011).

De acordo com Kozubek (1999) e Tyman (2005), as sementes da espécie *V. guianensis* apresentam propriedades antifúngicas em decorrência da presença das antraquinonas isoladas crisofanol 3 e fisciona 4, sendo esta informação científica muito importante no fortalecimento das informações populares do uso desta planta(sementes) no tratamento de micoses superficiais.

Apesar de ser bastante conhecida e utilizada para tratamento diversas dermatoses, a espécie *V. guianensis* somente é conhecida nas limitadas literaturas sobre a espécie, referências apenas nas áreas ecológicas, botânicas e químicas (SIMATUPANG et al., 1967; FORMIGA et al., 1975; PIEDADE, 1988). Assim, devido grande utilização da *V. guianensis* com finalidades terapêuticas em várias comunidades da Região Norte e vários países da América do Sul, este trabalho visa promover um melhor conhecimento e esclarecimento do

perfil toxicológico desta planta. Frente ao exposto, fica evidente a importância de estudos toxicológicos sistematizados com a espécie.

A utilização da espécie *V. guianensis* após este estudo e outros complementares e essências, poderá torná-la uma alternativa segura (fitoterápico) e eficaz no tratamento de dermatoses superficiais; com a possibilidade deste produto ser acessível as populações de baixa renda em virtude da grande quantidade desta espécie em toda a Região Norte; como também o surgimento de mais informações para o fortalecimento do banco de dados da referida espécie.

Neste contexto, a finalidade deste estudo é avaliar a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico das sementes de *V. guianensis* (EHGV) em animais experimentais. O protocolo experimental seguiu o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2004) e juntamente foi realizado o testes de bioatividade frente ao microscustáceo *Artemia salina* L. baseado na técnica descrita por Meyer et al. (1982), ambos descritos mais adiante.

O presente estudo foi direcionado pela Resolução Especial (RE) nº 90/04 de 16 de março de 2004, “Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”; nestes testes estão enquadrados os ensaios de toxicidade aguda (dose única ou repetida), subaguda, crônica e testes adicionais tais como o estudo especial de genotoxicidade e avaliação toxicológica tópica (sensibilização dérmica, irritação cutânea e irritação ocular).

A finalidade do ensaio de toxicidade aguda é caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao valor estimado da DL₅₀. Este parâmetro que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50 % dos animais de uma população, sendo útil para identificar a toxicidade relativa da substância (FOWLER; RUTTY, 1983).

Para Larini (1997), os testes de toxicidade tem a finalidade de classificar uma substância ou composto químico do ponto de vista toxicológico e, ao mesmo tempo, fornecer informações a respeito da forma correta de seu emprego, bem como as medidas preventivas e curativas quando do seu uso inadequado; independente do tempo de uso proposto para a espécie humana. Estes testes avaliam o impacto fisiológico após a administração de uma substância natural ou química em espécies animais, e os dados desses estudos fornecem bases importantes para a posterior validação clínica dos mesmos (CEVALLOS, 1996).

Portanto, as informações obtidas por meio do estudo de toxicidade aguda oral são de crucial importância na avaliação da segurança de substâncias químicas para uso humano e animal, entre as quais também se encontram as drogas vegetais e fitoterápicos.

Como teste preliminar foi realizado o bioensaio com o microcrustáceo *Artemia salina* que é considerado um bioindicador devido ao seu reduzido e específico grau de tolerância a um determinado fator ambiental, de modo que apresente uma resposta nítida em face de pequenas variações na qualidade do ambiente (BAROSA et al., 2003).

A utilização da *A. salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado, rapidez e o baixo custo o que favorece a sua utilização em diversos estudos. Ensaio de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL₅₀) (LUNA et al., 2005).

Segundo Meyer et al. (1982) foi estabelecido uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL₅₀, de extratos de plantas sobre microcrustáceo *A. salina* considerando que quando verificados valores acima de 1000 µg/mL e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos.

Esta técnica é considerada um método alternativo, pois se identifica com o que preconiza a ciência moderna em relação ao princípio dos 3Rs; que tem como meta, a substituição (replacement)- experimentos que utilizam animais por outros inferiores na escala zoológica, a redução (reduction) do número de animais e o refinamento (refinement) com a diminuição da severidade dos processos (REPETTO, G; REPETTO, M, 1995).

O crescimento do mercado mundial de fitoterápicos é estimado em 10 a 20% ao ano e as principais razões que impulsionaram esse grande desenvolvimento nas últimas décadas foram: a valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis e de uso de produtos naturais; os evidentes efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos; a comprovação científica do valor terapêutico de vários fitoterápicos e o preço mais acessível à população com menor poder aquisitivo (SOUZA; MIRANDA, 2004).

Em termos econômicos o mercado global de fitoterápicos movimenta US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano, com crescimento anual de 15%, bem superior aos 4% ao ano dos medicamentos sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico nacional movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão e emprega mais de 100 mil pessoas. Além disso, 82% da população brasileira utilizam produtos à base de ervas (FEBRAFARMA, 2007).

Por fatores de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais tem sido a opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira (ASSAD, 2005; SERAFIN, 2006).

Finalmente, quanto à estrutura, a dissertação foi organizada da seguinte forma: inicialmente, mediante uma revisão bibliográfica, este estudo oferece informações sobre a

referida espécie em aspectos diversos, tais como: botânicos, sinonímia, distribuição geográfica, seus usos e aspectos químicos. Em seguida, o presente estudo traz uma síntese sobre o histórico das plantas medicinais, regulamentação dos fitoterápicos, toxicidade relacionada ao uso de plantas e valorização monetária do mercado dos fitoterápicos; posteriormente foi realizado o bioensaio toxicológico com o microcrustáceo *Artemia salina*, método alternativo amplamente utilizado em triagem de substâncias de origem vegetal.

Por fim, foi realizado o estudo de toxicidade pré-clínica aguda do EHVG. Os testes de toxicidade aguda têm como objetivos principais: avaliar a toxicidade intrínseca de uma substância ou composto, analisar a suscetibilidade das espécies, Identificar possíveis órgãos alvo e fornecer informações para o estabelecimento de níveis de dose para estudos mais prolongados (toxicidade crônica).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DE *V. guianensis* (AUBLET)

A espécie *V. guianensis* pertence à família Fabaceae. A família Fabaceae é a terceira maior família das angiospermas (CHASE et al., 1993; DOYLE 1994; CHAPPILL, 1995). Compreende aproximadamente 700 gêneros e 18.000 espécies (POLHILL; RAVEN; STIRTON, 1981), dentre as quais muitas possuem importância econômica (TUCKER, 2003).

Três subgrupos são geralmente reconhecidos dentro da família Fabaceae: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. Na maior parte das classificações (POLHILL; RAVEN; STIRTON, 1981; JUDD et al., 1999), estas são consideradas subfamílias, mas são muitas vezes encontradas como famílias separadas (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN, 1983).

Na subfamília Mimosoideae encontra-se 65 gêneros e aproximadamente 3000 espécies; enquanto que a subfamília Faboideae é a maior com 455 gêneros e aproximadamente 12000 espécies (CHAPPILL, 1995). Já a subfamília Caesalpinioideae é formada por 170 gêneros e aproximadamente 3000 espécies (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000; BRUNEAU, 2001), sendo extremamente diversa em morfologia e ontogenia floral (TUCKER, 2003), compartilhando algumas das características de Mimosoideae e de Faboideae.

A subfamília Caesalpinioideae é atualmente dividida em cinco tribos: Cercideae, Caesalpinieae, Cassieae, Detarieae e Macrolobieae (BRUNEAU, 2001; TUCKER, 2003).

As análises filogênicas moleculares e de caracterização morfológica (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000); mostraram que as subfamílias Faboideae e Mimosoideae são totalmente monofiléticas (DOYLE et al., 2000; KAJITA et al., 2001; WOJCIECHOWSKI, 2003). Já a subfamília Caesalpinioideae é polifilética, com alguns gêneros mais próximos a Mimosoideae e outros mais relacionados a Faboideae (LAVIN, 1987). Apenas uma das tribos de Caesalpinioideae (Cercideae) aparenta ser monofilética (BRUNEAU, 2001).

As flores da família Fabaceae são extremamente variáveis de tamanho, forma, cor e tipo de polinização. Os polinizadores podem ser abelhas, vespas, formigas, borboletas, besouros, pássaros e morcegos, entretanto a polinização por abelhas é a mais comum (ARROYO, 1981).

As glândulas de néctar extraflorais são muito comuns em Mimosoideae e Caesalpinioideae (MACKEI, 1989).

A maioria das flores de Leguminosas é pentâmera e apresentam 5 séptalas e 5 pétalas, com 1 pétala que se destaca das demais por sua coloração diferente. A função desta pétala é a atração visual dos polinizadores (JUDD et al., 1999). As flores de Leguminosas possuem ainda 2 verticilos com 5 estames cada único carpelo perfazendo 21 órgãos florais no total (TUCKER, 2003).

A posição dos órgãos florais difere entre as subfamílias. Em Caesalpinioideae, o verticilo de séptalas, o de pétalas e os dois verticilos de estames são pentâmeros e alternados. Esta distribuição da posição dos órgãos florais de Caesalpinioideae é semelhante à de Faboideae, mas diferente da Mimosoideae (TUCKER, 2003).

Do ponto de vista químico, a família Fabaceae apresenta amplo potencial, sendo que muitas espécies são constituídas de tritepenos, os quais podem ser usados nos processos de industrialização de produtos farmacêuticos. Na etnomedicina, a casca do caule de *Crudia amazonica* Benth, é usada como vermífugo, as sementes de *V. guianensis* são utilizados no tratamento de empingem e os frutos em tratamentos de vários problemas dermatológicos (SOUZA; SILVA, 2001).

2.2 SUBFAMÍLIA FABOIDEAE

A literatura descreve aproximadamente 482 gêneros na subfamília Faboideae e cerca de doze mil espécies com ampla distribuição em regiões de clima temperado e tropical. Os gêneros de plantas lenhosas pertencentes a esta subfamília, apresentam maior representatividade nas regiões tropicais, sendo que, no mundo, os gêneros arbóreos mais primitivos pertencentes a esta subfamília predominam no hemisfério Sul, em especial, no Brasil. Sua distribuição é ampla em todas as regiões do país e é considerado o grupo mais evoluído das Leguminosas (BARROSO et al., 1991).

2.3 GÊNERO *Vatairea*

O gênero *Vatairea*, pertencente à família Fabaceae - Faboideae, é exclusivo da faixa neotropical, incluindo apenas 7 espécies de leguminosas arbóreas, as quais encontram-se distribuídas desde o sul do México até o sudeste do Brasil, abrangendo o México, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru e Brasil. O centro de concentração da maior variedade desse gênero está situado nas regiões florestais da Amazônia Central. O nome do gênero refere-se a um nome popular utilizado na Guiana. (CAVADA et al., 1998; BARROSO et al., 1991; LIMA, 1982)

Quanto às espécies florestais amazônicas pertencentes a esse gênero destacam-se, a *Vatairea guianensis*, *Vatairea fusca*, *Vatairea erythrocarpa*, *Vatairea paraensis* e *Vatairea sericeae*. Outras espécies do gênero habitam as matas de encosta como *Vatairea heteroptera*. Já no sul do México e América Central destaca-se a espécie *Vatairea lundelli* (LIMA, 1982).

Os estudos encontrados na literatura referentes a esse gênero estão voltados principalmente para as áreas de ecologia e botânica e praticamente são poucos os relacionados aos aspectos farmacológicos, químicos e toxicológicos.

As publicações existentes sobre esse gênero concentram-se em sua maioria nas espécies *Vatairea guianensis* Aubl, *Vatairea heteroptera* Ducke, *Vatairea macrocarpa* Benth, *Vatairea sericea* Ducke e *Vatairea paraensis* Ducke.

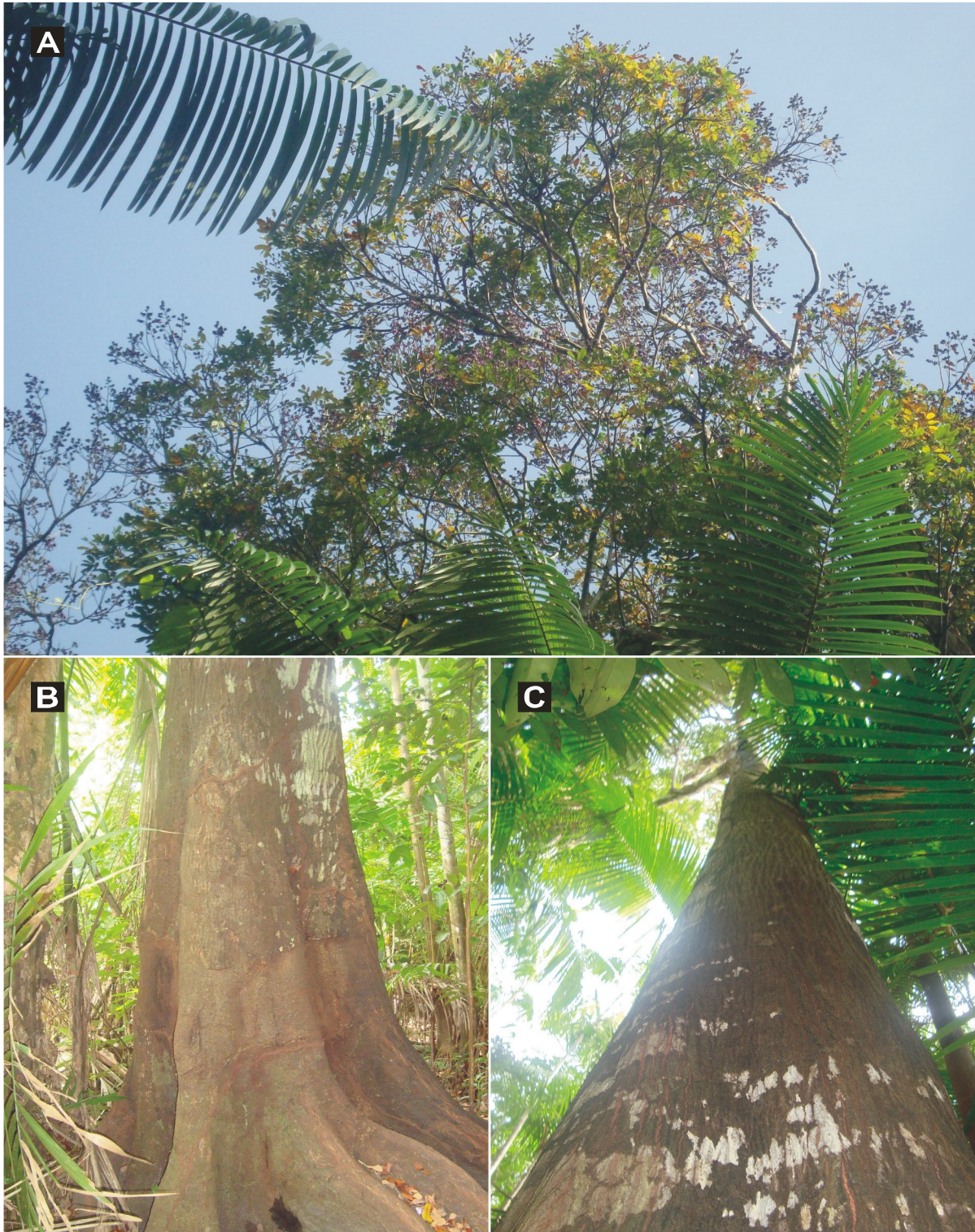
2.4 DESCRIÇÕES DA ESPÉCIE *V. guianensis* (AUBLET)

É comum nas várzeas a presença de determinadas famílias e espécies, pois são áreas com condições restritas, ou seja, solos com alto nível de saturação, fluxo constante de maré, período e altura de inundação, salinidade etc. É neste tipo de área que encontramos a *V. guianensis* (JARDIM et al., 2004).

A *V. guianensis* pertence à família Fabaceae, sendo comumente denominada de fava-de-bolacha, mas também recebe outras denominações: fava-d'água, fava-de-impigem, faveira-amarela, faveira-bolacha, faveira-grande, faveira-grande-do-igapó, lombrigueira, sucupira-amarela. A planta é uma árvore monopoidal (Figura 1), caducifólia, de 20 a 30 metros de

altura, de 0,5 a 2 metros de diâmetro, de copa ampla, frondosa e heterogênea, com ramificação abundante de forma irregular, casca de tronco grossa e rugosa, com sulcos longitudinais superficiais, de cor marrom a cinza-esverdeada, de 2 a 2,5 cm de espessura, que exsuda uma resina translúcida (REVILLA, 2000).

Figura 1- Imagem de *V. guianensis*: (A) Copa mostrando folhas e flores; (B) e (C) Espique.



Fonte: Arquivo pessoal

As partes utilizadas são os frutos, as sementes e as folhas. As sementes para uso no tratamento de impigem e também a o uso de sua madeira para construção de casas e canoas pelos ribeirinhos. A amêndoa contém: chrisofanol, physcion, emodina, ácido oleanólico, ácido de hidromacheiro e lactona (REVILLA, 2000).

Folhas compostas de até 60 cm de comprimento, paripinadas, alternas, com margens inteiras ou dentadas. Inflorescência em panículas terminais de 15 a 45 cm de comprimento. Flores numerosas, dióicas, pequenas, polígamas de cor amarelo-esbranquiçada; frutos, drupas de 8 a 12 cm de comprimento, por 6 a 11 cm de largura, ovóides, obovóides, casca fina e lisa de cor verde a amarela (Figura 2). Endocarpo suculento com testa membranácea e relativamente grande, contendo uma grande semente (REVILLA, 2000).

Figura 2- Imagem das folhas e flores de *V. guianensis*



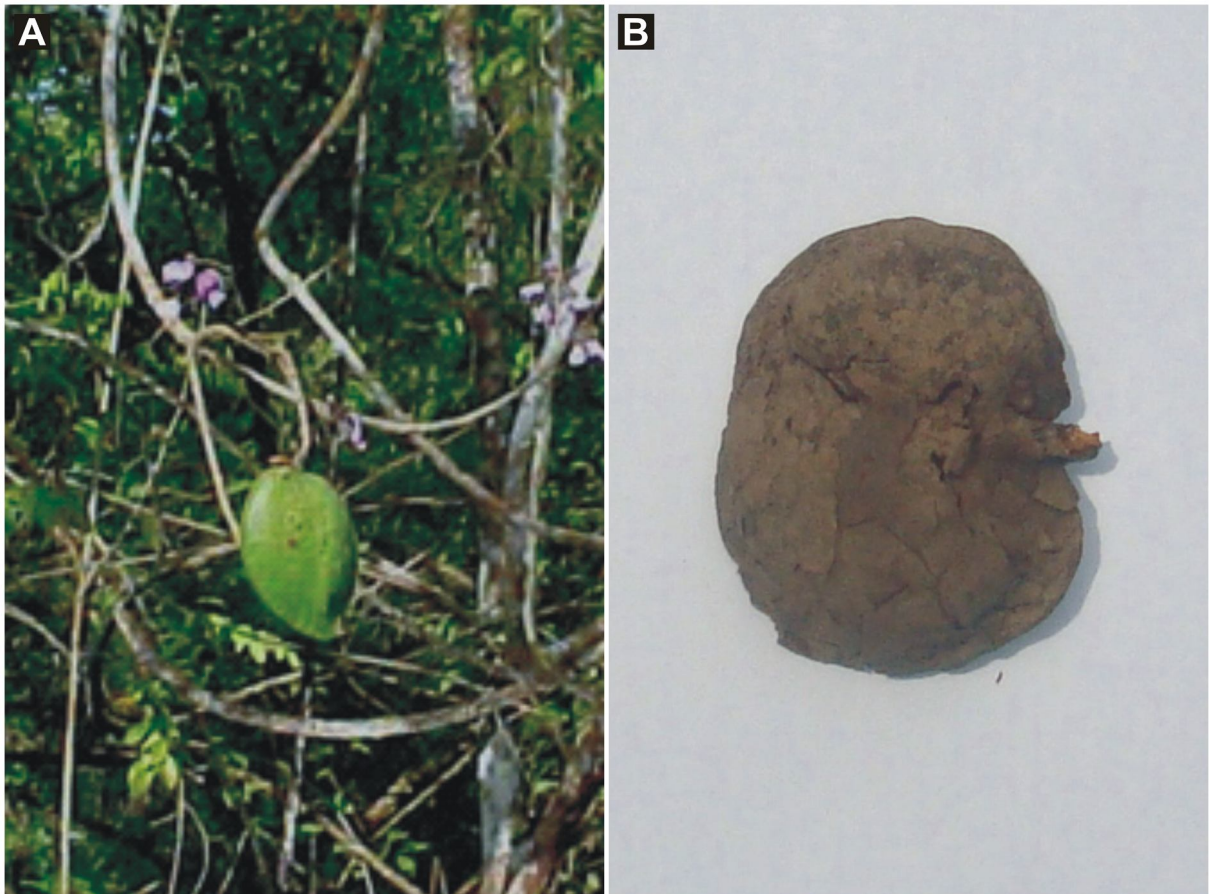
Fonte: Arquivo pessoal

A espécie está distribuída em toda região amazônica. Em destaque para o sul da América Central, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Ela habita geralmente matas inundáveis de várzea, igapós e restingas baixas. O clima favorável

para *V. guianensis* é o tropical, em zonas com 1500 a 3200 mm de precipitação pluvial, temperaturas médias entre 25 e 30 °C e umidade relativa entre 70 a 90%. Divide seu ambiente com espécies como o mulugu, taperebá e jenipapo. Também é possível encontrá-la na interface da várzea com a terra firme e na terra firme (REVILLA, 2001).

A semente seca (Figura 3 e 4) é descrita na literatura como exalbuminada, com superfície externa marrom claro, com tegumento delgado e quebradiço. Apresenta as reservas acumuladas nos cotilédones (simples); radícula pequena na comissura dos cotilédones; gêmula amarelo brilhante; sua consistência é dura e quebradiça; forma sub circular, achatada (semi globosa); odor agradável e levemente achocolatado; sabor amargo suave na superfície. A retirada do tegumento revela superfície lisa, apresentando coloração escura, tendendo ao preto. Em relação ao tamanho, possui cotilédones grandes, medindo em média 3,96cm de comprimento por 3,83cm de largura (média de 44 cotilédones); em seção transversal apresenta gêmula amarelo brilhante; em seção longitudinal mostra eixo hipocótilo – radicular reto e radícula pequena na comissura dos cotilédones (CORRÊA, 1969; PIEDADE; WOLTER, 1988; SANTOS et al., 2003).

Figura 3- A. Imagem do fruto e B. semente seca de *V. guianensis*



Fonte: A. MELO, 2006; B. : Arquivo pessoal

Figura 4- Imagem de exsicata de *V. guianensis*



Fonte: Arquivo pessoal

2.5 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE *V. guianensis* (AUBLET)

Quadro 1- Classificação Sistemática da Espécie *V. guianensis*

DIVISÃO	Magnoliophyta (Angiospermae)
CLASSE	Magnoliatae (Dycotyledonae)
SUB CLASSE	Rosidae
ORDEM	Rosales
FAMÍLIA	Fabaceae
SUB FAMÍLIA	Faboideae
TRIBO	Dalbergieae
GÊNERO	<i>Vatairea</i>
ESPÉCIE	<i>Vatairea guianensis</i> (AUBLET)

Fonte: CRONQUIST, 1981.

2.6 SINONÍMIA DA ESPÉCIE *V. guianensis* (AUBLET)

Na Amazônia esta espécie é popularmente conhecida também como “faveira”, “fava de empigem”, “faveira de empigem”, “fava bolacha”, “fava mutum”, “faveiro” e “Angelim do igapó” (PIEDADE; WOLTER, 1988).

Dentre a população indígena dos Palikur, na Amazônia setentrional, na fronteira Brasil e Guiana Francesa, extremo norte do Estado do Amapá a *V. guianensis* é chamada de waru. No Suriname, é conhecida por gales habbes, no Peru de anacapi e marupa del bajo; na Guiana Francesa é chamada de graine i dartres, bois dartre e maria congo e na Venezuela de guaboa (GRENAND et al, 1996).

2.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E USOS DA ESPÉCIE *V. guianensis* (AUBLET)

Árvore nativa da Amazônia, comum em áreas de florestas sazonalmente inundáveis, como as matas de igapó e várzea da Amazônia. Encontrada raramente em terra firme, ocorrendo em toda região banhada pelo Rio Amazonas e seus afluentes. Alcança a fronteira da Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru e Suriname (CORRÊA, 1969).

Especialmente no Amapá, a ocorrência dessa espécie é maior no município de Mazagão, sendo também encontrada em outros municípios do Estado como Porto Grande e Arquipélago do Bailique (SANTOS et al., 2003).

A madeira dessa árvore é forte e resistente sendo útil para construção civil, marcenaria, carpintaria e caixas industriais (LIMA, 1982).

Informações etnofarmacológicas na literatura relatam que o suco do fruto é empregado na medicina tradicional amazônica na cura da empigem e no tratamento de certas dermatoses no Brasil, Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa (LIMA, 1982).

O período de inflorescência ocorre nos meses de fevereiro e março e sua frutificação entre abril e junho (SCHONGART et al., 2002). O óleo extraído das sementes é usado topicamente contra manchas, sardas e pano de rosto (CORRÊA, 1969).

Estudos encontrados na literatura demonstraram a utilização desta espécie como fonte de alimento para quelônios na natureza (*Podocnemis unifilis*) mais conhecido como tracajá, o que pode indicar que esta planta não é venenosa. Contudo, no uso tradicional não encontramos nenhuma referência ao uso oral (PORTAL et al., 2002).

2.8 ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA *V. guianensis* (AUBLET)

Na literatura científica, foram encontrados poucos estudos relacionados à constituição química do gênero *Vatairea*. Contudo, a maioria das referências com este gênero se reportou ao isolamento de antraquinonas. Foi descrito também a ocorrência de outras classes como esteróides, catequinas, epicatequinas e triterpenos. Os resumos dos compostos químicos isolados do gênero *Vatairea* estão apresentados no quadro a seguir:

Quadro 2- Constituintes químicos isolados do gênero *Vatairea*

SUBST.	NOME	ESPÉCIE	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIAS
1	Crisofanol	<i>V. heteroptera</i> <i>V. guianensis</i> <i>V. macrocarpa</i> <i>V. paraensis</i>	Tronco	Formiga, 1975 Formiga, 1975 Formiga, 1975 Formiga, 1975
2	Emodina	<i>V. heteroptera</i> <i>V. guianensis</i>	Tronco	Formiga, 1975 Piedade, 1988
3	Formonometina	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
4	7-hidroxiflavona	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
5	Sitosterol	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
6	Stigmasterol	<i>V. heteroptera</i>	Tronco	Formiga, 1975
7	Ácido crisofânico (1,8-diidroxí-3-metil-antraquinona)	<i>V. macrocarpa</i>	Tronco	Matos, 1988
8	Catequina	<i>V. macrocarpa</i>	Caule	Strada,2003
9	Epicatequina	<i>V. macrocarpa</i>	Caule	Strada,2003
10	Ácido 9-antronacrisofânico	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Simatupang, 1967
11	9-antronaficiona	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Simatupang, 1967
12	10-antronafisciona	<i>V. guianensis</i>	Tronco	Simatupang, 1967
13	Fisciona	<i>V. guianensis</i>	Cascas do caule	Piedade e Filho, 1988
14	Ácido oleanólico	<i>V. guianensis</i>	Cascas do caule	Piedade e Filho, 1988
15	Lactona do ácido diidromacaerinico	<i>V. guianensis</i>	Cascas do caule	Piedade e Filho, 1988
16	FAB-05; FAB-07	<i>V. guianensis</i>	Cascas do fruto	Otobelli, 2009.

Estudos realizados por Formiga et al. (1975), revelaram que a partir do extrato benzênico do tronco de *Vatairea heteroptera*, foram registrados o isolamento de compostos antraquinônicos crisofanol, emodina e formonometina, ácidos graxos saturados em C₁₆ e C₂₄, 7- hidroxiflavona, sitosterol e stigmasterol. Além disso, verificou-se nesse mesmo trabalho a

ocorrência de crisofanol nos extratos benzênicos de *V. guianensis*; *Vatairea macrocarpa* Benth e *Vatairea paraensis* Ducke (PIEDADE, WOLTER, 1988). O estudo dessas três espécies revelou a presença de crisofanol comum a elas. Isso pode indicar que o crisofanol pode ser uma das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas do gênero.

Estudos fitoquímicos realizados por Matos et al. (1988) revelaram que o principal constituinte químico isolado do cerne da espécie *Vatairea macrocarpa* foi identificado como ácido crisofânico (1, 8 - dihidroxi-3-metil-antraquinona), baseados em dados espectrais de RMN¹H, de UV e IV.

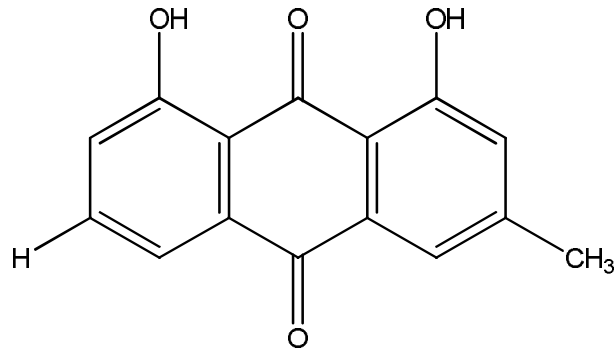
Outros estudos químicos realizados por Strada et al. (2003) e colaboradores, com a espécie *Vatairea macrocarpa* Benth, relatados na literatura, descrevem o isolamento e a caracterização da catequina e seu isômero epicatequina do extrato metanólico das cascas do caule desta espécie. Nesse trabalho os autores concluíram que o isolamento dessas catequinas, descritas pela primeira vez no gênero *Vatairea* confirmou a grande concentração de taninos no caule desta espécie em decorrência de tais substâncias serem precursoras de sua formação.

Simatupang; Dietrichs e Gottwald (1967), relataram a ocorrência do ácido 9-antronacrisofânico, 9-antronafisciona e 10-antronafisciona no cerne de *V. guianensis* e sugeriram que essas substâncias poderiam ser as responsáveis pelas propriedades irritantes à pele das pessoas que manuseavam a madeira importada pela Alemanha dos países Latino americanos.

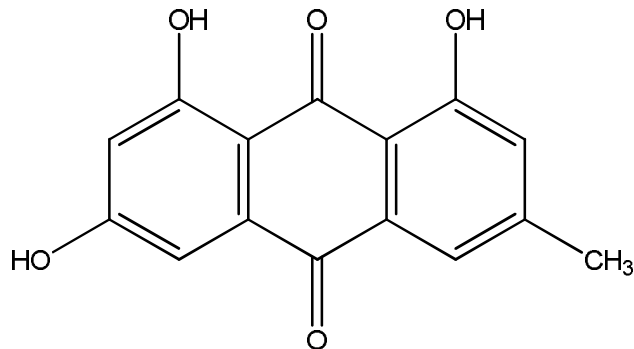
Piedade e Wolter (1988) realizaram estudo químico, no qual relataram a ocorrência do isolamento das antraquinonas crisofanol (Figura 5), fisciona (Figura 6), emodina (Figura 7) e os triterpenos conhecidos como ácido oleanólico e a lactona do ácido diidromacaerinico do extrato metanólico das cascas do caule da espécie *V. guianensis*. A presença desses dois últimos constituintes citados foi descrita pela primeira vez no gênero *Vatairea* no referido trabalho. Segundo Fernand et al. (2008), o Crisofanol possui propriedades antifúngicas.

Registros na literatura relatam atividades antifúngicas, anticancerígenas e bactericida para o crisofanol 3 e fisciona 4 (ZHOU et al., 2006; COOPOOSAMY et al., 2006; MINKYUN et al., 2008).

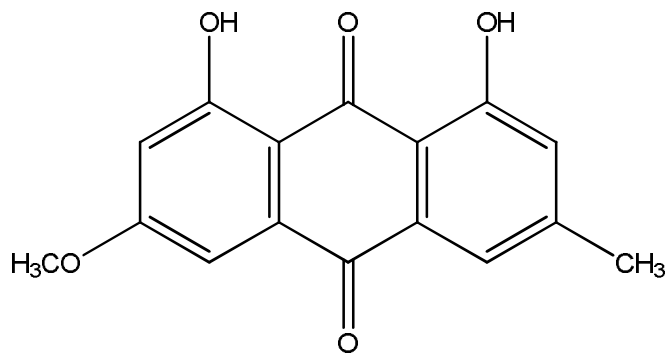
As informações populares sobre a *V. guianensis* relatam seu uso no tratamento de micoses superficiais, como por exemplo, impingem, o que pode ser explicado pela presença das antraquinonas isoladas crisofanol 3 e fisciona 4, possuidoras de atividades antifúngica (KOZUBEK; TYMAN, 1999; 2005).

Figura 5- Estrutura química do Crisofanol

Fonte: KOZUBEK; TYMAN 1999; 2005.

Figura 6- Estrutura química da Emodina

Fonte: PIEDADE; WOLTER, 1988.

Figura 7- Estrutura química da Fisciona

Fonte: KOZUBEK; TYMAN 1999; 2005.

Recentemente Otobelli et al. (2009), submeteram as cascas do fruto de *V. guianensis* ao estudo fitoquímico e isolaram do extrato hexânico duas substâncias que denominaram FAB 05 e FAB 07, por estarem em processo de patente. O espectro de massas da FAB 05 exibiu pico do íon molecular com razão de massa /carga 254,1 u, compatível com fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_4$ e para FAB 07 a razão de massa/ carga foi 284. 1 u, compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_4$.

Em estudo químico dos frutos da *V. guianensis* realizado por Otobelli et al. (2009) demonstrou que o óleo essencial apresentou as seguintes características:

- Muito viscoso
- Coloração vermelha

Quanto a sua constituição tem as seguintes substâncias:

- Aldeídos com (23,26%) – O dodecanal foi o que se apresentou em maior concentração 7,98%.
- Ácidos carboxílicos (64,73%)- 49,12% correspondem a dois ácidos graxos *cis*-insaturados, o ácido (9Z)-octadecenoico (24,95%) e o ácido docosaenoico (24,17%), sendo este último pertencente a classe dos ômega-3 (CARVALHO et al., 2003).

O ácido graxo docosahexaenoico, também conhecido como o DHA (22:6n-3), tem importante função na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina (CHEN et al., 1996; SANGIOVANNI; CHEW 2005). O ácido graxo (9Z)-9-octadecenoico, também conhecido como oleico, é um ácido graxo essencial (Omega-9), o qual participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios (SANGIOVANNI; CHEW, 2005).

Do extrato etanólico dos frutos de *V. guianensis* foram isolados dois sólidos amarelos os quais foram identificadas como sendo duas antraquinonas: crisofanol 3 e fisiona 4. As estruturas das antraquinonas 3 e 4 foram elucidadas através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados na literatura, (MESELHY, 2003; BARBOSA et al., 2004).

Outra informação encontrada na literatura sobre a espécie *V. guianensis* que dá fundamentação científica para seu uso na medicina tradicional no tratamento de impingens foi o estudo realizado por Araújo (2010), no qual, avaliou-se os efeitos do extrato de várias plantas sobre bactérias e fungos relacionados à lesão de Mucosite oral, dentre estes extratos foi testado o extrato de *V. guianensis*.

Em trabalho apresentado por Silva (2011), foi avaliado os resultados dos Extratos Obtidos das Sementes de *V. guianensis* sobre a atividade antibacteriana *in vitro*.

2.9 HISTÓRICO DAS PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas com fins medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Em todas as civilizações, as plantas foram utilizadas como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações artísticas, culturais e religiosas e também como meio restaurador da saúde (SCHENKEL et al., 2007). Este conhecimento passou a ser disseminado por diversos povos e nações sendo acumulado ao longo dos séculos (DI STASI, 1996).

Vários estudos têm demonstrado como as civilizações antigas conseguiram descobrir as vertentes para a utilização das plantas medicinais para finalidades terapêuticas; comprovando assim que o conhecimento sobre a utilização das plantas medicinais tem acompanhado a evolução da humanidade (DEVIENNE et al., 2004). Segundo Figueiredo (2005), uma teoria bastante aceita é que o homem seguia somente o seu instinto natural.

Segundo Mors (1982), o homem primitivo começou usando plantas apenas com finalidades alimentares. Com a observação da natureza de uma maneira inconsciente, nossos ancestrais começaram a perceber de uma maneira muito empírica, os efeitos que algumas plantas provocavam nos animais e também neles mesmos. Por exemplo, a observação de religiosos sobre os efeitos excitantes dos cafeeiros selvagens (*Coffea arábica L.*), nos herbívoros domésticos que os tinham ingerido, fez com que estes se utilizassem desses vegetais para prolongar o estado de vigília a que eram submetidos devido às suas piedosas ocupações. Deste processo empírico de observação, de acordo com Lewis (2001), os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e gêneros vegetais, bem como quais são as partes dos vegetais que se enquadram ao uso medicinal.

Destas experiências com ervas, tiveram sucessos com a obtenção da cura esperada e fracassos quando o resultado desejado não era alcançado; como a produção de efeitos colaterais severos e em caso extremos até a morte (DORTA, 1998).

Em relatos históricos sobre o uso de plantas com finalidades medicinais, verificamos que existem referências de seu uso em praticamente todas as antigas civilizações.

Vários estudos tem demonstrado que o registro histórico mais antigo da utilização de espécies vegetais com fins terapêuticos seja o da medicina chinesa realizado pelo imperador Shen Nong (2000 a.C.), que investigou o potencial medicinal de diversas plantas e outros

produtos naturais, registrados no “Livro da Medicina Interna do Imperador Amarelo”, onde constavam registros de 365 drogas vegetais. Muitos textos desta época se tratam de documentos religiosos, denotando a tradicional associação entre aspectos filosóficos e espirituais, aplicados para a Medicina Chinesa, Islâmica e Ayurvédica (BOTSARIS, 1995).

O respeito à milenar tradição da fitoterapia chinesa fez com que as fórmulas utilizadas naquela época fossem as mesmas de hoje. Estas fórmulas magistrais hoje são encontradas nos livros em diversos idiomas e são utilizadas e estudadas em quase todos os países.

No Japão, desde 1950 o Ministério da Saúde Japonês reconhece 148 destas fórmulas como de utilidade pública (LOBOSCO, 2005). Um exemplo da importância desta obra é a grande utilização do ginseng como medicamento nos dias atuais. Um antigo texto chinês extraído da Farmacopéia de Shen-Nung diz o seguinte sobre o ginseng:

“Tem sabor adocicado e sua propriedade é ligeiramente refrescante, cresce nos desfiladeiros das montanhas. É usado para reparar as cinco vísceras, harmonizar as energias, fortalecer a alma, afastar o medo, remover substâncias tóxicas, a brilhar os olhos, abrir o coração e melhorar o pensamento. Uso contínuo dará vigor ao corpo e prolongará a vida”.

Já outros estudos apontam que os primeiros registros foram escritos em placas de argila, oriundas da Mesopotâmia e datados por volta de 2600 a.C (GURIB, 2006).

Nas antigas civilizações ocidentais, os primeiros registros datam de 1500 a.C. quando foi escrito o manuscrito egípcio “Papiro de Ebers”, considerado um dos mais importantes livros da cultura médica. Neste, foram descritos cerca de 700 drogas diferentes, incluindo extratos de plantas, metais como chumbo e cobre e veneno de animais de várias procedências (ALMEIDA, 1993).

Neste mesmo papiro, mencionam-se ainda fórmulas específicas para doenças conhecidas e, dentre as espécies que aparecem na lista, estão incluídas algumas utilizadas por fitoterapeutas até hoje como sene, papoula e meimendo (ELDIN, 2001).

De acordo com Martins et al. (2000) registros históricos demonstram também que, desde 2300 a.C, os egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas e traziam de suas expedições tantas outras.

Na antiga Grécia, as plantas e o seu valor terapêutico ou tóxico eram muito conhecidos e Hipócrates (460-377 a.C), denominado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra “Corpus

Hipocratium” a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento (MARTINS et al., 2000).

Para Lorenzi e Matos (2002) no Ocidente os registros da utilização da fitoterapia são mais recentes, sendo suas primeiras prescrições datadas do século V a.C; no início da era Cristã, o grego Dioscórides, em sua obra “De Matéria Médica”, catalogou e ilustrou cerca de 600 plantas usadas para fins medicinais, descrevendo o emprego terapêutico de muitas delas, sendo os nomes por ele apresentados ainda hoje utilizados na Botânica. Esta obra é tida como a principal referência ocidental para área de plantas medicinais até o Renascimento.

As primeiras informações referentes à flora nativa do Brasil se devem aos cronistas coloniais que na sua maioria procuravam registrar os deslumbramentos causados pelas terras do Novo Mundo (CAMARGO, 1998).

O Brasil possui uma farmacopéia popular muito diversa, baseada em plantas medicinais, resultado de uma miscigenação cultural envolvendo africanos, europeus e indígenas, com introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e escravos (MARTINS et al., 2000).

De acordo com Tomazzone, Negrelle e Centa (2006), o sistema etnofarmacológico europeu foi introduzido no Brasil, inicialmente, pela colonização portuguesa e posteriormente por outros povos que aqui chegaram.

Segundo Lorenzi e Matos (2002), os primeiros europeus que aqui chegaram se depararam com uma grande quantidade de plantas medicinais em uso pelas inúmeras tribos indígenas e os pajés transmitiram o conhecimento da sua utilização, sendo este aprimorado por sucessivas gerações.

Os colonizadores europeus demonstram ter grande interesse em saber e catalogar quais as práticas de saúde utilizadas pelos nativos, entre elas estava o uso de plantas medicinais.

Dessa forma, uma gama de conhecimentos ligados à prática de saúde, acumulada pelos índios há milênios começou a ser passada ao europeu (CARREIRA, 2002).

No que se refere ao sistema etnofarmacológico africano, ressalta-se que ele foi trazido juntamente com o tráfico negreiro para o Brasil, no decorrer dos séculos XVI, XVII e XVIII.

Esse sistema associa rituais religiosos ao uso de plantas medicinais, comum em diversas culturas africanas. No Brasil, a maior expressão desse sistema ocorre no estado da Bahia. Foi através da cultura africana que se incorporaram plantas como a arruda (*Ruta graveolens*) e o jambolão (*Syzygium jambolanum*).

O sistema etnofarmacológico indígena é o mais amplo de todos e pode ser encontrado em praticamente todo o território nacional. Entre as plantas, atualmente conhecidas está a caapeba (*Piper umbellatum*), o abajerú (*Chrisobalanus icaco*) e o urucum (*Bixa orellana*).

Foi com ambição de se apropriar dos conhecimentos dos índios, que a interação dos colonos portugueses e particularmente dos jesuítas com os habitantes da colônia, permitiram que eles se apropriassem da cultura destes com relação às práticas de cura. Os colonizadores logo perceberam que perfeitamente adaptados ao clima, os índios eram resistentes às intempéries e resolviam seus problemas de saúde com os recursos que a natureza lhes oferecia e com os poderes de cura de seus pajés (KURY, 2001).

A matéria médica indígena, além dos vegetais, empregava sangue humano, saliva, urina, cauda e cabeça de cobra, gorduras de animais, bicos de aves, chifres e ossos calcinados, entre outros. O sangue era reconstituente, a saliva cicatrizante, a urina excitante e indutora de vômito (SANTOS, 1947), sendo os pajés os detentores da arte de curar (KURY, 2001).

Além destes principais sistemas etnofarmacológicos, Tomazzone, Negrelle e Centa (2006), destacam ainda no Brasil, o sistema etnofarmacológico Oriental trazido pelos imigrantes chineses e japoneses no final do século XIX, que contribuiu para a introdução de novas plantas na cultura brasileira tais como o gengibre (*Zingiber officinale*), a lichia (*Litchi chinensis*) e a raiz forte (*Wassabia japonica*).

As plantas medicinais e a prática da medicina popular no Brasil de hoje apresentam características que remontam ao período colonial, quando começaram a chegar os primeiros colonizadores portugueses atracando em nossa costa (FRANÇA, 1926).

Atualmente, no Brasil, o uso terapêutico de produtos de origem vegetal utilizados no cuidado do homem, sem acesso as instituições de saúde, está fortemente legitimado e enraizado nesse meio dominado pelas práticas alopáticas (ALVIM et al., 2004).

2.10 REGULAMENTAÇÃO DOS FITOTERÁPICOS

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica mundial. Ao longo da história a regulamentação destes produtos, desde o período que foi documentado na China por volta de 3000 a.C, na obra Pen Ts' ao do chinês Shen Nung, até os dias atuais vem passando por um contínuo processo de regulamentação legal e validação científica, tendo como objetivo que sua utilização possa assegurar aos seus usuários a tão desejada tríade: segurança, eficácia e qualidade no universo que envolve a legislação de produtos originados do reino vegetal no Brasil e no Mundo (TYLER, 1996).

A utilização de fitoterápicos tem apresentado um notável crescimento, exigindo uma normatização adequada para garantir a qualidade em todas as etapas de elaboração destes medicamentos. A regulamentação dos fitoterápicos está em processo de implementação em muitos países, principalmente, de forma mais consolidada na Europa.

No entanto, ainda não há uma uniformidade ou padronização em termos de regulamentação que seja utilizado mundialmente. Nos Estados Unidos as plantas assim como as vitaminas, sais minerais e aminoácidos são classificados como suplemento alimentar através pelo “*The Dietary Supplement Health and Education Act of 1994*” (LEWIS, 2001).

Já os países da Europa estão intensificando esforços para unificar a legislação referente aos medicamentos fitoterápicos, amplamente utilizados nestes países, em particular, na Alemanha e França. Na Alemanha destaca-se um índice de 90% de uso de formas farmacêuticas contendo algum componente de origem vegetal (WHO, 2003).

Tendo em vista o amplo consumo de produtos de origem vegetal no Brasil e o crescente desenvolvimento de fitoterápicos como medicamentos em escala industrial, a aplicação de normas sobre todo o ciclo de produção é uma exigência cada vez mais presente. Veiga-Junior e Pinto (2005) enfatizam que as pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, como também a fiscalização do comércio por parte dos órgãos competentes.

Diversos estudos demonstram que as plantas medicinais possuem efeitos indesejáveis e muitas vezes tóxicos, remetendo à conscientização do seu bom uso, segundo aspectos também cientificamente comprovados (TOLEDO et al., 2003).

Em nosso país, o registro e fiscalização de medicamentos existe desde a época do Brasil colônia, mas sua verdadeira estruturação teve origem na década de 1970, quando dentro do organograma departamental do Ministério da Saúde foi criada a Vigilância Sanitária (COSTA, 1999).

O principal órgão responsável pela regulamentação das plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico (BRASIL, 1999).

A regulamentação quanto ao uso de medicamentos à base de vegetais começou legalmente a partir da “Farmacopéia Brasileira Para o Reino e Domínios de Portugal”, publicada em 1794, de autoria de Francisco Tavares, da Universidade de Coimbra que vigorou como código Farmacêutico no Brasil até sua independência em sete de setembro de

1822. Desta época em diante, esta mesma farmacopéia continuou vigente, porém a partir de 1837, também foi adotado o “Codex Medicamentarius” de origem francesa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998).

A “Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil”, foi à primeira farmacopéia brasileira e foi redigida pelo Farmacêutico Adolfo Albino Dias da Silva, sendo oficializada em quatro de setembro de 1926, tornando-se obrigatória a partir de 15 de agosto de 1929. Esta apresentava informações sobre uma série de espécies botânicas, como o nome científico da planta, parte utilizada, caracterização farmacognóstica, macroscópica e microscópica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998).

Já no ano de 1931, com o decreto de nº 19606, que regulamentou as atividades relacionadas ao âmbito das farmácias, destaca-se entre elas a responsabilidade pela fiscalização do exercício da farmácia, detalhes sobre a profissão farmacêutica, entre outras. Este decreto também isentava de registro os medicamentos fitoterápicos, baseado no fato de que eles eram preparações farmacopéicas, preparadas magistralmente e facilmente processadas (PETROVICK; MARQUES; PAULA, 1999). Porém, logo em seguida começaram a surgir e a conquistar o mercado farmacêutico os medicamentos sintéticos e, com eles, o aparecimento de muitas reações adversas graves. Por isso, em 30 de outubro de 1967, é publicado o Decreto de N°22 do Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (SNFM); que estabelece normas para o emprego das preparações fitoterápicas, o controle de qualidade, as indicações terapêuticas, documentações necessárias para o registro e realização de ensaios farmacológicos e clínicos. A partir desta portaria, passa-se a exigir a submissão de pedidos de licenciamentos para fitoterápicos, mesmo que estes estivessem descritos nas Farmacopéias, fazendo-se necessária a apresentação de toda documentação disponível sobre o produto (BRASIL, 1967).

Em seguida, veio à lei de nº 5991 de 17 de dezembro de 1973 que mais uma vez conseguiu dar mais uma evolução em se tratando de fitoterápicos. Pois, esta lei estabeleceu que a dispensação de plantas medicinais fosse privativa de farmácias e ervanárias; exigindo a presença de farmacêuticos apenas em farmácia e drogarias, os excluído das ervanarias. Apesar da não exigência do farmacêutico nas ervanarias, esta lei obrigou que as plantas medicinais fossem comercializadas exclusivamente nestes estabelecimentos, e não em mercados, lojas de cosméticos, entre outras (BRASIL, 1973).

No ano de 1976 foi sancionada a Lei 6360 que regulamentou as normas para o registro e avaliação de novos medicamentos que não incluía os fitoterápicos. Esta Lei tornou oficial a não necessidade de registro para os medicamentos fitoterápicos e a partir deste momento, as

preparações farmacêuticas contendo matérias-primas vegetais descritas em Farmacopéias associadas a outras estariam isentas de registro (BRASIL, 1976).

Em âmbito mundial, o uso de medicamentos fitoterápicos, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978, quando realizou uma conferência em Alma-Ata (antiga URSS) onde foi estabelecida uma declaração na qual constava que “o cuidado integral para todos e por todos é uma necessidade não só no âmbito da saúde, mas para o futuro dos países que aspiram a continuar sendo nações soberanas em um mundo cada dia mais injustas”. Esta declaração foi um consenso com a presença de 134 países, 67 organismos internacionais e dezenas de organizações não governamentais. A proposta era “Saúde para todos no ano 2000”, onde um dos principais pontos foi à incorporação das práticas tradicionais, entre elas a fitoterapia, nos cuidados da saúde (OMS/UNICEF, 1979) com esta iniciativa ocorreu um impulso na utilização das plantas medicinais em todo mundo.

Em 1981, a Portaria n.º 212 de 11 de setembro de 1981, do Ministério da Saúde, em seu item 2.4.3 define o estudo de plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde. No ano 1982, a criação do Programa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos – CEME, do Ministério da Saúde, tem como objetivo o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, através do estabelecimento de medicamentos originados a partir de determinação do real valor farmacológico de preparações de uso popular a base de plantas ditas medicinais.

Sua estratégia de ação consiste em submeter às preparações de espécies vegetais, tais quais são usadas pela população em geral, a uma completa bateria de testes farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos e clínicos, através dos quais se procura a confirmação ou não da propriedade terapêutica que lhes é atribuída. Aquelas preparações que receberem a confirmação da ação medicamentosa, bem como de eficiência terapêutica e de ausência de efeitos prejudiciais, estarão aptas a se integrarem à Relação Nacional de Medicamentos Essenciais-RENAME (BRASIL, 2002).

Realizada no ano de 1986, a 8ª Conferência Nacional de Saúde trouxe, dentre suas recomendações a “[...] introdução de práticas alternativas de assistência à saúde no âmbito dos serviços de saúde, possibilitando ao usuário o acesso democrático de escolher a terapêutica preferida”. Com vistas à viabilização dessa recomendação, algumas medidas foram tomadas, como a regulamentação da implantação da fitoterapia nos serviços de saúde nas unidades federadas, com a resolução da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN) n.º 08, de 08 de março de 1988/Ministério da Saúde (BRASIL, 1988).

Ainda em 1986 através da Portaria Nº 19 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), tornava obrigatório o registro na DINAL (Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde) das especiarias e ervas destinadas a infusões ou chás que não contivessem com indicações no rótulo. No mesmo ano também foi emitida a Portaria Nº 32 que instituía a definição e as características para distinção das especiarias e ervas destinadas a infusões ou chás, usando como critério a presença ou não de indicações terapêuticas nos rótulos (PETROVICK, MARQUES, PAULA, 1999).

Na primeira década de 2000, a ANVISA publicou várias Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) e Resoluções Especiais (RE), tornando este período de grande evolução no que se refere à legislação dos medicamentos de origem vegetal. Começando em 24 de fevereiro de 2000, que entra em vigor a RDC nº. 17 (BRASIL, 2000).

Normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária em 16 de março de 2004 foi publicada a RDC nº. 48/2004, que veio substituir a RDC nº 17/2000, atualizando a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos.

Além desta RDC nº48, também foram publicadas a RE nº. 88/2004, que traz a “Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos,” a RE nº 89/2004, que publica a “Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos”; a RE nº 90/2004, que publica o “Guia para Realização dos Testes de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos”; a RE nº. 91/2004, com o “Guia para Realização de Alterações, Inclusões, Notificações e Cancelamentos Pós-Registros de Fitoterápicos” (BRASIL, 2004).

O ano de 2006 ficará marcado na luta pela consolidação dos fitoterápicos, pois foi por meio de Decreto nº. 5813 de 22 junho de 2006 que Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual se constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (CALIXTO, 2003; BRASIL, 2006).

De acordo com Rodrigues (2006), a Portaria Interministerial nº 2960, de 09 de dezembro de 2008, aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico, tornando assim mais consolidada a prática de uso seguro das plantas com propriedades terapêuticas.

Com vistas a atingir o objetivo da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que visa “[...] garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de

plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”, este Programa foi concebido baseado em alguns princípios para sua construção: melhoria da atenção à saúde, uso sustentável da biodiversidade brasileira e fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, desenvolvimento industrial e tecnológico e perspectiva de inclusão social e regional, além de participação popular e do controle social sobre todas as ações decorrentes desta iniciativa. Já como objetivos específicos apresentam os seguintes pontos:

- 1- Ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais.
- 2- Construir o marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos a partir dos modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países.
- 3- Promover pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva.
- 4- Promover o desenvolvimento sustentável das cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos e o fortalecimento da indústria farmacêutica nacional neste campo.
- 5- Promover o uso sustentável da biodiversidade e a repartição dos benefícios decorrentes do acesso aos recursos genéticos de plantas medicinais e ao conhecimento tradicional associado (BRASIL, 2006).

No ano de 2010, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, lança a RDC nº. 14 de 31 de março, que tem como objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos. Sendo esta RDC dividida em seis capítulos (BRASIL, 2010):

- I. Capítulo – disposições iniciais
- II. Capítulo – do registro de produtos nacionais
- III. Capítulo – do registro de produtos importados
- IV. Capítulo – das alterações pós-registro
- V. Capítulo – da renovação do registro
- VI. Capítulo – das disposições finais e transitórias

A regulação dos fitoterápicos é uma busca incansável para que estes medicamentos consigam cientificamente comprovar e obter a tríade ideal para qualquer medicamento: segurança, qualidade e eficácia.

2.11 TOXICIDADE RELACIONADA AO USO DE PLANTAS

Os relatos históricos e contemporâneos comprovam que todos os povos ou etnias do mundo fizeram e ainda fazem proveito das plantas medicinais, ou seus derivados, de forma direta ou indireta para o tratamento de males que acometem o homem (KOROLKOVAS, 1996).

A cultura popular da utilização de plantas medicinais, trazida através dos tempos, corrobora no uso indiscriminado de plantas medicinais dentro do contexto da automedicação. Tal uso é comum nas nações em desenvolvimento, onde a Organização Mundial da Saúde estima que 80% das pessoas dependem da medicina tradicional (FARNSWORTH, 1997).

Segundo Sharapim (1996) e Carvalho (2005), o uso de extratos vegetais com fins terapêuticos (fitoterápicos), tem sido crescente tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento.

De acordo com Cunha (2003), existe aproximadamente no planeta cerca de 250.000 espécies botânicas. Destas, apenas um inexpressivo percentual foi investigado quanto à sua farmacologia e toxicologia, isso torna este universo que compreende o consumo de plantas medicinais uma grande incógnita relacionada ao binômio “Risco / Benefício”.

Embora haja no país uma legislação que estabeleça critérios para a qualidade, e normas para produção e comercialização desses produtos, estes ainda têm sido comercializados fora dos padrões estabelecidos, sem garantia da eficiência terapêutica desejada ou da ausência de riscos à saúde do consumidor. Além disso, há a venda de produtos a base de plantas medicinais sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica de sua eficácia e segurança (YUNES; CALIXTO, 2001) e ainda ausência de farmacovigilância (BRANDÃO et al., 2002).

Para Calixto (2000), há dois tipos de efeitos (problemas) adversos relacionados ao uso de plantas medicinais. O primeiro é considerado intrínseco a estas plantas e pode ser relacionada à sua toxicidade, a uma super dosagem e/ou a interação com outros fármacos. O extrínseco está relacionado à sua manufatura e a problemas com a incorreta identificação da

planta utilizada, falta de padronização na preparação, contaminação, substituição e adulteração de plantas, preparação e/ou dosagem incorreta.

Existem várias causas responsáveis pelo desencadeamento de intoxicações com plantas medicinais como, por exemplo, falta de conhecimento a respeito de condições de cultivo, associada à correta identificação farmacobotânica da planta, informações insuficientes sobre reações adversas, esquema posológico, período de tempo a ser empregado, entre outras e, em especial, as interações medicamentosas decorrentes e falta de validação científica.

Atualmente, sabe-se que diversas plantas medicinais usualmente utilizadas e consideradas como seguras possuem substâncias tóxicas em sua composição e apresentam restrições quanto às partes a serem utilizadas; além disso, há variações das concentrações dos princípios ativos com relação à região de plantio e época de colheita, dentre outros fatores, o que determina uma grande variabilidade nas características de preparados medicinais formulados e administrados popularmente que podem estar relacionados a problemas de saúde de forma aguda ou crônica (ERNST; PITTLER, 1998).

Os tratamentos com plantas medicinais, por serem considerados isentos de efeitos colaterais pela população, são usados em várias doenças, de maior ou menor gravidade. Mas, contrariando a crença popular, o uso de muitas destas ervas, geralmente em automedicação, pode trazer sérias consequências (MARCUS; GROLLMAN, 2002). Pois, estas plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”.

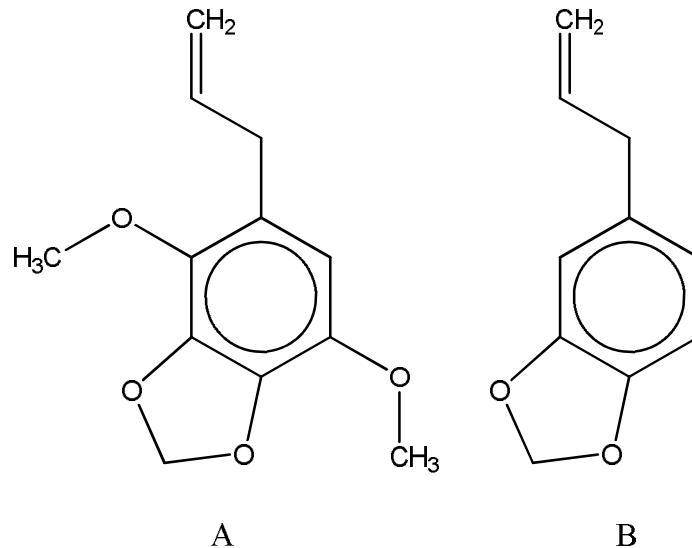
Segundo Tsen et al. (2000); Blanc et al. (2001); Ang-lee et al. (2001) é necessário a atenção dos médicos aos pacientes crônicos, no pré-operatório, nos idosos, crianças, gestantes, lactantes em relação ao consumo de produtos de origem vegetal isolados ou associados a medicamentos alopáticos.

A utilização na medicina popular do Reino Vegetal vem mostrando, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos.

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol (Figura 8), lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo Furanocumarinas (CAPASSO et al., 2000).

Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúxico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial (GUIL et al.,1997). Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (AMES, 1983)

Figura 8– Estruturas químicas do (A) apiol e (B) safrol.



Para Menon-miyake et al. (2004) várias plantas utilizadas pela população como medicamentos, pode ocasionar de forma sinérgica ou isolada vários problemas de saúde. Exemplificando esta situação temos: A buchinha-do-norte (*Luffa operculata*), muito usada nos casos de rinossinusite pela população leiga, pode provocar irritação mucosa nasal e epistaxe quando instilada no nariz além de anosmia ou hiposmia; o confrei (*Symphitum officinale*), que no início dos anos 80, foi amplamente divulgado na imprensa que esta planta teria fantásticas propriedades terapêuticas para uma série de doenças, incluindo a leucemia e até mesmo o câncer. A partir daí, muitas pessoas passaram a ingerir suco de “confrei” (folhas com água batidas no liquidificador) regularmente.

No entanto, estudos toxicológicos posteriores mostraram que o “confrei” possui substâncias extremamente tóxicas para o fígado, os alcalóides pirrolizidínicos, o que acabou culminando na proibição de sua indicação para uso interno, por possuírem alcalóides hepatotóxicos que podem induzir o surgimento do hepatocarcinoma; a erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*) interage com antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, podendo causar intoxicações.

Uma planta bastante conhecida e utilizada em todo o Brasil, a camomila (*Matricaria recutita* L.), indicada como antiespasmódico, antiinflamatório tópico, distúrbios digestivos e

insônia leve (BRASIL, 2004), interage com anticoagulantes (como a warfarina) aumentando o risco de sangramento (SEGAL, 2006). Com barbitúricos (fenobarbital) e outros sedativos, a camomila poderá intensificar ou prolongar a ação depressora do sistema nervoso central; reduz a absorção de ferro ingerido através de alimentos ou medicamentos (ABEBE, 2002).

O alho (*Allium sativum L.*) que tem como ações terapêuticas: coadjuvante no tratamento de hiperlipedemia e hipertensão arterial leve; prevenção da aterosclerose (ABEBE, 2002); pacientes que utilizam anticoagulantes orais como a warfarina poderão apresentar aumento do tempo de sangramento quando forem administrados medicamentos contendo alho; efeito semelhante será observado no uso dos antiplaquetários (BASILA, 2005). O alho poderá intensificar o efeito de drogas hipoglicemiantes (insulina e glipizida) causando uma diminuição excessiva dos níveis de açúcar no sangue (DHARMANANDA, 2010). Quando usado com saquinavir (empregado no tratamento de infecção por HIV) poderá diminuir os níveis plasmáticos daquela droga tornando seu efeito terapêutico menos eficaz o que poderá ocorrer com outras drogas anti-retrovirais (BASILA, 2005).

Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana D.C.*), bastante utilizada no tratamento de constipação ocasional; mas seu uso concomitante com diuréticos tiazídicos não é recomendado, já que pode ocorrer excessiva perda de potássio, resultando em quadro de hipocalemia (BRASIL, 2004).

Já a valeriana (*Valeriana officinalis*), que é indicada no tratamento de insônia leve, sedativo e ansiolítico; tem sua propriedade sedativa potencializada quando utilizada concomitantemente com benzodiazepínicos, barbitúricos, narcóticos, alguns antidepressivos, álcool e anestésicos, promovendo, então, maior tempo de sedação. As soluções extrativas desta droga apresentam álcool, o que poderá causar náuseas ou vômitos quando administrada com metronidazol ou dissulfiram. A valeriana também pode interagir com certos fármacos que utilizam metabolismo hepático (BRASIL, 2004).

Apesar da comprovada eficiência terapêutica de muitas plantas, os prováveis efeitos tóxicos que as mesmas podem apresentar quando usadas inadequadamente ainda são desconhecidos ou, muitas vezes, ignorados. Com a crescente utilização dessas plantas, aumentou-se a preocupação com o uso destas, visto que a medicina tradicional, popularmente chamada de “caseira”, não apresenta, na maioria das vezes, critérios rigorosos tanto na forma de utilização e preparo, quanto no que se refere à dosagem e contra-indicações, uma vez que tradicionalmente é disseminado que o uso de produtos naturais não é prejudicial à saúde.

Sendo assim, o cuidado com a utilização é imprescindível e de suma importância no controle dos possíveis efeitos adversos e colaterais que o uso crônico e/ou agudo pode

acarretar no organismo, devido à existência de plantas que, apesar de serem denominadas medicinais, podem apresentar toxicidade de acordo com a utilização, com o tempo de tratamento, com a forma de preparo, entre outros fatores.

2.12 VALORIZAÇÃO MONETÁRIA DO MERCADO DOS FITOTERÁPICOS

Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS, 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. No Brasil, pesquisas demonstram que mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (ABIFISA, 2004); sendo a fitoterapia uma das terapêuticas mais procuradas atualmente (SIMÕES et al., 1999).

A procura por medicamentos à base de plantas vem crescendo mundialmente. Nos países desenvolvidos é considerado como alternativa mais saudável, ou menos danosa a saúde. Mas, nos países em desenvolvimento é resultante do não acesso aos medicamentos farmoquímicos pela população carente (FREITAS, 2007).

As cifras envolvidas no mercado que giram em torno das plantas medicinais ainda são bastante divergentes em termos de informações sobre a sua magnitude. Estima-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal alcance valores em torno de US\$ 12, 4 bilhões e que o consumo somente no mercado Europeu seja responsável por aproximadamente 50% deste total (GUERRA; NODARI, 2004).

Já outras estimativas mostram que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimentam US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (GUERRA; NODARI, 2004).

Apesar de movimentar grandes cifras, o mercado que envolve as plantas medicinais ainda tem muito a crescer. Porém, segundo Soejarto (1996), do total de espécies vegetais encontradas no planeta, apenas 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

O comércio dos fitoterápicos é responsável por uma parcela significativa do mercado mundial de medicamentos. O mercado de produtos fitoterápicos vem crescendo a uma taxa anual média de 15%, sendo mais evidente nos países europeus como a Alemanha, França, Itália e Inglaterra. Além disso, naturalmente, em países asiáticos, onde as plantas medicinais constituem parte expressiva das formas de terapia disponíveis. Nesses países, as leis sanitárias vigentes são em geral mais rigorosas em relação ao controle de qualidade e eficácia clínica desses produtos que são, em muitos países, prescritos pelos médicos (ABIFISA, 2004). Por

outro lado, segundo a Associação Brasileira de Indústria Fitoterápica - ABIFITO (2004), o crescimento anual do mercado dos medicamentos sintéticos fica em torno de 7% ou menos.

De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA, 2004), que se apresenta como a principal associação do setor, o mercado brasileiro de fitoterápicos é dimensionado a partir de um faturamento de R\$ 660,5 milhões, em 2007, e uma quantidade vendida de 37,3 milhões de unidades. Esses valores correspondem a cerca de 3% do mercado farmacêutico. O comércio de fitoterápicos, com o crescimento acelerado, teve um faturamento de quase 11%, em relação a 2005, e de mais de 18% em relação a 2006. As quantidades vendidas, também tiveram uma aceleração significativa, passando de 1,8% para 8,5%.

Segundo a Associação Médica Brasileira de Fitomedicina (SOBRAFITO, 2010), a Alemanha é o país que mais consome fitoterápicos em todo o mundo, com vendas que superam os US\$ 4 bilhões e representam cerca de 10% do mercado farmacêutico total do país. O mercado europeu movimentou cerca de US\$ 7 bilhões, sendo o continente com o maior consumo de medicamentos fitoterápicos. O mercado asiático também é bastante expressivo com cerca de US\$ 4 bilhões. Estima-se que mais de 80% de pessoas no mundo utilizem fitoterápicos no atendimento primário à saúde (YUNES; CALIXTO, 2001).

Uma das vantagens de se investir em medicamentos fitoterápicos é a diminuição do tempo de pesquisa e o menor custo frente aos fármacos sintéticos. Estima-se que o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico gire em torno de 2% a 3% do previsto para o desenvolvimento de um medicamento alopático (SANT'ANA, 2002).

O custo de um medicamento originado a partir de plantas medicinais gira em torno de 35 milhões de dólares. Já a descoberta de um novo medicamento sintético varia de 500 a 800 milhões de dólares, podendo levar entre sete a vinte anos de pesquisa para chegar ao mercado (SANT'ANA, 2002; MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a toxicidade aguda do EHVG em ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a bioatividade do EHVG em *Artemia salina* para determinação da CL₅₀;
- Identificar sinais de toxicidade aguda causados pelo EHVG em ratos Wistar;
- Verificar possíveis influências do EHVG sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos Wistar;
- Analisar macro e microscopicamente os órgãos vitais (pulmões, coração, fígado e rins) dos animais tratados com EHVG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item descreveremos aspectos relacionados à parte experimental do presente estudo. Relacionamos tanto os locais onde as diversas atividades foram realizadas, quanto o material empregado e, ainda, o modo como cada protocolo experimental foi realizado.

4.1 LOCAL DA PESQUISA

As atividades desta pesquisa foram desenvolvidas nos seguintes locais:

- Áreas rurais do município de Mazagão velho (AP)
- Herbário do Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Amapá (HAMAB)
- Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá- Profº Reinaldo Damasceno (LACEN)
- Laboratório da Universidade Federal do Amapá
- Clínica Veterinária Saúde Animal (dosagens bioquímicas)

4.2 MATERIAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

O material necessário utilizado no experimento foi de natureza vegetal e animal, além de soluções, reagentes e aparelhagens.

4.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

- Ratos Wistar

O ensaio realizado com 24 ratos Wistar (Figura 9), albinos (*Rattus norvegicus albinos*), adultos, pesando entre 200 e 300 g (12 machos) e entre 150 e 250 g (12 fêmeas, nulíparas e não grávidas), fornecidas pelo Biotério do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Macapá, Ap.

Os animais ao longo do trabalho agrupados em gaiolas de polietileno (seis animais por gaiola, separados por sexo) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($26 \pm ^\circ\text{C}$), com livre acesso à comida (*pellets* de ração Purina) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno com bicos metálico. A ração e água são colocadas nas grades metálicas na parte superior da gaiola. Os animais mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, ou seja, de 6h às 18h (claro) e de 18h às 6h (escuro).

Figura 9- Imagem de Ratos Wistar agrupados em Gaiola



Fonte: Arquivo pessoal

- *Artemia salina* L.

A *Artemia Salina* é um microcústáceo da ordem Anostraca (Figura 10) utilizado na alimentação de peixes e camarões por seu alto valor nutritivo. Os cistos de *Artemia salina* L. utilizados neste ensaio foram provenientes do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da UNIFAP, sendo armazenados sob resfriamento a 5 °C até a execução do experimento.

Figura 10- Imagem de *Artemia salina* L



Fonte: http://marchiquita2010.blogspot.com/2010_05_01_archive.html.

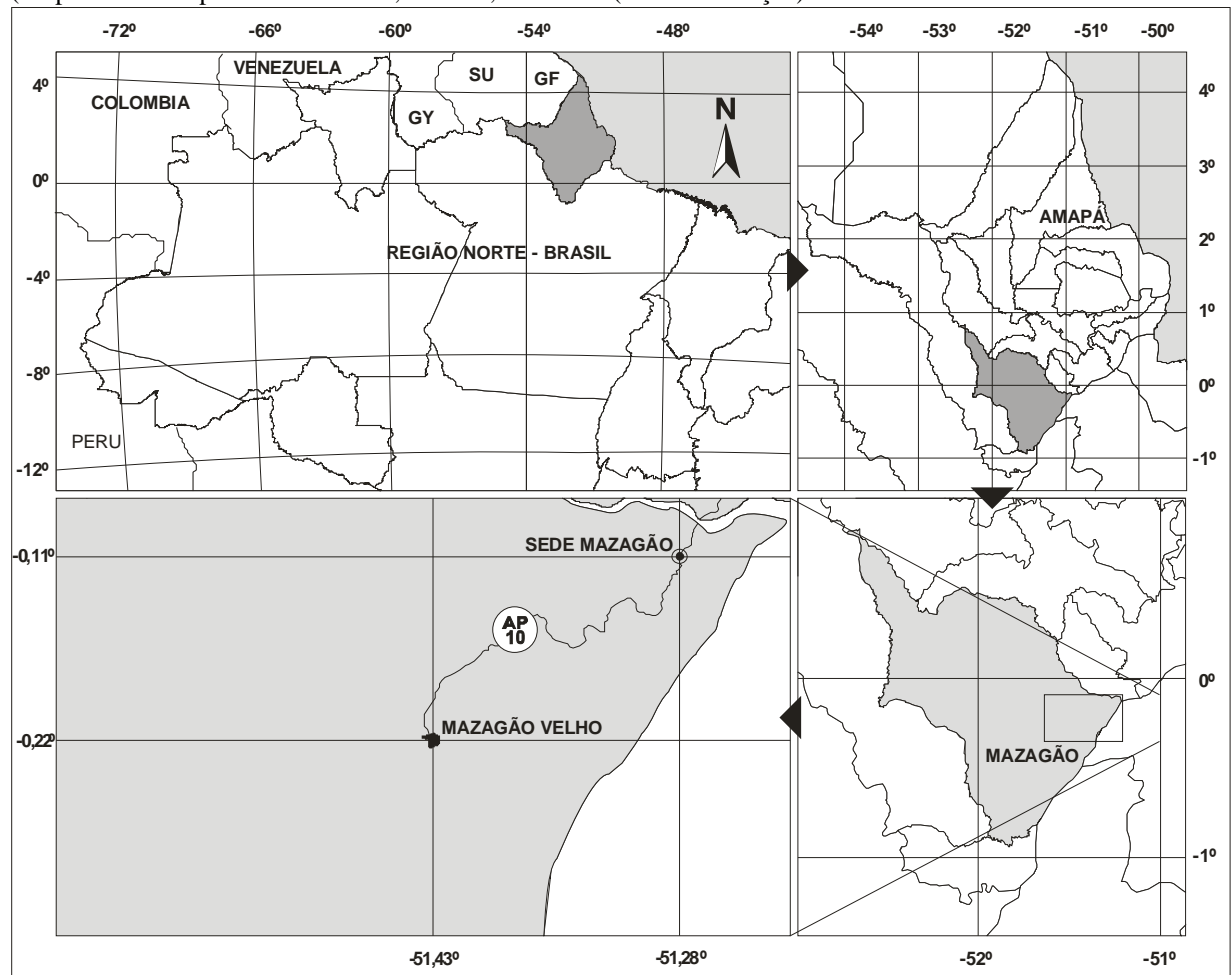
4.4 MATERIAL BOTÂNICO

As sementes de *Vatairea guianensis* foram coletadas no município de Mazagão, em área as margens da foz rio Mazagão Velho. Uma exsicata do material vegetal coletado foi encaminhada ao Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Amapá (IEPA), Macapá, Ap.

E a identidade da planta foi confirmada pelo Dr^o Breno Marques da Silva e Silva, baseada na taxonomia (família, gênero, espécie e respectivos nomes vernáculos), na morfologia floral. Foi observada, também, a presença de caracteres secundários que favorecem o reconhecimento da espécie tais como: habito da planta, tamanho e forma da planta, cor, estrutura e aspecto das folhas e sementes; como também através da comparação a um espécime que se encontra depositada neste herbário, obtendo o seu número de registro HAMAB-18349.

A espécie coletada tem como características observadas: Diâmetro 105 cm; aproximadamente 26 metros de altura; coleta realizada as 9 hs em área de várzea.

Figura 11- Mapa de localização geográfica da vila de Mazagão velho, município de Mazagão, Estado do Amapá (Mapa elaborado por Edson Ribeiro, PPGCS, UNIFAP. (com autorização).



Fonte: IBGE, s.d.; RABELO et al.,2005.

4.5 SOLUÇÕES E REAGENTES

- Água destilada
- Água potável
- Álcool etílico (70%)
- Ácido úrico (Kit reagente-Biochin)
- Amilase (Kit reagente-Biochin)
- Aspartato amino transferase (Kit reagent-Biochin)
- Alanino amino transferase (Kit reagente-Biochin)
- Bilirrubina total (Kit reagente)
- CK-Mb (Kit reagente-Biochin)
- Colesterol total (Kit reagente-Biochin)
- Creatinina (Kit reagente-Biochin)
- Éter
- Extrato hidroalcoólico das sementes de *Vatairea guianensis* Aublet
- Formol (10%)
- Fosfatase alcalina (Kit reagente-Biochin)
- Gama-glutamyltransferase (gama GT) - (Kit reagente-Biochin)
- Glicose (Kit reagente-Biochin)
- Proteínas totais (Kit reagente-Biochin)
- Triglicerídeos (Kit reagente-Biochin)
- Uréia (Kit reagente-Biochin)

4.6 APARELHAGEM

- Analisador bioquímico automático Celm para determinações bioquímicas no soro
- Analisador hematológico marca (IDEXX) modelo (QBC VET CENTRIFUGE /QBC VET AUTOREADER)
- Balança analítica digital, Marca AND, Modelo HR-120

- Estufa de circulação de ar (FANEN modelo 330, série 3096)
- Centrífuga (BIO ENG ® BE 400) para separação do soro (3500 rpm durante 10 minutos)
- Moinho de facas (tipo WILLYE)
- Microscópio (Olympus CX 31) para realização da contagem diferencial de leucócitos
- Microscópio (RML Askamania-Germany), utilizados nas análises histopatológicas
- Rotavapor- marca (QUIMIS), modelo (Q-344B2)

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa aqui apresentada terá característica observacional e descritiva, com abordagem quantitativa. A pesquisa observacional indica quais informações que realmente interessam ao estudo utilizando um instrumento de observação como também ainda vai indicar e limitar a área de observação evitando ao máximo a apreensão subjetiva dos fatos observados e assim indicar o campo, o tempo e a duração da observação (MINAYO, 2007).

A pesquisa descritiva busca mostrar os fatos como são observados, registrados, analisados, classificados e interpretados, isto é, ela descreve o objeto de pesquisa (TEIXEIRA, 2005).

A abordagem quantitativa faz uso intensivo de técnicas estatísticas, correlacionando as variáveis e verificando o impacto e a validade do experimento, sendo assim, essas técnicas devem ser adequadas ao tipo de delineamento adotado. Baseia-se na experimentação, onde os delineamentos serão experimentais com grande controle e valor científico (RICHARDSON, 2007).

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi protocolado junto ao comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (CEP/UNIFAP) de acordo com o que preconiza a Resolução de nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, sendo aprovado com o Nº 007A/2011. O projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO

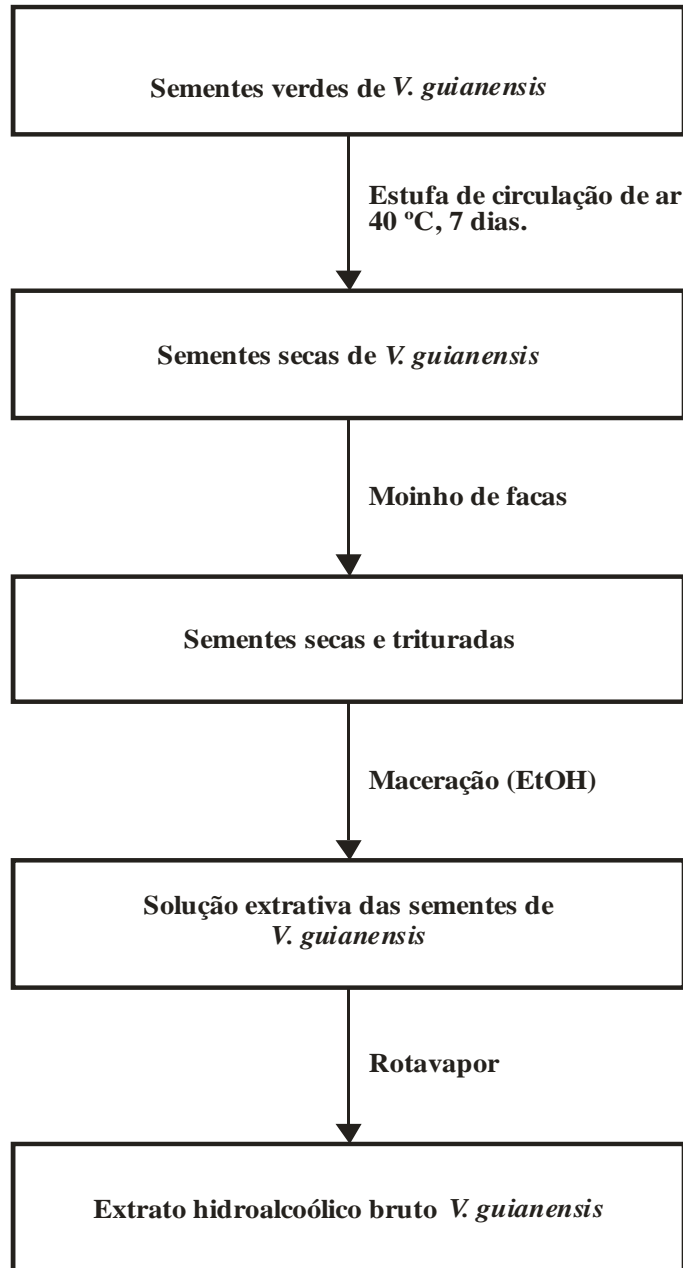
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (AUBLET)”. A utilização de animais obedeceu a princípios técnicos e éticos (ANDERSEN, 2004; COBEA, 2004).

4.9 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS SEMENTES DE *V. guianensis* (AUBLET)

O extrato vegetal foi preparado no laboratório do Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Amapá (IEPA). As sementes verdes de *V. guianensis* (1000g) foram secadas em estufa de circulação de ar a $45^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (FANEN modelo 330, série 3096) até completa desidratação. Após secagem foram trituradas em moinho de facas (tipo WILLYE) até obtenção do pó seco.

O material vegetal triturado foi submetido a um processo de maceração com Etanol 70% numa proporção de cinco vezes do líquido extrator em relação ao peso da amostra, por um período de 7 dias. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo a $45^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob pressão reduzida até remoção do solvente orgânico (VINATORU, 2001; FERRI, 1996).

A remoção completa da água residual foi realizada em banho maria até obtenção do extrato pastoso (155g) hidroalcoólico de *V. guianensis*. Para a realização dos testes, preliminarmente, o extrato hidroalcoólico concentrado foi dissolvido em veículo inerte (Tween 80) para a concentração desejada.

Figura 12- Fluxograma do processo de obtenção do EHVG.

4.10 BIOENSAIO COM *Artemia salina* L.

A citotoxicidade sobre *Artemia salina* foi realizada através da adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982).

Inicialmente foi preparada uma solução marinha artificial com o pH ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de uma solução de Na_2CO_3 . Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições.

Para a obtenção dos metanúplios (larvas de 24 horas), 20 mg dos cistos de *Artemia salina* foram colocados em um recipiente com solução marinha artificial (29 °C) o qual ficou sob iluminação artificial por 24 h.

Este recipiente possui dois compartimentos separados por uma placa perfurada. Um dos compartimentos foi iluminado e outro, onde foram colocados os cistos, ficou coberto com papel alumínio para evitar a incidência de luz. À medida que as larvas forem eclodindo migraram para o compartimento iluminado, já que possuem fototropismo positivo, permitindo assim, a separação dos cistos e dos metanúplios (MCLAUGHLIN, 1982; MEYER et al., 1982).

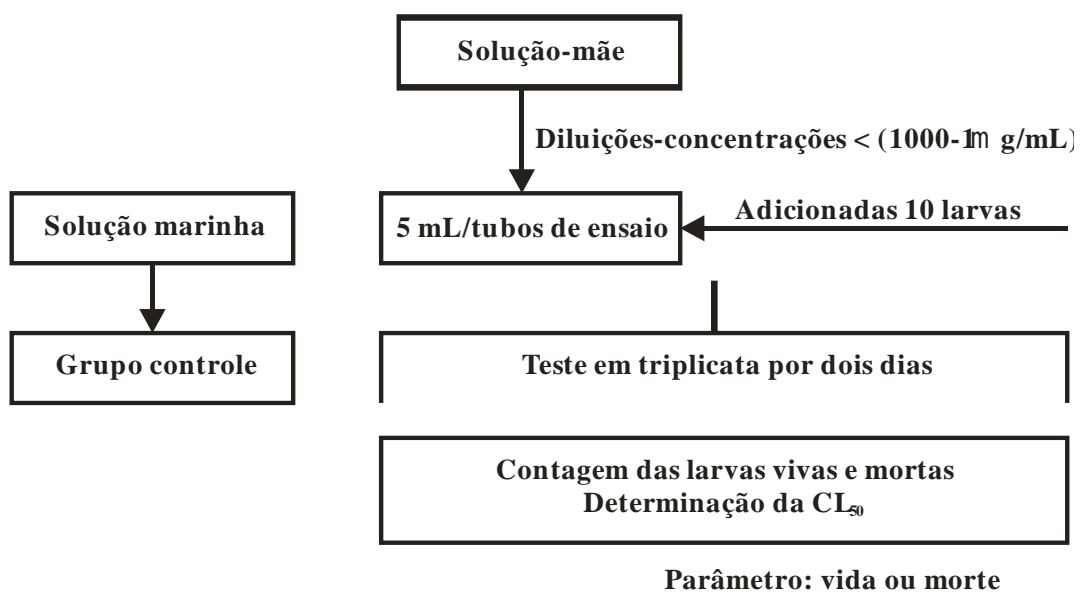
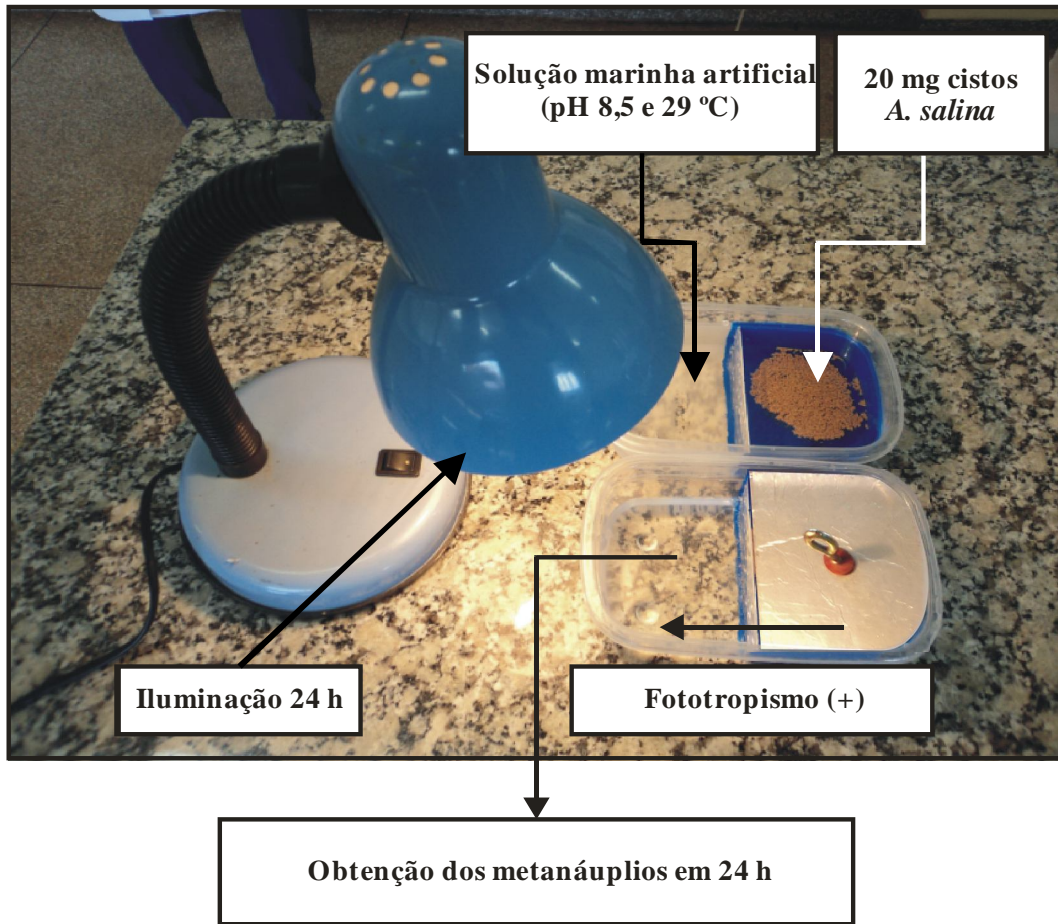
A partir de uma solução de 10 mg do extrato foram efetuadas diluições para concentrações (1,5, 10, 25,50, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foram colocados 2 mL de solução marinha artificial em cada uma dessas soluções em tubos de ensaio e 10 metanúplios adicionados em cada tubo.

O teste foi realizado em triplicata e em duas etapas. Um grupo controle também foi preparado contendo apenas o veículo utilizado para solubilizar os compostos a serem testados e as larvas.

O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas para determinação da CL_{50} de acordo com o método estatístico de Probitos utilizando o programa Microcal Origin 6.0.

O teste de toxidade foi baseada nos critérios estabelecidos por Meyer et al. (1982), que classifica extratos brutos como tóxicos quando apresentam $\text{CL}_{50} < 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ e não-tóxicos quando a $\text{CL}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 13- Fluxograma do bioensaio com *Artemia Salina*



4.11 TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA

O protocolo experimental utilizado foi baseado na Resolução nº 90, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária; esta resolução determina que a finalidade da Toxicidade aguda é avaliar os efeitos tóxicos de uma substância teste após exposição a uma dose única ou fracionada administrada no período de 24 horas.

Os testes agudos são obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (LARINI, 1997; BARROS; DAVINO, 2003).

4.12 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA

O extrato hidroalcoólico de *Vatairea guianensis* (EHVG), foi dissolvido em salina e Tween a 5% e administrado por via oral (gavagem), a um grupo de 12 animais do grupo teste (6 machos e 6 fêmeas) em jejum por 12 horas, na dose de 2000 mg/kg de peso corporal animal. O grupo controle (6 machos e 6 fêmeas) recebeu o mesmo volume do veículo (Figura 16).

Após a administração do EHVG, obedecendo aos seguintes tempos: 0, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e a cada 240 minutos e diariamente durante 14 dias seguidos foram observados sinais tóxicos em geral. Sendo avaliados os seguintes parâmetros no “Screening” hipocrático: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto de cauda, contorção trem posterior, endireitamento e retirada (cauda), tônus muscular, força de agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, estimulações, Straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, urina vermelha e diarreia. Os parâmetros foram avaliados através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 (Anexo 1).

A partir da 24ª hora até 14 dias após a administração da dose, foi observada diariamente a variação de peso (g) dos animais (Figura 15), consumo (Figura 14) de ração (g), água (mL), onde estes resultados foram anotados em ficha específica. Ao fim do período de observação, foi retirado sangue de todos os animais para análises dos parâmetros hematológicos e

bioquímicos, em seguida eles foram mortos por tração cervical e autopsiados, sendo observadas as características macroscópicas, histopatológicas e peso dos pulmões, rins, fígado e coração.

Figura 14- Peso da ração



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 15 – Peso dos animais



Fonte: Arquivo pessoal

Os sinais de toxicidade são assim divididos e definidos (ALMEIDA, 1983):

a. Avaliação do consciente e disposição

Aparência geral: É feita a observação se os animais estão excitados ou deprimidos, ou recolhidos em grupos no canto da gaiola.

Frêmito vogal: Verificam-se os sinais sonoros emitidos pelos animais estão aumentados.

Irritabilidade: Observação do comportamento animal quanto à agressividade.

b. Avaliação da atividade e descordenação do Sistema Motor

Atividade geral: Verifica-se a movimentação dos animais se estão dentro dos parâmetros de normalidade.

Resposta ao toque: Neste item é observado se os animais respondem aos estímulos do toque.

Resposta ao pinçamento da cauda: Com uma pinça aperta-se a cauda do animal com a finalidade de verificar a resposta sensitiva a dor.

Marcha anormal: É observado se o deslocamento do animal dentro da gaiola é normal ou não.

Reflexo de endireitamento: Verifica-se a falta de equilíbrio na locomoção do animal.

c. Avaliação da atividade sobre a musculatura esquelética

Tônus de pata: Testa-se a capacidade do animal se equilibrar sobre um lápis ou bastão de vidro.

Tônus do corpo: Retira-se o animal da gaiola e verifica-se se a musculatura está flácida.

Força para agarrar: Avalia-se a capacidade do animal em permanecer seguro a um lápis ou mesmo a grade superior da gaiola.

Ataxia: Observa-se se há irregularidades das ações musculares ou falta de coordenação destas ações.

d. Avaliação de reflexos

Auricular e corneal: Trata-se de comprovar se o animal responde a excitação provocada por cotonete de algodão nas regiões auriculares e corneal, através de movimentação sensitiva auricular e/ou com fechamento das pálpebras.

e. Avaliação da atividade no Sistema Nervoso Central

Tremores e convulsões: Verifica-se estes sinais nos animais do grupo teste.

Estimulações: Trata-se de aquilatar se os animais apresentam efeito estimulador semelhante ao provocado por drogas como estriçnina, picrotoxina e cardiazol.

Straub: É realizada uma observação se o animal apresenta cauda ereta, muitas vezes com ponta quase tocando a cabeça (devido a espasmo da musculatura próxima a base da cauda e ao redor do ânus), características do opiáceos.

Sedação: Neste item é observada a constatação se há sinais de sedação dos animais.

Hipnose: Verifica-se a ocorrência desses efeitos semelhantes ao apresentado pelos barbiturados.

Anestesia: Pode ser medido por pinçagem da cauda.

f. Avaliação da atividade autônoma

Tamanho da pupila: É verificada a ocorrência de contração ou dilatação do diâmetro pupilar.

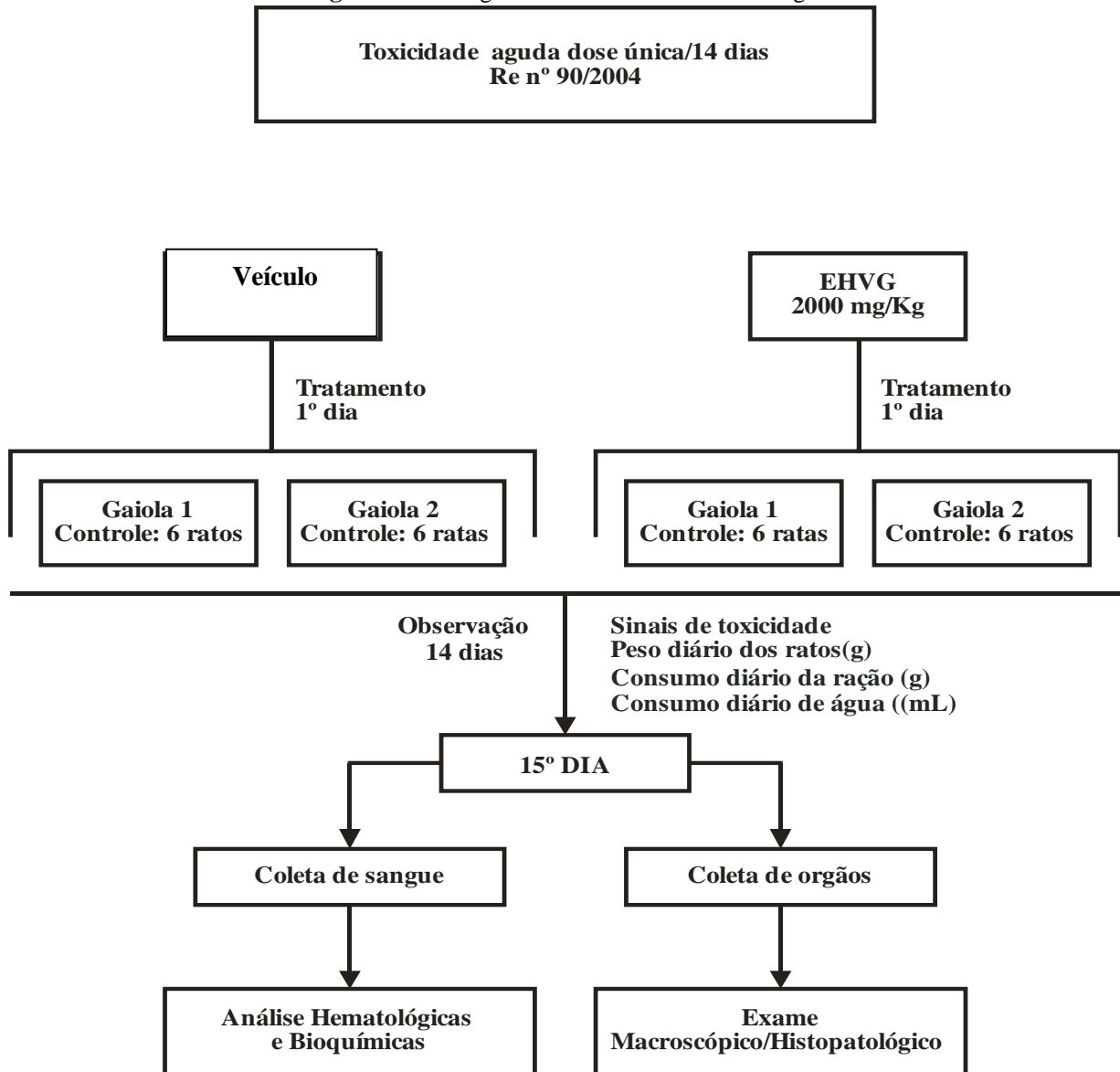
Lacrimejamento e salivação: Trata-se de examinar nos olhos e boca dos animais a presença de secreção que em geral apresentam tonalidade avermelhada.

Ptozes: Registra-se a ocorrência de fechamento palpebral que caracteriza as drogas neurolépticas.

Piloereção: Verifica-se se há eriçamento de pelos.

Respiração: Observa-se se a respiração do animal está aumentada ou há insuficiência respiratória.

Figura 16- Fluxograma do ensaio da toxicidade aguda



4.13 EXAME LABORATORIAL DO SANGUE

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

4.14 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Quatorze dias após a administração das doses utilizadas por via oral, foi retirado sangue dos vinte e quatro ratos através do plexo braquial, para análise laboratorial de parâmetros hematológicos, estudo das séries vermelha (eritrograma) e série branca (leucograma) e contagem de plaquetas.

O eritrograma ou hematimetria, de acordo com Failace (2003), é a parte do hemograma que avalia a série vermelha, e que compreende a massa eritróide circulante - reticulócitos e eritrócitos maduros - além do mielograma.

A hematimetria é uma avaliação quantitativa da massa de eritrócitos e hemoglobina no sangue circulante, que fornece informações sobre a morfologia dos eritrócitos. Ela é composta pela: contagem de hemácias (Hc) - expressa em $Hm \times 10^6/mL$; dosagem de hemoglobina (Hb) - expressa em gramas/ decilitros (g/dL); determinação do hematócrito (Ht) - expresso em porcentagem (%); determinação do volume corpuscular médio (VCM) - expresso em fentolitros (fL); determinação da hemoglobina corpuscular média (HCM) - expressa em picograma (pg); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) - expressa em (g/dL) e amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW – *Red blood cell Distribution Width*) fornecidos nas determinações automáticas.

Através do leucograma analisar-se as células responsáveis pela defesa do organismo e, portanto, avaliar a capacidade de resposta destas células frente a diferentes situações. É composto pelas contagens total de leucócitos (CTL) e diferencial de leucócitos (CDL). A contagem diferencial de cada leucócito (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e

monócitos) é expressada em (número de leucócitos/ mL, na contagem absoluta, e (b) pela avaliação da morfologia das mesmas no esfregaço sanguíneo (DESCAT, 2002).

Segundo Santos e Meirelles Filho (2004), as plaquetas são analisadas quantitativamente, sendo expressas em $PLT \times 10^3/mm^3$, e que através de contadores automatizados é possível obter: a amplitude de distribuição das plaquetas (PDW) - expressa em fentolitro (fL), o volume médio das plaquetas (VMP) - expresso em fentolitro (fL), e a razão de células grandes de plaquetas (RCGP) - expresso em percentual (%).

Estas determinações foram realizadas no analisador celular marca (IDEXX) modelo (QBC VET CENTRIFUGE /QBC VET AUTOREADER). As extensões sanguíneas foram corados (panótico) manualmente e analisados em microscópio Olympus, para confirmação e controle da contagem das células.

4.15 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram : Glicose (mg/dl), Colesterol (mg/dl), Triglicerídeos (mg/dl), Uréia (mg/dl), Creatinina (mg/dl), Ácido úrico (mg/dl), Fosfatase alcalina (UI/L), Aspartato amino transferase (UI/L), Alanina amino transferase (UI/L), Proteínas totais (g/dL), Amilase (UI/L), Bilirrubina total (mg/dl), Bilirrubina indireta (mg/dl), Bilirrubina direta (mg/dl) e Gama-glutamilttransferase (\square - GT).

4.16 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Após quatorze dias da administração da dose de 2000 mg/kg do EHVG pela via oral (gavagem), todos os animais do grupo teste e controle foram sacrificados por deslocamento cervical, examinados macroscopicamente, com ressecção dos pulmões, coração, fígado e rins. As secções teciduais dos órgãos excisados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada, após 24 horas, foram ressecionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação

e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (BACHA; WOOD, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 μM e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, e examinados ao microscópio óptico.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). O teste *t de Student* foi utilizado para avaliar a significância das diferenças entre as médias. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para “*p*” foi menor que 0,05 ($p < 0,05$), com intervalo de confiança de 95%. O programa utilizado para as análises foi o GraphPad Prism versão 4.03.

Para o bioensaio com *A. salina* L. foi utilizado o método estatístico de PROBIT e o programa Microcal Origin 6.0. na determinação do cálculo da concentração letal média (CL_{50}).

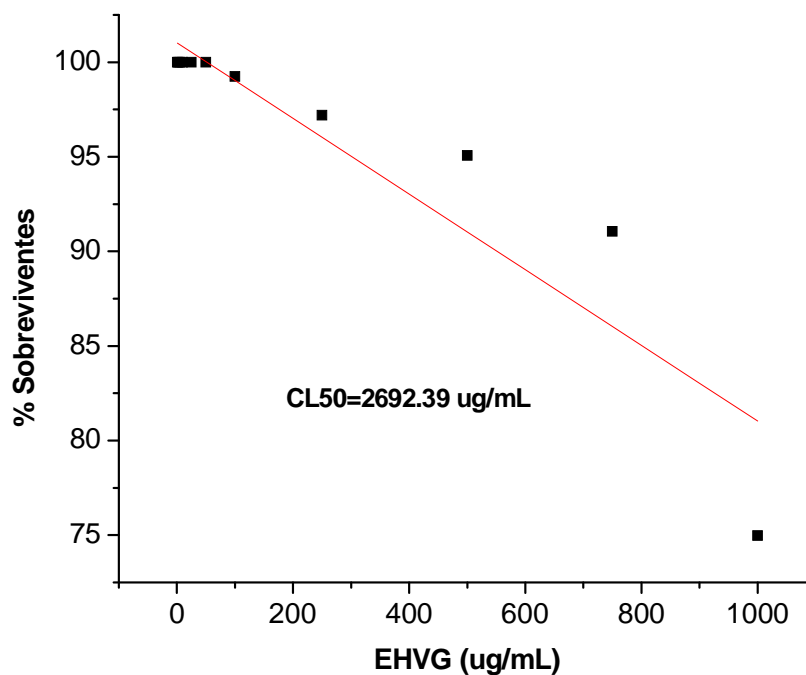
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EHVG EM *Artemia salina*

Como ensaio preliminar deste estudo foi realizado o teste de bioatividade sobre *Artemia salina*, expondo estes microcrustáceos a elevadas concentrações (1 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) do EHVG para cálculo da CL_{50} . Meyer et al. (1982) classificaram extratos brutos como tóxicos quando apresentam $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e não-tóxicos quando a $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

O valor médio da CL_{50} de EHVG obtido a partir deste teste foi de 2692,39 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17); mostrando que os compostos do EHVG não apresentam indícios de toxicidade. Ressalta-se que a ausência de toxicidade dos extratos no teste de letalidade contra *Artemia salina* é um provável indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico.

Figura17- Percentual (%) de larvas sobreviventes da exposição a concentrações crescentes do EHVG. Valores obtidos por regressão linear das média da triplicata do experimento. O intervalo de confiança foi de 95% e considerado significativo quando $p < 0,05$.



5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA DO EHVG EM RATOS

5.2.1 Observação clínica dos animais

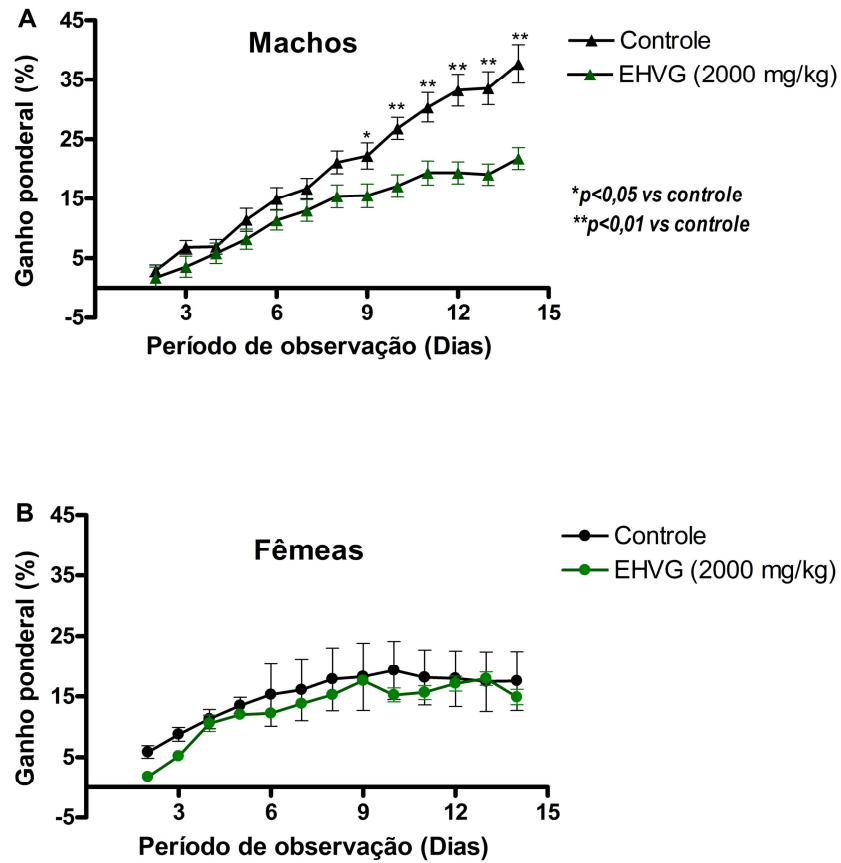
O EHVG (2000mg/kg,v.o) não induziu sinais de toxicidade como alterações comportamentais ou morte nos animais experimentais durante os 14 dias de observação, após a administração aguda.

5.2.2 Desenvolvimento ponderal dos animais

A análise da evolução ponderal dos animais tratados com EHVG (2000 mg/kg) foi avaliada comparando-se o ganho de peso diário destes com seus respectivos grupos controles machos e fêmeas (que receberam apenas o veículo).

Pode-se evidenciar que EHVG não promoveu alteração significativa no ganho de peso das fêmeas em relação aos animais do grupo controle, porém, os ratos machos tratados com o extrato demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no ganho de peso principalmente a partir do nono dia de observação (Figura 18).

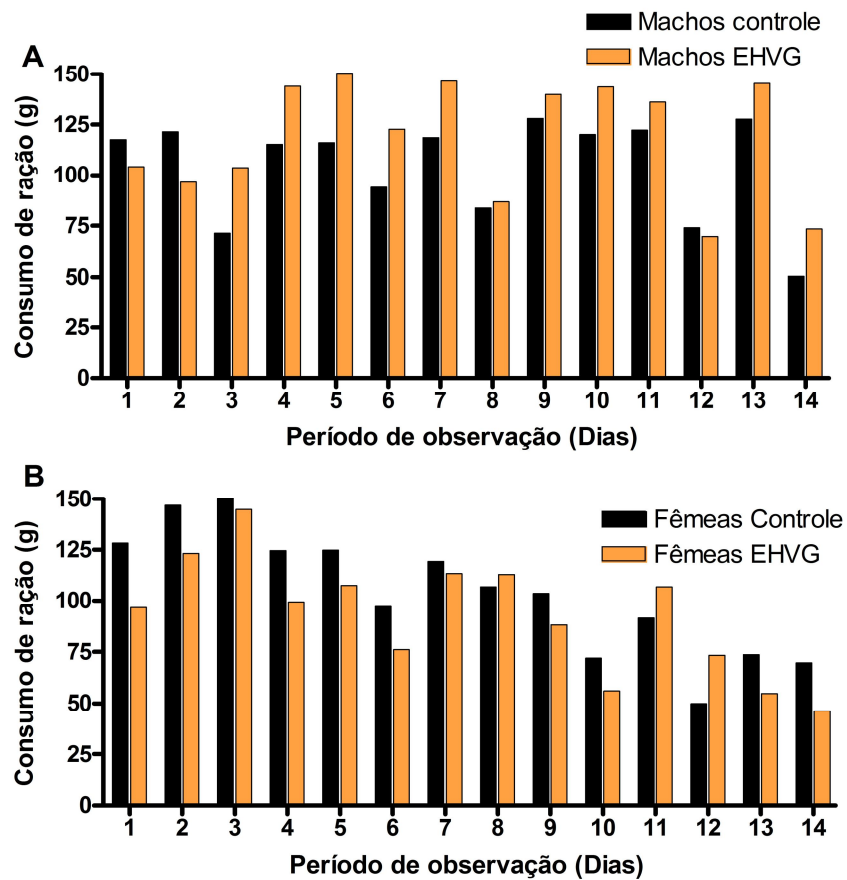
Figura 18- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a evolução ponderal de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas (n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. O teste utilizado para comparação entre médias foi o *t student*.



5.2.3 Consumo de ração

A Figura 19 (A e B) Mostra que (2000 mg/kg) do EHVG não foi capaz de induzir diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) quanto ao consumo de ração entre animais dos respectivos grupos testes e controles (que receberam apenas o veículo).

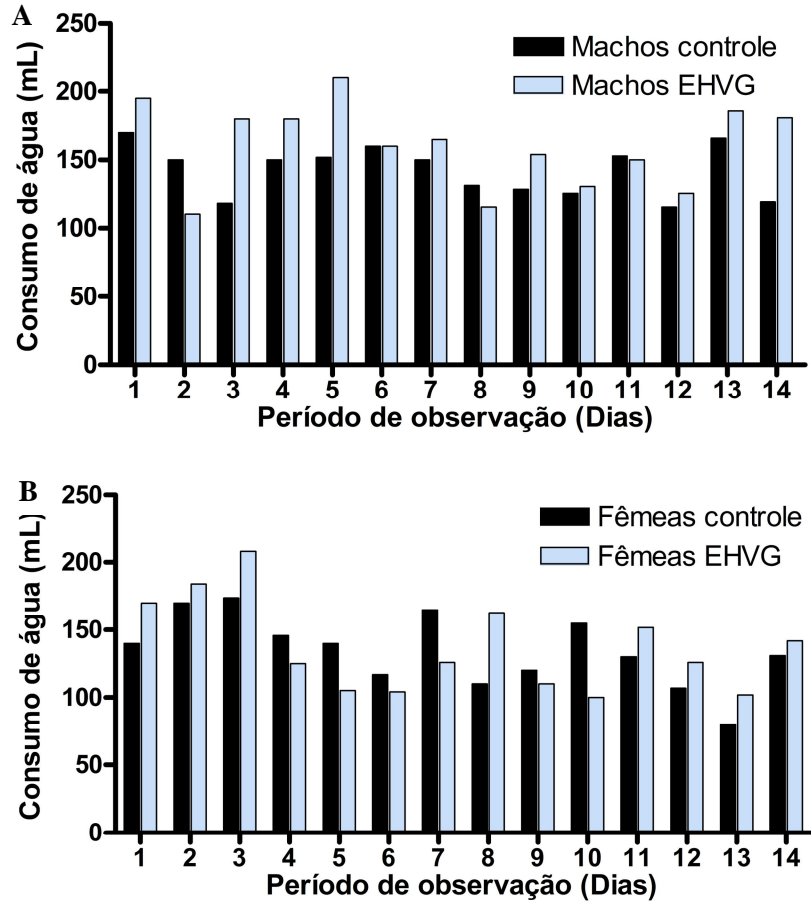
Figura 19- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a consumo de ração de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m.



5.2.4 Consumo de água

A ingesta hídrica pelos animais que receberam o EHVG (2000 mg/kg) também não foi diferente estatisticamente ($p > 0,05$) daquela dos grupos controles (veículo), tanto para os machos como para as fêmeas, conforme demonstrado nas Figuras 20 (A e B).

Figura 20- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a consumo de água de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com os respectivos grupos controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m.



5.2.5 Exame macroscópico e massa relativa (%) dos órgãos

No exame macroscópico de órgãos vitais (pulmões, fígado, coração e rins) dos ratos machos e fêmeas tratados com EHVG (2000 mg/kg), não evidenciou-se alterações na estrutura, rigidez ou coloração das superfícies de tais órgãos quando comparados aos respectivos grupos controles, tratado apenas com o veículo. Porém, o extrato reduziu de forma estatisticamente significativa a massa relativa (%) do coração (** $p < 0,01$), fígado (* $p < 0,05$) e rins (* $p < 0,05$) dos machos do grupo teste em relação ao grupo controle. Nenhuma alteração significativa foi evidenciada na massa relativa dos órgãos de animais fêmeas (Figuras 21 A-B, Figuras 22 A-B, Figuras 23 A-B e Figuras 24 A-B).

Figura 21- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) do coração de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas (n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m., sendo estas comparadas com as dos respectivos grupos controle (n=6-6) utilizando o teste-*t* de Student.

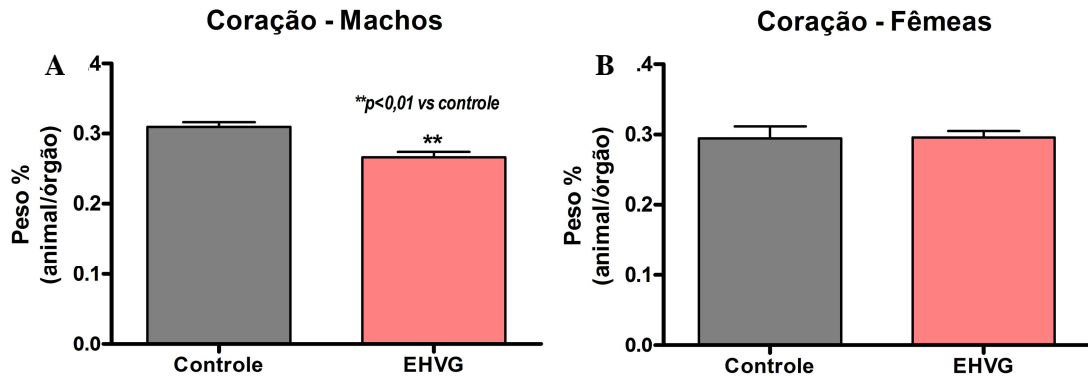


Figura 22- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) dos pulmões de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m., sendo estas comparadas com as dos respectivos grupos controle (n=6-6) utilizando o teste-*t* de Student.

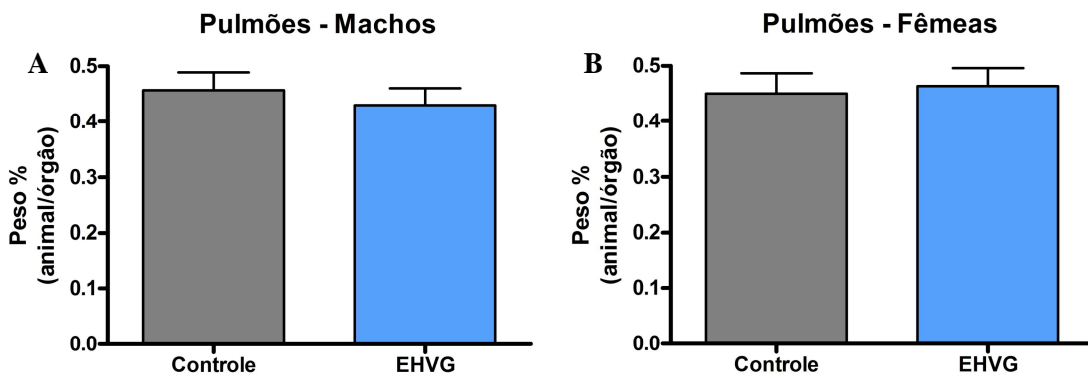


Figura 23- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) do fígado de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m., sendo estas comparadas com as dos respectivos grupos controle (n=6-6) utilizando o teste-*t* de Student.

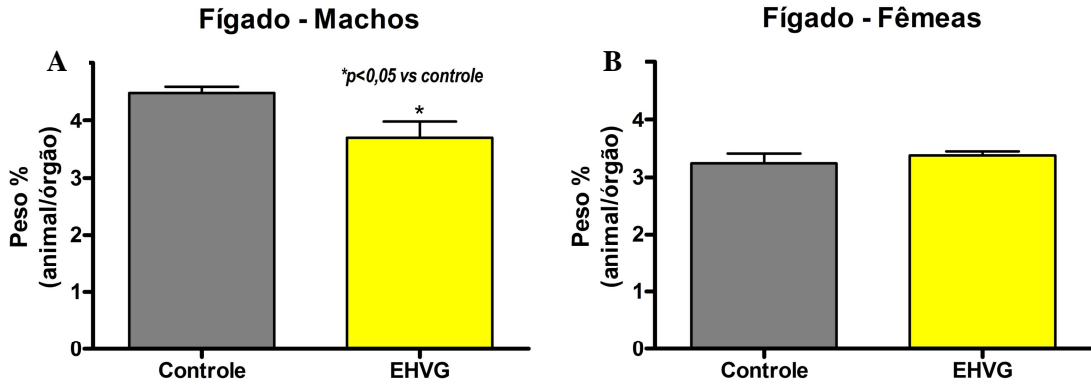
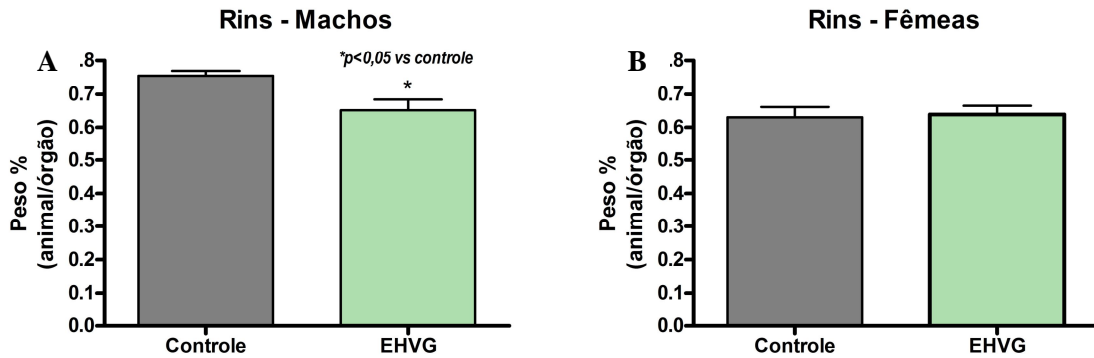


Figura 24- Efeito de EHVG (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) dos rins de (A) ratos machos (n=6) e (B) fêmeas n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m., sendo estas comparadas com as dos respectivos grupos controle (n=6-6) utilizando o teste-*t* de Student.



5.2.6 Análise do perfil hematológico

A Tabela 1 nos mostra o resultado do hemograma realizado nos 24 ratos dos grupos controle e teste (machos e fêmeas), após 14 dias da administração via oral do EHVG na dose de 2000 mg/kg.

Como pode ser observado na tabela abaixo os animais, tanto os machos como as fêmeas de ambos os grupos, conforme análises estatísticas realizadas não foram encontradas diferenças significativas para a hematócrito, hemoglobina, granulócitos, Concentração Hemoglobina Corpuscular Média, plaquetas, leucócitos totais e eosinófilos. No entanto, para série branca, na contagem diferencial, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os leucócitos segmentados e linfócitos para os animais machos e fêmeas do grupo tratado com o EHVG em comparação ao grupo que recebeu apenas o veículo.

Tabela 1- Efeito da administração aguda de EHVG sob o perfil hematológico dos ratos machos (n=6) e fêmeas (B n=6) quatorze dias após a exposição, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (média±EPM), **p<0,01e ***p <0, 001 *versos* controle (teste “t” de Student).

Parâmetros Hematológicos	Machos			Fêmeas		
	Controle	EHVG (2g/kg)	Valor de “p”	Controle	EHVG (2g/kg)	Valor de “p”
HT (%)	42,37±0,96	44,48±1,08	0,1749	42,38±1,76	37,63±1,45	0,0639
HB (g/dL)	13,48±0,33	14,52±0,46	0,0961	13,55±0,41	12,53±0,62	0,2000
GRANS	8,17±0,94	7,73±0,81	0,7303	8,58±1,68	5,77±1,12	0,1942
CHCM	31,87±0,84	32,58±0,36	0,4552	32,05±0,54	33,28±0,94	0,2830
PLT (µL)	407,67±112,78	415,83±57,90	0,9499	258,50±50,94	289,17±115,22	0,8126
LEUC.	21,28±2,45	20,00±1,66	0,6745	19,92±2,96	15,17±2,89	0,2776
EOS (%)	3,50±0,96	2,67±0,67	0,5531	2,67±0,42	3,33±0,99	0,4945
SEGM (%)	20,17±1,51	8,83±1,70	0,0005***	26,00±2,39	13,17±1,25	0,0008***
LINF (%)	76,33±1,20	87,83±2,09	0,0008***	70,00±2,45	83,17±1,62	0,0012**

Os valores representam a média ± EPM (erro padrão da média). **p<0,001, ***p<0,0001 (Teste “t” de student).

5.2.7 Análise do perfil bioquímico

A Tabela 2 nos mostra a média dos valores bioquímicos sanguíneos absolutos dos ratos (machos e fêmeas) que receberam o EHVG na dose de 2000 m/kg (dose única, via oral) e o grupo controle que recebeu apenas o veículo. Os resultados obtidos demonstram que o EHVG não foi capaz de promover alterações com significância estatística para o colesterol, triglicerídeos, uréia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, amilase, gama-glutamyltransferase (γ -GT) e bilirrubina direta. Porém, o EHVG induziu alterações estatisticamente significativas para enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) dos animais machos e fêmeas que receberam o extrato, como também nas bilirrubinas (total e indireta) e fosfatase alcalina (FAL) somente nas fêmeas tratadas com o EHVG e também a glicose nos machos tratados.

Tabela 2- Efeito da administração aguda de EHVG sob o perfil bioquímico dos ratos machos (n=6) e fêmeas (n=6) quatorze dias após a exposição, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (média \pm epm), *p<0,05 e **p<0,01versos controle (teste “t” de Student).

Parâmetros Bioquímicos	Machos			Fêmeas		
	Controle	EHVG (2mg/kg)	Valor de “p”	Controle	EHVG (2mg/kg)	Valor de “p”
Glicose (mg/dL)	161,7 \pm 5,0	125,4 \pm 8,92	0,0238*	142,8 \pm 5,0	161,3 \pm 22,7	p=0,4851
Colesterol (mg/dL)	277,8 \pm 24,2	257,7 \pm 38,0	0,6914	302,2 \pm 14,1	316,8 \pm 65,9	p=0,8465
Triglicerídeos (mg/dL)	317,0 \pm 77,0	379,3 \pm 48,4	0,5086	301,3 \pm 54,1	348,8 \pm 59,8	p=0,5688
Uréia (mg/dL)	139,3 \pm 14,1	99,7 \pm 18,3	0,1478	96,5 \pm 27,19	151,2 \pm 45,4	p=0,3682
Creatinina (mg/dL)	1,4 \pm 0,21	1,0 \pm 0,16	0,1560	1,0 \pm 0,22	1,6 \pm 0,44	p=0,2754
Ácido úrico (mg/dL)	10,8 \pm 1,28	12 \pm 2,13	0,6777	9,8 \pm 1,42	12,3 \pm 2,32	p=0,4209
AST (UI/L)	72,7 \pm 12,38	88,8 \pm 32,5	0,6801	82 \pm 9,16	55,5 \pm 7,28	p=0,0656
ALT (UI/L)	115,7 \pm 18,9	65,3 \pm 6,5	0,0440*	139,7 \pm 20,7	80,3 \pm 10,2	p=0,0424*
Proteínas totais (g/dL)	6,7 \pm 0,54	6,4 \pm 0,79	0,8962	6,7 \pm 0,54	6,5 \pm 0,67	p=0,7841
Fosfatase alcalina (UI/L)	114,7 \pm 29,9	120,7 \pm 22,4	0,8865	80 \pm 10,3	168,3 \pm 32,9	p=0,0416*

Bilirrubina total (mg/dL)	0,62±0,05	0,6±0,07	0,8684	0,6±0,04	0,8±0,03	p=0,0061**
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,37±0,05	0,4±0,05	0,6703	0,33±0,03	0,55±0,04	p=0,0025**
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,25±0,03	0,2±0,03	0,3409	0,27±0,02	0,25±0,02	p=0,5995
Amilase (U/I)	584,2±108,6	388,5±73,5	0,2031	674,5±65,4	465,5±153,3	p=0,2788
G-GT (U/I)	4,72±0,78	5,45±1,01	0,6127	6,78±0,31	6,67±0,36	p=0,8283

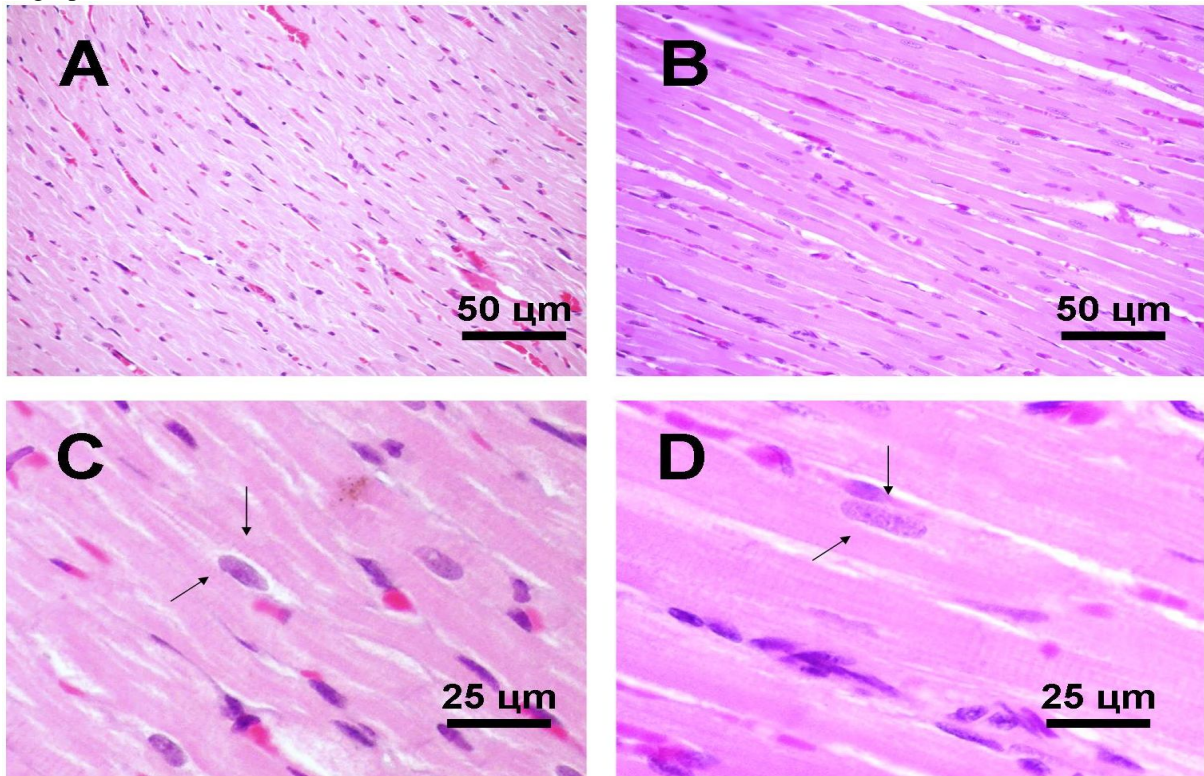
5.2.8 Exame Histopatológico

Foi realizada análise microscópica com o intuito de investigar a capacidade do EHVG em produzir alterações agudas histológicas no fígado, pulmão, rins e coração dos animais tratados.

Os resultados obtidos demonstraram não haver alterações significativas morfo-arquiteturais ou citológicas nos tecidos cardíacos e pulmonares (Figuras 25 e 26) analisados após o fim do ensaio de toxicidade pré-clínica aguda dose única (gavagem) de 2000 mg/kg do EHVG nos animais do grupo tratado (machos e fêmeas).

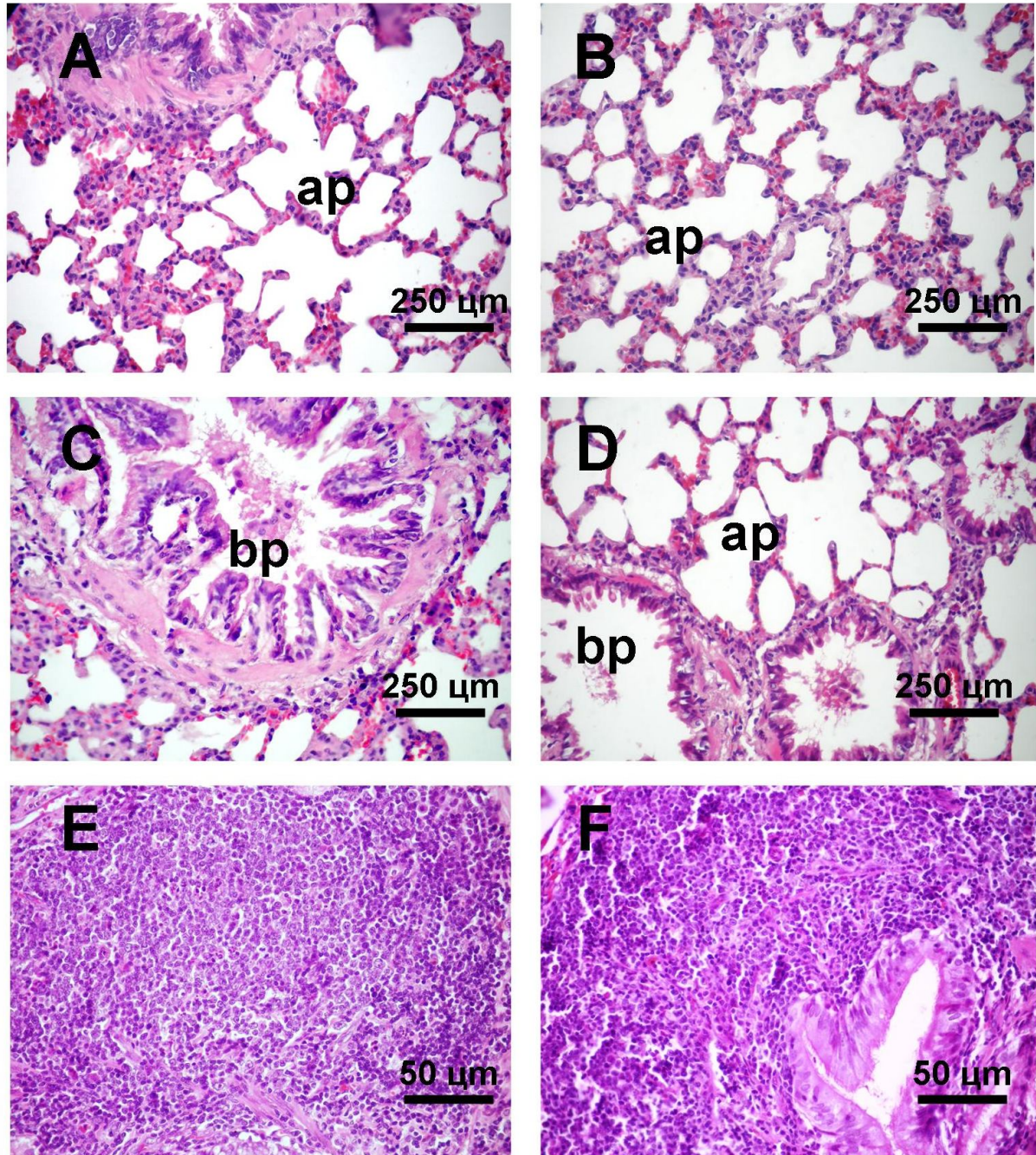
No tecido cardíaco, as fibras musculares se organizam, em secção longitudinal, em uma disposição fascicular paralela. Individualmente, as células (rbdomioblastos) exibem citoplasma eosinofílico granuloso, com estriações transversais típicas e núcleos volumosos e alongados, com cromatina finamente dispersa e disposição periférica no citoplasma celular.

Figura 25- Secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina da musculatura cardíaca exibindo fibras levemente distendidas demonstrando características de normalidade em um animal macho que recebeu o número 1 e de uma fêmea que recebeu o número 1 em gaiolas separadas (dos grupos tratados com EHVG (A) e (B)). Detalhe da fibra muscular exibindo rbdomioblastos com núcleos fusiformes com cromatina tipicamente dispersa (setas delgadas) e citoplasma apresentando estriações transversais características em macho-1 e fêmea-1 do grupo tratado com EHVG (C) e (D).



Conforme pode ser visto na Figura 26, a maior parte da massa pulmonar se mostrou constituída por alvéolos septados por paredes delgadas revestidas em cada face por uma camada de epitélio simples constituído por pneumócitos tipo I (células pavimentosas) e pneumócitos tipo II (células cuboidais). Observam-se, ainda, a presença de brônquios revestidos por um epitélio respiratório, abaixo do qual se encontra uma lâmina própria circundada por camada de fibras musculares lisas, e mais periféricamente por placas de cartilagem hialina, e bronquíolos (semelhantes aos brônquios, mas sem cartilagem periférica). Em áreas focais, evidencia-se a presença de agregados linfóides, algumas vezes reacionais, denominados de Sistema BALT (Tecido Linfóide Associado aos Brônquios).

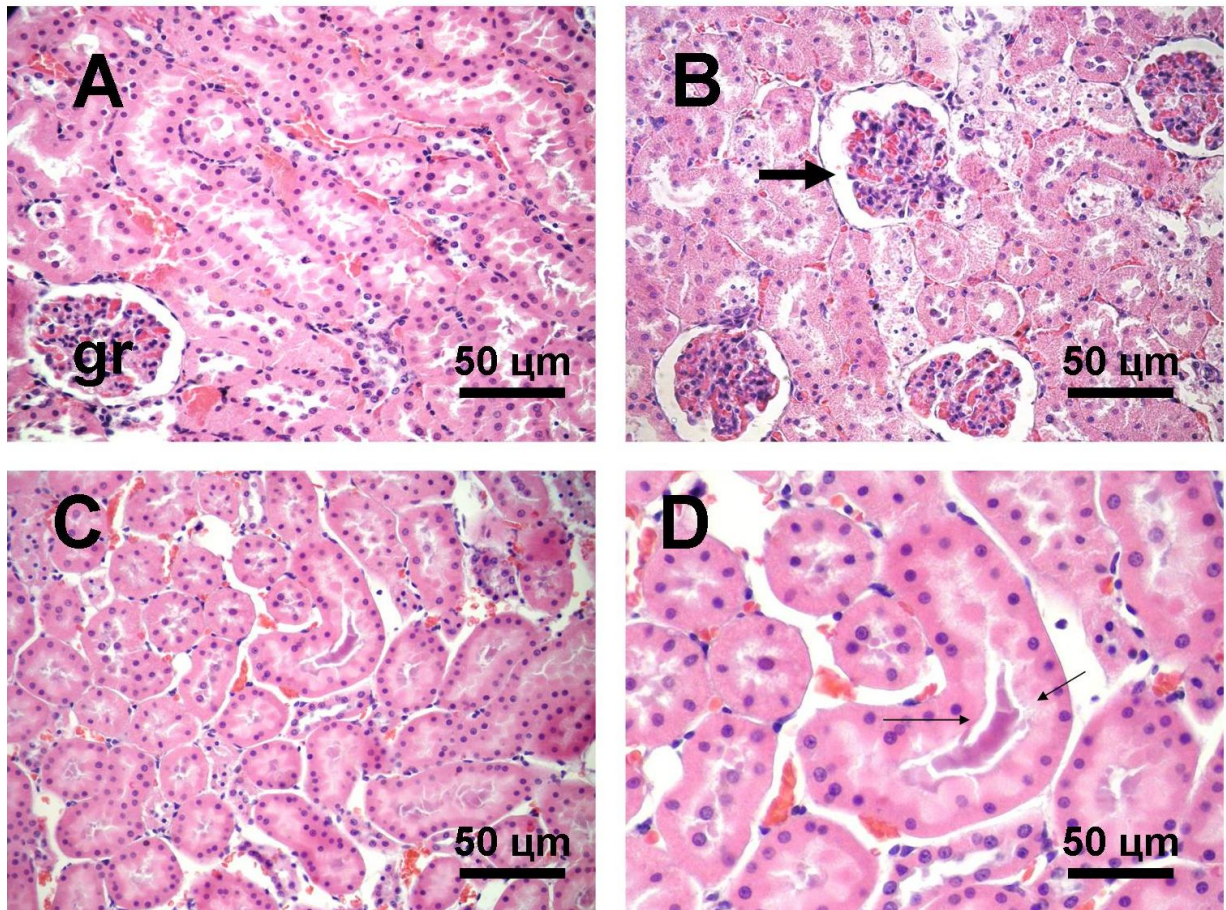
Figura 26- Secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina de tecido pulmonar. Observar alvéolos pulmonares (ap) com características usuais em um animal macho-1 (A) e uma fêmea-1 (B) do grupo tratado com EHVG. (C) Bronquíolos pulmonares (bp) típicos em um animal macho-1 (C) e uma fêmea-1 (D) tratados com EHVG. Agregados linfóides dos sistema BALT (*Bronchiolar Associated Lymphoid Tissue*) em um macho-1 e uma fêmea-1 do grupo tratado (E) e (F).



A análise do tecido renal (Figura 27) revelou que, apesar das características morfo-arquiteturais se apresentaram basicamente típicas, amostras dos animais do grupo tratado com o EHVG: animal-1 e animal-5 machos e um animal-2 fêmea exibiram ocasional acúmulo de gotículas de material amorfo eosinófilico, refringente, hialino, com limites nítidos nos túbulos renais proximais. Este tipo de degeneração hialina ocorre devido à absorção de proteínas

provenientes da luz tubular, quando o glomérulo permite a passagem de proteínas (GOMBOS et al., 2010), como em casos de glomerulonefrite. Além disso, áreas focais de aumento do espaço da cápsula de Bowman foram observadas no animal-5 macho. No entanto, a ausência de inflamação cortical e de inclusões citoplasmáticas hialinas nas células tubulares e de outras modificações morfológicas glomerulares dificulta a interpretação deste dado. Sugerimos, pois, que seja realizada correlação com dados bioquímicos a fim de analisar se estes achados morfológicos representam um sinal toxicológico ou apenas um artefato.

Figura 27- Secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina do tecido renal. (A) Cótex renal exibindo glomérulo (gr) típico e (B) glomérulo com espessamento da cápsula de Bowman, ambos no animal-1 macho tratado com EHVG. (C) Túbulos proximais mostrando acúmulo de material eosinofílico amorfo de aspecto proteináceo no animal-2 macho tratado com EHVG. (D) detalhe da figura anterior, destacando túbulo contendo material proteináceo (setas delgadas).

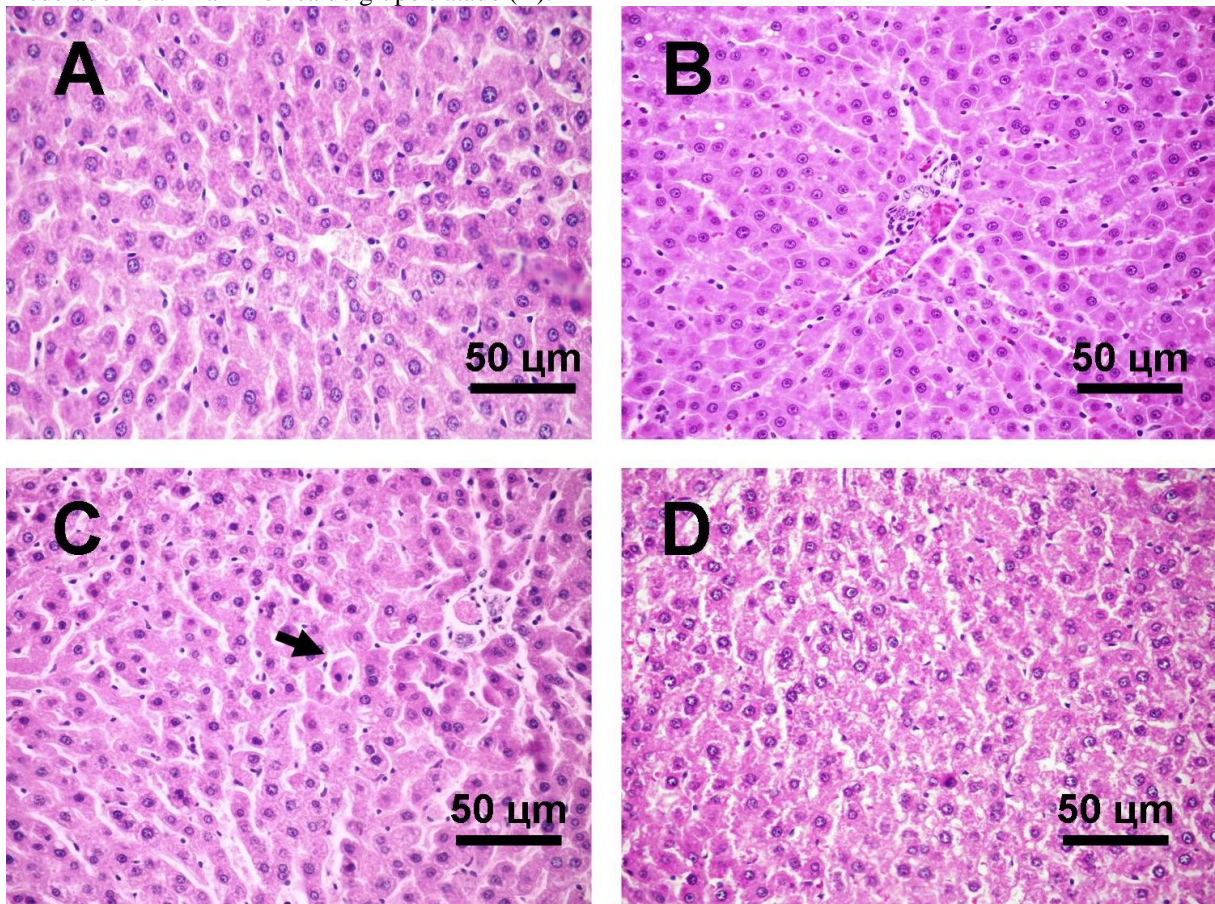


Conforme mostra a Figura 28, a análise histológica do tecido hepático revelou áreas focais onde se observava a presença de corpos apoptóticos e binucleação em todos os espécimes. A apoptose, ou morte celular programada, é regulada pela transcrição de alguns genes e se caracteriza por um conjunto característico de câmbios morfológicos celulares. A

renovação celular implica que todas as células completamente diferenciadas que constituem um tecido devem morrer e ser substituídas de modo controlado e “programado”. Além de assegurar a manutenção fisiológica da população de hepatócitos e células não-parenquimatosas no fígado, a apoptose participa na patogênese de diversas doenças hepatobiliares, como hepatites a vírus, doenças colestáticas, doença hepática alcoólica e transplantes hepáticos (PAROLINI; REASON, 2001).

A binucleação, por sua vez, tem sido descrita como um importante indicador de crescimento hepático ou de aumento na atividade metabólica hepática, embora o aumento nas figuras de binucleação venham sendo associadas a danos oxidativos (PARK et al., 2010). Contudo, conquanto apoptose e binucleação tenham sido observadas em todos os grupos, essas características morfológicas parecem representar muito mais o balanço entre perda e regeneração celular hepática do que uma expressão morfológica de dano citológico ou tissular.

Figura 28. Secções histológicas hepáticas coradas em Hematoxilina e Eosina mostrando hepatócitos bem corados, com citoplasma finamente granuloso, organizados em cordões, no animal-1 macho (A) e um animal-1 fêmea (B) do grupo tratado com EHVG. Destaque para corpo apoptótico (seta) no animal-2 macho do grupo tratado (C) e área focal de discreta perda de eosinofilia citoplasmática consistente com edema intracelular moderado no animal-4 fêmea do grupo tratado (D).



6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DO EHVG FRENTE AO BIOENSAIO DE *Artemia salina*

O ensaio com *A. salina* L. foi escolhido devido ser considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e produtos de origem natural com potencial atividade biológica de acordo com as literaturas e códigos de vigilância em vários países. Esse teste é viável devido à semelhança dos limites dos efeitos tóxicos produzidos em *A. salina* com aqueles produzidos no ser humano (KLASSE et al., 2001).

No experimento frente ao microcústáceo *A. salina* L. com o EHVG foi obtido uma $CL_{50} = 2692,39 \mu\text{g/mL}$. Comprovando desta maneira, de acordo com a classificação de toxicidade proposta por Meyer et al. (1982), que o extrato é não tóxico.

Desta forma, considera-se que a ausência de toxicidade dos extratos no teste de letalidade contra *Artemia salina* é um provável indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados com a espécie *V. guianensis* para a avaliação da toxicidade empregando-se outros modelos (*in vitro* e *in vivo*) se fazem necessários.

6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA (DOSE ÚNICA)

A avaliação do binômio risco/benefício no emprego de toda e qualquer preparação farmacêutica (alopática, homeopática, fitoterápica) é um dos principais objetivos dos estudos farmacológicos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos. Para Brito (1994), dentro de uma avaliação estimativa das propriedades tóxicas de uma substância química a determinação da toxicidade pode ser efetuada após a obtenção de dados de toxicidade aguda em doses simples ou repetidas.

De acordo com Lapa et al. (2000), num ensaio de toxicidade pré-clínica aguda os animais são tratados com dose única do produto em teste ou, eventualmente, com doses repetidas em período não superior a 24 horas. No caso deste estudo, fez-se a utilização da dose única com o EHVG de 2000 mg/kg em ratos Wistar.

O estudo toxicológico pré-clínico agudo de uma dada droga é de fundamental importância, pois caracteriza os efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração, em

uma determinada concentração, capaz de provocar danos em órgãos de metabolização em animais de experimentação.

No que concerne à espécie em estudo, *Vatairea guianensis*, os trabalhos da literatura estão relacionados aos aspectos químicos (isolamento), microbiológicos, antiparasitários e valor econômico de sua madeira, contrastando com carência de estudos toxicológicos detalhados com produtos originados dessa planta e utilizados na medicina popular.

O tratamento agudo de 2000 mg/kg do EHVG (dose única) por gavagem em ratos Wistar, inicialmente não promoveu morte e nenhum sinal clínico visível de toxicidade durante os 14 dias do experimento.

Segundo Malone e Robichaud (1983), o screening hipocrático fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e a disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo.

Já para Lúcio et al.(2000) o screening hipocrático é um ensaio bastante útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para determinar atividades toxicológicas e farmacológicas.

Por tanto, neste estudo, a administração aguda em dose única (2000 mg/kg) do EHVG demonstrou não influenciar nas alterações comportamentais(nenhum sinal visível de toxicidade foi observado), indicando de acordo com o período de observação (14 dias consecutivos), que o extrato administrado de forma aguda é bem tolerado por via oral em ratos de ambos os sexos, não interferindo na coordenação motora nem nos reflexos, além de não influenciar em outras atividades fisiológicas relacionadas com o Sistema Nervoso Central (como tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia), ou com o Sistema Nervoso Autônomo (como lacrimação, respiração, cianose, ptose, salivação, micção, piloereção, hipotermia).

A variação na massa corporal, o consumo de água e ração são dados de fácil obtenção e são também variáveis de extrema importância no que se refere à toxicidade. Alterações nesses parâmetros de modo diferente do esperado pode ser sinal do desenvolvimento de doenças e alterações tanto centrais como periféricas (SUCKOW et al., 2006).

Na avaliação dos hábitos fisiológicos diários (consumo de ração e de água) durante os 14 dias do experimento, a administração do EHVG na dose de 2000mg/kg via oral (gavagem) não produziu diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o grupo tratado e o grupo controle (Figuras 20 e 21), fortalecendo a hipótese que o extrato se apresenta com baixa toxicidade aguda.

Conforme os dados obtidos em relação à evolução ponderal dos animais no ensaio de toxicidade aguda, o EHVG induziu de forma estatisticamente significativa ($*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ *t-student*) somente o peso dos ratos machos tratados com o extrato (Figura 19). Durante os 14 dias do experimento, evidenciou-se uma redução no peso dos machos do grupo teste que se mostrou mais significativa a partir do nono dia de execução do ensaio; revelando que o extrato não produz um efeito imediato a administração.

A redução na massa corporal nos animais experimentais pode estar relacionada diretamente a sinais de toxicidade aguda (TOFOVIC e JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002) e a uma sensibilidade diferenciada entre os sexos ao extrato. Porém este fenômeno ganha uma conotação menor quando se considera que não houve alterações significativas na ingesta de ração e água entre os grupos testes e controles. Sendo uma possibilidade que esta alteração esteja associada à variação metabólica e fisiologia destes animais.

Para Mello (2001), além da redução do desenvolvimento ponderal, alterações no consumo de ração e água, alterações comportamentais, apatia e má condição da pelagem são indícios de manifestações tóxicas. No entanto, o que ficou evidenciado neste experimento é que do conjunto de parâmetros citados, somente o peso dos animais machos mostrou alteração significativa.

Para Gonzalez e Silva (2003), sinais de toxicidade também podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos.

A administração do EHVG causou uma diminuição estatisticamente significativa na massa relativa (%) dos seguintes órgãos: coração ($**p < 0,01$), fígado ($*p < 0,05$) e rins ($*p < 0,05$) apenas em machos tratados com o extrato (Figuras 23, 25 e 26). Como observado nestes resultados, às diferenças com significância estatística para o fígado e os rins que são órgãos diretamente ligados a biotransformação e eliminação de drogas, assim pode ser um indício de toxicidade para machos.

No presente estudo, a redução na massa relativa destes órgãos pode estar associada a sinais de toxicidade aguda conforme a literatura citada (GONZALEZ e SILVA, 2003). Porém, verifica-se que comumente ocorre aumento da massa relativa para esta evidência toxicológica de acordo com Diallo et al. (2010) e Bevilacqua et al. (2011). Sendo assim, há a possibilidade que os órgãos nos machos teriam diminuído de tamanho acompanhando a evolução ponderal também diminuída nos animais machos. Uma vez que, exames mais minuciosos (histopatológicos) e bioquímicos sanguíneos relacionados a estes órgãos não evidenciaram

alterações significativas que pudéssemos fazer uma correlação com essa diminuição da massa relativa dos órgãos e suas funções.

A avaliação hematológica e bioquímica também fornecem importantes indícios de manifestações tóxicas locais e sistêmicas induzidas por extrato, podendo auxiliar o diagnóstico e no prognóstico de diversas enfermidades (SWENSON, 1988; JAIN, 1993).

Alterações no número de células circulantes pode indicar o comprometimento da hemopoese devido a interferências na multiplicação, maturação ou diferenciação celular, processos esses dependentes das células pluripotentes da medula óssea, do microambiente medular e dos fatores reguladores envolvidos (PISONI et al., 2001).

Quando observamos os resultados do perfil hematológico, de acordo com a Tabela 1, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em quase todos os parâmetros hematológicos avaliados. Entretanto, houve uma diminuição significativa na contagem diferencial dos leucócitos segmentados dos ratos machos (**20,17±1,51; 8,83±1,70-p=0,0005*****) e fêmeas (**26,00±2,39; 13,17±1,25-p=0,0008*****) tratados com o extrato em relação ao grupo controle; enquanto que na contagem diferencial para linfócitos houve um aumento da contagem nos animais machos (**76,33±1,20; 87,83±2,09- p=0,0008*****) e fêmeas (**70,00±2,45; 83,17±1,62-p=0,0012****).

Os leucócitos possuem importantes funções na resposta imune inata e adaptativa, devido principalmente, a sua grande capacidade de adaptação a diferentes condições metabólicas. O sistema inato caracteriza-se por responder aos estímulos de maneira não específica; é composto por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, basófilos, monócitos, células natural Killer e outros fatores solúveis (Dufaux ,1991).

De acordo com Dufaux (1991), os hormônios do estresse adrenalina e cortisol estão envolvidos em inúmeras mudanças na imunidade.

Do conjunto de dados que compõem o hemograma, somente foi observado alterações nas contagens diferenciais destas duas células (neutrófilos segmentados e linfócitos), e mesmo assim se encontram dentro dos limites de referência (Harkness; Wagner, 1993), não sendo estas pequenas flutuações indicativo de importância clínica.

Como demonstrado nos resultados obtidos para o hematócrito e hemoglobina, a administração aguda do EHVG é improvável causar de danos diretos nas células sanguíneas da série vermelha (eritrograma), na medula óssea ou anormalidades na absorção ou incorporação de nutrientes necessários para a eritropoiese, pelo menos num grau suficiente para causar anemia.

As análises dos índices hematimétricos são importantes indicadores na determinação do tipo morfológico das anemias. No presente estudo, o índice CHCM entre os grupos se mostrou sem alterações estatisticamente significativas. Sendo, este parâmetro analisado, mais uma evidência de que o EHVG não apresenta grau considerado de toxicidade aguda para equilíbrio fisiológico do sistema hematopoiético.

Leucócitos totais e plaquetas para ambos os grupos sem alterações estatisticamente significativas. Demonstrando a não interferência do extrato na contagem global destes parâmetros hematológicos (sistema imunológico e coagulação sanguínea). Isto é, uma atividade imunodepressora deste extrato é também improvável.

Nos parâmetros bioquímicos avaliados no fim do ensaio toxicológico agudo (dose única) para os dois grupos de ratos (machos e fêmeas) conforme mostra a Tabela 2, a grande maioria dos resultados obtidos demonstrou que o EHVG não foi capaz de promover diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (controle e teste). No entanto, a enzima alanina aminotransferase (ALT), apresentou-se reduzida nos animais machos ($115,7 \pm 18,9$; $65,3 \pm 6,5$ - $p=0,0440^*$) e fêmeas ($139,7 \pm 20,7$; $80,3 \pm 10,2$ - $p=0,0424^*$) do grupo teste em relação ao grupo controle. Já para a Fosfatase alcalina (FAL), houve uma redução somente nas fêmeas que receberam o EHVG em relação ao controle ($168,3 \pm 32,9$; $80 \pm 10,3$ - $p=0,0416^*$). Os resultados das Bilirrubinas mostraram que houve um aumento da Bilirrubina total ($0,6 \pm 0,04$; $0,8 \pm 0,03$ - $p=0,0061^{**}$) das fêmeas que receberam o extrato em comparação as fêmeas do grupo controle; sendo também evidenciada alteração similar para a Bilirrubina indireta ($0,33 \pm 0,03$; $0,55 \pm 0,04$ - $p=0,0025^{**}$) e Glicose reduzida nos machos tratados ($161,7 \pm 5,0$; $125,4 \pm 8,92$ - $p=0,0238^*$).

Os efeitos tóxicos de substâncias podem atingir todos os sistemas e órgãos, porém é o fígado que paga o maior tributo, provavelmente devido a dois fatores importantes: a) a sua posição anatômica, que o torna mais vulnerável e, b) o seu próprio determinismo funcional, que condiciona maior concentração celular, não apenas dos compostos a serem transformados, como também dos metabólitos resultantes (MENDES, 1988).

De acordo com Coles (1986), as seguintes enzimas podem ser utilizadas como indicadores de injúria hepática: alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (ALS), gama-glutamilttransferase (G-GT), fosfatase alcalina (FAL) e as bilirrubinas (total, direta e indireta).

Para Moura (2000), as enzimas AST e ALT encontram-se em grande quantidade no fígado, pulmão e músculo esquelético, sendo que por isso seu aumento sérico não implica obrigatoriamente em lesão hepática, surgindo como uma hipótese.

As alterações na concentração das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) e da fosfatase alcalina (FAL) são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MOTTA, 2003; MILINKOVIC-TUR; PERIC; STOJEVIĆ et al., 2005).

A presença de elevados níveis de AST no plasma hepático pode ser indicativa de lesão hepática grave, e ALT sérica elevada indica lesão moderada. Quanto maior a relação AST/ALT maior a gravidade da lesão (GAYOTTO, 2005).

Conforme mostra a Tabela 2 ocorreu uma redução da enzima ALT em machos e fêmeas que receberam o extrato em comparação ao grupo que recebeu apenas o veículo. Este achado teria maior relevância clínica caso a alteração encontrada fosse o aumento da enzima AST, que está mais direcionada a uma lesão hepática grave; no entanto, este resultado não descaracteriza ainda uma possível alteração hepatotóxica leve do EHVG.

Para Santos et al., (2008). A fosfatase alcalina (FAL) está presente em vários tecidos, principalmente osso, no sistema hepatobiliar e na mucosa gastrointestinal e é indicadora da ocorrência de colestase (fluxo biliar prejudicado), que pode levar a um incremento dos níveis séricos em até 10 vezes. A colestase bioquimicamente consiste numa alteração de constituinte do soro como hiperbilirrubinemia, bile ácida e elevação de atividades das enzimas AST e G-GT (HASCHEK; ROUSSEAU, 1996).

A redução significativa da Fosfatase alcalina evidenciada somente nas fêmeas que receberam o EHVG pode estar relacionado provavelmente à variabilidade biológica destes animais, pois, este resultado se fez presente nas fêmeas em relação às Bilirrubinas (indireta e total). Como o fígado é um órgão responsável pela metabolização de drogas, estes achados podem também estar associados a uma possível capacidade do EHVG produzir toxicidade aguda.

A γ -glutamyltransferase (γ -GT) aparece no fígado (ductos biliares e fração microsomal). Emprega-se o doseamento desta enzima para diagnosticar comprometimento da função biliar (ALVAREZ; BERG; BIANCHI et al., 2002).

Neste estudo não houve diferença estatisticamente significativa para a enzima γ -GT. Tornando este resultado um bom indicativo da não interferência do EHVG na função biliar.

Segundo Smink et al. (2006); Vetelainen et al. (2006), os achados alterados para as enzimas das funções hepáticas (ALT, FAL e Bilirrubinas total e indireta), pode não haver dano hepatobiliar com a administração do EHVG; devido a não correlação com os resultados macroscópicos e principalmente histopatológicos do fígado; podendo ser a variabilidade biológica dos animais que pode estar relacionada com estas alterações encontradas. No

entanto, há a necessidade de estudos complementares para um esclarecimento destas alterações.

Para avaliar a disfunção renal quando associada a efeito tóxico produzido por xenobiótico faz-se necessário utilizar uma bateria de testes. Segundo Lopes, et al. (1996), fatores renais e extra-renais podem interferir no aumento sérico da uréia.

Para Loeb (1997), a mensuração sérica de uréia constitui um indicador insensível de dano renal em roedores. E, de acordo com Loeb (1997); Lopes et al., (1996), a utilização de creatinina endógena “clearenc test” é o mais específico e sensível teste para avaliar a função renal, pois, ao contrário da uréia, seu nível não é afetado pela dieta, idade e sexo.

Para Davis e Berndt (1994) a elevação das concentrações de creatinina e uréia no sangue podem ser usadas como índice de decréscimo da filtração glomerular. Isto é, estar relacionado a alterações nas funções renais. No presente trabalho os resultados da uréia e creatinina (Tabela 2) dos grupos tratado e controle não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, evidenciando-se desta maneira que o EHVG provavelmente não cause danos ao sistema renal. Desta forma não interferindo no processo de filtração e eliminação dos rins. Conclui-se assim, que não houve evidência de nefrotoxicidade do EHVG, pois, o equilíbrio hidro-eletrolítico (como a excreção de compostos nitrogenados) não foi alterado.

O ácido úrico, segundo Gonzales e Silva (2003), pode ter seus valores aumentados em decorrência de neoplasias de células sanguíneas, doenças hepáticas, insuficiência renal, endocrinopatias, ingestão de substâncias tóxicas ou drogas, e em falhas genéticas das enzimas necessárias para o metabolismo do ácido úrico.

No presente estudo não houve alterações estatisticamente significativas entre os valores do ácido úrico entre o grupo tratado com o EHVG e o grupo controle. Desta forma, o EHVG não induziu alterações de toxicidade aguda em relação às patologias que apresentam o perfil do ácido úrico elevado.

A enzima Amilase participa da digestão de carboidratos de alto peso molecular ainda na saliva e posteriormente no estômago. Encontra-se em maior parte no pâncreas, entretanto, a Amilase sérica é originada em grande parte do fígado. Sua redução pode significar tanto insuficiência pancreática, como ocorre na pancreatite crônica e/ou em tumores pancreáticos, quanto dano hepático (MILLER, 1992; KANECO, 1996).

A administração aguda do EHVG demonstrou não induzir alterações na função da amilase. Pois, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os animais tratados com o extrato e os que receberam somente o veículo. Desta maneira, não evidenciou-

se alterações sugestivas de disfunção pancreática exócrina ou endócrina após a exposição aguda.

Para Gonzales e Silva (2003), em relação às proteínas totais sua diminuição estar diretamente ligadas a casos de: síndrome nefrótica, hiperidratação, queimaduras severas, desnutrição, insuficiência renal, distúrbios na síntese de proteínas e na síndrome da má absorção.

Neste experimento, em relação às proteínas totais, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os animais do grupo tratado com o EHVG e o grupo controle (veículo). Reforçando a hipótese da não interferência do EHVG nas funções bioquímicas diretamente ligados as variações das proteínas totais.

A não alteração com significância estatística na dosagem do colesterol e triglicerídeos entre os grupos (controle e teste) demonstra que não há interferência do EHVG sobre o metabolismo dos lipídios.

Para os níveis séricos da glicose foi evidenciada uma redução significativa somente nos machos tratados (**161,7±5,0; 125,4±8,92- $p=0,0238^*$**) em comparação ao grupo controle. Como também ocorreu redução na variação ponderal, redução na massa relativa do fígado nestes animais, provavelmente este achado possa estar correlacionado com o metabolismo dos animais que receberam o extrato.

A principal finalidade da análise histopatológica é avaliar a integridade tecidual dos órgãos extipados. Dentre os principais parâmetros investigados estão lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose.

Quanto à avaliação histopatológica, nos tecidos cardíacos e pulmonares analisados do grupo tratado com o EHVG na dose de 2000 mg/kg em dose única (gavagem), observa-se que de acordo com as Figuras 25 e 26, que os mesmos se apresentaram com as características morfo-arquiteturais ou citológicas sem alterações. Demonstrando assim, a não interferência da administração aguda do EHVG nas características dos tecidos em estudo.

Em relação à avaliação histológica do tecido renal (Figura 27) foi observado que o mesmo apresentou características morfo-arquiteturais típicas. No entanto, os animais tratados com o EHVG machos-1 e 5 e outro animal fêmea-2; apresentaram um tipo de degeneração hialina, que poderá ser resultante de uma provável glomerulonefrite. O animal-5 macho também apresentou áreas focais de aumento do espaço da cápsula de Bowman.

Estes resultados histológicos relacionados aos rins perdem significado clínico quando se faz uma correlação destes com dosagens bioquímicas que estão diretamente ligadas a função

renal (uréia e creatinina), que não foram alteradas com a administração aguda do EHVG. Levando-se a concluir, que as alterações morfológicas encontradas no tecido renal destes animais se caracterizam apenas com um artefato e não um sinal de toxicidade.

Na avaliação microscópica do tecido hepático (Figura 28) foi obtido um resultado comum em todos os animais: corpos apoptóticos e binucleação. De acordo com Parolini e Reason (2001), a apoptose pode estar envolvida na patogênese de diversas doenças hepatobiliares, enquanto que binucleação pode ser um indicador de crescimento hepático ou aumento na atividade metabólica hepática. Como estes achados no tecido hepático foram comuns a todos os animais e os resultados obtidos das enzimas que avaliam os danos hepatobiliares nos dois grupos caracterizaram possivelmente uma variabilidade fisiológica dos animais; acredita-se que todas estas evidências colaboram para que estas análises histopatológicas possam representar muito mais o balanço entre perda e regeneração celular hepática do que uma expressão morfológica de dano citológico ou tissular da administração do EHVG.

7 CONCLUSÃO

- A concentração letal média ($CL_{50} = 2692,39 \mu\text{g/mL}$) no bioensaio frente à *Artemia salina*;
- Não ocorrência de mortes e modificações comportamentais, bem como ausência de alterações no consumo de ração e água;
- A falta de alterações com significância estatísticas para a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados;
- Aspectos macroscópicos dentro da normalidade, alterações significativas na massa relativa dos órgãos das fêmeas tratadas e as análises histopatológicas com características morfo-arquiteturais sem alterações significativas;
- O conjunto de dados obtidos sugere que o EHVG apresenta baixa toxicidade aguda.

Por se trata de um estudo inicial, são necessários, estudos mais avançados, com períodos mais prolongados (toxicidade subcrônica e crônica), para um delineamento mais completo do perfil de toxicidade da espécie *Vatairea guianensis* (AUBLET).

REFERÊNCIAS

ABBOT, P. J. Comfrey: assessing the low-cost health risk. **Med. J. Aust.**, v.149.678-682, 1988.

ABEBE, W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.27, p.391-401, 2002.

ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. **Informações sobre os fitoterápicos brasileiros**, 2004. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 20 julho 2010.

ABIFITO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA FITOTERÁPICA. **Mercado de Fitoterápicos no Brasil**. Disponível em: <<http://notes.visywork.com.br/empresas/herbarium/prod.nsf/infomre?OpenForm>>. (Histórico: Mercado Mundial). Acesso em: 12.05.2010.

ALMEIDA, A. V.; CÂMARA, C. A. G.; MARQUES, E. A. T. Plantas medicinais brasileiras usadas pelo Dr. João Ferreyra da Rosa na “Constituição Pestilencial de Pernambuco” no final do século XVII, **Biotemas**, 21 (4): 39- 48, dezembro de 2008.

ALMEIDA, E. R.; **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus; 1993.

ALMEIDA, M. T et al. **Triagem Farmacológica de plantas do Nordeste Brasileiro**. In: Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais. Paraíba. Anais, p 345-354, 1983.

ALVIM, N. A. T., et al. Tecnologias na enfermagem: o resgate das práticas naturais no cuidado em casa, na escola e no trabalho.. **In: Nébia Maria Almeida de Figueiredo. (Org.). Tecnologias e técnicas em saúde: como e porque utilizá-las no cuidado de enfermagem**. São Paulo: Difusão Editora, 2004, v. 1, p. 338-355.

ANDERSEN, M. L et al. **Princípios éticos práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, p.167, 2004.

ANG-LEE, M. K., MOSS, J.; YUAN, C.S. Herbal medicines and perioperative care. **JAMA.**; 286 (2): 208-16, 2001.

ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais Sobre Microorganismos Relacionados à lesão de Mucosite Oral**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde. Belém: Universidade Federal do Pará, 2010.

ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEM, P. H. (Ed). **Advances in legume Systematic**. Richmond: Royal Botanic Gardem, Kew, p.723-769, 1981.

- ASCHAWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they Bull. **W.H.O.**, Geneva, v.79, n.79, p.691-692. 2001, Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin>>. Acesso em: 09 de Abril de 2010.
- ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**. p. 113– 114, 2008.
- ASSAD, A. L. D.; FERRO, A. F. P. Biodiversidade e sua utilização na Geração de Fitoterápicos. **Fármacos & Medicamentos**. 2005; 37, p-40.
- BACHA, W. J.; WOOD, L. M. **Color atlas of veterinary histology**. Ed. Lea & Febiger. p.269, 1990.
- BARBOSA, F. G et al. Anthraquinones and naphthopyrones from *Senna rugos*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 32: 363-365, 2004.
- BAROSA, J et al. Teste de toxicidade do cobre para *Artemia salina* L. **Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente**, nov.2003.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga S. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 57-67, 2003.
- BARROSO, G. M et al. de: **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. Minas Gerais: Imprensa Universitária, 377p. 1991.
- BASILA, D.; YUAN, C. S.: Effects of dietary supplements on coagulation and platelet function. **Thromb. Res.**, v.117, p.49-53, 2005.
- BEVILACQUA, A. H. V et al. Toxicity of apolar and polar *Lantana camara* L. crude extracts in mice. **Research in Veterinary Science [S.I.]**, v. 90, n. 1, p. 106-115, 2011.
- BIELORY, L. Adverse reactions to complementary and alternative medicine: ragweed's cousin, the coneflower (echinacea), is "a problem more than a sneeze". **Ann Allergy Asthma Immunol**. 2002; 88:7-9.
- BLANC, P. D et al. Alternative therapies among adults with a reported diagnosis of asthma or rhinosinusitis: data from a population-based survey. **Chest**. 2001; 120: 1461-7.
- BOTSARIS, A.S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995.
- BRAGANÇA, L. A. R. (Coord.). **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Niterói: EDUFF, 1996. 300p.
- BRANDÃO, M. G. L et al . Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.5, n.1, p.56-59, 2002.
- BRASIL, 2004. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. *D.O.U* 18/03/04. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BRASIL, 2010. Resolução RDC n°. 14 de 31 de março de 2010. *D.O.U.* 05/04/10. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2006.

_____. **Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica**. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. mar/2002. Disponível em <<http://www.abifito.com.br>>. Acesso em 12/06/ 2010.

_____. Congresso Nacional. Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 17 de 24 de fevereiro de 2000. **Diário Oficial da União de 25 de fevereiro de 2000**. Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Consulta em: 26 jan.2010.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução. Determina a publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. **Diário Oficial da União. Resolução nº. 89, 16 de março de 2004**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10241&word=>>>. Acesso em: 05 nov 2010.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada RDC 48 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União de 18 de Março de 2004**. Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Consulta em: 26 jan.2010.

_____. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 3ª edição, Brasília: Ministério da Saúde, p.88, 2002.

BRASIL. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez. 1973.

BRASIL. Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 set. 1976.

BRASIL. Ministério da saúde. Serviço nacional de fiscalização da medicina e da farmácia. Portaria nº 22 de 30.10.1967 estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. **Diário Oficial da União**, 16.11.1967, p.11571-11572, 1967.

BRUNEAU, A.; FOREST, F. Phylogenetic relationships en the Caesalpinioidea (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL sequences. **Systematic Botany**, v.26, p.478-514, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.** Vol.55. nº 3. São Paulo, Jul-Sept. 2003.

CALIXTO, J. B.; Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for medicines (phytotherapeutic agents). **Braz j Med Biol Res** 33(2): 179-189, 2000.

CAMARGO, M. T. L. A. As plantas na medicina popular e nos rituais afrobrasileiros. **Investigações Folclóricas**, vol. 13, Buenos Aires, Argentina, 1998.

CAPASSO, R et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, n. 71, p.58-65, 2000.

CARREIRA, L. **O cuidar ribeirinho: os saberes e práticas de saúde das famílias da ilha**

CARVALHO, J. C. T. **Formulário Médico-Farmacêutico de Fitoterapia**. Belo Horizonte: Ciências Brasilis, p. 2-9, 2005.

CARVALHO, P. O et al. 2003. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids. **Química Nova**, 26: 75-80. (in Portuguese, with abstract in English)

CAVADA, B. S et al. Purification and characterization of lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Phytochemistry**, v.49.n.3.p675-680, 1998.

CAVALCANTE, M. F et al . Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, vol.23, No. 1. São Paulo, 2001.

CAZARIN, C. C. K et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol.40 no.3 São Paulo Julho/Setembro. 2004.

CEVALLOS, G.C., 1996. Estudos de toxicologia pré-clínica para nuevos fármacos. *Archive Neurociências*. 1, 118-121.

CHAPPILL, J. A. Cladistic analysis of the Leguminosae: the developmenet of an explicit hypothesis. In: CRISP, M.D.; DOYLE, J.J. (Ed), **Advances in legume Systematic**. Richomond: Royal Botanic Gardem, Kew. 1995. P.1-10.

CHASE, M. W et al. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. **Annls of Missouri Botanical Garden**, v.80, p.528-580, 1993.

CHEN Y et al. Docosahexaenoic Acid Modulates the Interactions of the Interphotoreceptor Retinoid-binding Protein with 11-*cis*- Retinal. **The Journal of Biological Chemistry**, 271: 20507-20515. 1996.

COELHO, S. R. Levantamento de plantas medicinais em comunidades de Rio Novo do Sul, Iconha, Itapemirim e Cahoeiro de Itapemirim. In: ENCONTRO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS, 1, 1989, Rio Novo do Sul. **Anais**. Vitória: EMATER- ES/ MEPES, P.13- 27. 1989.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Legislação e Ética**. Res. 592. Disponível em: < <http://www.meusite.com.br/cobea/>>. Acesso em 01 dez. de 2010.

COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. Cap. 7 : Liver function, p. 129-151.

COOPOOSAMY, R. M.; MAGWA, M. L. 2006. Antibacterial activity of chrysophanol isolated from *Aloe excelsa* (Berger). **African Journal of Biotechnology**, 5: 1508-1510.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, vol.4, p.515-519. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, completado por Leonandia Azeredo, 1969.
COSTA, E.A. **Vigilância Sanitária Proteção e Defesa da Saúde**. São Paulo: HUCITEC.1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press.1981. p. 1236-1248.

CUNHA, A. P et al . Aspectos históricos sobre o uso das plantas na terapêutica. In: CUNHA, A.P.; TEIXEIRA.A, F.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. (Eds.), **Plantas na terapêutica, farmacologia e ensaios clínicos** (15-21). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2007.

CUNHA, L. C. **Estudo farmacognóstico e da atividade antitumoral, antiinflamatória e toxicidade pré-clínica do *Synadenium umbellatum***. Projeto de Pesquisa – CNPq, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2003.

DAHLGREN, R. M. T. General aspectos of angiosperm evolution and Macrosystematic. **Nordical Journal of Botany**, v. 3. P. 119-149, 1983.

DAVIS, E.M; BERNDT, W.O. Renal Methods for Toxicology. In: **Principles and Methods of Toxicology**. 3ªed. Raven Press, 1994.

DERGAL, J. M et al. Potencial interactions between herbal medicines and conventional drug therapies by older adults attending a memory clinic. **Drugs Aging**. 19(11), 879-886, 2002.

DESCAT, F. **Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme**. (Tese) Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France. p.105, 2002.

DEVIENNE, K.F.; RADDI, M. S. G.; POZZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6. Botucatu, p. 11-14, 2004.

DHARMANANDA, S. **The interactions of herbs and drugs**. Disponível em: <<http://www.itmonline.org/arts/herbdrug.htm>>. Acesso em 25 outubro 2010.

DI STASI, L. C.; Química de produtos naturais: principais constituintes ativos: In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESPE, p.109-129, 1996.

DIALLO, A et al. Acute and sub-chronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcohol leaf extract of *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** [S.I.], v. 9, n. 5, p. 463-467, 2010.

DOLABELA, M. **Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti- *T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 128p, 1997.

DORTA, E. J. Introdução. In: **Escala Rural**: especial de plantas medicinais. 1(4):1-62. São Paulo: Escala Ltda; 1998.

DOYLE, J. J et al. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidences from rbcL sequences and non molecular data. **Advances in legume Systematic**. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew. PT 9.; p. 1-20. 2000.

DOYLE, J. J. DNA data and legume Phylogeny: a progress report. **Advances in legume Systematic**. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew. Phylogeny, PT 7, p. 11-30, 1995

DOYLE, J. J.; DONOGHUE, M.J.; ZIMER, E. A. Integration of morphological and ribosomal RNA data an the Origen of angiosperms. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 419-450, 1994.

DUFAUX, B., ORDER U. **Effect of short maximal physical exercise on coagulation, fibrinolysis and complement System**. International journal of sports Medicine. p. 2381-2389.1991.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. São Paulo: Manole; 2001.

EMBRAPA. **Recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: estratégias para conservação e manejo sustentável**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/antec/plantasm.html>>. Acesso em: 07 out 2010. enfermagem: o resgate das práticas naturais no cuidado em casa, na escola e no trabalho.. **In:**

ERNST, E; PITTLER, M. H. Risks associated with herbal medicinal products. **Wien Med Wochenschr**, 152 (7-8): 183-9, 1998.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 4. ed. Porto Alegre: Artemed, p.298, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo : Atheneu, pt.1, p.IV.1-IV.10. 1998.

FARNSWORTH, N.R. Testando plantas para novos remédios. In: WILSON, E. O. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, Cap. 9, 1997.

FAUSTO, B. **História Concisa do Brasil**. SP: Edusp, 2006.

FEBRAFARMA. Departamento de Economia. **Comércio Exterior**. Disponível em <<http://www.febrafarma.org.br>>. Acesso em 12 de dezembro de 2010.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In. DISPASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Universidade Paulista, p. 129-156, 1996.

FIGUEIREDO, B. G. **Farmácia: Ofício & história**, Belo Horizonte: Conselho Regional de Farmácia do Estado de Minas Gerais, p.152 (44), Gráfica e Editora Ideal LTDA., 2005.

FORMIGA, M. D et al . Constituintes of Brazilian Leguminosae. **Phytochemistry**, v.14, n.3, p. 828, 1975.

FOWLER, J. S. L.; RUTTY, D. A. Methodological aspects of acute toxicity testing particularly LD50 determinations present use in development of new drugs. **Acta Pharmacol.**, v. 52, p. 20-30, 1983.

FRANÇA, C. "Os portugueses no século XVI e a história natural do Brasil" In: **Rev. Hist.** 15(57/60): 35-166, 1926.

FRAZIER, J. M. **In vitro Toxicity testing**. Applications to safety evaluation. New York, Marcel Dekker, Inc., p. 300, 1992.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Ministério da Saúde - Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Brasília, p.15, 2007.

GARCIA-ROSA, K et al. Chrysophanol, an Antimicrobial Anthraquinone from the Root Extract of *Colubrina greggii*. **Journal Mexican Chemistry Society**, 50: 76-78. 2006.

GAYOTTO, V.A.F.A. (Ed.). **Doenças do fígado e vias biliares**. Vol. 1. Rio de Janeiro:Atheneu. 2005. 664 p.

GRAMS, W. F. M. P. **Plantas medicinais de uso popular em cinco distritos da Iha de Santa Catarina**. Dissertação Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Botânica. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1999.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Creoles, Palikur, Wayãpi. Iberoamérica (Guatemala)**. p.42-44, 1996.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. ; Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M.O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.;MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5th ed . Universidade/UFMS and ed Da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp13-28, 2004.

GURIB-F, A. Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p. 1-93, 2006.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 3.ed. São Paulo : Roce, p. 238. 1993.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G. **Fundamentals of toxicology pathology**. Academic Press, 1996.

- HEINRICH, M.; GIBSON, A. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytoterapy. **Elsevier Science**. v.3, p. 287-289, Jan. 2004. Disponível em: <https://portal.fucapi.br/tec/imagens/revistas/004_rev011_aspectos_da_legislacao_no_control_e.pdf>. Acesso em: 09 jul10.
- JAIN, N. C.; **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger 1993.
- JARDIM, M. A. G et al . Análise florística e estrutural para avaliação da fragmentação nas florestas de várzea do estuário amazônico. In: JARDIM, M.A.G.; MOURÃO, L.; GROSSMANN, M. (Org.) – **Açaí** – possibilidades e limites para o desenvolvimento sustentável no estuário amazônico. Belém, 2004. MPEG, pg.101–121.
- JUDD, W. S et al. **Plant systematic phylogenetic approach**. Sinauer Associates, P 238-288. 1999.
- KAJITA, T et al. RbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botany**, v.26, p. 515-536, 2001.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KLASSEN, C. O.; WATKINS, J. B. **Toxicologia, A Ciência Básica Dos Tóxicos de Casarett e Doull's**. 5ª Ed. McGraw-Hill de Portugal, Ltda., 2001.
- KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n.1, p.1-7, 1996.
- KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Bioactive phenolic lipids. **Studies in Natural Products Chemistry**, 30: 111-190. 2005.
- KOZUBEK, A.; TYMAN, J.H.P. Resorcinolic lipids, the natural nonisoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **Chemical Reviews**, 99: 1-25. 1999.
- KURY, L. – Viajantes – naturalistas do Brasil oitocentista: experiência, relato e imagem-história. **Ciência e Saúde – Manguinhos**, vol. VIII (suplemento), 868-80, 2001.
- LAPA, A .J et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, cap. 11, p.181-289. 2000.
- LAPA, A.J et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFSC, p. 183-98. 2001.
- LARINI, L. Avaliação Toxicológica. In: LARINI L. **Toxicologia**. 3ed. São Paulo: Manole. p 43-58. 1997.
- LAVIN, M. A cladistic analysis of the tribe Robiniae (Papilionoideae, Leguminosae). **Advances in legume Systematic**. In: STIRTON, C. H. (Ed). Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew. 1987, pt. 3, p. 31-64.

LEWIS, E. Should web be concerned about herbal remedies? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164, 2001.

LIMA, H. C.; Revisão Toxonômica do Gênero *Vatairea guianensis* Aublet (Leguminosa Faboideae). **Arquivos de Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v.26, n.3, p.173-203, 1982.

LOBOSCO, M. **Fitoterapia Chinesa** :Introdução à tradição e ao uso de plantas orientais.

LOEB, W. F. Clinical Biochemistry of Laboratory Rodents and Rabbits. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, p.845-855, 1997.

LOPES, S. T. A et al.; **Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, p.166, 1996.

LOPES, W. B et al . Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais, *Horizonte científico* 2002. Disponível em: <<http://www.propp.ufu.br/revistaelectronical/b/desenvolvimento.pdf>>. Acesso em: 20 de set. 2010.

LORENZI, H ; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil** – Nativas e exóticas. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002.

LÚCIO, E. M. R. A et al . Avaliação toxicológica agudo e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev Bras Farmacogn**, v.9/10, p23-25, 2000.

LUNA, J. S et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 199 – 206, 2005.

MACKELI, D. Interactions between ants and leguminous plants. **Monographs in Systematic Botany**. Missouri Botanical Garden, v. 29, p. 673-718, 1989.

MALONE, M. H; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products - General and; pecificapproaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol** 8: 127-147. 1983.

MARCUS, D. M.; GROLLMAN, A. P. Botanical medicines - The need for new regulations. **N Engl J Med**. 2002; 347(25): 2073-6.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. **Plantas medicinais**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, v. 1, p 15-19, Jul, 1994.

MARTINS, E. R et al. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Universidade de Viçosa, MG, Brasil, p.220, 2000.

MARQUES, L. C. 1992. *Produção e comercialização de fitoterápicos no Paraná: uma abordagem de vigilância sanitária*. Curitiba, 1992. Tese [Mestrado] apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 232 p.

MATOS, F. J. A.; AGUIAR, L.M.B.A.; SILVA, M.G.V. Constituintes Químicos e Atividade Antioimicrobiana de *Vatairea macrocarpa*. **Acta amazônica**, v.18, n.1-2, p. 351-352, 1988.

MCCHESENEY, J. D; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future on into extinction. **Phytochem**, v. 68, p.2015-2020, 2007.

McLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and Brine shrimp lethaly. Two simple bioassay for higher plants screeing and fraction. **Methods in Plants Biochemistry**. v.6, p. 2-27, 1982.

MEDLINE PLUS. **Garlic** (*Allium sativum* L.). Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/patient-garlic.html>>. Acesso em: 05 de agosto de 2010.

MELLO, F. B. Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. Porto Alegre, 120p. Dissertação – Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

MENDES, F.T. 1988. Fígado e drogas. In: DANI, R.; CASTRO, L. P. **Gastroenterologia clínica**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 80, p.1035-1042.

MENDONÇA-FILHO, R. R. Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences. In: AHMAD I.; AQIL, F.; OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs**. Wiley-VCH: Weinheim, p. 2. 2006.

MENON-MIYAKE, M. A et al . Inquérito sobre o uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital público terciário. **Rev Bras Otorrinolaringol.**; 70(2) supl: 43-55. 2004.

MESELHY, M. R. Constituents from Moghat, the Roots of *Glossostemon bruguieri* (Desf.). **Molecules**, 8: 614-621. 2003.

MEYER, B. N. et al . Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medicinal*, v.45, p. 31-34, 1982.

MILINKOVIĆ-TUR, S et al. Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. **Veterinarski arhiv** 75: 195-202, 2005.

MILLER, O. **Laboratório para o clínico**. 7. Edição Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. 593p.

MINAYO, M. A. S. **O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde**. 10. ed. São Paulo: Hucitec, 2007.

MINKYUN, N et al. Protein Tyrosine Phosphatase 1B inhibitory Activity of Anthraquinones and Stilbenes. **Natural Product Sciences**, 14: 143-146. 2008.

MOREIRA F. H. **Plantas Medicinais - I**. Universidade Federal do Paraná. v.1 p.103. Curitiba-Pr, 2003.

MORS, W. Plantas Mediciniais. **Ciência Hoje**, v. 1, n. 3, p. 51-54, 1982.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório**: princípios e interpretações. 4ed. São Paulo: Robe, 2003.

MOURA, R. T. et al. **Técnicas de Laboratório**. 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 1987. 511p. **Mutum-PR** (Dissertação de Enfermagem). Rio de Janeiro- RJ: EEAN/UFRJ, 2002. P 134. n.1, p. 929-938,2002.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. SP: Atheneu, p.515, 1996.

OMS-ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Promoción y Desarrollo de La Medicina Tradicional**. Genebra, 1978.

OTOBELLI, I et al. **Estudo Fitoquímico e atividade leishmanicida de *Vatairea guianensis* Aubl (FABACEAE)**. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro do Mercosul de Parasitologia. Foz do Iguaçu – PR. Brasil. 2009

OTTOBELLI, I et al. Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (fabaceae). **Acta Amazônica**. Vol.41(3) 2011:393-400.

PARIS, R. R.; MOYSE; **Matière Médicale**. 2º Ed. Masson, Vol. I, Paris, p.419, 1976,

PISONI, R; RUGGENENTI, P; REMUZZI, G. Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management. **Drug Saf**, v. 24, n. 7, p. 491-501, 2001.

PARK, J. K et al. **Vitamin C deficiency increases the binucleation of hepatocytes in SMP30 knock-out mice**. J Gastroenterol Hepatol. 2010 Nov; 25 (11):1769-76.

PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; PAULA, I. C.; New rules for Phytopharmacol drug registration in Brazil. **J. Ethopharmacol**. Amisterdam, j. 66, n1, p.51-55, 1999. **Pharmacol**. v. 33, p. 360-366, 1999.

PIEIDADE, L. R.; WOLTER, F.W.; Antraquinonas de *Vatairea guianensis* Aubl. **Acta Amazônica**, Manaus, v.18, n.3-4, p. 185-187.1988.

PINN, G.; Adverse effects associated with herbal medicine. **Australian Family Physician** **30**: 1070-1075, 2001.

PINTO, C. A et al . Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quimica nova*, v. 25, supl.1, p.25-61, 2002.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. (Ed). Evolution and systematic of the Leguminosae. **Advances in legume Systematics**. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew. Pt 1, p. 1-26. 1981.porque utilizá-las no cuidado de enfermagem.. São Paulo: Difusão Editora, 2004, v. 1, p. 338-355.

PORTAL, R. R et al . Espécies vegetais utilizadas na alimentação de *Podocnemis unifilis*. Troschef 1948 (Reptilia, Testudinae, Pelomedusidae) na região do Pracuúba-Amapá Brasil. **Ciência Animal Brasileira** v.3(1). p11-19, jan/jun.2002.

RAINFORESTTREASURE.com. Herbs with drug interactions – a partil list. Disponível em: <http://rainforesttreasure.clm/drug_interact.asp>. Acesso em 25 jul 2010.

RATES, S. M. K. Plants as souce of drugs. **Toxicon**. Amsterdan, v.39, p.603-613, Jan, 2001.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, A.O.; EL-HADIYAH, T.M.; AL-MAJED, A.A. Effect of

REPETTO, G.; REPETTO, M. **Toxicologia Avanzada**. Capítulo 2: Métodos Alternativos: estudios toxicológicos in vitro. Madrid: Ediciones Días de Santos. p. 37 – 45. 1995.

REVILLA, J. ; MELO, L. **Levantamento Florístico e Econômico da Flora do município de Manaquiri-AM**. Relatório dos alunos do Curso de Inventário Florístico. Curso de Pós Graduação em Botânica/INPA-UFAM. Manaus-AM, 2001.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 405p. Manaus-AM, Brasil, 2000.

RICHARDSON, R. J. **Pesquisa social: métodos e técnicas**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2007. Rio de Janeiro: Ed. Booklink, 2005.

RODRIGUES, A. G. **Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. Anais da V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais**. Joinville, 2006. p. 68-69.

SANGIOVANNI, J. P.; CHEW, E.Y. 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Retinal and Eye Research**, 24: 87-138.

SANT'ANA, P.J. **Bioprospecção no Brasil: Contribuições para uma Gestão Ética**. 1ª ed. Paralelo 15, Brasília, 2002.

SANTOS, E. V.; MEIRELLES FILHO, J. Plaquetograma em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.26, n.3, p.201-206, 2004.

SANTOS, F. Llycurgo. **História da medicina no Brasil (Do século XVI ao século XIX)** 2vs., São Paulo, Ed. Brasiliense, 1947.

SANTOS, M. A. C et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq Vet Bras** 28: 1-14 2008.

SANTOS, M. A. C et al. **Estudo botânico/ecológico e análise qualitativa de espécies medicinais extrativas utilizadas na produção de fitoterápicos pelo IEPA**. Relatório técnico: Macapá IEPA/BASA, 80 P. 2003.

SCHENKEL, E. P et al . Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 371-400. 2007.

SCHIMIDT, P. C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavoidgehaltes von Passiflorae herba. **Deutscher Apotheker Zeitung**, v. 47, p. 17-26, 1993.

SCHONGART, J et al . Phenology and stem-growth periodicity of tree species in Amazonian floodplain forests. **Journal of Tropical Ecology**, 18: 581–597. 2002.

SEGAL, R., PILOTE, L. Warfarin interaction with Matricaria chamomilla. **CMJA**, v. 174, n.9, p.1281-82, april25, 2006.

SERAFIN, C. **Estudos da composição química e das propriedades biológicas das partes áreas de *Plinia glomerata***. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí. 2006.

SHARAPIN, N. Normatização da indústria farmacêutica. In: **Anais do Seminário sobre industrialización y legislación de productos fitofarmacêuticos**. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/34-1/artigo647.pdf>>. 1996.

SHARON, A. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**. Center DMV 1995 p.1166-1183.

SILVA, C. T.L.da;. **Avaliação Biológica dos Extratos Obtidos das Sementes de *Vatairea guianensis* (Aubl.)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde. Belém: Universidade Federal do Pará, 2011.

SIMATUPANG, M. H.; DIETRICH, H. H.; GOTTWALD, H. 1967. Über die hautreizenden stoffe in *Vatairea guianensis* Aubl. Holsforshung. **Phytopharmacol drug registration in Brazil. J. Ethopharmacol.** v.7, n.3, p. 21-89, 2003.

SIMÕES, C. M. O et al . (Org.); **Farmacognosia – Da planta ao Medicamento**; 1 ed., Ed. da UFSC, p. 308-310, 1999.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS - **SINITOX**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab02_brasil_2008.pdf>. Site acessado dia 31 de outubro de 2010.

SMINK, F et al . Caso report: Risk factors of acute hepatic failure during antituberculosis treatment: two cases and literature review. **Journal of medicine**, 2006.

SOBRAFITO. Disponível em <http://www.sobrafito.org.br>. Acesso em 15 de julho de 2010.

SOEJARTO, D. D.; Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **J Ethnopharmacol** 51:1-15, 1996.

SOLER, O. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Brasília: Ministerio da Saúde; 2001.

SOUSA, J. A. MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Porto Alegre/RS, Editora, UFRGS, 2004. Disponível em: <[htm.ambientebrasil - ambiente agropecuário](http://htm.ambientebrasil.com.br/ambiente_agropecuário) (Plantas medicinais e fitoterápicos alternativas viáveis). Acesso em: 10/05/10.

SOUZA, L. A. G.; SILVA, M. F. Bioeconomical potential of Leguminosae from the lower negro river, Amazon, Brazil. In: BUSSMANN, R.W.; LANGE, S. (Ed.) In: **International Congress of Biodiversity**. Cusco: Proceeding of Congress of Biodiversity en los Andes y la Amazonia. Cusco: Inka. v.1, CD-ROM. 2001.

STRADA, L. C et al. **Catequinas das cascas do caule de Vatairea macrocarpa (Leguminosae)**. Sociedade Brasileira de Química-Departamento de Química-Cuiabá-MT, 2003.

SUCKOW, M. A. et al. **The Laboratory rat**. 2. ed. Londres: Elsevier, 2006.
SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes celulares e químicos do sangue. In: _____. **Fisiologia dos animais domésticos**. 10 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

TEIXEIRA, E. **As três metodologias: acadêmica, da ciência e da pesquisa**. Rio de Janeiro: Vozes, 2005.

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

TOLEDO, A. C et al . Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, São Francisco, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, Jul, 2003.

TOMAZZONE, M. I.; NEGRELLE, R. R.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Rev. texto contexto**, Florianópolis, 2006; v15, n1, p.115-21, Fev. 2006.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hipertensive heart failure prone rats. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, v. 33, p. 360-366, 1999.

TSEN, L.C.; SEGAL, S.; POTHIER, M.; BADER, A.M. Alternative medicine use in presurgical patients. **Anesthesiology**. 2000; 93(1):148-51.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**, v. 131, p. 911-926, 2003.

TUROLLA, M. S. R., NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 42, n. 2, abr./jun., pag. 189-306, 2006.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview In: BALICK, M.J; ELISABETSKY, E; LAIRD, S.A. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press: p 3-10, 1996.

UNITED STATES NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Papyrus Ebers. In.: History of Medicine. **National Institutes of Health**. USA. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/hmd/breath/breath_exhibit/MindBodySpirit/originframe.htm>. Acesso em: 2 Dez 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn** 18: 464-471, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, 28 (3), 519-528, 2005.

VETELAINEN, R. L et al . Hepatobiliary function assessed by ⁹⁹Tc-mebrofenin cholescintigraphy in the evaluation of severity of steatosis in a rat model. **European Journal of nuclear medicine and molecular imaging**. v.33, n.10, p-1107-114, 2006.

VIEGAS, J. R. C; BOLZANI, V. S. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, vol. 29, nº 2, 326-337, 2006.

VILELLA, T et al . **Plantas Medicinais e Tóxicas**. Corumbá-MS: III Simpósio sobre recurso naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 27 a 30 nov. 2000.

VINATORU, M. An Overview of the Ultrasonically Assisted Extration of Bioactive Principles from Herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.303-313, Jun, 2001.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (ed). **Secondary products from plant tissue cultere**. Oxford: Clarendon, 1990.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legume (Leguminosae): an early 21st Century perspective. **Advances in legume Systematics**. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew. 2003. Pt. 10.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Draft WHO guidelines on safety monitoring and pharmacovigilance of herbal medicines**. Amsterdam: World Health Organization, 2003.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 47-75, 2001.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, Fev, 2001.

ZHOU, X et al . 2006. Isolation and inhibitory activity against ERK Phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, 16: 563–568.

ANEXOS

TOXICIDADE AGUDA/TABULAÇÃO DOS DADOS

Teste Hipocrático: Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Droga..... Via de administração.....

Dosemg/kg; Volume da injeção;.....mL;

Concentração da droga.....

Hora da injeção.....h.....min.; Data...../...../.....

Administrador:.....

Investigador..... Assinatura.....

DOSE: _____		Tempo (min.):												Tempo (min.):											
		15() 30() 60()						120() 240()						15() 30() 60()						120() 240()					
CAIXA		Machos						Fêmeas						Machos						Fêmeas					
Nº de animais		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Peso																									
SINTOMAS	NORMAL																								
Atividade geral	0																								
Frêmito vocal	0																								
Irritabilidade	0																								
Resposta ao toque	0																								
Aperto de cauda	0																								
Contorção	0																								
Trem posterior	0																								
Endireitamento	0																								
Tônus muscular	0																								
Força de agarrar	0																								
Ataxia	0																								
Reflexo auricular	0																								
Reflexo corneal	0																								
Tremores	0																								
Convulsões	0																								
Estimulações	0																								
Straub	0																								
Hipnose	0																								
Anestesia	0																								
Lacrimação	0																								
Proses	0																								
Micção	0																								
Defecação	0																								
Piloereção	0																								
Hipotermia	0																								
Respiração	0																								
Cianose	0																								
Nº de mortos																									

Códigos: **Testes com anotação normal .0.**, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal .4., a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

Observações gerais/comentários:

Tabela para registrar o ensaio

Substância ou extrato: _____							
Responsável: _____				Data: _____			
		Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto
N	Conc. (µg/mL)	Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3	
1	Controle						
2	1000						
3	750						
4	500						
5	250						
6	100						
7	50						
8	25						
9	10						
10	5						
11	2,5						
12	1						