

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ISLAINE DE SOUZA SALVADOR

Estudos toxicológicos não-clínicos dos infuso e extratos secos nebulizados das drogas vegetais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Poincianella pyramidalis* Tul. (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (angico)

João Pessoa

2017

ISLAINE DE SOUZA SALVADOR

Estudos toxicológicos não-clínicos dos infuso e extratos secos nebulizados das drogas vegetais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Poincianella pyramidalis* Tul. (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (angico)

João Pessoa

2017

ISLAINE DE SOUZA SALVADOR

Estudos toxicológicos não-clínicos dos infuso e extratos secos nebulizados das drogas vegetais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Poincianella pyramidalis* Tul. (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* var. cebil (angico)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Inovação tecnológica em medicamentos; Linha de pesquisa: Ensaio não-clínicos e clínicos

Primeiro orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

Segundo orientador: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

João Pessoa

2017

S182e Salvador, Islaine de Souza.

Estudos toxicológicos não-clínicos dos infuso e extratos secos nebulizados das drogas vegetais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Poincianella pyramidalis* Tul. (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (angico) / Islaine de Souza Salvador. - João Pessoa, 2017.

139 f.: il. -

Orientadores: Rui Oliveira Macedo, Fábio Santos de Souza.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS

1. Toxicologia. 2. Medicamentos – Inovação Tecnológica.
3. Medicina Popular. 4. Drogas Vegetais. 5. Plantas Medicinais.
I. Título.

UFPB/BC

CDU: 615.9(043)

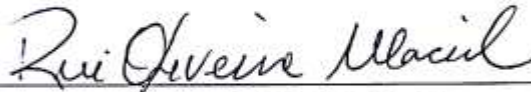
Islaine de Souza Salvador

Estudos toxicológicos não-clínicos dos infuso e extratos secos nebulizados das drogas vegetais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Poincianella pyramidalis* Tul. (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (angico)

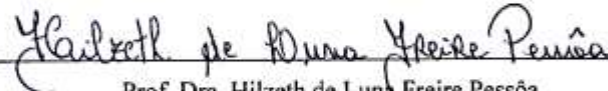
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor

Aprovada em: _____

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo
Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dra. Clarice Ricardo Macedo Pessoa (Avaliador Externo)
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. André Flávio Almeida Pessoa (Avaliador Externo)
Universidade Federal de Sergipe

*“Dedico a Deus e a Nossa
Senhora, aos meus pais, aos meus
irmãos e meu namorado Luiz
Claudio – Kaká, por todo amor e
apoio que sempre me deram.
Dedico também a dois anjos,
Aline Salvador e Armando Simões
(in memoriam).”*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, que por diversas vezes, nas horas em que pensei em desistir, me deram força e coragem pra chegar até aqui.

À Meu pai e Minha mãe, por sempre lutarem por mim, e por meus irmãos. E pela confiança e todo amor, que depositaram em mim, me ajudando dessa forma a realizar um dos meus sonhos.

Ao meu namorado Kaká (Luiz Claudio) pelo incentivo, força e amor dedicado.

Aos meus irmãos Anarita e Armando Neto pelo carinho e apoio.

Aos meus avós, tios, tias, padrinhos e primos pelo amor e apoio dedicado.

Aos meus amigos: Rayanne Sales, Valmir Gomes, Taynara Batista, Fabricio Havy, Renata Leite, Waleska Viana, Paula Felisberto, Agna Hélia e Valdilândio Procópio, pelo apoio e ensinamentos.

Obrigada aos meus amigos, por todos os momentos que passamos juntos, vocês moram no meu coração.

A meu orientador prof. Dr. Rui Oliveira Macedo e o co-orientador prof. Dr. Fábio Santos de Souza, pelo ensinamento, amizade, dedicação e paciência que demonstram por mim.

Aos professores e a secretária Aparecida do Programa de Pós- Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da UFPB, UFRN, UFRPE, pelos conhecimentos que me passaram.

Obrigada!

RESUMO

As plantas *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Poincianella pyramidalis* (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* (angico), são comumente utilizadas na medicina popular do Cariri paraibano, para o tratamento de diversas afecções intestinais, ginecológicas, de cicatrização e respiratórias. O trabalho teve como objetivo avaliar o perfil toxicológico não clínico agudo, dos infusos e dos extratos secos nebulizados das drogas vegetais das folhas de *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e *A. colubrina*. Foram avaliados os infusos dos pós das drogas vegetais das plantas estudadas, nos tamanhos de partículas de pó grosso (710-355 μm), pó semifino (355-180 μm) e o pó finíssimo (150-75 μm), nos camundongos *swiss* em dose única, avaliados durante 14 dias, quanto às alterações comportamentais, consumo de água, ração e massa corporal. Os extratos secos nebulizados (ESN) das drogas vegetais *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e *A. colubrina* foram avaliados nas dose de 500, 1000 e 2000 mg/kg por animal em dose única via oral em camundongos machos/fêmeas durante 14 dias, observando-se às alterações comportamentais, consumo de água, ração e massa corporal. Foram determinados, também, a massa dos órgãos coração, fígado, rins, pulmão e baço, com avaliação morfológica desses órgãos. Os estudos em doses repetidas utilizando o ESN das drogas vegetais estudadas, na dose de 2000 mg/kg/dia /animal em camundongo e coelhos machos/fêmeas, avaliados durante 30 dias, quanto às alterações comportamentais, consumo de água, ração e massa corporal, bem como massa dos órgãos coração, fígado, rins, pulmão e baço, além da análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, morfológicos e histopatológicos dos órgãos estudados. Foram utilizados grupos controle administrando-se solução salina (NaCl 0,9%) em camundongos e coelhos. Os dados obtidos com os infusos evidenciaram a não existência de sinais de toxicidade sistêmica para todos os tamanhos de partículas das drogas vegetais estudadas. Os estudos toxicológicos de dose única com os ESN nas três dose também evidenciaram nenhuma alteração comportamental, no consumo de água e ração, na massa corporal, massa dos órgãos coração, fígado, rins, pulmão e baço. Em doses repetidas de 2000 mg/kg por animal de cada ESN das drogas vegetais *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e *A. colubrina* ficaram demonstradas a não existência de alterações toxicológicas sistêmicas e comportamentais ou morte nos camundongos e coelhos tratados em relação aos seus respectivos grupos controle. Os estudos toxicológicos não-clínicos agudos mostraram que os infusos e extratos secos das espécies estudadas podem ser utilizados em formulações tópicas nas dose avaliadas com segurança comprovada.

Palavras-chave: *Myracrodruon urundeuva*, *Poincianella pyramidalis*, *Anadenanthera colubrina*, quercetina, canferol, toxicidade dose única, toxicidade em doses repetidas.

ABSTRACT

The plants *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Poincianella pyramidalis* (catingueira) and *Anadenanthera colubrina* (angico), are commonly used in the popular medicine of Cariri Paraibano, for the treatment of various intestinal, gynecological, healing and respiratory diseases. The objective of this study was to evaluate the acute non-clinical toxicological profile of infusions and nebulized dry extracts of the plant drugs of *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* and *A. colubrina*. The powder infusions of the plant drugs of the studied plants were evaluated in the sizes of particles of coarse powder (710-355 μm), semifinished powder (355-180 μm) and fine powder (150-75 μm) in the swiss Single dose, evaluated for 14 days, regarding behavioral changes, water consumption, feed and body mass. The spray dried extracts *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* and *A. colubrina* were evaluated at concentrations of 500, 1000 and 2000 mg / kg per animal in a single oral dose in male / female mice for 14 days, Observing the behavioral changes, water consumption, ration and body mass. We also determined the mass of the heart, liver, kidney, lung and spleen organs, with morphological evaluation of these organs. The repeated doses studies using the ESN of the studied plant drugs at a concentration of 2000 mg / kg / day / animal in mouse and male / female rabbits, evaluated during 30 days, regarding behavioral changes, water consumption, feed and body mass, As well as mass of the heart, liver, kidney, lung and spleen organs, as well as the analysis of the hematological and biochemical, morphological and histopathological parameters of the organs studied. Control groups were used by administering distilled water in mice and rabbits. The data obtained with infusions showed no signs of systemic toxicity for all particle sizes of the studied plant drugs. Single-dose toxicity studies with NSAs at three concentrations also showed no behavioral change in water and feed intake, body mass, body mass, liver, kidney, lung and spleen organs. At repeated doses at the concentration of 2000 mg / kg per animal of each ESN of the plant drugs *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* and *A. colubrina*, there was no evidence of systemic and behavioral toxicological changes or death in mice and rabbits treated with their respective control groups. Acute non-clinical toxicological studies have shown that the infusions and dry extracts of the species studied can be used in topical formulations at concentrations evaluated with proven safety.

Key words: *Myracrodruon urundeuva*, *Poincianella pyramidalis*, *Anadenanthera colubrina*, quercetin, canferol, single dose toxicity, repeated doses toxicity.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Classificação das categorias de perigos para toxicidade aguda.	25
Figura 2	A árvore caule e folhas (A) e flores e frutos (B) da <i>M. urundeuva</i> .	28
Figura 3	Árvore (A), flores e frutos (B) da <i>P. pyramidalis</i>	33
Figura 4	Árvore (A), flor e vagem (B) da <i>A. colubrina</i>	38
Figura 5	Estrutura química da quercetina.....	48
Figura 6	Estrutura química do canferol.....	49
Figura 7	Cromatograma para o ESN (A), extrato hidroetanólico (B) de <i>M. urundeuva</i> e da quercetina na amostra padrão (C).....	61
Figura 8	Cromatograma para o ESN (A), extrato hidroetanólico (B) de <i>P. pyramidalis</i> e do canferol na amostra padrão (C).....	61
Figura 9	Cromatograma para o ESN (A), extrato hidroetanólico (B) de <i>A. colubrina</i> e da quercetina na amostra padrão (C).....	62
Figura 10	Peso dos camundongos dos grupos testados/grupo controle (n: 06), após administração do infuso dos pós da droga vegetal da <i>M. urundeuva</i>	65
Figura 11	Peso dos camundongos dos grupos testados/grupo controle (n: 06), após administração do infuso dos pós da droga vegetal da <i>P. pyramidalis</i>	65
Figura 12	Peso dos camundongos dos grupos testados/grupo controle (n: 06), após administração do infuso dos pós da droga vegetal da <i>A. colubrina</i>	66
Figura 13	Ingestão de água por camundongos tratados/controle, os grupos tratados receberam as dose 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg por animal de <i>M. urundeuva</i>	68
Figura 14	Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados receberam as dose 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg por animal de <i>M. urundeuva</i>	68
Figura 15	Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle os grupos tratados receberam as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal por dose de <i>P. pyramidalis</i>	70
Figura 16	Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados com as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal por dose única de <i>P. pyramidalis</i>	71
Figura 17	Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados com as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal em dose única de <i>A. colubrina</i> .	73
Figura 18	Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados receberam as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal por dose única de <i>A. colubrina</i>	74
Figura 19	Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de <i>M. urundeuva</i>	77
Figura 20	Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal de ESN de <i>M. urundeuva</i>	77
Figura 21	Ingestão de água por grupos de coelhos tratados/controle, os tratados na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de <i>M. urundeuva</i>	78

Figura 22	Ingestão de ração por grupos de coelhos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de <i>M. urundeuva</i>	78
Figura 23	O exame histológico nos coelhos machos devido a administração de 30 dias de ESN de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	87
Figura 24	O exame histológico nos coelhos fêmeas devido à administração de 30 dias de ESN de <i>M. urundeuva</i>	88
Figura 25	Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de <i>P. pyramidalis</i>	90
Figura 26	Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de <i>P. pyramidalis</i>	90
Figura 27	Ingestão de água por grupos de coelhos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de <i>P. pyramidalis</i>	91
Figura 28	Ingestão de ração por grupos de coelhos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de <i>P. pyramidalis</i>	91
Figura 29	O exame histológico nos coelhos machos devido à administração de 30 dias de ESN de <i>P. pyramidalis</i>	100
Figura 30	O exame histológico nos coelhos fêmeas devido à administração de 30 dias de ESN de <i>P. pyramidalis</i>	101
Figura 31	Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de <i>A. colubrina</i>	103
Figura 32	Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle, os tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de <i>A. colubrina</i>	103
Figura 33	Ingestão de água por grupos de coelhos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de <i>A. colubrina</i>	104
Figura 34	Ingestão de ração por grupos de coelhos tratados/controle, os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de <i>A. colubrina</i>	104
Figura 35	O exame histológico nos coelhos machos devido à administração de 30 dias de ESN de <i>A. colubrina</i>	112
Figura 36	O exame histológico nos coelhos machos devido à administração de 30 dias de ESN de <i>A. colubrina</i>	113

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Condições de secagem utilizadas para obtenção do extrato ESN por <i>spray-dryer</i>	53
Tabela 2	Os tamanhos de partículas dos pós das drogas vegetais das plantas <i>M. urundeuva</i> , <i>P. pyramidalis</i> e da <i>A. colubrina</i>	55
Tabela 3	Quantidade equivalente dos marcadores quercetina e canferol nas dose 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg/animal do ESN das drogas vegetais.....	56
Tabela 4	Os valores na dose dos marcadores quercetina e canferol, nos extratos das plantas.....	60
Tabela 5	Consumo de água e ração, após administração do infuso dos pós das drogas vegetais na dose de 2000 mg/kg.....	64
Tabela 6	Peso dos órgãos de camundongos do grupo tratado/controle, usando as dose 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg/animal de <i>M. urundeuva</i>	69
Tabela 7	Peso dos órgãos de camundongos dos grupos tratados/controles, usando as dose 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg/animal de <i>P. pyramidalis</i>	72
Tabela 8	Peso dos órgãos de camundongos do grupo tratados/controle, usando as dose 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg/animal de <i>A. colubrina</i>	75
Tabela 9	Peso dos órgãos dos camundongos, dos grupos tratados e controle, os tratado com 2000 mg/kg do ESN de <i>M. urundeuva</i> .	79
Tabela 10	Peso dos órgãos de coelhos dos grupos tratados/controle, os tratados com 2000 mg/kg do ESN de <i>M. urundeuva</i>	80
Tabela 11	Resultado dos parâmetros hematológicos de camundongos tratados/controle, os tratados com ESN de <i>M. urundeuva</i>	83
Tabela 12	Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de coelhos tratado/controle, os tratados com ESN <i>M. urundeuva</i> ..	84
Tabela 13	Resultado dos parâmetros bioquímicos de camundongos tratados/controle, os tratados usando o ESN da <i>M. urundeuva</i> ...	85
Tabela 14	Resultado dos parâmetros bioquímicos analisados dos grupos de coelhos tratado/controle, tratado com ESN da <i>M. urundeuva</i> .	86
Tabela 15	Peso dos órgãos de camundongos do grupo controle/tratado com dose do ESN de 2000 mg/kg de <i>P. pyramidalis</i>	92
Tabela 16	Peso dos órgãos de coelhos dos grupos tratado/controle, os grupos tratados com 2000 mg/kg/animal de <i>P. pyramidalis</i>	93
Tabela 17	Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de camundongos tratados/controle, a dose de 2000 mg/kg/animal de <i>P. pyramidalis</i>	96
Tabela 18	Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de coelhos tratados usando a dose do ESN de 2000 mg/kg de <i>P. pyramidalis</i>	97
Tabela 19	Resultado dos parâmetros bioquímicos dos camundongos tratados/controle, os tratados na dose de 2000 mg/kg de <i>P. pyramidalis</i>	98
Tabela 20	Resultado dos parâmetros bioquímicos de coelhos tratado/controle, na dose 2000 mg/kg de <i>P. pyramidalis</i>	99

Tabela 21	Peso dos órgãos de camundongos dos grupos tratados/controle, o tratado com 2000 mg/kg do ESN de <i>A. colubrina</i>	105
Tabela 22	Peso dos órgãos de coelhos dos grupos tratado/, os grupos tratados com 2000 mg/kg do ESN de <i>A. colubrina</i>	106
Tabela 23	Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de camundongos tratados/ controle, os tratados usando a dose 2000 mg/kg de <i>A. colubrina</i>	108
Tabela 24	Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de coelhos tratados/controle, os tratados usando a dose 2000 mg/kg de <i>A. colubrina</i>	109
Tabela 25	Resultado dos parâmetros bioquímicos grupos de camundongos tratado/controle, os tratados na dose 2000 mg/kg de <i>A. colubrina</i>	110
Tabela 26	Resultado de parâmetros bioquímicos dos coelhos tratado e controle, os tratados na dose 2000 mg/kg de <i>A. colubrina</i>	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs	<i>Reduction, Replacement e Refinement</i>
ALT	Alanina aminotransferases
ANOVA	Teste estatístico para comparação de resultados múltiplos paramétricos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARAGAL	Exsudato Gomoso de <i>A. columbrina</i>
AST	Aspartato aminotransferases
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração Letal
CLAED-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX-2	Enzimas ciclo-oxigenase
DL ₅₀	Dose Letal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrozil
DSC	Dióxido de Silício Coloidal
DSC	Dióxido de Silício Coloidal
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPM	Erro Padrão da Média
ESN	Extrato Seco Nebulizado
Fig.	Figura
GFAP	<i>Glial Fibrilar Acid Protein</i>
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCN	Ácido cianídrico
HEp ²	Huma Epidermoide Cancer Cells
HPLC	<i>High Phorman Liquide Chromatography</i>
i.p.	Intraperitoneal
IC ₅₀	Concentração que inibi 50% do crescimento celular em relação ao controle
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico síntese
IpeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
M	Média
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OX-42	Anticorpo reagente a micróglia imuno-reativas
p.o.	Por via Oral
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PTEF	Polímero Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAN	Elixir Sanativo®
SQR	Substância Química de Referência
SUS	Sistema Único de Saúde

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis factor</i>).
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	Detector de Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
*p	Varição Estatística
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou Menos
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Bar	Pressão
Cm	Centímetro
G	Grama
H ₂ O ₂	Água
Kg	Quilograma
M	Metro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n°	Número
°C	Graus Celsius
ppm	Partes por milhão
UI	Unidade Internacional
v/v	Fração volumétrica

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1. Estudo da Toxicidade.....	25
3.1.1. Segurança no uso das plantas medicinais.....	26
3.1.2. Toxicidade oral aguda.....	26
3.1.3. Toxicidade oral em doses repetidas.....	27
3.2. Sobre as drogas vegetais.....	28
3.2.1. <i>Myracrodruon urundeuva</i>	28
3.2.2. Aspectos Botânicos.....	28
3.2.3. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos.....	29
3.2.4. Aspectos Fitoquímicos	30
3.2.5. Aspectos Toxicológicos.....	31
3.2.6. Aspectos Farmacológicos.....	31
3.2.7. <i>Poincianella pyramidalis</i>	33
3.2.8. Aspectos Botânicos.....	33
3.2.9. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos.....	34
3.2.10. Aspectos Fitoquímicos	35
3.2.11. Aspectos Toxicológicos.....	36
3.2.12. Aspectos Farmacológicos.....	36
3.2.13. <i>Anadenanthera colubrina</i>	37
3.2.14. Aspectos Botânicos.....	38
3.2.15. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos.....	39
3.2.16. Aspectos Fitoquímicos	39
3.2.17. Aspectos Toxicológicos.....	40
3.2.18. Aspectos Farmacológicos.....	41
3.2.19. Legislação no Brasil sobre Medicamentos Fitoterápicos	43
3.2.20. Parâmetros Tecnológicos de Obtenção de Drogas Vegetais...	45
3.2.21. Processo de secagem para a obtenção de extratos secos nebulizados.....	45
3.2.22. Granulometria.....	46
3.2.23. Flavonoide quercetina.....	46
3.2.24. Flavonoide canferol.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. Material Botânico.....	51
4.2. Tamanho de partículas do material vegetal	51
4.3. Solventes e padrões analíticos	51
4.4. Preparação das amostras do extrato hidroalcoólico	52
4.5. Solução padrão do biomarcador	52
4.6. Obtenção do extrato seco nebulizado – ESN.....	52
4.7. Quantificação de quercetina e canferol nos extratos por CLAE..	53
4.8. Animais Experimentais.....	54
4.9. Estudo da toxicidade oral dos diferentes tamanhos de partículas das drogas vegetais	54

4.10. Estudo da toxicidade oral de dose única do extrato seco nebulizado (ESN) das drogas vegetais	55
4.11. Estudo da toxicidade oral de doses repetidas do ESN das drogas vegetais.....	56
4.12. Análises hematológicas e bioquímicas.....	57
4.13. Estudo Morfológico.....	57
4.14. Estudo Histopatológico.....	57
4.15. Análise Estatística.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1. Quantificação de quercetina e canferol por CLAED - DAD.....	60
5.2. Estudo de toxicidade oral utilizando dose única utilizando diferentes tamanhos de partículas	62
5.3. Estudo da toxicidade oral de dose única do extrato seco nebulizado (ESN) das drogas vegetais	66
5.3.1. <i>Myracrodruon urundeuva</i>	66
5.3.2. <i>Poincianella pyramidalis</i>	70
5.3.3. <i>Anadenanthera colubrina</i>	73
5.4. Estudo da toxicidade oral de doses repetidas do ESN das drogas vegetais	76
5.4.1. <i>Myracrodruon urundeuva</i>	76
5.4.2. <i>Poincianella pyramidalis</i>	89
5.4.3. <i>Anadenanthera colubrina</i>	101
7. CONCLUSÕES.....	115
8. REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICE.....	132
Artigo publicado no International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 9, Issue 4, p. 154-160, 2017.....	133

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são bastante utilizadas e recebe o incentivo da OMS (WHO, 1993). Mas não só o uso na medicina popular é suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. (TUROLA; NASCIMENTO, 2006; AGRA et al. 2008). Os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar os produtos fitoterápicos, que por serem naturais, não são isentos de efeitos tóxicos ou adversos (CRAVEIRO et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008).

Os fitoterápicos tem seu registro regulamentado no Brasil seguindo a RDC n° 14 de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Requerendo estudos e controles dos aspectos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, analíticos e tecnológicos. Através dos requisitos e parâmetros exigidos por essa resolução, à necessidade do controle de qualidade que abrangem desde a matéria-prima vegetal, derivados da droga vegetal até o produto final, com métodos analíticos validados e a comprovação de segurança de uso visando garantir a eficácia do produto final a ser comercializado (BRASIL, 2010a).

Integrando a diversidade de espécies que compõem a flora do bioma da caatinga, estão as seguintes espécies medicinais que foram estudadas: *Myracrodruon urundeuva* Allemão, a *Poincianella pyramidalis* Tul. e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*.

M. urundeuva uma espécie arbórea pertencente à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão, aroeira-do-cerrado e aroeira-preta (SANTIN; LEITÃO FILHO, 1991). É indicada no tratamento de ferimentos na pele, nas mucosas, sendo também, utilizada em gastrites, úlceras do estômago e do duodeno, bem como, no tratamento do aparelho genital feminino. Apresenta ação adstringente, anti-inflamatória, antialérgica e cicatrizante (MATOS, 2002; MATOS et al., 2004).

P. pyramidalis uma leguminosa da família Fabacea, popularmente conhecida como “catingueiro” ou “pau-de-rato” é endêmica na caatinga (BAHIA et al., 2005; SILVA et al., 2009). As folhas, flores, sementes e/ou casca desta espécie são muito utilizadas na medicina popular como diurético, antipirético (BAHIA et al., 2005) para tratamento de problemas estomacais, como cicatrizante e hemostático (CARTAXO et al., 2010), contra infecções respiratórias (MAIA, 2004).

A. colubrina pertencente à subfamília Mimosoideae (Leguminosae), conhecida popularmente como angico, angico-brando, é uma espécie arbórea que ocorre em vários

biomas, entre ele o da caatinga (NEPUMOCENO, 2007). A casca interna da *A. colubrina* é popularmente indicada para combater bronquite e pneumonia (ALMEIDA et al., 2005) e segundo Albuquerque et al. (2007) é também utilizada no combate a asma.

O uso de plantas medicinais na população representa uma prática cultural e um modelo alternativo de desenvolvimento humano sustentável, de educação, respeito pela natureza e direito à saúde. Considerando que muitas plantas do semiárido nordestino que são utilizadas na medicina popular, ainda não foram devidamente estudadas e seus efeitos farmacológicos comprovados, obtivemos drogas vegetais das plantas medicinais estudadas, garantimos a qualidade o ESN através da cromatografia e avaliamos os efeitos toxicológicos dos infusos e dos ESN das plantas *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e a *A. colubrina*. Garantindo o acesso seguro e o uso racional das plantas medicinais estudadas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial tóxico dos infusos dos pós das drogas vegetais, dos extratos secos nebulizados (ESN) e analisando quantitativamente os flavonoides quercetina e canferol nas folhas das plantas *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e a *A. colubrina* que são espécies de plantas medicinais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A quantificação de quercetina para *M. urundeuva* e *A. colubrina* e canferol para *P. pyramidalis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.
- Avaliar a toxicidade não-clínica em dose única via oral em camundongos, administrando o infuso dos pós das drogas vegetais estudadas.
- Avaliar a toxicidade não-clínica em dose única via oral em camundongos, administrando extra ESN das plantas estudadas, nas dose 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg do animal.
- Avaliar a toxicidade não-clínica em dose repetidas (30 dias) via oral em camundongos e coelhos, administrando o ESN das plantas: *M. urundeuva*, a *P. pyramidalis* e *A. colubrina*, na dose de 2000 mg/kg do animal.

Revisão de Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Estudo da Toxicidade

O uso e a produção de fitoterápicos são fundamentais para o bem estar, a saúde e o desenvolvimento econômico de um país e, ao mesmo tempo podem representar um risco para a saúde e ao meio ambiente, se não forem administrados de maneira responsável e sustentável. Os estudos toxicológicos são importantes para avaliar as drogas vegetais, pois estas não estão isentas dos efeitos tóxicos e indesejáveis.

A *Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD, desenvolveu um sistema de classificação de produtos químicos, com informações que orientam o reconhecimento, dos perigos para a saúde humana e o meio ambiente. Nesse sistema aos produtos químicos podem ser atribuídos, uma das cinco classificações das categorias de toxicidade (Fig. 1) com base na toxicidade aguda por via oral, dérmica ou por inalação de acordo com os critérios numéricos expressos como valores (aproximados) de DL₅₀ (oral, dérmica) ou CL₅₀ (inalação) (OECD, 2000; OECD, 2001a).

Figura 1 - Classificação das categorias de perigos para toxicidade aguda.

	Category 1	Category 2	Category 3	Category 4	Category 5
Oral (mg/kg)	5	50	300	2000	5000 See detailed criteria
Dermal (mg/kg)	50	200	1000	2000	
Gases (ppm) see: Note a	100	500	2500	5000	
Vapours (mg/l) see: Note a Note b Note c	0.5	2.0	10	20	
Dusts and Mists (mg/l) see: Note a Note d	0.05	0.5	1.0	5	

Fonte: OECD Series on testing and assessment, Number 33.

3.1.1. Segurança no uso das plantas medicinais

O estudo da toxicidade de um fitoterápico, deve assegurar a sua utilização, garantindo a avaliação botânica, estudos farmacêuticos, ensaios biológicos não-clínicos realizados em animais de laboratório e posteriormente ensaios clínicos em humanos (LAPA et al, 2003).

A avaliação da toxicidade tem como objetivo conhecer os efeitos nocivos decorrentes das interações das substâncias químicas com o organismo para o estabelecimento de formas seguras para sua utilização, sendo a identificação destes efeitos proveniente de estudos não-clínicos, clínicos e epidemiológicos (CORRÊA; ZAMBRONE, 2009).

A fim de padronizar a condução de estudos de toxicidade, a OECD, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e outras agências e instituições internacionais possuem protocolos (*guidelines*) padronizados que correspondem a metodologias de uso comum do governo, das indústrias e de laboratórios independentes, para identificar e caracterizar os perigos de substâncias químicas novas e já existentes. Essa harmonização garante uma ampla aceitabilidade dos dados gerados para fins regulatórios e evita duplicações ou repetições desnecessárias de estudos já efetuados (CORRÊA; BOFF, 2009, BRASIL, 2014, OECD, 2001a).

A ANVISA dispõe através da Resolução – RE nº90 de 16 de março de 2004 e da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26 de maio de 2014, sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, que conduz os testes de toxicidade aguda e toxicidade em doses repetidas (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2014).

3.1.2. Toxicidade oral aguda

Segundo Valadares (2006), o início da realização desses testes ocorreu na década de 20, para avaliar substâncias que seriam usadas em seres humanos, no entanto na década de 1970 passou a ser amplamente utilizada para a comparação e classificação da toxicidade de substâncias químicas e após esse período, gradativamente, tornou-se pré-requisito para as agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos.

Os efeitos adversos avaliados ocorrem em um curto período de tempo, após a administração única ou múltipla dentro de 24 horas, de elevadas doses da substância avaliada. É possível identificar os perigos relativos as diferentes vias de exposição, a diferença entre os

sexos, a morte dos animais, efeitos comportamentais e adversos, que possam ser atribuído a substância (CORRÊA; BOFF, 2009; BRASIL, 2014).

O teste de toxicidade oral aguda segundo a ANVISA e juntamente com o protocolo nº 420 da OECD, tem como princípio verificar o aparecimento de sinais evidentes de toxicidade a partir da exposição a doses fixas do produto estudado. São utilizadas três doses, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis. Uma espécie de mamífero, machos e fêmeas adultos, com seis animais por grupo, devendo se utilizar a mesma via de administração proposta para o uso do fitoterápico (BRASIL, 2014; OECD, 2001b).

3.1.3. Toxicidade oral em doses repetidas

O estudo de toxicidade oral com exposições contínuas as substâncias, são utilizados para mimetizar a forma mais comum de exposição humana, as exposições repetidas constituem a etapa inicial para identificação dos efeitos adversos potencial (CAMPOS; AMARAL, 2009).

A partir do teste é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação dos órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomopatológicas e histopatológicas. A utilização de duas espécies, uma roedora e outra não roedora, aumenta a probabilidade de avaliar as respostas da substância teste como maior similaridade com o homem (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2014).

O estudo de toxicidade em doses repetidas é conduzido de acordo com a ANVISA e metodologias do protocolo nº 407 da OECD, o teste é realizado com pelo menos duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não roedora, grupos de dez animais para roedores e de três animais para não roedores, utilizando machos e fêmeas. A duração do tratamento com a substância-teste depende do tempo de uso proposto, que será utilizado até 30 dias de uso por ano a duração é de quatro semanas (BRASIL, 2014; OECD, 2008).

Durante o período do teste são avaliados sinais clínicos gerais, alterações comportamentais, de peso corpóreo e consumo de água e ração, ao final devem ser avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos, análises macroscópicas, histopatológicas dos órgãos e tecidos selecionados e os pesos dos órgãos (OECD, 2001b; OECD, 2008; BRASIL, 2014).

3.2. Sobre as plantas

3.2.1. *Myracrodruon urundeuva*

A *Myracrodruon urundeuva* Allemão é uma planta de importância econômica e na medicina popular (Fig.2), conhecida como aroeira. Na medicina popular é utilizada em doenças do aparelho reprodutor feminino, doenças gastrointestinais, propriedades anti-inflamatórias, cicatrizante e com várias outras ações curativas atribuídas pela população, cientificamente é estudada seu potencial farmacológico (SILVA et al., 2015; LORENZI; MATOS, 2008; BANDEIRA, 2002). A sua madeira utilizada na marcenaria, a casca nos curtumes, devido a suas várias utilizações e alta qualidade, está havendo um consumo predatório colocando esta espécie em ameaçada de extinção (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 1992)

Figura 2 - A árvore da *M. urundeuva* com seu caule e folhas (A) e sua inflorescência com flores e frutos do tipo ovóide (B).



Fonte: www.arvores.greennation.com.br (A) e rosadacaatinga.blogspot (B)

3.2.2. Aspectos botânicos

É uma espécie arbórea que chega até 20 metros de altura, pertence à família Anacardiaceae, foi descrita por Manoel Freire Allemão em 1862 e tem por sinonímia *Astronium urundeuva* após requalificação feita por Engler em 1881 (LORENZI; MATOS, 2008).

M. urundeuva conhecida como aroeira do sertão, aroeira-do-cerrado e aroeira-preta, é nativa do Brasil e apresenta uma grande amplitude ecológica, que apresenta distribuição natural

limitada a América do Sul, ocorrendo naturalmente desde o Ceará até a Argentina e Paraguai, sendo encontrada em formações vegetais de caatinga, cerrado e floresta pluvial (LORENZI; MATOS, 2002; SANTIN; LEITÃO FILHO, 1991). Árvore frondosa possui folhas compostas, imparipinadas, com 5-7 pares de folíolos ovado-obtusos, pubescentes em ambas as faces da lâmina foliar, quando jovens. O porte da aroeira varia conforme a região de sua ocorrência (LORENZI, 1992; ANDRADE et al., 2000), podendo atingir 30 m de altura (RIZZINI, 1971).

Geralmente, a espécie floresce entre julho e setembro, e a maturação dos frutos ocorre de setembro a outubro (LORENZI, 1992; ANDRADE et al., 2000). Seus frutos são do tipo drupa globosa ou ovóide, com cálice persistente, considerado um fruto-semente (FIGUEIRÔA et al., 2004). A semente é única (0,2 a 0,4 cm de diâmetro), globosa, desprovida de endosperma, com epicarpo castanho-escuro, mesocarpo castanho, carnoso, resinífero, com odor característico e tegumento membranáceo (MEDEIROS, 1996; ALMEIDA et al., 1998).

Sua madeira é densa de grande resistência mecânica e imputrescível, com copa larga e piramidal formada por folhas alternadas. Por causa de suas qualidades medicinais e da madeira, é muito explorada, chegando a uma forma predatória e tornou-se escassa em todas as áreas de ocorrência. Está na lista oficial de espécies brasileiras ameaçadas de extinção, na categoria como “menos preocupante” pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (MAIA, 2004; GAINO et al., 2010; CNCFlora, 2017). Essa espécie é proibida de corte em floresta atlântica primária e autorizada sob aprovação de plano de manejo florestal em floresta secundária, cerradões e cerrados (IBAMA, 1991).

3.2.3. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos

Estudos etnofarmacológicos citam o emprego da *M. urundeuva* por via oral, na forma de infusos e decoctos, para o tratamento de afecções respiratórias, diarreias, hemoptise e metrorragias (BRAGA, 1976). A literatura cita seu uso como antirreumático e adstringente (CONCEIÇÃO, 1982). O decocto da casca do caule é usado no tratamento de feridas como tônico e adstringente (SANGUINETTI, 1989; COIMBRA, 1994).

Muito conhecida popularmente a *M. urundeuva*, apresenta indicações terapêuticas abrangentes como, ação anti-inflamatórias e expectorante, pode ainda ser usada para o tratamento de gonorreia, cervicite vaginite, úlceras bucais e gástricas, gastrites, doenças gengivais e respiratórias (SARAIVA et al., 2015; LORENZI; MATOS, 2008)

A utilização da casca desta espécie é atribuída as indicações anti-inflamatório, cicatrizante, para curar a gastrite, dor de garganta, bronquite e para o tratamento das inflamações ovarianas e do útero (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2015). As raízes são usadas no tratamento de reumatismo e as folhas são indicadas para o tratamento de úlceras (ALMEIDA *et al.*, 1998). Havendo relatos do consumo da *M. urundeuva* em formas de infusos, xaropes e maceração, proveniente das folhas, cascas e raízes são utilizadas no tratamento de doenças respiratórias, inflamações e doenças infecciosas e parasitárias (FRANCO; BARROS, 2006).

3.2.4. Aspectos fitoquímicos

Estudos fitoquímicos relatam o isolamento, a partir de extratos das cascas, de polifenóis (proantocianidinas), ligninas (NAPOLEÃO et al., 2011; MORAIS et al., 1999), as chalconas urundeuvinas I, II e III, responsáveis pelas atividades analgésica e antiinflamatória (BOTELHO et al., 2008; VIANA et al., 2003) e a lectina que apresentou atividade inseticida (SÁ et al., 2008; NAPOLEÃO et al., 2011) e larvicida em *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2009). Extratos das folhas apresentaram majoritariamente galotaninos (SILVA et al., 2011).

Da casca interna da *M. urundeuva* isolou-se as chalconas diméricas: urundeuvina A, B, C e matosina que por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) determinou suas fórmulas moleculares (BANDEIRA, 2003). Outros estudos químicos confirmaram a predominância de chalconas e de taninos na casca da aroeira (VIANA et al., 1997).

Souza (2012) identificou as substâncias ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido protocatecuico, ácido clorogênico e ácido elágico. Do fracionamento fitoquímico foram isolados dois galotaninos, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose 7, e uma mistura de ácido 3-galoilgálico e 4-galoilgálico 9, e quercetina-3-Orhamnopiranosídeo, um flavonoide comumente encontrado em folhas de espécies vegetais. Foram isolados ainda compostos mais apolares como cicloeucalenol e cicloeucalenona a partir do extrato hexânico da entrecasca, que apresentam atividade antioxidante (DANTAS, 2003).

Estudos fitoquímicos do caule e da folha de indivíduos jovens e adultos de *Myracrodruon urundeuva* constatam que as partes analisadas possuem taninos, flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (ARAÚJO et al., 2005; MONTEIRO, 2005; SILVA, 2008). Nas folhas de

M. urundeuva foi identificada a presença dos seguintes óleos essenciais em ordem crescente de concentração: β -cariofileno, car-3-eno, α -terpinoleno, β -elemeno e eugenol (BANDEIRA, 2002; SCHENKE et al., 2007).

3.2.5. Aspectos Toxicológicos

O estudo toxicológico agudo não clínico do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. urundeuva* demonstrou que em camundongos por via intraperitoneal tem alta toxicidade (8 mg/kg) (ALMEIDA et al., 2010).

Viana et al (1995) demonstrou que extratos hidroalcoólicos e aquoso da entrecasca de *M. urundeuva* tem baixa toxicidade quando administrados por via oral e ausência de efeitos teratogênicos nas doses estudadas. Outro estudo demonstrou que extratos liofilizados da entrecasca de *M. urundeuva* administrado por via oral durante 83 dias a ratos machos na dose (13,8 mg/kg) causou diminuição do hematócrito e induziram malformações ósseas nos fetos quando administradas a ratas prenhas (CARLINI et al., 2013).

O extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* foi tóxico nas dose de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) foram capazes de causar a morte de mais de 70% de larvas de *Artemia salina* durante as 24 horas de exposição (CAVALCANTE et al., 2016).

3.2.6. Aspectos Farmacológicos

Estudos farmacológicos de extratos hidroalcoólico e aquoso da entrecasca da *M. urundeuva* têm mostrado efeitos no tratamento de patologias ginecológicas, indicada nos caso de cervicite e ectopia (BANDEIRA, 2002), como antiinflamatório, cicatrizante, antiulcerogênico, antihistamínico, antibradicinina e analgésico, aliados à ausência de efeitos tóxicos e teratogênicos (VIANA et al, 1997; VIANA et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2004; CAVALCANTE, 2005), antiúlcera, antialérgica (CARLINI et al., 2010, ALBUQUERQUE et al., 2011) e antidiarreica (CHAVES et al., 1998).

M. urundeuva é um potencial composto inibidor da tirosinase. Comprovado pela capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH \cdot) utilizando a cascas do caule de *M. urundeuva* (1,0 mg/ml), foi capaz de influenciar na atividade enzimática da tirosinase. Os extratos metanólicos das folhas e cascas

do caule foram significativos, apresentando percentuais de inibição da tirosinase de 66% para o extrato metanólico das folhas e 42% para o extrato metanólico das cascas do caule, respectivamente (VIEIRA et al., 2015).

Também foi testada a capacidade dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de inibir a formação de biofilme bacteriano, apontando o possível papel dos taninos nessa atividade (TRENTIN et al., 2013). Da casca de *M. urundeuva* também foi isolada a proteína lectina com atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2009).

Em um estudo *in vitro* foi avaliado o extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva* e se observou que uma atividade bactericida e bacteriostática sobre *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* e *L. casei*, como também ação antifúngica sobre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (ALVES, 2009).

Efeitos neuroprotetores *M. urundeuva*, possivelmente relacionada às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, destacando seu potencial uso na prevenção ou tratamento de condições neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Estudados em um modelo da doença de Parkinson, os animais tratados com extrato padronizado (5, 10, 20 ou 40 mg / kg, p.o.) por 2 semanas. Que reverteu alterações comportamentais observadas no grupo. O número de neurônios viáveis e as células IM imunopositivas foram aumentadas pelo extrato padronizado GFAP e OX-42 (CALOU et al., 2014).

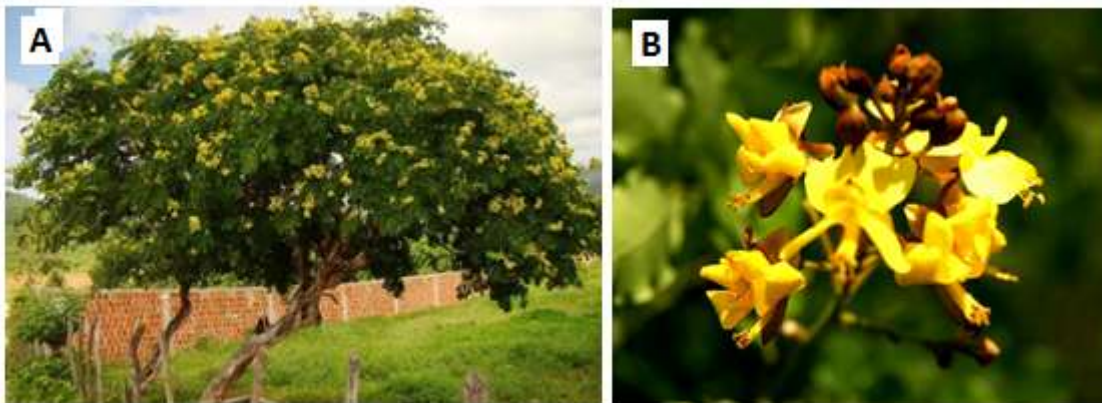
No tratamento de doenças ginecológicas, o uso do creme vaginal de aroeira 15% contra as cervicites, vaginites e ectopias em 18 mulheres e os resultados demonstraram efetividade no tratamento das doenças estudadas sem reações adversas durante o tratamento (CAMPO, 2008).

Viana et al., (1995) avaliou o elixir da *M. urundeuva* em pacientes de ambos os sexos (12 no total) diagnosticados com úlcera duodenal ou gastrite e lesão endoscópica na dose de 1 a 2 g extrato/dia por 30 dias e os resultados mostraram que em 75% ocorreu cicatrização completa sem efeitos colaterais.

3.2.7. *Poincianella pyramidalis*

A *Poincianella pyramidalis* é bastante utilizada na medicina popular (Fig.3) como anti-inflamatório, digestivo e analgésico, sendo conhecida como catingueira. É uma espécie endêmica na vegetação da Caatinga e bastante explorada devido a utilização na marcenaria, potencial forrageiro e na medicina popular (QUEIROZ, 2009; MAIA, 2004).

Figura 3 – Árvore da *P. pyramidalis* com caule e folhas (A) e a beleza da floração da *P. pyramidalis* com suas flores e frutos (B).



Fonte: www.ciplamasces.wordpress.com (A) e <http://www.cnip.org.br> (B)

3.2.8. Aspectos Botânicos

A espécie *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P.Queiroz, é uma Leguminosae, pertencente a sub família das Fabaceae, gênero *Poincianella* (MAIA, 2012), popularmente é conhecida como “catingueira” ou “pau-de-rato”. Esta espécie era conhecida como *Caesalpinia Pyramidalis* (Tul.) e como resultado de uma reformulação taxonômica pertence ao gênero *Poincianella* (QUEIROZ, 2009).

P. pyramidalis é arbustiva e atinge até 12 m de altura, comum na Caatinga com características morfofisiológicas promotoras de sua tolerância ao ambiente semiárido, dentre eles o mecanismo de caducifólia, perda das folhas na época seca (BAHIA et al., 2005; SILVA et al., 2009). Com casca acinzentada a amarronzada, apresenta crescimento rápido e boa capacidade de rebrota, sua altura varia de 1 a 6 metros e a copa pode ser densa ou aberta, os ramos jovens podem ou não apresentar tricomas, sendo o eixo foliar com tricomas glandulares pedunculados densos ou esparsos; tricomas plumosos presentes ou ausentes nos eixos da inflorescência (MAIA, 2004; QUEIROZ, 2009).

Essa espécie está amplamente distribuída na caatinga com elevados valores de frequência e densidade apontados por diversos estudos florísticos e fitossociológicos (AMORIM et al., 2009; SANTOS; SANTOS, 2012). Bastante explorada devido ao seu potencial madeireiro, para estacas, mourões, construção de casas de taipa, como lenha e carvão e, devido sua rusticidade, e indicada para reflorestamento e aos potenciais forrageiro e farmacológico (MAIA, 2004; QUEIROZ, 2009).

3.2.9. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos

Estudos etnofarmacológicos citam o emprego da casca e a flor por via oral, na forma de infusos e lambedor para gripe, inflamação no corpo e como cicatrizante (SILVA et al., 2015).

Na medicina popular, as folhas de *P. pyramidalis* são empregadas, pela população, no tratamento de febre, de doenças estomacais, gases e má digestão e como diurética (ALMEIDA et al, 2005; QUEIROZ, 2009) e a maceração da casca interna em vinho ou cachaça como afrodisíaco (AGRA et al., 2007), no tratamento de infecções catarrais e como agente anti-inflamatório (MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005).

Suas flores, folhas e cascas são utilizadas principalmente no tratamento de doenças infecciosas e como um anti-inflamatório e analgésico (BRAGA, 1960; MAIA, 2004; SANTOS et al., 2008), diurético, antipirético (BAHIA et al., 2005), contra infecções respiratórias, bronquite, asma, expectorante (ALBUQUERQUE et al., 2007) e para o tratamento de verminoses de animais domésticos (MAIA, 2004).

A sua infusão em água é utilizada tradicionalmente como antitérmica, anti-inflamatória, expectorante, depurativa e no tratamento de infecções intestinais e bronquites (MEDEIROS et al. 2012).

3.2.10. Aspectos fitoquímicos

Em estudos fitoquímicos realizados com a *P. pyramidalis*, foram encontrados flavonóides, taninos, saponinas (BAHIA et al., 2010; OLIVEIRA, 2010). Possivelmente, os metabólitos secundários são responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias (derivados fenólicos, taninos, flavonoides e saponinas) e antioxidantes (taninos, terpenos e derivados fenólicos) da planta (OLIVEIRA, FIGUEIREDO, 2007). A presença de diterpenos,

flavonóides e outros compostos fenólicos é característica desse gênero e família (CHAVES et al., 2013)

Estudos químicos realizados com *P. pyramidalis* relataram que nas folhas e caules são encontrados triterpenos, ácido gálico, esteróides, fenilpropanóides, lignana, taninos e, principalmente flavonóides e biflavonóides (MENDES et al, 2000; BAHIA et al, 2005; BAHIA et al. 2006, BAHIA et al., 2010; OLIVEIRA, 2010).

Sua flor é largamente utilizada, tendo sido confirmada as suas propriedades curativas, devido à presença de taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis, flavononas e alcaloides (LORENZI; MATOS, 2008).

Monteiro (2005) quantificou a maior abundância de metabólitos no extrato de metanol da casca de catingueira, onde obteve 29,60 e 24,72 mg para fenol total e taninos, respectivamente. O extrato de clorofórmio das folhas fornece biflavonoides e compostos fenólicos chamados caesalflavona, podocarpusflavona A, agathisflavona, apigenina, kaempferol, sitosterol e lupeol. O ácido fenilpropanóide glicosídico, ácido 4-Ob-glucopiranosiloxi-7-Z-hidroxicinâmico e ácido 4-Ob-glucopiranosiloxi Z-8-hidroxicinâmico foram também isolados das folhas. O extrato de clorofórmio forneceu a haste 4, 4'-dihidroxi-2'-metoxi-chalcona, (-) - galato de metilo e siringarossinol (MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005; BORGES-DOS -SANTOS et al., 2012).

Com extrato hexânico da raiz foi realizado, o isolamento de lupeol, acacetina, fenilpropanóide, e uma mistura de sitosterol e estigmasterol. A partir da fase metanólica isolou-se um biflavonoide, e também 7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5a-2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (OLIVEIRA, 2010).

3.2.11. Aspectos Toxicológicos

A administração das folhas frescas de *P. pyramidalis* como única fonte de forragem a cabras prenhas durante o período reprodutivo e gestacional, causou aborto e malformação ao final do experimento (REIS et al., 2016).

O extrato metanólico da casca de *P. pyramidalis* apresentou importante toxicidade para *A. salina* nas dose mais tóxicas foram as de 250, 500 e 1000 ppm, por 24 horas (PESSOA et al., 2013).

Um estudo avaliou os efeitos embriotóxicos e fetotóxicos de folhas de *P. pyramidalis* em ratas prenhas que receberam ração contendo 5% e 10% das folhas, durante todo o período gestacional, resultando em aborto, malformações e redução do desenvolvimento dos fetos (CAMARA et al., 2017).

Melo et al. (2013) verificaram que a flor e o pólen desta planta são tóxicos a variedades da espécie *Apis melífera*, causando a morte destes organismos.

4.12. Aspectos Farmacológicos

Estudos de avaliação terapêutica desta entrecasca demonstraram atividade anti-inflamatória (SANTOS et al. 2011), antinociceptiva (SANTANA et al. 2012) e eficaz no tratamento de úlceras gástricas (RIBEIRO et al. 2013)

Alviano et al. (2008) observou atividade antibacteriana contra patógenos orais na casca e folhas de *P. pyramidalis*, os valores de CIM observados neste estudo foram de 1000 µg/ml para *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, e 8000 µg/ml para *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, microorganismos relacionados à cárie dentária.

A atividade antimicrobiana avaliada nos extratos de metanol das folhas, flores, cascas, raízes, frutos e sementes e no extrato de acetato de etila da casca, raízes e frutos (CIM ≤ 1000 µg/ml), demonstraram a eficácia antimicrobiana destes extratos contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (SARAIVA et al., 2012). Os valores de CIM do extrato de metanol das folhas contra *P. aeruginosa* (CIM = 125 µg/ml) e o extrato de acetato de etila da raiz contra *E. coli* e *S. aureus* foram 500 e 250 µg/ml, respectivamente; E o extrato de metanol das folhas contra *E. coli* foi de 250 µg/ml (SARAIVA et al., 2012).

Cruz e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antifúngica para o tratamento de infecções fúngicas. *P. pyramidalis* apresentou atividade significativa contra as cepas padrão e isolados clínicos de *Trichophyton rubrum* (CIM = 6,25 µg/ml), *Candida guilliermondii* (CIM = 25 µg/ml), *Cândida albicans* (CIM = 12,5 µg/ml), *Cryptococcus neoformans* (CIM = 12,5 µg/ml) e *Fonsecaea pedrosoi* (CIM = 200 µg/ml).

Uma pesquisa com isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* resistentes ao antifúngico, utilizou o método de difusão em disco e o extrato aquoso de folhas de *P.*

pyramidalis em uma dose de 4, 40 e 100 mg/ml. Os extratos mostraram boa atividade contra 5 das 10 cepas testadas, com zonas de inibição variando entre 7 e 14 mm (BARBOSA et al., 2015).

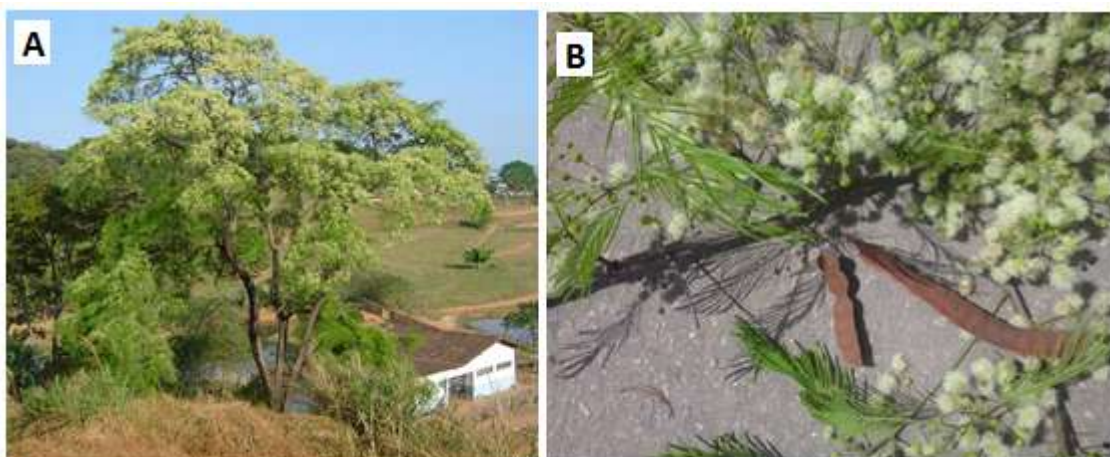
A atividade antioxidante foi avaliada no extrato etanólico da casca de *P. pyramidalis*, pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O extrato (dose de 100 e 1000 µg/ml) mostrou atividade antioxidante reduzindo significativamente ($P < 0,001$) a peroxidação lipídica em relação ao controle (77,66 e 82,41%, respectivamente) (SANTOS, 2010).

3.2.13. *Anadenanthera colubrina*

Popularmente, *A. colubrina* é conhecida como angico, e encontrada em quase todo território brasileiro (Fig. 4), apresenta potencial terapêutico de fácil acesso, reconhecida pela medicina popular e muito utilizada como antisséptico e cicatrizante (LORENZI; MATOS, 2008; AGRA et al., 2007; MONTEIRO et al., 2006).

A casca do caule é unanime como a mais utilizada na preparação de cocções e tinturas, causando um agravamento devido ao fornecimento contínuo de matéria prima (casca) que não garante a sustentabilidade das árvores e de novas colheitas, podendo destruir a árvore que são coletada sucessivamente. O controle do manejo sustentável dessa plantas medicinal é a melhor forma de garantir a preservação dessa espécie (MAIA, 2004).

Figura 4 – Árvore *A. colubrina* frondosa demonstrando seu grande porte, caule e folhas (A), flor e frutos em formato de vagens achatadas (B) da *A. colubrina*.



Fonte: www.arvores.brasil.nom.br

3.2.14. Aspectos Botânicos

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan, o gênero *Anadenanthera* pertence à seção Mimosoideae da família Fabaceae, ordem Fabales. O gênero *Anadenanthera*, inicialmente proposto por J. P. M. Brenan (1955) e Reis Altschul (1964, 1967), consistia de quatro espécies. O pesquisador Siri Von Reis Altschul (1964, 1967), em sua revisão taxonômica do gênero considerou este ser composto de apenas duas espécies, *A. Peregrina* (L.) Speg. E a *A. colubrina* (Vell.) Brenan, cada uma delas contendo duas variedades (ALTSCHUL, 1964; ALTSCHUL, 1967; BRENAN, 1955).

Esta espécie é conhecida popularmente por angico, angico-branco ou cambuí-angico, nativa do Nordeste, mas encontrada do Maranhão até o Paraná (LORENZI; MATOS, 2008). É uma árvore de 5-15 metros de altura, de copa aberta e irregular. Com tronco quase cilíndrico de 30–50 cm de diâmetro, revestido por casca um pouco rugosa e provida de espinhos esparsos. Folhas compostas bipinadas, com 15-20 jugas; folíolos opostos, de 4-6mm de comprimento. Flores de cor branca, dispostas em inflorescência do tipo panículas de espigas globosas. Os frutos são legumes (vagens) achatados, rígidos, glabros, brilhantes, deiscentes, de cor marrom, de 10–20 cm de comprimento, contendo 5-10 sementes lisas e escuras. Multiplica-se apenas por sementes (LIMA, 1985; AGRA, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007).

Uma planta ornamental e de muitas utilidades sendo sua madeira de ótima qualidade usada na construção civil e naval, para uso na marcenaria e carpintaria, na confecção de portas, janelas, móveis, postes, currais e carroças. Indicada para o reflorestamento de áreas degradadas e reposição de mata ciliar em áreas não inundáveis. Seu pólen e néctar serve para alimentação de abelhas (MAIA, 2004). Encontrada em diferentes ecossistemas brasileiros, existe uma preocupação por partes dos conservacionistas em relação a essa espécie por causa principalmente exploração excessiva, já que ela é utilizada para diversos fins por populações locais de maneira não sustentável (ALMEIDA et al. 2006; LORENZI, 2002).

3.2.15. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos

A casca da *A. colubrina* é amplamente utilizada na medicina popular nordestina como anti-inflamatório, cicatrizante, para a gastrite, dor de garganta e para o tratamento das

inflamações ovarianas e do útero (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008).

A decocção da casca ralada é utilizada para complicações do fígado, gonorreia, infecção dos ovários e como depurativo do sangue. O xarope da casca e da resina é administrado por via oral no tratamento da bronquite e angina (PAULA,1981; MONTEIRO et al., 2006).

A maceração da resina do caule da *A. colubrina* é utilizada no tratamento da bronquite (MONTEIRO et al., 2006; BRANDÃO et al., 2008). A solução hidroalcoólica para o tratamento da anemia, tosse, processo inflamatório, asma, gripe (ALBUQUERQUE et al., 2007). A inalação das sementes, previamente seca ao sol, assadas e moídas, é utilizada para dores de cabeça, resfriado e secreções pulmonares (MONTEIRO et al., 2006).

Algumas preparações de uso tópico são elaboradas através da decocção, que são indicadas na higienização de áreas de lesão tegumentar, ou são utilizadas como loção após o banho sem restrição à área lesada (MARCIA, 2005).

3.2.16. Aspectos fitoquímicos

Segundo Lorenzi e Matos (2008), no estudo fotoquímico da *A. colubrina* (Vell.) Brenan., foram isolados da casca flavonoides e alguns compostos fenólicos, além de ser rica em taninos, justificando suas atividades terapêuticas, tendo sido confirmado nos testes realizados. Identificados em estudo a presença dos seguintes metabólitos, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, flavononas e alcaloides (LORENZI; MATOS, 2008). Em análise fitoquímica do extrato aquoso e hidroalcoólico da casca do caule da *A. colubrina* apresentou taninos e flavonoides como composto majoritários (WEBER, 2010).

As vagens contêm sementes com 3% de taninos e cerne 1,8% deste metabólito secundário, as sementes possuem alcalóides psicoativos (LORENZI, 1998). Estudos demonstraram que a quantidade de taninos na casca do caule poderia variar de 3,21 a 11,07% em relação ao peso total da amostra vegetal, já que a concentração destes compostos depende da interação planta-ambiente, em resposta a diversos fatores biológicos e químicos, como quantidade de nitrogênio e oxigênio disponível no solo (MONTEIRO, 2005; TORRES; REPKE, 2009). Um estudo ainda demonstrou não haver diferenças significativas entre os teores de taninos e flavonoides da casca da árvore e de suas folhas (FREITAS et al.,2004).

Gutierrez-Lugo et al. (2004), estudando os inibidores da lipoxigenase, verificaram que entre os doze compostos isolados das partes aéreas de *A. colubrina*, os mais ativos eram: Anadantoflavona, lupenona, lupeol, α -amirina e apigenina.

Extratos hidroalcoólico e acetato de etila da espécie *A. colubrina* apresentaram o alcalóide N,N-dimetiltriptamina, esteroides (palmitato de β -sitosterol, sitosterol, glicosídeos), Flavonoides, triterpeno (lupeol) e compostos fenólicos (dalbergina, 3,4,5- dimetoxidalbergina) (LORENZI; MATOS, 2002).

Segundo Agra (1996), o angico é quimicamente constituído por alcalóides indólico (óxido de N, N-dimetiltriptamina), esteróides (palmitato de δ -sitosterol e δ -sitosterol), flavonóides (3,3',4',7,8-pentahidroflavona), triterpenóides (lupenona e lupeol), derivados fenólicos (3,4,5-dimethoxidalbergina, dalbergina e kuhlmannia). Contêm nas entrecascas aproximadamente 32% de tanino (PIO CORRÊA, 1978), também conhecidos por proantocianidinas, capazes de facilitar a cicatrização de feridas.

3.2.17. Aspectos Toxicológicos

O extrato da cascas de *A. colubrina* apresentou toxicidade contra *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada (LUNA et al., 2004). De acordo com McLaughlin (1991), este ensaio é considerado uma ferramenta útil para a avaliação preliminar de toxicidade e tem mostrado boa correlação com atividade citotóxica frente a tumores sólidos humanos.

Foi considerada como tóxica, a fração diclorometano do extrato das folhas de *A. colubrina* que obteve uma Concentração Letal - CL₅₀ de 23,7 μ g/mL, para o modelo experimental com *Artemia salina* (SILVA et al., 2014).

Tokarnia *et al.* (1999) estudou a intoxicação cianídrica em bovinos e testou as folhas de *A. colubrina* e constatou que são mais tóxicas quando em brotos do que maduras. Sua toxicidade é perdida lentamente quando dessecadas. Os resultados positivos do teste do papel picro-sódico realizados foram mais lentos para brotos de *A. colubrina* e mais retardadas nas folhas maduras sugerindo que o teste tem valor apenas relativo na avaliação de glicosídeos cianogênicos em material vegetal.

Experimentos realizados com amostras de *A. colubrina*, coletadas no município de Patos, causaram intoxicação por ácido cianídrico (HCN) na dose de 10mg por kg de peso do animal (MEDEIROS et al., 2000). Amorim et al. (2004) reproduziram a intoxicação cianídrica em amostras de *A. colubrina* com doses de 5 a 10 g/kg em bovinos na Paraíba. Os sinais clínicos da intoxicação por HCN, se iniciam com incapacidade de deglutição associada à dispnéia, seguidos de uma insuficiência respiratória aguda em consequência da anóxia, com sinais nervosos (incoordenação, tremores musculares, nistágmo, opistótono). Esses sinais devem-se à

interação do HCN no processo enzimático final (citocromooxidase) da respiração aeróbia mitocondrial, envolvendo os mecanismos de transporte de elétrons (SMITH, 1994).

A síntese observada de glicosídeos cianogênicos pode estar relacionada ao fato de que esta planta abriga simbioses bacterianas e fúngicas. Esses organismos fixam o nitrogênio atmosférico, que pode ser utilizado posteriormente para fins defensivos (MENDONÇA, 1996; GROSS et al., 2002; PATREZE, CORDEIRO, 2004). Uma vez que a toxicidade nesta planta está mais relacionada com a presença de glicosídeos cianogênicos baseados em nitrogênio (TOKARNIA et al., 1999).

3.2.18. Aspectos Farmacológicos

Em ensaios microbiológicos realizados por Araújo e colaboradores (2015), foi possível observar que tanto o extrato hidroalcoólico quanto o aquoso foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* da bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo que ambos extratos apresentaram como CIM 25 mg/mL.

Da *A. colubrina* é retirado um exsudado gomoso, conhecido como “goma arábica”, empregado na indústria (PIO CORRÊA, 1978). Este exsudado gomoso produzido pela *A. colubrina* (Vell) Brenan é formado por um complexo heteropolissacarídeo, ácido constituído principalmente por moléculas de arabinose e galactose, denominado de ARAGAL por Delgobo et al. (1998). Na dose de 100 mg/Kg, o ARAGAL mostrou ação antitumoral contra S-180 em ascites ou tumores sólidos com inibição tumoral de 63 e 38%, respectivamente (MORETÃO et al., 2004)

O estudo realizado por Weber (2010) observou que de três frações produzidas com a casca do caule de *A. colubrina* (hidroalcoólico, ciclohexânica e acetato de etila), a fração hidroalcoólica foi a que apresentou maior atividade antimicrobiana, sendo que das bactérias estudadas, as linhagens de *Staphylococcus aureus* multi droga resistente foram as mais sensíveis às frações do caule de *A. colubrina*.

A fração ciclo-hexânica da casca do caule de *A. colubrina* demonstra pelo IC₅₀ - (Concentração que inibi 50% do crescimento celular em relação ao controle) que inibi o crescimento de células tumorais da linhagem Huma Epidermoide Cancer Cells - HEp -2 (IC₅₀=8,45µg/ml), quando comparada a droga controle (Etoposídeo-Epósido) (IC₅₀=4,8µ g/ml) mesmo existindo diferenças entre elas, por se tratar de uma fração onde o princípio ativo está

diluído e uma substância pura, a proximidade dos valores e IC_{50} são animadores (WEBER, 2010).

Um produto fitoterápico composto de *A. colubrina* tem uso tradicional na região Nordeste do Brasil é o Elixir Sanativo® (SAN). Um extrato fluido que é indicado no tratamento de feridas, queimaduras, inflamações de garganta, de tecidos epiteliais lesionados e com propriedades adstringentes. Sua fórmula é constituída por 20% de *A. colubrina* (angico) e associações (LIMA et al., 2006).

Desmarchelier e colaboradores (1999) relataram que o extrato das cascas do caule de *A. colubrina* suprimiu a geração de radicais peroxila e a degradação do DNA mediado pelo radical hidroxila, como também inibiu a peroxidação lipídica em ratos. Desta forma, os resultados obtidos sugeriram que tal atividade antioxidante pode desempenhar um papel importante na atividade anti-inflamatória descrita para esta planta.

3.2.19. Legislação no Brasil sobre Medicamentos Fitoterápicos

No Brasil, é usada uma legislação considerada mundialmente avançada ao regular o registro de fitoterápicos e as boas práticas em geral (cultivo, manipulação, fabricação, comercialização etc.) a partir de plantas cujo tripé de eficácia – segurança – qualidade pode ser delimitado, entre outros aspectos da cadeia produtiva (BRASIL, 2004).

A fitoterapia científica ocidental é o estudo integrado do emprego clínico de plantas medicinais e fitoterápicos para finalidades terapêuticas, diagnósticas ou profiláticas, com base em dados e evidências científicas, mesmo que se partindo inicialmente de conhecimentos populares e tradicionais (BRASIL, 2006b; SCHULZ, HANSEL; TYLER, 2002).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem elaborado normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria nº 6, de janeiro de 1995, passando pelas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 2000; nº 48, de 16 de março de 2004, nº10, de 9 de março de 2010, e nº 14, de 31 de março de 2010, as quais tinham por objetivo a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 1995; BRASIL, 2000; BRASIL, 2004b; BRASIL, 2010a).

Em 2006, o país aprovou a Portaria 971, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e o Decreto n.º 5.813, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a).

A PNPIC contempla diretrizes para plantas medicinais e fitoterapia no SUS, cuja proposta foi construída seguindo o modelo da fitoterapia ocidental, entendida como “terapêutica caracterizada pela utilização racional de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal”. Nesse sentido, visa ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS com garantia de acesso aos produtos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006a).

A PNPMF estabelece diretrizes e linhas prioritárias, à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, a ampliação das opções terapêuticas, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006a).

Dentre os requisitos e parâmetros exigidos, está a necessidade do controle de qualidade, com métodos analíticos que incluam resultados de prospecção (*screening*) fitoquímica ou perfis cromatográficos, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade não clínica (BRASIL, 2010a).

A ANVISA fornece as referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos na Resolução (RE) nº 90 de 2004 e a RDC nº 26 de maio de 2014, dispõe sobre o Guia para a realização de estudos de toxicidade não clínica de fitoterápicos que tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia não clínica para registro e renovação de registro de fitoterápicos destacando que os estudos de toxicidade devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2014).

A comunidade científica tem interesse em aplicar os princípios para utilizar animais na experimentação em toxicidade, descrito por Russel e Burch, (1959), que lançaram a ideia dos 3Rs: *Reduction, Replacement e Refinement* (Redução, Substituição e Refinamento); Redução: usar sempre o menor número de animais possível, Substituição: utilizar modelos alternativos em vez de modelos animais, Refinamento: o aperfeiçoamento de toda estrutura experimental, técnicas empregadas e processos envolvidos (RUSSEL; BURCH, 1959).

Sendo o art. 22 do Decreto nº 8.077/2013, as plantas medicinais sob a forma de droga vegetal, doravante denominadas chás medicinais, serão dispensadas de registro, devendo ser notificadas de acordo com o descrito na Resolução nº 26 de 13/2014 (ANVISA) na categoria de produto tradicional fitoterápico, e caracterizando ainda a droga vegetal por ser uma planta

medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014).

A qualidade de um produto terapêutico vegetal é determinada pela sua caracterização e se estabelece desde a obtenção da planta medicinal, devidamente cultivada, colhida e seca, até o processamento, por meio de técnicas de extração, concentração e a secagem, além da caracterização físico-química do insumo farmacêutico vegetal obtido, como tintura, extrato fluido e seco, ou óleo essencial (FARIAS, 2007; CARVALHO et al., 2007).

No controle de qualidade dos fitoterápicos, derivados da droga vegetal, excipientes e o produto final tecnologicamente acabado, deve-se utilizar metodologia descrita na farmacopeia ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA descritos na RE nº 899 de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003; NETTO et al., 2013).

Além disso, pesquisas com o intuito de padronizar, determinar a eficácia e a segurança destas drogas estarão contribuindo para o aumento da lista de drogas vegetais reconhecidas pela ANVISA para uso popular (BRASIL, 2010a).

3.2.20. Parâmetros Tecnológicos de Obtenção de Drogas Vegetais

3.2.21. Processo de secagem para a obtenção de extratos secos nebulizados

As monografias da Farmacopeia descrevem, que os extratos secos são preparações sólidas, pulverulentas ou granuladas obtidas por evaporação de extratos de plantas medicinais adicionadas ou não de adjuvantes, apresentando o teor de substâncias ativas indicado nas respectivas monografias (BRASIL, 2010b). Eles podem ser preparados a partir de soluções extrativas vegetais submetidas aos processos de secagem como a liofilização, a evaporação rotativa e secagem por *spray-dryer* (RUNHA et al, 2001; SILVA et al, 2012).

Os extratos secos detém vantagens sobre os líquidos, estando relacionadas à maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, maior concentração de compostos ativos, facilidade de padronização, distribuição granulométrica dos constituintes da preparação e por isso na indústria de fitoterápicos tem sido aplicado na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas, como produto intermediário (CORDEIRO, 2000).

No Brasil estão registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas cujas matérias primas são extratos secos (CARVALHO et al., 2008).

Os pós obtidos por *spray-dryer* apresentam características relacionadas à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade, forma e fluidez que garantem padrões elevados de qualidade do produto final e exigidos na indústria (REMILI et al., 1994).

É um processo de secagem rápido que produz partículas com tamanho definido, com custos de produção relativamente baixos, versatilidade da técnica, capacidade de gerar um produto com especificações definidas e de qualidade (ISONO et al., 1995; SILVA JÚNIOR, 2006; GEORGETTI et al., 2008).

3.2.22. Granulometria

A análise granulométrica consiste na determinação das dimensões das partículas que constituem os infusos (AULTON, 2005). O conhecimento do tamanho de partícula é um pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento, para homogeneização das partículas, levando a um processo de extração mais eficiente (BRADÃO, 2007).

O tamanho das partículas influenciam, na velocidade de dissolução e biodisponibilidade das formulações farmacêuticas (AULTON, 2005). O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado.

A granulometria que foi utilizada, condiz com intervalos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010), a classificação dos tamanhos de partículas foram: pó moderadamente grosso 710 – 355 μm , pó semifino 355 - 180 μm e pó finíssimo 150 - 75 μm (BRASIL, 2010b).

Ao utilizar a infusão “chás medicinais”, para realizar os ensaios toxicológicos dos pós de diferentes tamanhos de partículas, das drogas vegetais estudadas, priorizamos estudar uma das formas mais utilizadas pela medicina popular, para garantir a segurança e o uso sustentável de plantas medicinais (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2014).

A RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, determina como infusão a preparação, destinada a ser feita pelo consumidor, que consiste em verter água potável fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, tampar ou abafar o recipiente por um período de tempo determinado (BRASIL, 2014).

3.2.23. Flavonoide quercetina

Estudos relatam que os flavonóides e taninos são capazes de inibir as isoformas das enzimas ciclo-oxigenase (COX-2), a óxido nítrico sintase (iNOS), e outros mediadores do processo inflamatório (SOOBRAATTEE *et al*, 2005).

A análise qualitativa e quantitativa de flavonóides comuns em extratos polares de plantas como, por exemplo, rutina, isoquercitrina, quercetina, catequinas e canferol podem ser realizadas através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se de padrões destas substâncias (RODRIGUES, 2012).

A quercetina, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona, (Fig. 5) é um dos flavonóides identificados em *M. urundeuva* (JANDÚ et al, 2013; MACHADO, 2013). A quercetina é um flavonóide dietético importante, encontrado em uma série de alimentos à base de plantas, incluindo cebolas, maçãs, alcaparras, brócolis, salsa e uvas vermelhas (GUO, 2013; NISHIMURO, 2015). A quercetina tem efeitos benéficos na saúde humana por suas amplas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória e antioxidante (MUTHUKALA et al., 2015; KOBORI, 2016; HALEAGRAHARA, 2017; NILE, 2017).

Um estudo mostrou que a quercetina atua normalizando os níveis de glicose plasmática, aumentando o conteúdo de glicogênio hepático e induzindo as enzimas glicocinase e hexocinase prevenção do desenvolvimento da fibrose hepática (LEE et al., 2003). Ensaios *in vivo* e *in vitro* da substância isolada ou contida em extratos vegetais tem comprovado ação antimicrobiana (GATTO et al., 2002; NITIEMA et al., 2012), antistamínica (KAHRAMAN et al, 2003) e antiangiogênico (TAN et al, 2003).

Rodrigues et al., (2012) apresentaram um estudo que indica uma ação citoprotetora e antioxidante, que confere um efeito gastroprotetor contra injúria gástrica induzida por etanol e indometacina em camundongos.

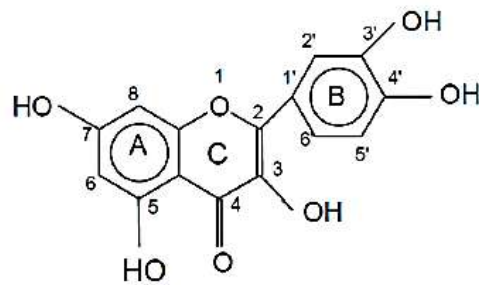
A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos) (AFANAS'EV, 1989; BEHLING et al., 2004).

A quercetina por regular o ciclo celular, interagir com os locais de ligação do estrogênio tipo II, diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais pode tornar-se um potente composto antitumoral. Adicionalmente, a quercetina inibe a atividade da tirosina quinase (YOSHIDA et al., 1990; XIAO, 1997).

Kahraman et al. (2013) em estudos da função renal, observaram que a administração de quercetina (50 mg/kg) 60 min antes da indução da isquemia/reperfusão renal, em ratos, provocou a diminuição no nível das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, no fator de necrose tumoral, na atividade da mieloperoxidase e no conteúdo de proteína carbonil. Em um estudo experimental com ratos, a administração de quercetina resultou na preservação da

integridade histológica renal com diminuição do dano tubular e da inflamação intersticial (SHOSKES, 1998). Confirmando ser uma substâncias com potencial atividade nefroprotetora (KAHRAMAN, 2013).

Figura 5 - Estrutura química da quercetina.



Fonte: Costa, 2005

3.2.24. Flavonoide canferol

Os flavonóides atuam como antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonóides encontradas universalmente na natureza. Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Canferol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona), (fig. 6) é um flavonoide encontrado na *P. pyramidalis* (MENDES et al., 2000) e um componente comum de uma dieta humana (TSAO, 2010; CALDERON-MONTANO, 2011). O canferol contém a estrutura do difenilpropano, que é responsável pela sua propriedade hidrofóbica. Em plantas, açúcares diferentes, tais como rutinose, ramnose, glicose e galactose são ligados a canferol para produzir forma glicosídica de canferol como astragalina (canferol-3-Oglucosideo) (CALDERON-MONTANO, 2011).

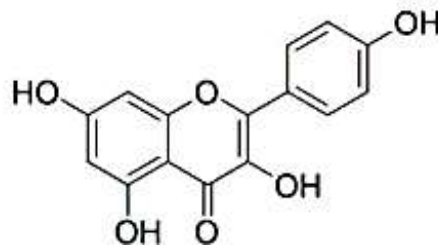
O canferol é encontrado em muitas plantas medicinais e ervas usadas na medicina tradicional, como *P. pyramidalis*, *Ginkgo biloba*, *Moringa oleifera*, *Sophora japonica*, *Tilia* spp, *Equisetum* spp, *Nelumbo nucifera* e em plantas própolis, brócolis e repolho (CALDERON-MONTANO, 2011; WHEATER; BYARS, 2017).

Em um experimento *in vitro* de inflamação oral, o canferol numa concentração de 5µm suprimiu significativamente a secreção de IL-8 induzida pelo TNF α , que sugere ser importante para o tratamento de doenças inflamatórias induzidas por TNF- α (WHEATER; BYARS, 2017).

Os efeitos biológicos relatados do canferol são muitos e variados. O canferol funciona como um antioxidante e protege contra o estresse oxidativo e apoptose (SUCHALA et al., 2016). Inibiu a proliferação de células de câncer cervical humano (TU, 2016) e reduziu significativamente a citotoxicidade induzida por H_2O_2 em células pulmonares e hepáticas (KUMAR et al., 2016). Reduziu o crescimento de células de leucemia pró-mielócita através da alteração do ciclo celular (AGANATHAN; MANDAL, 2009). Chen e colaboradores (2012) relataram que evidências disponíveis demonstraram que o canferol pode suprimir a metástase de células de câncer do ovário *in vitro*.

Foi demonstrado que o canferol interage na glândula mamária, com a via do receptor de estrogênio e altera a sinalização para ajudar a reduzir o crescimento e o desenvolvimento do câncer de mama primário e secundário (WANG, 1994; AIYER, 2012).

Figura 6 - Estrutura química do canferol.



Fonte: Sigma Aldrich Chemical

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Botânico

Para o desenvolvimento deste estudo foram coletadas as plantas: *M. urundeuva* Allemão (aroeira), *P. pyramidalis* Tul. (catingueira) e a *A. colubrina* var. cebil (angico), na Fazenda Cacimbas, Município de Caraúbas no estado da Paraíba – Brasil, em maio de 2013. As exsiccatas destas espécies foi registrada no Herbário Lauro Pires Xavier, sob o NC240 (*M. urundeuva*), NC36 (*P. pyramidalis*) e NC262 (*A. colubrina*) e as identificação botânica foi realizada pela Professora Alecksandra Vieira de Lacerda da Universidade Federal de Campina Grande. O material vegetal foi limpo, seco em estufa de ar circulante (Tecnal[®], Modelo TE – 394 - 4), sob temperatura de $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 horas, triturado em moinho mecânico e armazenado em saco plástico hermeticamente fechado até sua utilização. O projeto de pesquisa recebeu Autorização do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (ICMBio\SISBio\MMA-Brasil) para atividades com finalidade científica, os números dos registros são: n^o 53346-1 para *M. urundeuva* e *P. pyramidalis* e n^o 41277-2 da *A. colubrina*.

4.2. Tamanho de partículas do material vegetal

As folhas desidratadas das drogas vegetais de cada uma das plantas estudadas foram moídas em moinho de rotor vertical usando um sistema de tamises auto vibratórios. O material retido nos tamises foi removido com auxílio de pincel para um papel impermeável. Classificados os tamanhos de partículas e em seguida foram selecionados para análise dos tamanhos de partículas, de pó moderadamente grosso 710 – 355 μm , pó semifino 355 – 180 μm e pó finíssimo 150 – 75 μm , classificados segundo a descrito na Farmacopeia Brasileira (2010).

4.3. Solventes e padrões analíticos

A água foi purificada utilizando o sistema Sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, USA). Todas as soluções foram filtradas em membrana de 0.45mm (Millipore, Massachusetts, USA). A quercetina dihidratada de CAS – 117-39-5 (97% de pureza), utilizada como substância química de referência (SQR), foi adquirida da Sigma Aldrich[®]. O canferol hidratado de CAS – 520-18-3 (97% de pureza), adquirida da Sigma Aldrich[®], utilizada como SQR.

4.4. Preparação das amostras para análise dos marcadores químicos

Os extratos de *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e *A. colubrina* foram analisados por adição de 2 mL de hexano a 1 mL de extrato de extrato hidroalcoólico (m/v – 20/100). A mistura foi homogeneizada por 2 minutos e depois centrifugada, durante 10 minutos. Após isso, a fase hexânica foi descartada, e 3 mL de diclorometano foram adicionados a 500 µL do extrato resultante, que foi homogeneizada durante 2 minutos e centrifugado durante 10 minutos. Este processo foi repetido por 2 vezes, resultando em 9 mL de fase de diclorometano. Os 4 mL desta fase foram evaporados, em banho-maria à 50 °C, e reconstituída em 2 mL de metanol, filtrado em filtro PTFE de 0,45µm e injetou-se a solução no sistema cromatográfico por CLAE.

4.5. Solução padrão dos marcadores químicos

Estudos fitoquímicos apontaram a presença majoritária de compostos fenólicos na composição fitoquímica de *M. urundeuva* e da *A. colubrina* dentre elas o flavonóide quercetina e para a *P. pyramidalis* o flavonóide canferol (MENDES et al., 2000; JANDÚ et al, 2013; MACHADO, 2013). O solvente utilizado na preparação das soluções padrão estoques e de leitura foi o metanol 70 e 50%, respectivamente. As concentrações das soluções de quercetina e canferol foram preparadas a partir das soluções-mãe de 200 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹.

4.6. Obtenção do extrato seco nebulizado - ESN

Os extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e *A. colubrina*, obtidos nas condições do sistema de solvente etanol:água 50%:50% (v/v), foram submetidos ao processo de secagem em *spray drier* de escala laboratorial Modelo LAB PLANT SD-05.

O bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de abertura de 1.2 mm operou com taxa de vazão de ar de 40 L.min⁻¹ e pressão de 2.0 bar. O Dióxido de silício coloidal (CSD) com tamanho médio das partículas primárias de 12 µm foi adquirido da Henrifarma (Lot 3157052414, Brasil) foi utilizado como adjuvante de secagem.

O dióxido de silício coloidal (DSC) foi selecionado para o estudo por ser um adjuvante com elevada área superficial e estabilidade térmica, além de ser um excipiente seguro quando utilizado em produtos farmacêuticos por via oral ou tópica, sendo muito utilizado com

adjuvante tecnológico em estudos para secagem de extratos vegetais por *spray-dryer* (ROWE, SHESKEY, OWEN, 2006).

Para a obtenção dos extratos secos nebulizados (ESN) por emprego da tecnologia de *spray-drier* foram utilizadas as condições de secagem conforme descritas na Tabela 1. Os parâmetros empregados foram: proporção do DSC, temperatura de entrada e fluxo de alimentação.

Os produtos tecnológicos foram armazenados em temperatura ambiente entre 20 e 30 °C protegidas da luz e da umidade em frascos hermeticamente fechados.

Tabela 1- Condições de secagem utilizadas para obtenção do extrato ESN por *spray-dryer*.

Parâmetros de secagem	Extratos Secos Nebulizados		
	<i>M. urundeuva</i>	<i>P. pyramidalis</i>	<i>A. colubrina</i>
Proporção do DSC	10 %	10 %	10 %
Temperatura de entrada	180 °C	160 °C	160°C
Fluxo de alimentação	4 mL.min ⁻¹	4 mL.min ⁻¹	8 mL.min ⁻¹

Fonte: Dados da pesquisa

4.7. Quantificação de quercetina e canferol nos extratos por CLAE

A quantificação da quercetina na *M. urundeuva*, foi realizada utilizando metodologia proposta por Leite et al., (2017). Nos ensaios cromatográficos dos extratos de *M. urundeuva*, *A. colubrina* e da *P. pyramidalis* foi utilizado o sistema cromatográfico Prominence series (Shimadzu, Tóquio, Japão), mostrador automático SIL-20^a, sistema de desgaseificação DGU-20A5, empregando uma coluna C18 (Phenomenex) de dimensões 4,6 mm X 25 cm X 5 µm, o sistema de fase móvel em modo isocrático, foi composto por metanol/ácido fosfórico a 1% (47:53, v / v). O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL.min⁻¹, o detector de ultravioleta - UV com o comprimento de onda em 370 nm, volume de injeção de 20 µL, a temperatura do forno da coluna de 40°C e o tempo de análise de 30 minutos, detector de arranjo de díodos SPD-M20A e software Lab Solutions[®] foram utilizados para aquisição e análise dos dados.

A quantificação dos marcadores químicos foi realizada comparando o tempo de retenção e os espectros UV dos picos dos biomarcadores com os obtidos com a análise dos padrões.

O marcador quercetina foi monitorado nos extratos hidroetanólicos e nos ESN de *M. urundeuva* e da *A. colubrina* e o biomarcador canferol monitorado no extrato hidroetanólico e ESN de *P. pyramidalis*. A análise de quercetina e canferol em extratos foram realizada usando um sistema CLAE-DAD.

4.8. Animais Experimentais

Os camundongos Swiss (*Mus musculus*) saudáveis, adultos, macho e fêmeas (nulíparas ou não grávidas) pesando entre 25 e 30 gramas, e os coelhos Nova Zelândia, adulto, saudável, macho e fêmea (nulíparas ou não grávidas), pesando 1,3 a 1,5 kg, foram utilizados para os experimentos de toxicidade aguda em dose única (camundongos) e de doses repetidas (camundongos e coelhos). Eles foram fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – IPeFarM da Universidade Federal da Paraíba – (UFPB - Brasil) e alojados em caixas de polietileno (camundongos) e gaiolas de metálicas (coelhos) em condições controladas de laboratório (12 h ciclo claro / escuro, temperatura: 22 ± 2 °C) e com um período de aclimação de 7 dias antes do experimento. Todos os animais receberam ração (pellets) e água *ad libitum*. O bioensaio foi conduzido de acordo com as diretrizes internacionalmente aceitáveis para avaliar a segurança e eficácia dos medicamentos à base de plantas (WHO, 2000; OECD, 2001b; BRASIL, 2004; OECD, 2008; BRASIL, 2014). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Universidade Federal da Paraíba (número 0207/10).

4.9. Estudo da toxicidade oral dos diferentes tamanhos de partículas das drogas vegetais

Foram utilizados, grupos tratados/controle de 6 camundongos cada (machos), segundo o teste descrito pelo *Guideline* 407 da OECD (2008). O grupo controle recebeu água e os grupos de testados receberam o infuso dos pós das drogas vegetais dos diferentes tamanhos de partícula da *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina* por via oral (gavagem) em temperatura ambiente (Tabela 2). A quantidade do infuso de cada planta foi de 2000 mg/kg/animal. Os animais experimentais foram privados de alimentos 2 h antes da administração. Eles foram monitorados após a administração 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas até 12 horas, e

diariamente durante 14 dias, para detectar quaisquer sinais de toxicidade e mudanças no comportamento, respiração, piloereção, diarreia, salivação excessiva, hiperexcitabilidade, redução na locomoção, a agressividade, a reação a estímulos, perda de peso, reflexo auricular, ataxia e mortalidade. Nesse período, os animais receberam ração e água *ad libitum*, foram mensurados durante o experimento o peso corporal (semanalmente), o consumo de ração e a ingestão de água (alternados).

Tabela 2- Os tamanhos de partículas utilizados para avaliação da toxicidade dos pós das drogas vegetais das plantas *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina*.

Tamanhos de Partículas	Droga Vegetal (μm)		
	<i>M. urundeuva</i>	<i>P. pyramidalis</i>	<i>A. colubrina</i>
01: pó grosso	710-355	710-355	710-355
02: pó semifino	355-180	355-180	355-180
03: pó finíssimo	150-75	150-75	150-75

Fonte: Dados da pesquisa

4.10. Estudo da toxicidade oral de dose única do extrato seco nebulizado (ESN) das drogas vegetais

Para o estudo dos efeitos tóxicos ou alterações possíveis no comportamento normal dos camundongos, foram utilizados, grupos tratados/grupo controle de 12 camundongos cada (6 machos e 6 fêmeas), segundo o teste descrito pelo *Guideline 420* da OECD (2001b). O grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e os grupos testados receberam o destilado dos ESN das plantas *M. urundeuva*, a *P. pyramidalis* e *A. colubrina*, dissolvido em água filtrada por via oral (Tabela 3).

Os animais experimentais foram privados de alimentos durante 2 h antes da administração. Eles foram monitorados continuamente após a administração 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas até 12 horas, e diariamente durante 14 dias, para detectar quaisquer sinais de toxicidade e mudanças no comportamento, respiração, piloereção, diarreia, salivação excessiva, hiperexcitabilidade, redução na locomoção, a agressividade, a reação a estímulos, perda de peso, ataxia e mortalidade. Durante este período, os animais receberam ração e água

ad libitum, e mensurado durante o experimento o peso corporal (semanalmente), o consumo de ração e água (alternados).

Tabela 3- Quantidade equivalente dos marcadores quercetina e canferol nas dose 500 mg, 1000 mg e 2000 mg do ESN de *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina*.

ESN	<i>M. urundeuva</i>	<i>P. pyramidalis</i>	<i>A. colubrina</i>
	Marcador	Marcador	Marcador
Quantidade (mg)	Quercetina (µg)	Canferol (µg)	Quercetina (µg)
500	35,6	182,5	212,8
1000	58,4	365,0	425,7
2000	142,5	730,0	851,4

Fonte: Dados da pesquisa

4.11. Estudo da toxicidade oral de doses repetidas do ESN das drogas vegetais

Foram utilizados grupos de camundongos tratados/controle com 10 machos e 10 fêmeas e os grupos com coelhos tratados/controle com 3 machos e 3 fêmeas. Um grupo teste para cada ESN e um grupo controle para os três ESN tratados. O grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e grupos de testados receberam o ESN dissolvido em água filtrada por via oral durante 30 dias consecutivos. A quantidade de ESN administrado foi ajustada para uma dose de 2000 mg/kg/dia do ESN de cada droga vegetal das plantas, *M. urundeuva*, a *P. pyramidalis* e *A. colubrina*. Durante o tratamento, o consumo de ração e a ingestão de água dos animais foram registados em dias alternados. Os animais foram observados duas vezes ao dia quanto a sinais de toxicidade, tais como a piloereção, diarreia, e as alterações na atividade locomotora, reação a estímulos, ataxia, perda de reflexo e a mortalidade ao longo do período experimental. No final do tratamento de 30 dias, foi realizada a coleta de sangue, inicialmente, os camundongos foram anestesiado com a combinação dos fármacos cloridrato de quetamina 5% e cloridrato de xilazina 2%, em partes iguais, no volume final de 0,2 mL, via intraperitoneal, quadrante lateral inferior direito, utilizando-se agulha 25 x 5 mm. Após a anestesia geral, cuja profundidade foi avaliada pela ausência do reflexo podal, foi realizada a punção cardíaca de acordo com Hoff (2000). Os coelhos foram anestesiados, com tiopental (35 mg/kg, i.p.) e amostras de sangue foram obtidas da veia auricular e armazenada em dois tubos: um tubo que

contém o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e um tubo sem anticoagulante para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, respectivamente. Este trabalho foi realizado seguindo o bem-estar dos animais e de acordo com as diretrizes internacionalmente aceitáveis para avaliar a segurança e eficácia dos medicamentos à base de plantas (WHO, 2000; BRASIL, 2004; OECD, 2008; BRASIL, 2014).

4.12. Análises hematológicas e bioquímicas

Análises hematológicas foram realizadas imediatamente após a colheita utilizando um analisador de hematologia BC-3000 automático plus, Mindray®. Eritrocitos, hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas. Para a análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos para se obter soro, e foram determinados os seguintes parâmetros: glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicéridos, proteínas totais e fosfatase alcalina. As dosagens foram realizadas utilizando um analisador bioquímico automático BS 300 Mindray®.

4.13. Estudo Morfológico

Após a colheita de sangue os animais foram eutanizados com um excesso de tiopental (140 mg kg⁻¹, i.p.) e foram necropsiados para avaliação macroscópica, quanto a coloração, textura, presença ou ausência de anormalidades nos padrões macroscópicos referentes a cada órgão. Os órgãos coração, pulmões, fígado, rins, baço e estômago, foram cuidadosamente removidas e pesados individualmente, sendo os pesos dos órgãos expressos em termos relativos (g /100 g de peso corporal).

4.14. Estudo Histopatológico

As amostras post-mortem dos órgãos coletados, fixados em formalina tamponada 10% durante 30 dias, em seguida embebidos em parafina, cortados no micrótomo rotativo (Leica RW 2125 RT) em 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) para o exame histopatológico, realizado no Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário - HV, no

Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR, da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

Examinado por microscopia de luz (Olympus 20) nas objetivas de 20x e 40x, para pesquisa de anormalidades nos parâmetros histológico dos tecidos, como a presença de células inflamatórias, áreas de necrose, infiltrados celulares e possíveis anormalidades nos padrões histológico.

4.15. Análise Estatística

Os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média – $M \pm EPM$. Para comparação de resultados múltiplos paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de post teste Dunnett's (teste de múltiplas comparações) com nível significância de $p < 0,05$. A comparação entre dois grupos utilizado o Teste “t” de Student não pareado (teste de dupla comparação), utilizando o Software Graph Pad Prism 6.0, sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram valores de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação de quercetina e canferol por CLAE-DAD

As análises de CLAE-DAD foram realizadas para avaliar a composição do ESN após o processo de secagem por *spray drier* e os flavonóides quercetina e canferol foram monitorizados como marcadores químicos, identificadas e quantificadas nos extratos ESN e hidroalcoólico de *M. urundeuva*, *A. colubrina* e da *P. pyramidalis*.

Os cromatogramas de amostra da quercetina SQR, do extrato hidroalcoólico e ESN de *M. urundeuva* estão ilustrados na Fig. 7, *A. columbrina* na Fig. 9, e os cromatogramas de amostra do canferol SQR, do extrato hidroalcoólico e ESN de *P. pyramidalis*, Fig. 8. A identificação da quercetina foi baseada na comparação com o tempo de retenção do pico da quercetina SQR. Os tempos de retenção dos picos da amostra da quercetina SQR, extrato hidroalcoólico e ESN da *M. urundeuva* foram 10,1, 9,7 e 9,7, respectivamente. Na *A. colubrina* os tempos de retenção dos picos da amostra da quercetina SQR, extrato hidroalcoólico e ESN foram 10,1, 9,9 e 10, respectivamente. Para o canferol os tempos de retenção dos picos, da amostra da canferol SQR, extrato hidroalcoólico e ESN da *P. pyramidalis* 17,4, 17,3 e 17,5, respectivamente (Tabela 4).

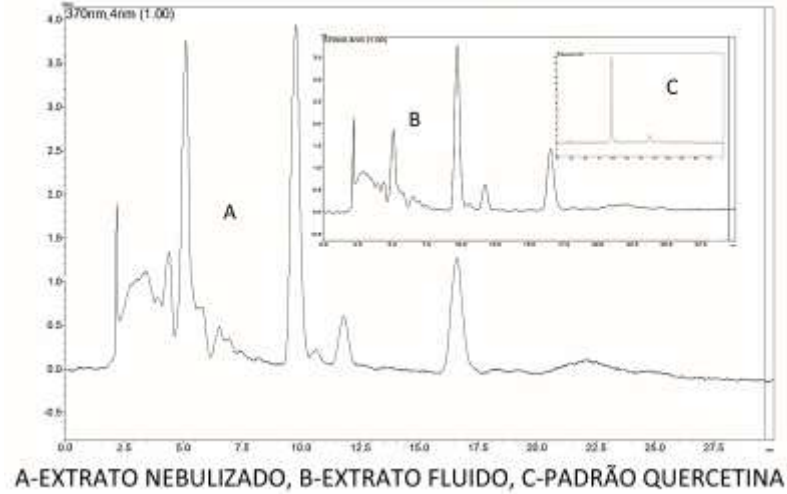
A concentração da quercetina no extrato hidroalcoólico e no ESN de *M. urundeuva* foram de $14,82 \pm 0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $264,5 \pm 2,0 \mu\text{g/g}$, respectivamente, a concentração da quercetina no extrato hidroalcoólico e ESN de *A. colubrina* $99,40 \pm 1,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $853,33 \pm 28,20 \mu\text{g/g}$ e a concentração do canferol no extrato hidroalcoólico e ESN de *P. pyramidalis* $41,6 \pm 2,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1277,17 \pm 25,54 \mu\text{g/g}$ respectivamente, o perfil cromatográfico manteve-se semelhante após o processo de secagem.

Tabela 4- Os valores da concentração dos marcadores quercetina e canferol, nos extratos das plantas.

Amostras	Extrato hidroetanólico $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Extrato seco nebulizado $\mu\text{g/g}$
<i>M. urundeuva</i> - Quercetina	$14,8 \pm 0,2$	$264,5 \pm 2,0$
<i>P. pyramidalis</i> - Canferol	$41,6 \pm 2,2$	$853,3 \pm 28,2$
<i>A. colubrina</i> - Quercetina	$99,4 \pm 1,9$	$1277,1 \pm 25,5$

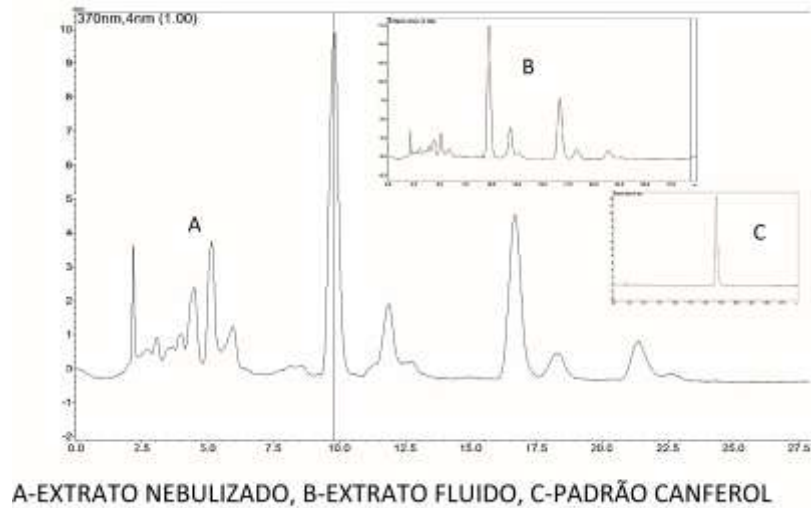
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7 - Cromatograma para o ESN (A), extrato hidroalcoólico (B) de *M. urundeuva* e da quercetina na amostra padrão (C)



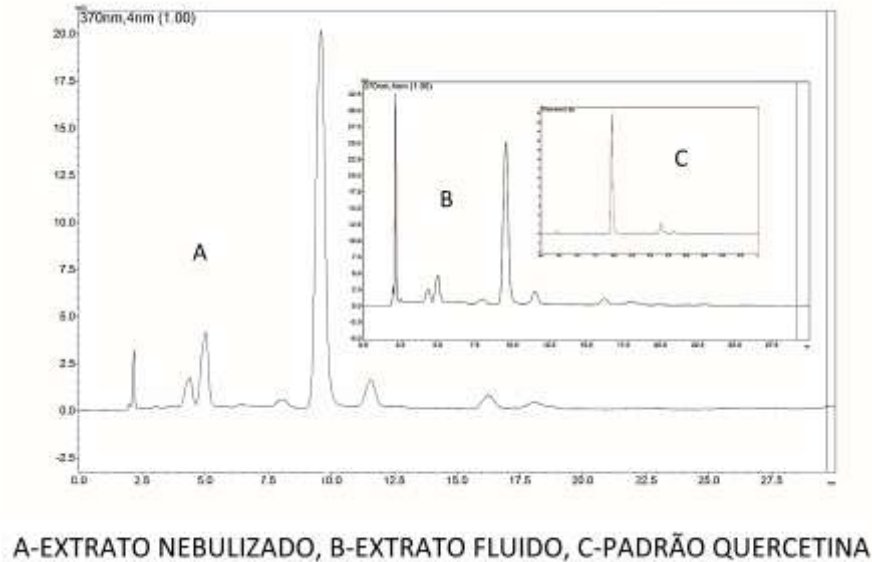
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8 - Cromatograma para o ESN (A), hidroalcoólico (B) de *P. pyramidalis* e do canferol na amostra padrão (C)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 9 - Cromatograma para o ESN (A), extrato hidroalcoólico (B) de *A. colubrina* e da quercetina na amostra padrão (C).



Fonte: Dados da pesquisa

5.2. Estudo de toxicidade oral utilizando infusos em dose única com diferentes tamanhos de partículas

Na toxicidade aguda deve ser priorizada a via utilizada ou pretendida, para o uso em humanos. Quando a via pretendida for a oral, a administração do produto testado em animais deve ser por gavagem (BRASIL, 2010a). Considerando que o infuso é uma das bebidas mais consumidas e mais antigas do mundo, sendo na literatura referido como uma das melhores fontes de compostos fenólicos (LIMA et al., 2004).

Foi avaliada a toxicidade dos infusos dos pós das drogas vegetais das plantas *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina* com a escolha de três tamanhos de partículas: 01 pó grosso (710-355 μm), 02 pó semifino (355-180 μm) e 03 pó finíssimo (150-75 μm), em dose única 2000 mg/kg/vivo a camundongos, e ao final dos 14 dias de avaliação diárias, não foram observadas alterações clínicas e comportamentais durante o período de experimental. As infusões em água são utilizada tradicionalmente como antitérmica, anti- -inflamatória, expectorante, depurativa e no tratamento de infecções intestinais e bronquites (MEDEIROS et al., 2012).

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, além da redução do desenvolvimento, através do comportamento apático, letárgico e alterações na pele (MELLO et al., 1997; MELLO, 2001). Não foi observada alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no consumo de água e ração (Tabela 5), quando comparados os animais tratados com os infusos dos pós das drogas vegetais *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina* em relação ao grupo controle.

Um dos aspectos mais fáceis e lógicos de serem avaliados quando o organismo é submetido a um tratamento é o peso corpóreo (BARDOCZ et al., 1996). Nessa avaliação não foram encontrados diferença estatísticas ($p < 0,05$) na massa corporal dos camundongos tratados com os infusos, em relação aos camundongos controle (Fig. 10, Fig.11, Fig.12).

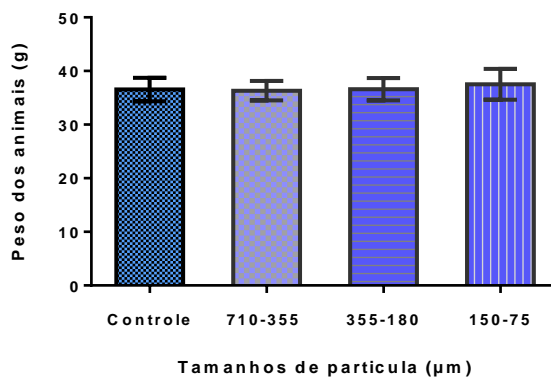
Os infusos das drogas vegetais *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina* dos tamanhos de partículas estudados, não alterou os parâmetros avaliados, denotando ausência de toxicidade sistêmica, quando administrado o infuso em dose única por via oral e avaliado durante 14 dias.

Tabela 5 - Consumo de água e ração por grupos testados/controles com seis (06) camundongos (*Mus musculus*) *swiss* machos, após administração do infuso dos pós das drogas vegetais *M. urundeuva*, *P. pyramidalis*, e da *A. colubrina* na dose de 2000 mg/kg/animal.

Consumo	Pós da droga vegetal	Grupo Controle	Partícula 01: (710-355 µm)	Partícula 02: (355-180 µm)	Partícula 03: (150-75 µm)	Valor p*
Ração (g)	<i>M. urundeuva</i>	43,8 ± 1,7	38,7 ± 0,5	43,4 ± 2,7	44,3 ± 1,8	0,15
	<i>P. pyramidalis</i>	43,1 ± 2,5	41,4 ± 2,3	44,8 ± 1,2	44,9 ± 0,9	0,53
	<i>A. colubrina</i>	43,7 ± 1,6	40,6 ± 2,2	38,6 ± 0,9	39,8 ± 0,8	0,32
Água (ml)	<i>M. urundeuva</i>	52,1 ± 2,8	51,4 ± 1,4	52,5 ± 2,3	60,3 ± 2,0	0,11
	<i>P. pyramidalis</i>	54,7 ± 4,3	52,8 ± 3,2	57,2 ± 3,5	53,5 ± 3,6	0,81
	<i>A. colubrina</i>	50,0 ± 2,1	47,1 ± 1,9	45,0 ± 1,7	51,4 ± 2,0	0,10

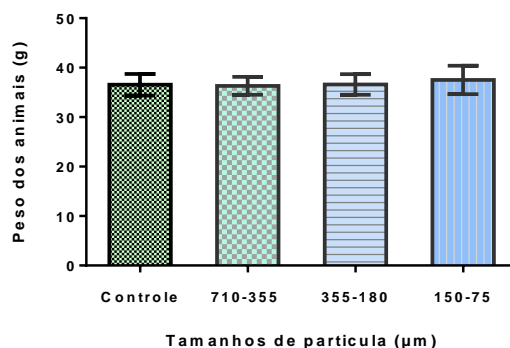
*Comparação do valores representados em M ± E. P. M. entre o grupo controle e os grupos testados, não causaram alterações significativas (*p < 0,05). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Figura 10 - Peso dos camundongos (*Mus musculus*) swiss machos dos grupos testados/grupo controle (n: 06), após administração do infuso dos pós da droga vegetal da *M. urundeuva* na dose de 2000 mg/kg/animal. Comparação dos valores representados em $M \pm E. P. M.$ entre o grupo controle e os grupos testados, não causou alterações significativas (* $p < 0,05$). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).



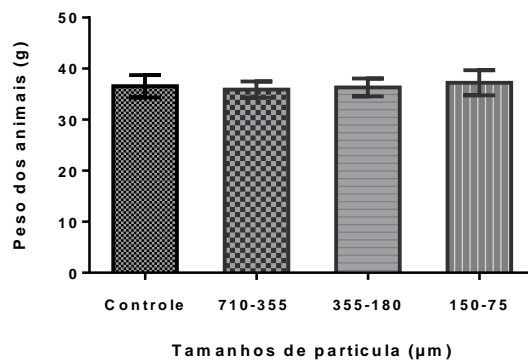
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 11 - Peso dos camundongos (*Mus musculus*) swiss machos dos grupos testados/grupo controle (n: 06), após administração do infuso dos pós da droga vegetal da *P. pyramidalis* na dose de 2000 mg/kg/animal. Comparação dos valores representados em $M \pm E. P. M.$ entre o grupo controle e os grupos testados, não causou alterações significativas (* $p < 0,05$). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 12 - Peso dos camundongos (*Mus musculus*) swiss machos dos grupos testados/grupo controle (n: 06), após administração do infuso dos pós da droga vegetal da *A. colubrina* na dose de 2000 mg/kg/vivo. Comparação dos valores representados em $M \pm EPM$ entre o grupo controle e os grupos testados, não causou alterações significativas (* $p < 0,05$). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).



Fonte: Dados da pesquisa

Os dados mostraram que os infusos obtidos com diferentes tamanhos de partículas apresentando diferentes concentrações dos marcadores quercetina (*M. urundeuva* e *A. colubrina*) e canferol (*P. pyramidalis*) (Projeto RHAE, dados não publicados, 2014), evidenciaram segurança de uso para os diferentes infusos, os quais podem ser considerados não tóxicos segundo classificação da OECD.

5.3. Estudo da toxicidade oral de dose única do extrato seco nebulizado (ESN) das drogas vegetais

5.3.1. *Myracrodruon urundeuva*

A fim de estudar qualquer efeito tóxico ou alterações no comportamento normal dos camundongos, foram utilizados, três grupos experimentais tratados e um grupo controle. Os grupos de tratados receberam o extrato seco nebulizado (ESN) dissolvido em água filtrada por via oral (gavagem). As doses do ESN de *M. urundeuva* administrados foram ajustadas para as dose de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg do animal e os grupos controles receberam solução salina (NaCl 0,9%).

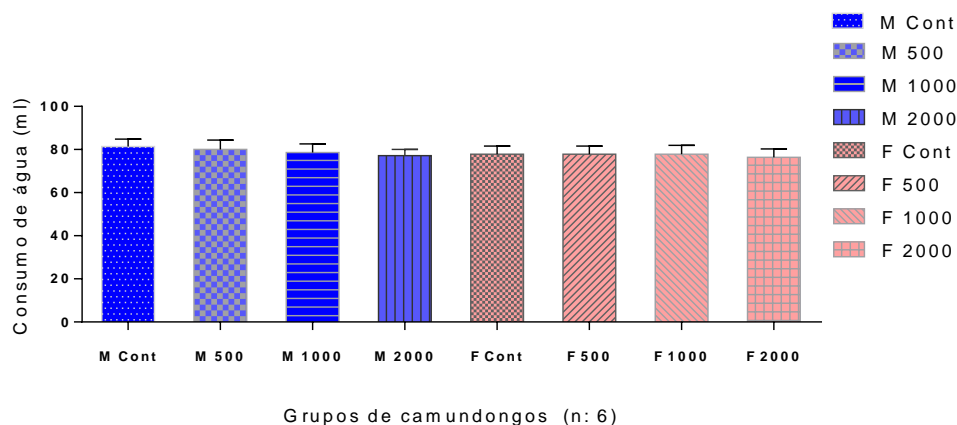
Não foram observados sinais de toxicidade não clínica nos grupos tratados com o ESN de *M. urundeuva* em comparação com o grupo de controle. A toxicidade sistêmica se manifesta pela redução do desenvolvimento ponderal, redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Foi demonstrado (Fig. 13 e Fig. 14) que a administração oral de ESN de *M. urundeuva* nas doses de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg do animal em dose única não causou alterações significativas no consumo de água e ração dos camundongos de tratados quando comparados com o respectivo grupo de controle ($p > 0,05$).

Durante a administração não foram constatadas diferenças na massa corporal, quando comparamos os grupos de camundongos tratados, com aqueles do grupo controle. Corroborando com os resultados encontrados anteriormente onde, todos os ratos tratados com extratos aquoso de *M. urundeuva* mostraram um ganho de peso gradual e ao longo das sete semanas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle (MENEZES, 2010)

Não foram evidenciadas (Tabela 6) estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no peso relativo dos órgãos, coração, pulmões, fígado, rins e baço dos camundongos tratados em relação ao grupo controle. No trabalho de Menezes (2010) a ingestão dos extratos aquoso de *M. urundeuva* também não alterou significativamente os órgãos dos ratos dos grupos tratados em relação aos do grupo controle.

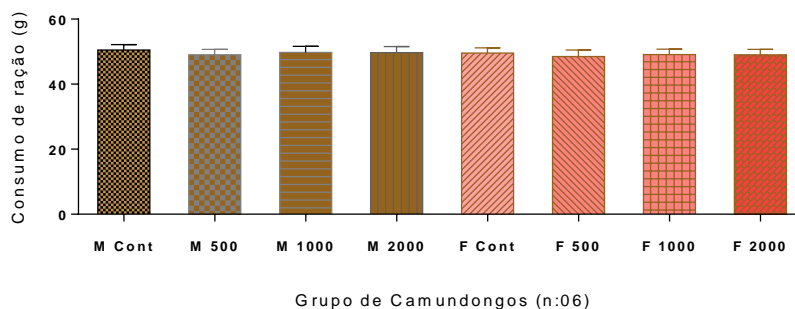
Um requisito importante em experimentos toxicológicos é a capacidade de avaliar os efeitos sobre órgãos específicos. Essa avaliação é feita através de exame macroscópico e mensuração do peso dos órgãos e exame histopatológico. Os resultados são a diferença significativas ou não, entre o peso dos órgãos dos grupos tratados e do controle (BAILEY et al., 2004). O ESN de *M. urundeuva*, nas doses estudadas, não alterou nenhum dos parâmetros avaliados, denotando ausência de toxicidade sistêmica, quando administrado por via oral e nas doses estudadas.

Figura 13 - Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controlado macho (M) e fêmea (F) (n: 06), os grupos tratados receberam as doses 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg por animal de *M. urundeuva*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Figura 14 - Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controlado macho e fêmea (n: 06), os grupos tratados receberam as doses 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg por animal de *M. urundeuva*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Tabela 6 - Peso dos órgãos de camundongos do grupo tratado/controle macho e fêmea (n: 06) e grupos tratados usando as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal dose única de *M. urundeuva*.

Órgãos	Macho (g)				Valor p*	Fêmea (g)				
	Grupo Controle	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000mg/kg	Tratado 2000 mg/kg		Grupo Controle	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000 mg/kg	Tratado 2000 mg/kg	Valor p*
Coração	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,40	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,97
Fígado	1,49±0,0	1,47±0,0	1,46±0,0	1,47±0,0	0,62	1,49±0,0	1,48±0,0	1,49±0,0	1,50±0,0	0,82
Baço	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,86	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,37
Rins	0,39±0,0	0,40±0,0	0,39±0,0	0,40±0,0	0,90	0,40±0,0	0,40±0,0	0,40±0,0	0,40±0,0	0,98
Pulmão	0,20±0,0	0,20±0,0	0,20±0,0	0,19±0,0	0,82	0,20±0,0	0,20±0,0	0,19±0,0	0,19±0,0	0,97

* Comparação dos valores representados em $M \pm EPM$ do grupo controle e dos grupos tratados com o ESN nas dose de 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal, não causou alterações significativas (*p < 0,05). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

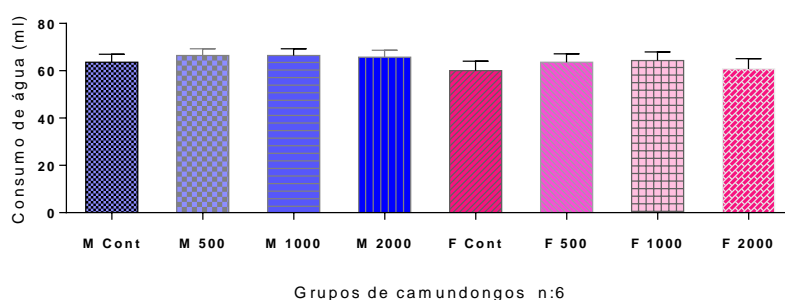
5.3.2. *Poincianella pyramidalis*

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que ao final dos 14 dias de avaliação diária, não foram observados morte, toxicidade não clínica ou alterações comportamentais em nenhum dos animais tratados com o ESN de *P. pyramidalis* em comparação com o grupo de controle. A administração oral de ESN de *P. pyramidalis* nas dose de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg não causou alterações significativas no consumo de água (Fig. 15) e ração (Fig. 16) dos camundongos tratados quando comparados com o grupo dos camundongos controle que recebeu solução salina (NaCl 0,9%) ($p > 0,05$).

Na toxicidade aguda não clínica, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos considerando a redução na massa corporal, no desenvolvimento ponderal dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON, 1999). Não foram constatadas diferenças estatísticas no ganho de peso, quando comparamos do grupo de camundongos tratados, com aqueles do grupo controle.

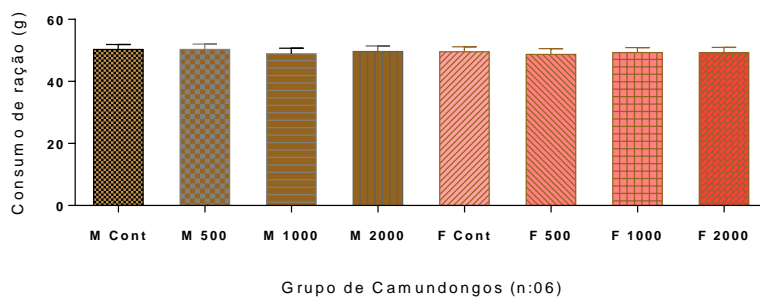
A toxicidade pode ser expressa pela alteração da massa relativa dos órgãos, pois em caso intoxicação a massa aumenta ou diminuir, e causa alterações morfológicas nesses órgãos (MELLO, 2007). Nas doses empregadas nesse teste não foi demonstrada diferença estatisticamente significativas ($p > 0,05$), do peso relativo dos órgãos coração, pulmões, fígado, rins e baço, dos camundongos do grupo tratados e do grupo controle (Tabela 7). Ribeiro (2013) não avaliou efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico da casca *P. pyramidalis* via oral e nas doses 30, 100 e 300 mg/kg em ratos.

Figura 15 - Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n: 06), os grupos tratados receberam as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal por dose de *P. pyramidalis*. Comparação dos valores em $M \pm E.P.M.$, não causou alterações significativas ($*p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Figura 16 - Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n: 06), os grupos tratados receberam as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal por dose única de *P. pyramidalis*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Tabela 7 - Peso dos órgãos de camundongos dos grupos tratados/controles macho e fêmea (n: 06) e grupos tratados usando as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal em dose única de *P. pyramidalis*.

Órgãos	Macho (g)				Valor p*	Fêmea (g)				Valor p*
	Grupo Controle	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000mg/kg	Tratado 2000 mg/kg		Grupo Controle	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000 mg/kg	Tratado 2000 mg/kg	
Coração	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,43	0,14±0,0	0,15±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,86
Fígado	1,49±0,0	1,48±0,0	1,45±0,0	1,48±0,0	0,56	1,49±0,0	1,48±0,0	1,49±0,0	1,50±0,0	0,48
Baço	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,75	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,88
Rins	0,39±0,0	0,39±0,0	0,39±0,0	0,39±0,0	0,82	0,39±0,0	0,40±0,0	0,39±0,0	0,40±0,0	0,97
Pulmão	0,20±0,0	0,20±0,0	0,20±0,0	0,19±0,0	0,79	0,20±0,0	0,20±0,0	0,19±0,0	0,20± 0,0	0,99

* Comparação dos valores representados em $M \pm EPM$ do grupo controle e dos grupos tratados com o ESN nas dose de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg/animal, não causou alterações significativas (* $p < 0,05$). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

5.3.3. *Anadenanthera colubrina*

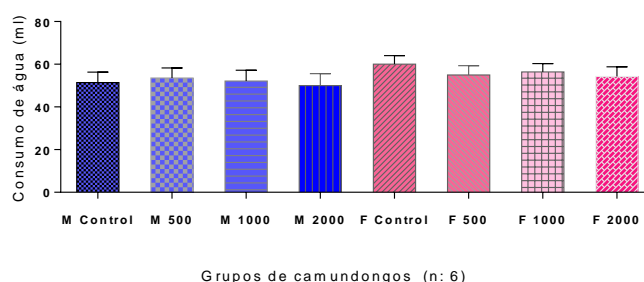
Nas observações realizadas durante o período experimental, não foram encontradas alterações comportamentais, morte ou qualquer sinal de toxicidade, durante a administração do ESN de *A. colubrina*, nas dose 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg em camundongos por via oral, quando comparamos os grupos tratado e o controle.

Durante o experimento, os animais foram observados diariamente, com relação a manifestações de sinais indicativos de toxicidade. Os principais parâmetros avaliados são, as modificações no consumo de água e ração, na massa corporal, na cor e textura dos pêlos, anormalidades motoras e comportamentais (BARNES; DOURSON, 1988).

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas no consumo de água (Fig. 17) e ração (Fig. 18) quando comparados os grupos tratados com administração oral de ESN de *A. colubrina* nas dose de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg, com o grupo controle. Santos (2013) testou o extrato aquoso da casca da *A. colubrina* e não observou sinais de toxicidade, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, por via oral em camundongos.

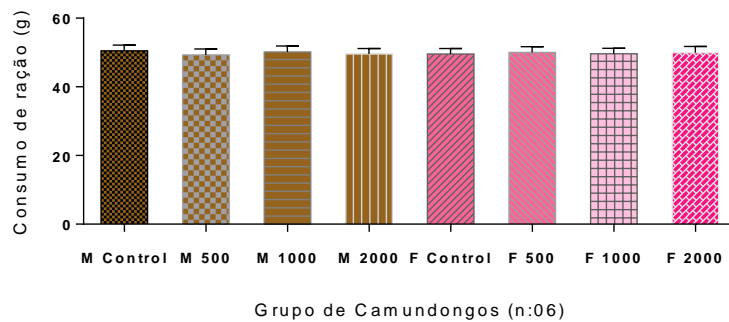
Os estudos de segurança não clínica são importantes na determinação do perigo (dose-dependente) das drogas vegetais, como também na identificação dos possíveis órgãos afetados e avaliar o tipo de toxicidade produzida (BOELSTERLI, 2003). A análise estatística não detectou alterações significativas ($p > 0,05$) no peso relativo dos órgãos, coração, pulmões, fígado, rins e baço, quando se realizou a comparação entre os valores obtidos dos animais dos grupos controles e dos grupos tratados com ESN de *A. colubrina* (Tabela 8).

Figura 17 - Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n: 06), os grupos tratados receberam as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal em dose única de *A. colubrina*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas ($*p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Figura 18 - Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n: 06), os grupos tratados receberam as dose 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal por dose única de *A. colubrina*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

Tabela 8 - Peso dos órgãos de camundongos do grupo tratado/controle macho e fêmea (n: 06), os grupos tratados nas dose de 500, 1000 e 2000 mg/kg/animal em dose única de *A. colubrina*.

Órgãos	Macho (g)					Fêmea (g)				
	Grupo Controle	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000mg/kg	Tratado 2000 mg/kg	Valor p*	Grupo Controle	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000 mg/kg	Tratado 2000 mg/kg	Valor p*
Coração	0,15±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,14±0,0	0,36	0,14±0,0	0,15±0,0	0,15±0,0	0,14±0,0	0,60
Fígado	1,49±0,0	1,49±0,0	1,48±0,0	1,47±0,0	0,98	1,50±0,0	1,47±0,0	1,48±0,0	1,49±0,0	0,14
Baço	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,79	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,09±0,0	0,54
Rins	0,39±0,0	0,40±0,0	0,39±0,0	0,39±0,0	0,86	0,40±0,0	0,39±0,0	0,39±0,0	0,39±0,0	0,57
Pulmão	0,19±0,0	0,2±0,0	0,20±0,0	0,19±0,0	0,14	0,20±0,0	0,19±0,0	0,19±0,0	0,20±0,0	0,28

* Comparação dos valores representados em $M \pm EPM$ do grupo controle e dos grupos tratados dose de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg/animal, não causou alterações significativas (* $p < 0,05$). (Teste One-Way ANOVA/Dunnett).

5.4. Estudo da toxicidade oral de doses repetidas do ESN das drogas vegetais

5.4.1. *Myracrodruon urundeuva*

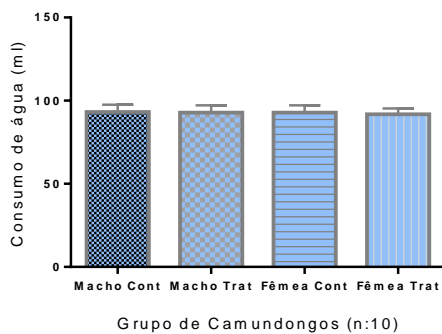
A administração oral em doses repetidas durante 30 dias do ESN de *M. urundeuva* nos camundongos e coelhos de ambos os sexos não causou alterações no ganho de peso dos animais, morte ou quaisquer sinais clínicos e comportamentais de toxicidade. Machado *et al.* (2012) avaliou a resposta biológica (por meio de análise histopatológica, utilizando os extratos hidroalcoólico e aquoso das folhas da *M. urundeuva*, em ratos utilizando o implantes de biofilme, esse contato dos extratos com o tecido conjuntivo subcutâneo, não apresentou efeitos toxicológicos durante os 28 dias de experimentação.

Durante o experimento, os animais devem ser observados diariamente, com relação a manifestações de sinais indicativos de toxicidade. Os principais parâmetros avaliados são: as modificações no consumo de água e ração, na massa corporal, na cor e textura dos pelos, alterações respiratórias e circulatórias, anormalidades motoras e de comportamento (BARNES; DOURSON, 1988). A avaliação dos efeitos do tratamento com ESN de *M. urundeuva* sobre o consumo de água e ração, no período de 30 dias, em camundongos (Fig. 19 e Fig. 20) e nos coelhos (Fig. 21 e Fig. 22), demonstram que o tratamento com o ESN da *M. urundeuva* não causou alterações significativas ($p > 0,05$), no que se refere ao consumo de água e ração.

Com base na classificação de produtos químicos da OECD, pode-se considerar a *M. urundeuva*, por via oral na dose estudadas, na categoria 4 com doses de 2000 mg/kg, que as classifica como produto químico com toxicidade aguda relativamente baixa, mas que sob certas circunstâncias, podem causar um risco para uma população vulnerável (OECD, 2001a).

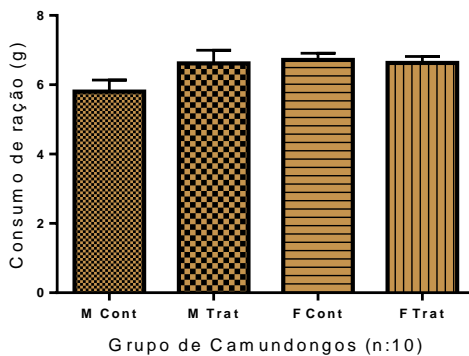
Alguns sinais de toxicidade nos animais testados em relação aos controles, podem ser evidenciados pela alteração da massa relativa dos órgãos, na histopatológica, alterações hematológicas e bioquímicas (GONZALES; SILVA, 2003). Na avaliação da massa dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão, dos camundongos (Tabela 9) e coelhos (Tabela10) machos/fêmeas tratados com 2000 mg/kg do ESN de *M. urundeuva*, não diferiram significativamente ($p > 0,05$), quando comparados aos seus grupos controles. Menezes e Rao (1987), trataram camundongos com o extrato alcoólico da casca da *M. urundeuva* nas doses de 100 e 200 mg/kg por via oral, e não evidenciou efeitos toxicológicos e ainda sugeriu uma atividade antidiarreica para este extrato.

Figura 19 - Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de *M. urundeuva*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



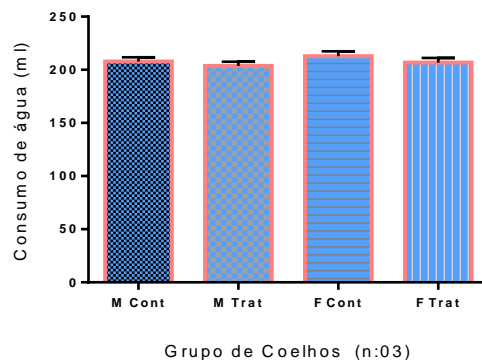
Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 20 - Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n: 10), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal de ESN de *M. urundeuva*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



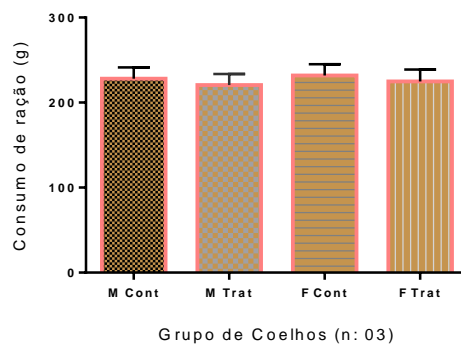
Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 21 - Ingestão de água por grupos de coelhos tratados/controlado macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de *M. urundeuva*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 22 - Ingestão de ração por grupos de coelhos tratados/controlado macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de *M. urundeuva*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Tabela 9 - Peso dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão dos camundongos dos grupos tratados/controle macho e fêmea (n: 10), o grupo tratado na dose de 2000 mg/kg/animal do ESN de *M. urundeuva*.

Órgãos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Teste	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Teste	Valor p*
Coração	0,14 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,57	0,14 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,91
Fígado	1,48 ± 0,0	1,48 ± 0,0	0,56	1,49 ± 0,0	1,50 ± 0,0	0,30
Baço	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,36	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,06
Rins	0,39 ± 0,0	0,39 ± 0,0	0,74	0,39 ± 0,0	0,39 ± 0,0	0,72
Pulmão	0,19 ± 0,0	0,20 ± 0,0	0,83	0,19 ± 0,0	0,19 ± 0,0	0,87

* Comparação da M ±E. P. M. dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas, (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 10 - Peso dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão de coelhos dos grupos tratados/controle macho e fêmea (n: 03), os grupos tratados com a dose 2000 mg/kg/animal do ESN de *M. urundeuva*.

Órgãos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Coração	4,37 ± 0,1	4,93 ± 0,2	0,15	5,90 ± 0,4	4,76 ± 0,1	0,05
Fígado	51,67 ± 2,5	52,50 ± 3,9	0,86	73,60 ± 3,3	69,17 ± 3,2	0,39
Baço	0,66 ± 0,0	0,77 ± 0,1	0,37	1,143 ± 0,3	0,79 ± 0,0	0,32
Rins	9,96 ± 0,4	10,13 ± 0,4	0,81	13,00 ± 0,3	11,85 ± 0,4	0,11
Pulmão	9,60 ± 0,4	11,53 ± 0,6	0,07	9,067 ± 0,6	8,050 ± 0,2	0,21

* Comparação da M ± E. P. M. dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

A análise dos parâmetros sanguíneos é importante para a avaliação de risco, uma vez que quaisquer alterações no sistema hematológico têm um efeito preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são relevados a partir de animais (VIANA, 1997). A análise estatística não detectou alterações significativas ($p > 0,05$) nos parâmetros hematológicos eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, plaquetas, nos grupos de camundongos e coelhos machos/fêmeas tratados, quando comparados com os parâmetros encontrados nos grupos controle dos camundongos (Tabela 11) e coelhos (Tabela 12). Estes dados indicam que o ESN de *M. urundeuva*, não teve efeito sobre as células sanguíneas circulantes ou sobre a sua produção, e que estão dentro dos valores descritos na literatura (DINIZ et al., 2006).

A ausência de efeito nos eritrócitos e hematócrito, sugere que o ESN não alterou o balanço entre a razão de produção e destruição dos corpúsculos sanguíneos. O VCM, HCM e CHCM estão relacionados às células vermelhas individualmente, enquanto que a hemoglobina e hemácia estão associadas a população total de células sanguíneas vermelhas. A ausência de efeitos nesses índices implica que nem incorporação da hemoglobina nas células vermelhas nem a morfologia e fragilidade osmótica dos eritrócitos foram afetados. Desta forma é improvável que o ESN de *M. urundeuva* afete a capacidade de carreamento de oxigênio nos animais (ADEBAYO et al., 2005).

O perfil bioquímico dos camundongo (Tabela 13) e coelhos (Tabela 14) machos/fêmeas tratados, demonstrou semelhança estatística entre os grupos controles e que todos os parâmetros avaliados estão dentro dos valores de referência (RODRIGUES et al., 2006), indicando não haver toxicidade no tratamento com o ESN de *M. urundeuva* na dose estudada. Chaves (1998) ao utilizar o extrato hidroalcoólico da casca da *M. urundeuva* na dose oral de 400 mg/kg em cobaias, não constatou atividade toxicológica nesse tratamento.

A avaliação morfológicas e histológicas das alterações patológicas nos órgãos dos animais tratados, é a base de uma avaliação de segurança de um produto (PRABU, 2013). Na análise morfológica dos órgãos dos camundongos e coelhos tratados em relação aos seus respectivos controles, não demonstraram alterações patológicas aparentes.

Durante o estudo histopatológicos não foram observadas alterações nos órgãos coração, rins, fígado, pulmão e baço em camundongos e coelhos (Fig. 23 e Fig.24)

tratados em comparação aos grupos controles. A leitura das lâminas foram realizadas utilizando os grupos controles de camundongos e coelhos (macho e fêmea) como parâmetro do padrão de normalidade, assim foi constatado a ausência de toxicidade nos achados histológicos nas espécies estudadas.

No exame histopatológico do fígado revelou a ausência de congestão, infiltrados celulares que caracterizam uma inflamação e a ausência de degenerações (DOBEREINER, 1984; CARLTON; MCGAVIN, 1998). A superfície e na coloração da composição celular dos rins não sofreram alteração, não houve presença de hemorragias focais ou multifocais, nas camadas cortical e medular não foram observadas congestão ou degeneração e nefroses (DOBEREINER, 1984; JONES, 2000). O coração não apresentava congestão, nenhuma eosinofilia ou degeneração dos feixes de fibras cardíacas (ROBINSON; MAXIE, 1993). No pulmão não foi observado nenhuma congestão pulmonar, pneumonia, edema, desaparecimento de células ciliadas dos bronquíolos ou deposição de material refrativo, amorfo e eosinófilico (CARLTON; MCGAVIN, 1998). Comprovando a normalidade já observada nas etapas já descritas anteriormente no período de avaliação e experimentação da toxicidade do ESN da *M. urundeuva* na dose de 2000 mg/kg/dia estudada. No trabalho de Menezes (2010) a ingestão dos extratos aquoso de *M. urundeuva* também não alterou significativamente os órgãos dos ratos tratados.

Tabela 11 - Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), na dose 2000 mg/kg/animal do ESN de *M. urundeuva*.

Parâmetros Hematológicos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Eritrocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,80 ± 0,3	6,62 ± 0,3	0,11	6,72 ± 0,1	6,63 ± 0,1	0,74
Hemoglobina g/dL	14,88 ± 0,5	15,29 ± 0,5	0,61	14,58 ± 0,3	14,57 ± 0,3	0,98
Hematócrito (%)	45,46 ± 1,3	44,92 ± 1,3	0,78	43,36 ± 1,5	43,39 ± 1,5	0,98
CHCM g/dL	33,20 ± 0,2	33,50 ± 0,3	0,52	33,40 ± 0,3	32,80 ± 0,4	0,27
HCM (pg)	15,00 ± 0,2	15,20 ± 0,1	0,48	15,20 ± 0,2	15,30 ± 0,2	0,76
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	97,80 ± 1,5	99,00 ± 1,9	0,63	102,5 ± 1,5	101,8 ± 2,0	0,78
VCM (fL)	49,00 ± 0,5	49,01 ± 0,4	0,98	50,38 ± 0,2	50,28 ± 0,2	0,79

* VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CMHC: dose média de hemoglobina corpuscular, plaquetas. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 10/grupo). * Comparação do grupo controle e dos grupos testados, não causou alterações significativas (*p < 0,05). (Teste “t” de Student).

Tabela 12 - Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de coelhos tratados/controle macho e fêmea (n:03), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN da *M. urundeuva*.

Parâmetros Hematológicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Eritrocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,90 \pm 0,1	4,30 \pm 0,6	0,38	4,43 \pm 0,2	4,70 \pm 0,2	0,53
Hemoglobina g/dL	12,10 \pm 0,6	11,97 \pm 0,9	0,90	11,53 \pm 0,1	12,32 \pm 0,4	0,14
Hematócrito (%)	39,30 \pm 0,1	38,60 \pm 0,9	0,49	37,27 \pm 1,2	37,33 \pm 1,1	0,97
CHCM g/dL	34,00 \pm 0,5	33,63 \pm 0,3	0,60	34,60 \pm 0,7	34,57 \pm 0,3	0,96
VG ($10^6/\mu\text{L}$)	5,15 \pm 0,2	5,17 \pm 0,3	0,97	5,33 \pm 0,2	4,88 \pm 0,2	0,26
HCM (pg)	23,50 \pm 0,3	22,87 \pm 0,2	0,24	23,37 \pm 0,5	23,07 \pm 0,4	0,71
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	113,0 \pm 10,5	133,3 \pm 17,7	0,38	127,3 \pm 20,2	134,7 \pm 8,0	0,75
VCM (fL)	65,70 \pm 3,3	67,30 \pm 1,2	0,67	67,23 \pm 1,1	67,65 \pm 1,1	0,80

* MCV: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CMHC: concentração média de hemoglobina corpuscular, plaquetas e VG: volume globular. Os valores representam a média \pm E.P.M. ($n = 03/\text{grupo}$). * Comparação do grupo controle e dos grupos testados, não causou alterações significativas (* $p < 0,05$). (Teste “t” de Student).

Tabela 13 - Resultado dos parâmetros bioquímicos grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN da *M. urundeuva*.

Parâmetros Bioquímicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Glicose mg/dL	140,3 ± 1,8	137,4 ± 1,4	0,22	137,7 ± 2,8	132,0 ± 1,9	0,11
Colesterol mg/dL	102,9 ± 5,5	96,60 ± 6,6	0,47	104,6 ± 4,6	109,4 ± 4,2	0,45
Uréia mg/dL	26,10 ± 1,2	26,60 ± 1,1	0,77	25,90 ± 1,0	26,40 ± 1,1	0,75
Creatinina mg/dL	0,298 ± 0,0	0,330 ± 0,0	0,35	0,288 ± 0,0	0,280 ± 0,0	0,76
Fosf. Alcalina mg/dL	50,76 ± 0,3	50,77 ± 0,4	0,98	51,04 ± 0,2	50,62 ± 0,3	0,39
AST U/L	80,40 ± 1,3	82,30 ± 1,6	0,37	83,90 ± 1,6	84,40 ± 1,6	0,83
ALT U/L	86,70 ± 1,0	88,40 ± 1,4	0,35	87,40 ± 1,8	85,00 ± 1,2	0,30
Proteínas totais g/dL	48,88 ± 0,9	46,80 ± 1,6	0,28	49,90 ± 0,6	49,88 ± 1,4	0,98
Triglicerídeos mg/dL	107,0 ± 4,3	114,7 ± 6,9	0,36	114,7 ± 3,8	109,9 ± 5,1	0,46

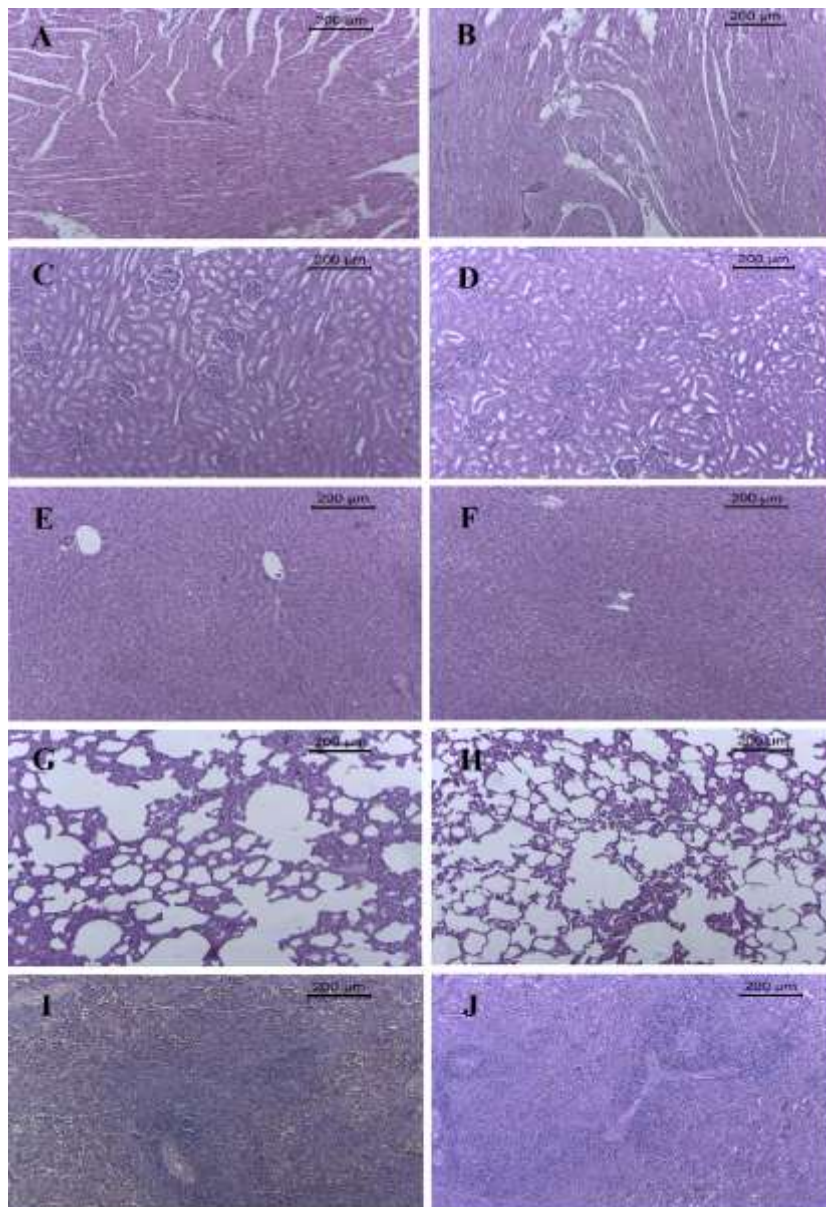
AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferases. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 10/grupo). * Comparação do grupo controle e os grupos tratados, não causou alterações significativas (*p < 0,05). (Teste “t” de Student).

Tabela 14 - Resultado dos parâmetros bioquímicos analisados dos grupos de coelhos tratados/controle macho e fêmea (n:03), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN da *M. urundeuva*.

Parâmetros Bioquímicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Glicose mg/dL	116,5 ± 2,5	121,3 ± 14,7	0,76	122,3 ± 13,5	145,7 ± 3,3	0,17
Colesterol mg/dL	38,00 ± 0,5	34,67 ± 3,1	0,36	42,00 ± 5,8	58,00 ± 2,8	0,07
Uréia mg/dL	39,00 ± 5,1	35,00 ± 2,6	0,53	44,67 ± 3,2	44,50 ± 1,6	0,96
Creatinina mg/dL	1,28 ± 0,2	1,26 ± 0,2	0,95	1,37 ± 0,0	1,55 ± 0,0	0,16
Fosf. Alcalina mg/dL	61,50 ± 12,9	32,67 ± 2,3	0,09	62,33 ± 15,2	51,13 ± 9,4	0,56
AST U/l	135,0 ± 0,5	104,7 ± 15,3	0,12	106,0 ± 5,5	120,8 ± 5,1	0,12
ALT U/L	113,0 ± 25,1	114,7 ± 21,1	0,96	133,0 ± 11,7	124,2 ± 1,8	0,50
Proteínas totais g/dL	5,72 ± 0,4	6,09 ± 0,4	0,55	5,727 ± 0,5	5,93 ± 0,2	0,73
Triglicerídeos mg/dL	62,00 ± 13,0	65,67 ± 23,2	0,89	68,00 ± 18,3	81,83 ± 15,4	0,59

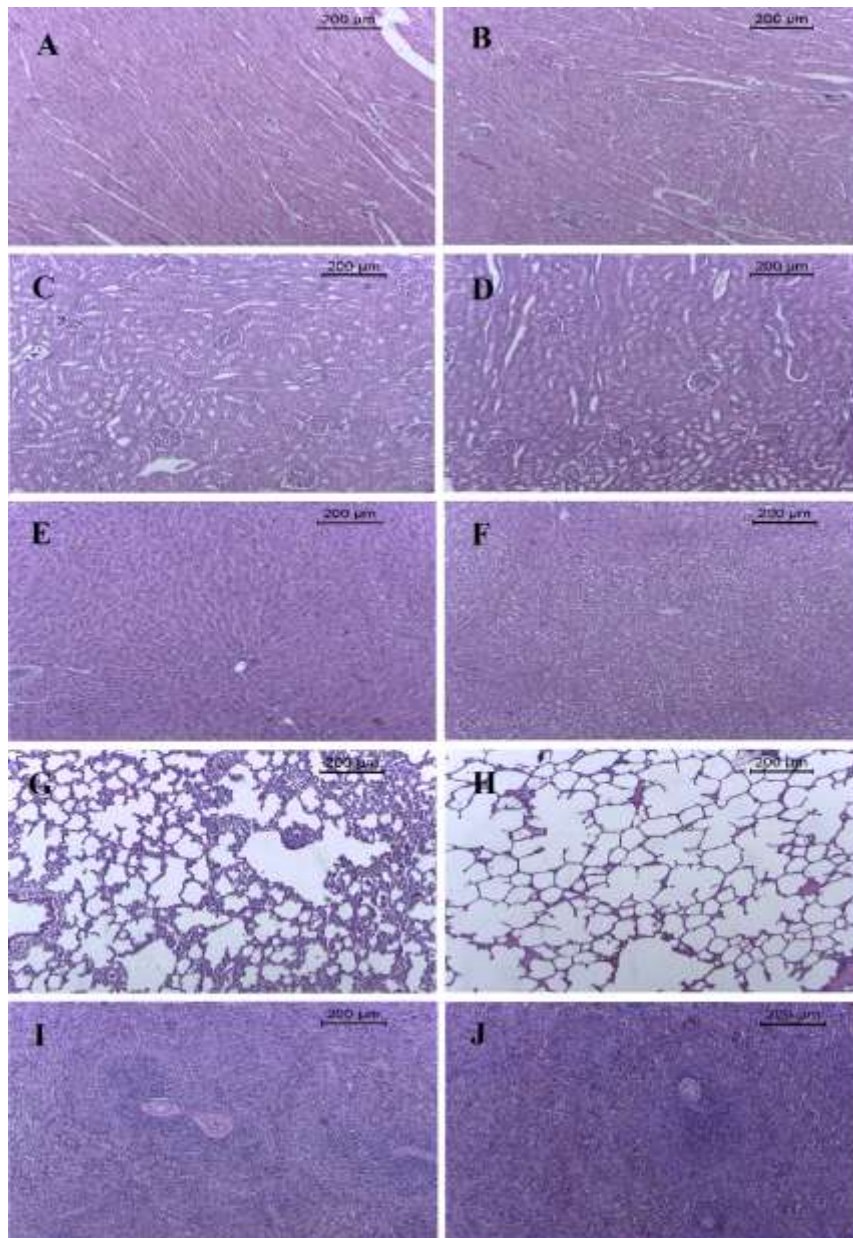
AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferases. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 03/grupo). * Comparação do grupo controle e dos grupos tratados, não causou alterações significativas (*p < 0,05). (Teste “t” de Student).

Figura 23 - O exame histológico demonstrou que não foram observadas alterações nos coelhos machos devido a administração de 30 dias de ESN de *M. urundeuva* no coração (A, B), rins (C, D), fígado (E, F), pulmão (G e H) E o baço (I e J).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 24 - O exame histológico demonstrou que não foram observadas alterações nos coelhos fêmeas devido à administração de 30 dias de ESN de *M. urundeuva* no coração (A, B), rins (C, D), fígado (E, F), pulmão (G e H) E o baço (I e J).



Fonte: Dados da pesquisa

5.4.2. *Poincianella pyramidalis*

As informações toxicológicas sobre compostos químicos são obtidas basicamente a partir de testes toxicológicos não-clínicos, ou seja, com animais de laboratórios em condições previamente padronizadas (MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003).

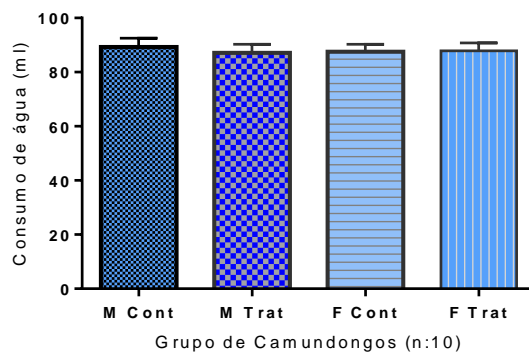
Na avaliação diária durante os 30 dias após a administração oral, não foi constatada morte ou alterações clínicas, toxicologias e comportamentais em nenhuma das espécies estudadas.

Com a administração oral na dose de 2000 mg/kg/animal do ESN de *P. pyramidalis* em camundongos e coelhos machos/fêmeas, não foram observadas diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os ganho de massa corporal desses animais tratados em relação aos seus respectivos grupos controles. Os sinais de toxicidade aguda não-clínico são definidos considerando a perda de massa corporal, o desenvolvimento ponderal dos animais e alterações comportamentais (RAZA et al., 2002).

A ingestão oral do ESN de *P. pyramidalis* ao longo de 30 dias não causou alterações estatisticamente significativas no consumo de água e ração nos camundongos (Fig. 25 e Fig. 26) e nos coelhos (Fig. 27 e Fig. 28) estudados. Santana (2012), demonstrou que o extrato hidroalcoólico da casca de *P. pyramidalis* nas doses de 100 e 400 mg/kg, via oral em ratos, não causou toxicidade e demonstrou atividade anti-inflamatória nos animais tratados no experimento com o modelo experimental de pancreatite aguda, induzida pela obstrução de ducto biliar.

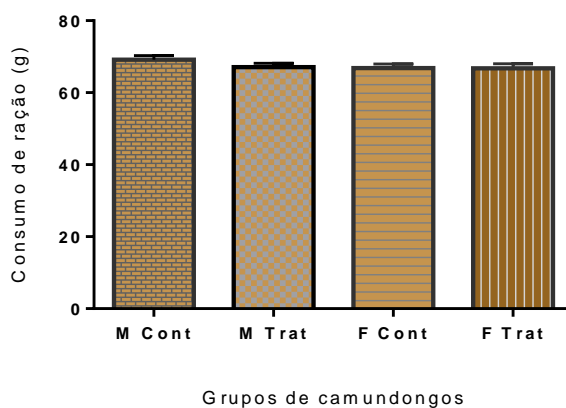
A avaliação toxicológica em doses repetidas tem como principal objetivo estabelecer os níveis possíveis para observação de efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados, bem como, o grau de comprometimento dos mesmos (FAUSTMAN, 1994). A avaliação estatística dos valores obtidos da massa dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão dos camundongos (Tabela 15) e coelhos (Tabela 16) dos grupos tratados e controles, também constatam que não houve diferença significativa entre os grupos nas espécies estudadas.

Figura 25 - Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de *P. pyramidalis*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



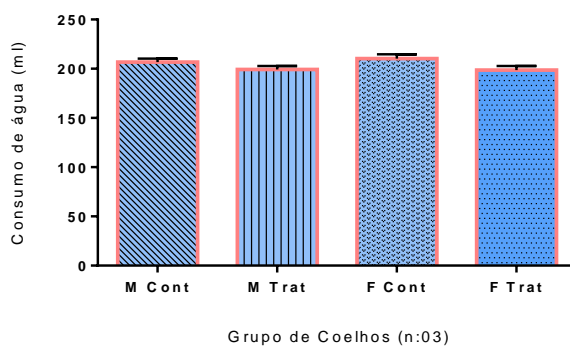
Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 26 - Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de *P. pyramidalis*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



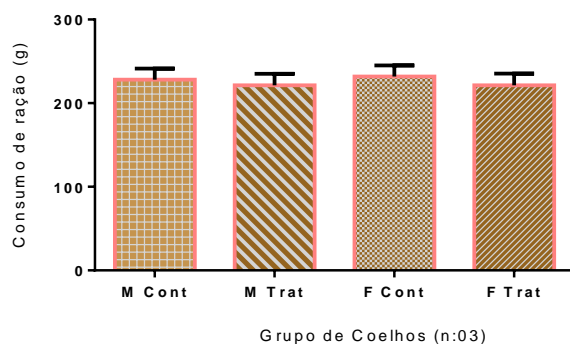
Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 27 - Ingestão de água por grupos de coelhos tratados/controlado macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de *P. pyramidalis*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 28 - Ingestão de ração por grupos de coelhos tratados/controlado macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas de *P. pyramidalis*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Tabela 15 - Peso dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão de camundongos do grupo controle macho e fêmea (n: 10) e grupo tratado na dose de 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *P. pyramidalis* (n: 10).

Órgãos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Coração	0,14 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,98	0,14 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,15
Fígado	1,48 ± 0,0	1,47 ± 0,01	0,33	1,49 ± 0,0	1,49 ± 0,0	0,91
Baço	0,38 ± 0,0	0,39 ± 0,0	0,08	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,45
Rins	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,36	0,39 ± 0,0	0,39 ± 0,0	0,72
Pulmão	0,19 ± 0,0	0,20 ± 0,0	0,84	0,19 ± 0,0	0,20 ± 0,0	0,74

*Comparação da M ± E.P.M. dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 16 - Peso dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão de coelhos dos grupos tratado/controle macho e fêmea (n: 03), os grupos tratados na dose de 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *P. pyramidalis*.

Órgãos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Coração	4,36 ± 0,1	4,50 ± 0,4	0,77	5,90 ± 0,4	4,93 ± 0,2	0,11
Fígado	51,67 ± 2,5	52,47 ± 2,3	0,82	73,60 ± 3,3	71,10 ± 5,4	0,71
Baço	0,66 ± 0,0	0,696 ± 0,0	0,48	1,14 ± 0,3	1,02 ± 0,1	0,72
Rins	9,96 ± 0,4	9,66 ± 0,2	0,61	13,00 ± 0,3	12,48 ± 0,6	0,53
Pulmão	9,60 ± 0,4	10,13 ± 0,2	0,35	9,06 ± 0,6	8,58 ± 0,4	0,56

* Comparação da $M \pm E.P.M.$ dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (* $p < 0,05$), (Teste “t” de Student).

A ingestão do ESN de *P. pyramidalis* na dose 2000 mg/kg/animal nos camundongos e nos coelhos machos/fêmeas estudados durante os 30 dias, não ocasionou alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$), nos parâmetros hematológicos eritrocitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e plaquetas, avaliados nos camundongos (Tabela 17) e coelhos (Tabela 18) machos/fêmeas tratados, quando comparados aos seus grupos controle. As plaquetas também permaneceram inalteradas em número e forma. Observamos que a administração do ESN de *P. pyramidalis* na dose de 2000 mg/kg/dia, não causou danos nas células sanguíneas, na medula óssea ou de anormalidades na absorção ou incorporação de nutrientes, pelo menos num grau suficiente para causar anemia, corroboram com Branco et al, (2011).

A análise dos parâmetros bioquímicos dos camundongos (Tabela 19) e coelhos (Tabela 20) machos/fêmeas tratados mostraram que o tratamento com o ESN de *P. pyramidalis* não afetou os níveis séricos dos triglicérides, ureia, fosfatase alcalina, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferases, colesterol total e proteína total, quando comparados com os seus respectivos grupos de controle, indicando não haver alteração no metabolismo geral dos animais tratados. Houve uma diminuição da glicose dos camundongos tratados, mas os resultados encontrados estão dentro do intervalo descrito em outros estudos (BRANCO et al., 2011), essa mesma diminuição não foi observada nos coelhos tratados.

Avaliada a enzima AST que também é encontrada em um grande número de tecidos, como coração, pulmão, músculo esquelético e rim, pois esta permite predizer pela sua análise, a presença de substâncias tóxicas nesses órgãos. Enquanto a ALT é principalmente encontrada nos hepatócitos, onde é considerada um indicador altamente sensível de hepatotoxicidade. Portanto, o fato de que a administração do ESN de *P. pyramidalis* não produziu alterações nesses parâmetros, sugeri a ausência de toxicidade renal e hepática (KANEKO, 1997; EMANUELLI, 2002).

Diniz (2014), utilizaram o extrato da casca da *P. pyramidalis* em ratos nas doses 30, 100 e 300 mg/kg via oral, e não observou sinais de toxicidade aparente e nem na avaliação histológica dos mastócitos do tecido gástrico. Nesse estudo não foram observadas alterações morfológicas nos órgãos coração, rins, fígado, pulmão e baço dos camundongos/coelhos tratados, com os seus respectivos grupos controle. De acordo com os achados histopatológicos nos órgãos coração, rins, fígado, pulmão e baço, não foram

encontradas alterações, indicativas de lesão celular ou tecidual nos grupos tratados de camundongos e coelhos machos/fêmeas (Fig. 29 e Fig. 30) em comparação com os animais do grupo de controle, indicando não haver toxicidade nesses órgãos estudados. A ausência de alterações e mecanismos patogênicos nos tecidos estudados, justificou os aspectos e valores encontrados nos testes comportamentais, hematológicos e bioquímicos quando comparados os grupos tratados com o ESN de *P. pyramidalis* e seus respectivos controle.

Tabela 17 - Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de camundongos tratado/controle macho e fêmea (n:10), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *P. pyramidalis*.

Parâmetros Hematológicos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Eritrócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,51 ± 0,3	6,33 ± 0,4	0,73	6,88 ± 0,3	6,11 ± 0,2	0,07
Hemoglobina g/dL	11,92 ± 0,7	12,48 ± 0,9	0,64	12,84 ± 0,5	13,40 ± 0,7	0,54
Hematócrito (%)	44,41 ± 1,6	40,63 ± 1,5	0,11	41,83 ± 1,5	40,86 ± 1,6	0,67
CHCM g/dL	32,10 ± 0,8	31,03 ± 1,1	0,47	31,26 ± 1,1	32,90 ± 1,0	0,30
HCM (pg)	14,90 ± 0,2	15,78 ± 1,1	0,47	14,61 ± 0,4	16,38 ± 1,1	0,18
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	94,90 ± 3,1	96,60 ± 5,6	0,79	95,60 ± 3,4	105,1 ± 3,3	0,06
VCM (fL)	48,85 ± 0,3	49,03 ± 0,4	0,73	49,12 ± 0,3	50,21 ± 0,1	0,06

* VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: dose média de hemoglobina corpuscular e VG: volume globular. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 10/grupo). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 18 - Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de coelhos controle macho e fêmea (n:03) e grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *P. pyramidalis* (n:03).

Parâmetros Hematológicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Eritrocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,90 ± 0,1	4,93 ± 0,2	0,91	4,43 ± 0,2	4,63 ± 0,2	0,62
Hemoglobina g/dL	12,10 ± 0,6	12,40 ± 0,5	0,74	11,53 ± 0,1	12,32 ± 0,5	0,22
Hematócrito (%)	39,30 ± 0,1	39,03 ± 0,2	0,41	37,27 ± 1,2	36,90 ± 0,4	0,80
CHCM g/dL	34,00 ± 0,5	32,88 ± 0,8	0,34	34,60 ± 0,7	33,73 ± 1,1	0,56
GV ($10^6/\mu\text{L}$)	5,157 ± 0,2	5,307 ± 0,2	0,70	5,333 ± 0,2	5,343 ± 0,2	0,97
HCM (pg)	23,50 ± 0,3	22,83 ± 0,2	0,22	23,37 ± 0,5	23,33 ± 0,3	0,96
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	113,0 ± 10,5	128,3 ± 11,2	0,37	127,3 ± 20,2	126,3 ± 7,5	0,97
VCM (fL)	65,70 ± 3,3	64,80 ± 1,8	0,82	67,23 ± 1,1	67,02 ± 1,3	0,90

* VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular, plaquetas e VG: volume globular. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 03/grupo). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 19 - Resultado dos parâmetros bioquímicos grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *P. pyramidalis*.

Parâmetros Bioquímicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Glicose mg/dL	137,3 ± 2,1	128,8 ± 3,4	0,05	136,6 ± 1,7	129,9 ± 2,7	0,05
Colesterol mg/dL	96,60 ± 4,4	87,50 ± 2,4	0,08	93,10 ± 7,0	94,10 ± 2,6	0,89
Uréia mg/dL	26,40 ± 1,0	27,80 ± 1,2	0,42	26,50 ± 1,1	29,00 ± 1,5	0,20
Creatinina mg/dL	0,311 ± 0,0	0,327 ± 0,0	0,58	0,34 ± 0,02	0,319 ± 0,0	0,34
Fosf. Alcalina mg/dL	50,59 ± 0,3	49,28 ± 0,5	0,07	48,59 ± 1,2	48,29 ± 0,6	0,83
AST U/L	80,90 ± 1,2	82,20 ± 1,5	0,51	85,00 ± 1,7	85,20 ± 1,7	0,93
ALT U/L	84,80 ± 1,8	83,30 ± 3,3	0,70	84,90 ± 3,4	82,10 ± 3,1	0,55
Proteínas totais g/dL	4,724 ± 0,1	4,59 ± 0,1	0,40	4,63 ± 0,1	8,50 ± 3,9	0,34
Triglicerídeos mg/dL	100,0 ± 2,7	94,70 ± 5,6	0,40	94,80 ± 6,2	85,70 ± 6,7	0,33

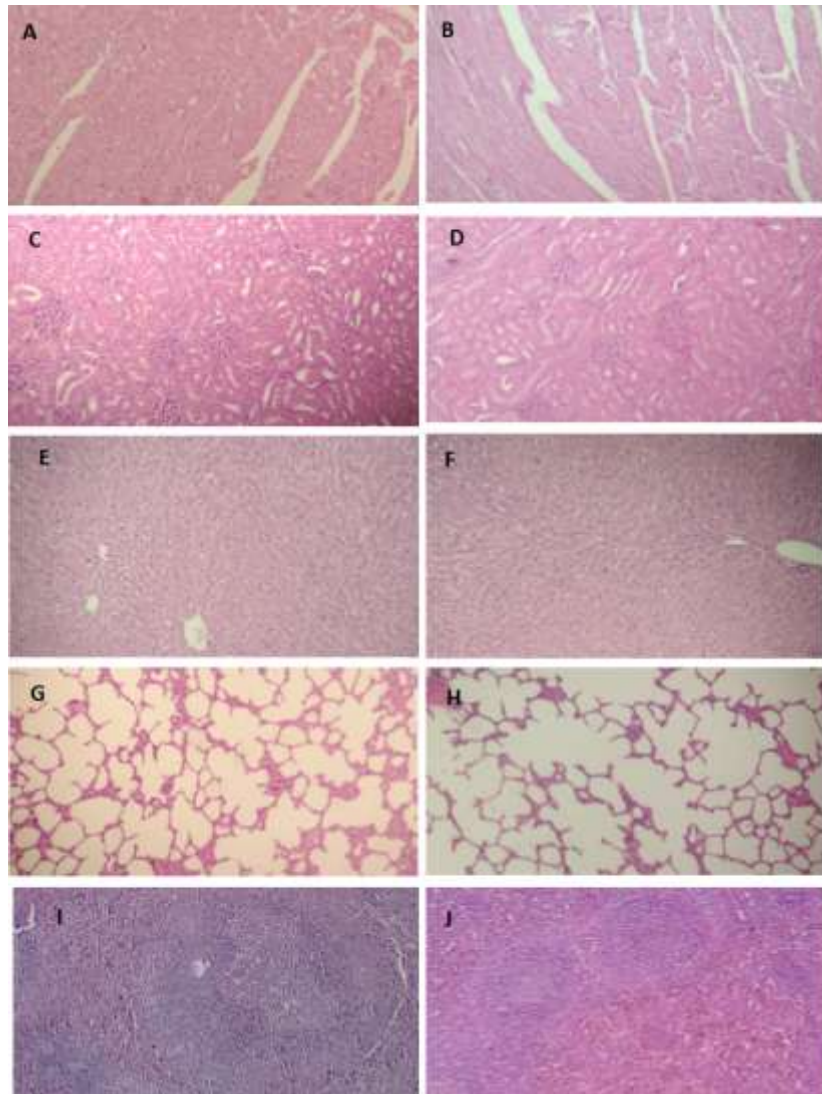
AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferases. Os valores representam a M ± E.P.M. (n = 10/grupo). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 20 - Resultado dos parâmetros bioquímicos grupos de coelhos tratado/controle macho e fêmea (n:03), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *P. pyramidalis*.

Parâmetros Bioquímicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Glicose mg/dL	116,5 ± 2,5	111,0 ± 7,7	0,53	133,0 ± 4,9	135,3 ± 3,7	0,72
Colesterol mg/dL	43,67 ± 4,4	34,00 ± 3,2	0,15	43,67 ± 8,2	47,33 ± 7,8	0,76
Uréia mg/dL	43,67 ± 2,6	39,67 ± 4,8	0,50	41,67 ± 1,3	40,67 ± 2,0	0,70
Creatinina mg/dL	1,17 ± 0,1	1,04 ± 0,1	0,55	1,20 ± 0,0	1,32 ± 0,0	0,17
Fosf. Alcalina mg/dL	65,00 ± 10,4	36,67 ± 3,9	0,06	76,67 ± 4,0	58,67 ± 12,2	0,23
AST U/L	135,0 ± 6,0	111,3 ± 15,3	0,22	90,00 ± 7,2	102,7 ± 5,5	0,23
ALT U/L	110,7 ± 22,9	114,7 ± 21,1	0,90	114,3 ± 13,3	124,2 ± 1,8	0,50
Proteínas totais g/dL	5,15 ± 0,2	5,19 ± 0,2	0,91	4,63 ± 0,2	5,73 ± 0,3	0,07
Triglicerídeos mg/dL	81,67 ± 13,5	76,67 ± 14,0	0,81	62,33 ± 19,4	78,00 ± 12,1	0,53

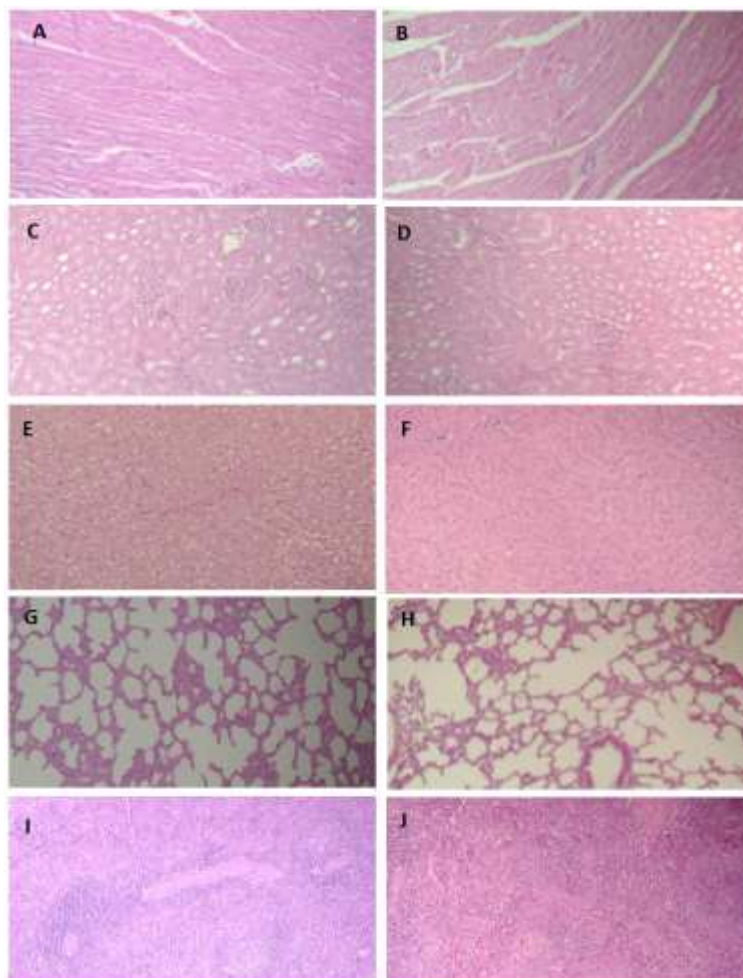
AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferases. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 3 / grupo). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Figura 29 - O exame histológico demonstrou que não foram observadas alterações nos coelhos machos devido à administração de 30 dias de ESN de *P. pyramidalis* no coração (A, B), rins (C, D), fígado (E, F), pulmão (G e H) E o baço (I e J)



Fonte: Imagens da pesquisa

Figura 30 - O exame histológico demonstrou que não foram observadas alterações nos coelhos fêmeas devido à administração de 30 dias de ESN de *P. pyramidalis* no coração (A, B), rins (C, D), fígado (E, F), pulmão (G e H) E o baço (I e J)



Fonte: Imagens da pesquisa

5.4.3. *Anadenanthera colubrina*

Nas observações clínicas realizadas durante o estudo de toxicidade em doses repetidas, com o ESN da *A. colubrina* em camundongos e nos coelhos machos/fêmeas não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) entre os ganho de peso dos animais tratados em relação aos grupos controles. Não houve alterações comportamentais dos animais tratados e nem qualquer sinal de toxicidade quando comparado com seus respectivos grupos controle. A sobrevivência de 100% dos animais, camundongos e coelhos tratados durante os 30 dias experimentais com a dose de 2000 mg/kg/animal,

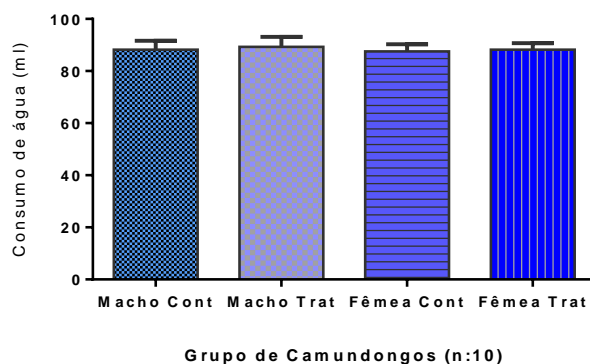
indicou que este ESN não causou toxicidade nos parâmetros avaliados e nessas condições. Alguns dos sinais de toxicidade sistêmica, para a avaliação não clínica, considera a redução do desenvolvimento corporal e perda de peso dos animais experimentais, como característica da toxicidade em doses repetidas (TEO et al., 2002).

Sabe-se, pois, que a toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração, sendo tais sinais importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância, pois fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais (VALADARES, 2006). Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$), quanto ao consumo de água e ração entre os grupos tratados/controle de camundongos (Fig. 31 e Fig. 32) e coelhos (Fig. 33 e Fig. 34).

Em outro estudo com o ARAGAL da *A. colubrina* no tratamento de camundongos nas doses de 50, 100 ou 200 mg/Kg, não causou toxicidade e aumentou o número de células fagocitárias presentes no exsudado do peritônio em 18, 44 e 88%, respectivamente (MORETÃO et al., 2004).

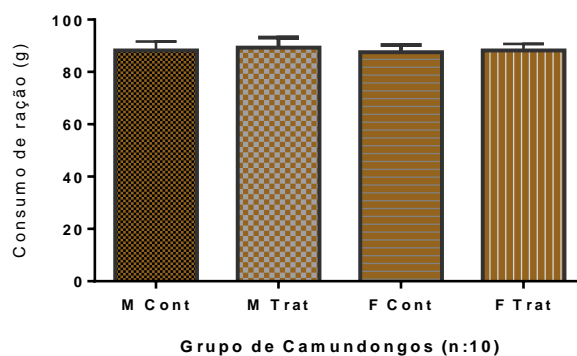
O peso total dos órgãos exerce efeito importante no metabolismo corporal, uma vez que uma diminuição ou um aumento no peso dos órgãos poderá afetar as funções vitais no organismo (SILVA et al., 2016). Não foram encontradas alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$), nos pesos dos órgãos analisados, coração, fígado, baço, rins e pulmão, dos animais camundongos (Tabela 21) e coelhos (Tabela 22) machos/fêmeas tratados com 2000 mg/kg do ESN de *A. colubrina*, em relação aos seus respectivos controles.

Figura 31 - Ingestão de água por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



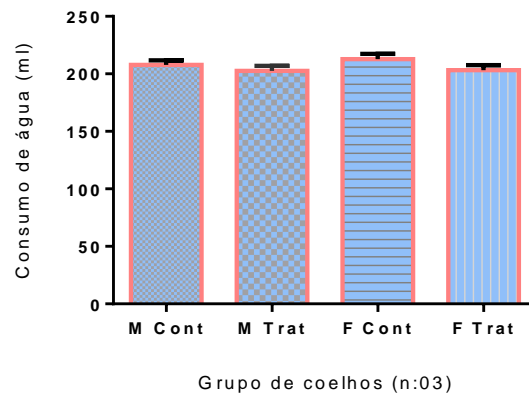
Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 32 - Ingestão de ração por grupos de camundongos tratados/controle macho e fêmea (n:10), os tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



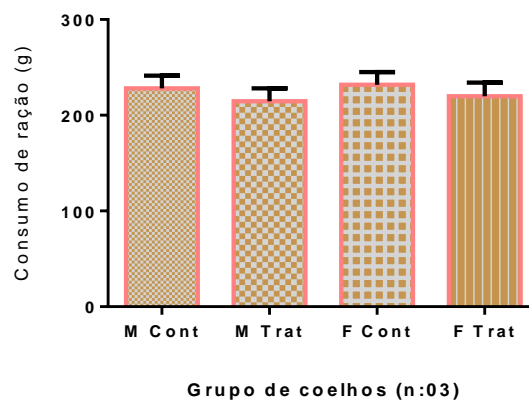
Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 33 - Ingestão de água por grupos de coelhos tratados/controlado macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Figura 34 - Ingestão de ração por grupos de coelhos tratados/controlado macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*. A comparação da $M \pm E. P. M.$, entre os grupos, não causaram alterações significativas (* $p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa, (Teste “t” de Student).

Tabela 21 - Peso dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão dos camundongos dos grupos tratados/controlado macho e fêmea (n: 10), o grupo tratado na dose de 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*.

Órgãos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Coração	0,14 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,75	0,14 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,96
Fígado	1,49 ± 0,0	1,48 ± 0,0	0,37	1,50 ± 0,0	1,48 ± 0,0	0,11
Baço	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,44	0,09 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,53
Rins	0,39 ± 0,0	0,39 ± 0,0	0,25	0,40 ± 0,0	0,39 ± 0,0	0,19
Pulmão	0,19 ± 0,0	0,20 ± 0,0	0,30	0,20 ± 0,0	0,19 ± 0,0	0,24

*Comparação da M ± E.P.M. dos grupos tratado/controlado, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 22 - Peso dos órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão de coelhos dos grupos tratado/controle macho e fêmea (n: 03), os grupos tratados na dose de 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*.

Órgãos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Coração	4,36 ± 0,1	4,33 ± 0,0	0,87	5,90 ± 0,4	5,33 ± 0,2	0,30
Fígado	51,67 ± 2,5	53,83 ± 3,3	0,63	73,60 ± 3,3	71,50 ± 4,3	0,72
Baço	0,67 ± 0,0	0,70 ± 0,0	0,38	1,14 ± 0,3	0,893 ± 0,0	0,46
Rins	9,96 ± 0,4	9,67 ± 0,2	0,61	13,00 ± 0,3	12,52 ± 0,4	0,45
Pulmão	9,60 ± 0,4	10,53 ± 0,5	0,24	9,07 ± 0,6	8,90 ± 0,3	0,82

*Comparação da M ± E.P.M. dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

A avaliação sanguínea é um importante indicador da fisiologia e patologia nos homens e animais, e seus valores podem ser alterados pela ingestão de plantas tóxicas (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007). Nos parâmetros hematológicos mensurados nesse estudo, não foram observadas alterações estatísticas ($p > 0,05$), quando foram analisados os camundongos (Tabela 23) e coelhos (Tabela 24) machos/fêmeas tratados, em comparação com seus grupos controles. Estes parâmetros indicaram que o ESN de *A. colubrina* na dose 2000 mg/kg/dia, durante 30 dias, não alterou as células sanguíneas circulantes, como também a sua produção nos camundongos e coelhos tratados.

A composição bioquímica do soro sanguíneo reflete a real situação metabólica dos tecidos dos animais, de forma que é possível avaliar as lesões teciduais, transtorno no funcionamento dos órgãos, a adaptação nutricional e fisiológica do organismo e desequilíbrios metabólicos específicos (GONZALES, 2003).

Na análise dos parâmetros bioquímicos dos camundongos (Tabela 25) e coelhos (Tabela 26) machos/fêmeas tratados com o ESN de *A. colubrina*, não observou-se alterações nos níveis séricos de glicose, triglicérides, ureia, fosfatase alcalina, creatinina, AST, ALT, colesterol total e proteína total, quando comparados com seus respectivos grupos de controle, indicando não haver alteração no metabolismo geral dos animais de testados. Pessoa et al., (2012) avaliou o efeito da tintura hidroalcoólica (5% de etanol) da casca e entrecasca da *A. colubrina* como auxílio no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos *wistar* durante 21 dias e não observou alterações toxicológicas nos animais.

Não foram verificadas alterações na morfologia macroscópica externa dos órgãos coração, rins, fígado, pulmão e baço dos animais tratados em relação aos animais controle. Na avaliação histopatológica desses órgãos, não observou-se anormalidades nos achados microscópicos, quando comparados os grupos dos camundongos e coelhos tratados em relação aos grupos controle. A ausência de achados histopatológicos se dá provavelmente em função da homeostasia normal do equilíbrio do organismo (PEREIRA; BOGLIOLO, 2000). Dessa forma, a avaliação histopatológica não foi capaz de evidenciar alterações dose-resposta relacionadas ao tratamento dos camundongos e coelhos machos/fêmeas, com o ESN de *A. colubrina* na dose 2000 mg/kg/dia.

Tabela 23 - Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de camundongos tratados/ controle macho e fêmea (n:10) e na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*.

Parâmetros Hematológicos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Eritrocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,51 \pm 0,3	6,77 \pm 0,2	0,52	6,88 \pm 0,3	6,34 \pm 0,2	0,22
Hemoglobina g/dL	11,92 \pm 0,7	13,56 \pm 0,7	0,12	12,84 \pm 0,5	12,33 \pm 0,6	0,57
Hematócrito (%)	44,35 \pm 1,7	44,26 \pm 1,6	0,97	41,83 \pm 1,5	42,16 \pm 1,5	0,87
CHCM g/dL	32,10 \pm 0,8	32,34 \pm 1,0	0,86	31,26 \pm 1,1	31,10 \pm 1,1	0,92
HCM (pg)	14,90 \pm 0,2	15,01 \pm 0,3	0,78	14,61 \pm 0,4	15,12 \pm 0,3	0,41
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	94,90 \pm 3,1	94,50 \pm 3,8	0,93	95,60 \pm 3,4	95,30 \pm 4,1	0,95
VCM (fL)	48,85 \pm 0,3	49,03 \pm 0,4	0,74	49,12 \pm 0,3	49,53 \pm 0,2	0,40

* VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular. Os valores representam a média \pm E.P.M. ($n = 10/\text{grupo}$). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (* $p < 0,05$), (Teste “t” de Student).

Tabela 24 - Resultado dos parâmetros hematológicos dos grupos de coelhos tratados/controle macho e fêmea (n:03), na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*.

Parâmetros Hematológicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Eritrocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,90 \pm 0,1	4,73 \pm 0,2	0,58	4,43 \pm 0,2	4,83 \pm 0,2	0,38
Hemoglobina g/dL	12,10 \pm 0,6	12,93 \pm 0,2	0,30	11,87 \pm 0,4	12,00 \pm 0,5	0,85
Hematócrito (%)	39,30 \pm 0,1	38,67 \pm 0,5	0,30	37,27 \pm 1,2	36,60 \pm 0,7	0,67
CHCM g/dL	34,00 \pm 0,5	34,40 \pm 0,6	0,67	34,60 \pm 0,7	35,33 \pm 0,2	0,40
GV ($10^6/\mu\text{L}$)	5,157 \pm 0,2	5,337 \pm 0,1	0,63	5,35 \pm 0,2	4,92 \pm 0,2	0,27
HCM (pg)	23,50 \pm 0,3	23,77 \pm 0,4	0,68	24,07 \pm 1,1	23,53 \pm 0,3	0,67
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	113,0 \pm 10,5	133,7 \pm 2,6	0,13	127,3 \pm 20,2	128,0 \pm 12,4	0,97
VCM (fL)	65,70 \pm 3,3	66,03 \pm 2,1	0,93	67,23 \pm 1,1	66,83 \pm 0,7	0,77

* VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular, plaquetas e VG: volume globular. Os valores representam a média \pm E.P.M. ($n = 03/\text{grupo}$). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (* $p < 0,05$), (Teste “t” de Student).

Tabela 25 - Resultado dos parâmetros bioquímicos grupos de camundongos tratado/controle macho e fêmea (n:10) e na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*.

Parâmetros Bioquímicos	Macho (g)			Fêmea (g)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Glicose mg/dL	137,3 ± 2,1	134,7 ± 2,0	0,39	136,6 ± 1,7	132,4 ± 1,1	0,05
Colesterol mg/dL	96,60 ± 4,4	84,50 ± 8,0	0,20	93,10 ± 7,0	100,7 ± 2,7	0,32
Uréia mg/dL	26,40 ± 1,0	26,80 ± 1,1	0,80	26,50 ± 1,1	27,00 ± 1,3	0,77
Creatinina mg/dL	0,311 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32	0,33 ± 0,0	0,315 ± 0,0	0,61
Fosf. Alcalina mg/dL	50,59 ± 0,3	50,35 ± 0,4	0,70	50,43 ± 0,4	50,11 ± 0,4	0,61
AST U/L	80,90 ± 1,2	82,60 ± 1,7	0,44	85,00 ± 1,7	82,20 ± 1,6	0,26
ALT U/L	84,80 ± 1,8	85,50 ± 2,0	0,80	84,90 ± 3,4	83,20 ± 1,7	0,66
Proteínas totais g/dL	4,72 ± 0,1	4,52 ± 0,1	0,20	4,63 ± 0,1	8,58 ± 3,9	0,33
Triglicerídeos mg/dL	100,0 ± 2,7	101,7 ± 5,3	0,78	94,80 ± 6,2	99,50 ± 4,1	0,54

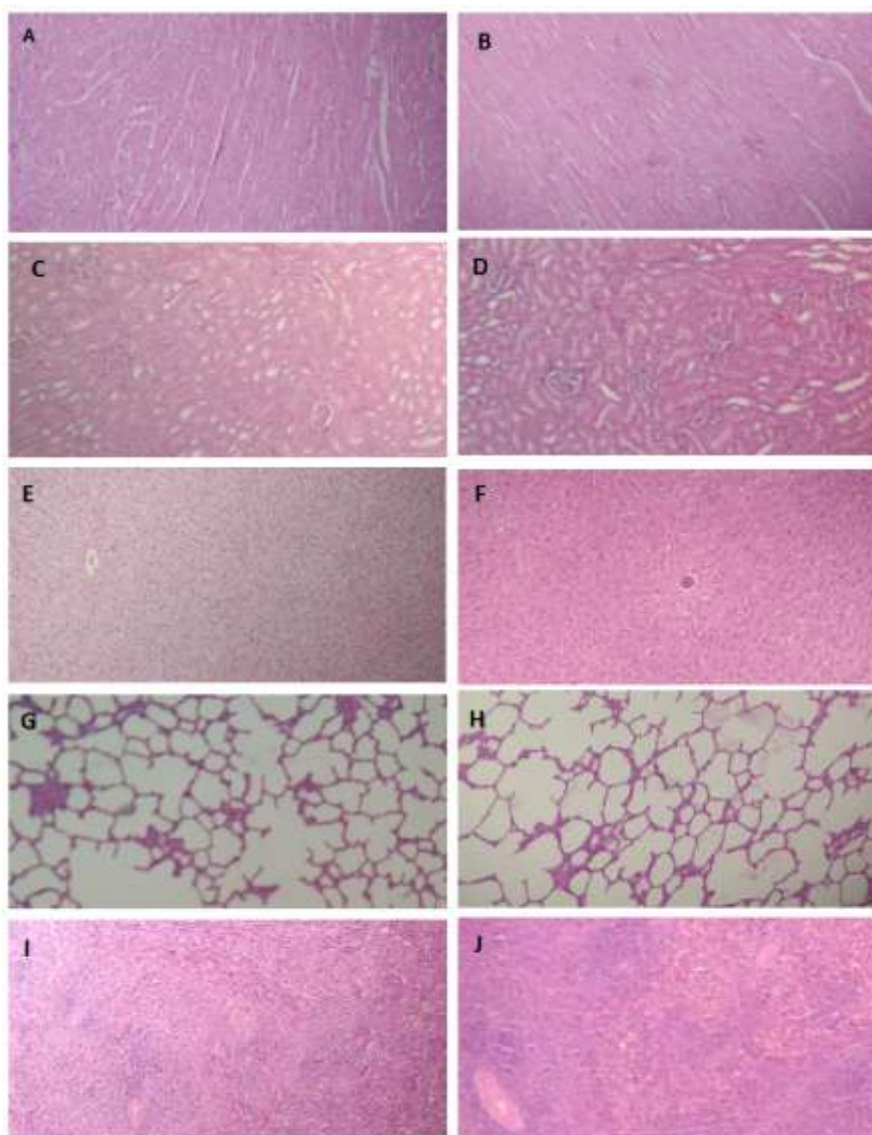
AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferases. Os valores representam a M ± E.P.M. (n = 10/grupo). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Tabela 26 - Resultado dos parâmetros bioquímicos grupos de coelhos tratado/controle macho e fêmea (n:03), os grupos tratados na dose 2000 mg/kg/animal em doses repetidas do ESN de *A. colubrina*.

Parâmetros Bioquímicos	Macho			Fêmea		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*	Grupo Controle	Grupo Tratado	Valor p*
Glicose mg/dL	111,7 ± 5,4	120,3 ± 2,9	0,23	119,0 ± 10,9	121,0 ± 7,8	0,88
Colesterol mg/dL	38,00 ± 0,5	30,67 ± 6,6	0,33	42,00 ± 5,8	47,33 ± 5,2	0,53
Uréia mg/dL	39,00 ± 5,1	40,67 ± 3,3	0,80	44,67 ± 3,2	47,00 ± 0,5	0,52
Creatinina mg/dL	1,28 ± 0,2	1,08 ± 0,0	0,42	1,37 ± 0,0	1,28 ± 0,1	0,60
Fosf. Alcalina mg/dL	65,00 ± 10,4	48,00 ± 11,5	0,33	62,33 ± 15,2	67,00 ± 12,5	0,82
AST U/L	135,0 ± 0,5	120,0 ± 6,1	0,07	106,0 ± 5,5	101,7 ± 8,7	0,69
ALT U/L	113,0 ± 25,1	107,7 ± 11,7	0,85	133,0 ± 11,7	111,0 ± 21,5	0,42
Proteínas totais g/dL	5,15 ± 0,2	4,82 ± 0,2	0,41	5,727 ± 0,5	4,96 ± 0,5	0,39
Triglicerídeos mg/Dl	81,67 ± 13,5	72,33 ± 15,9	0,67	68,00 ± 18,3	70,67 ± 5,4	0,89

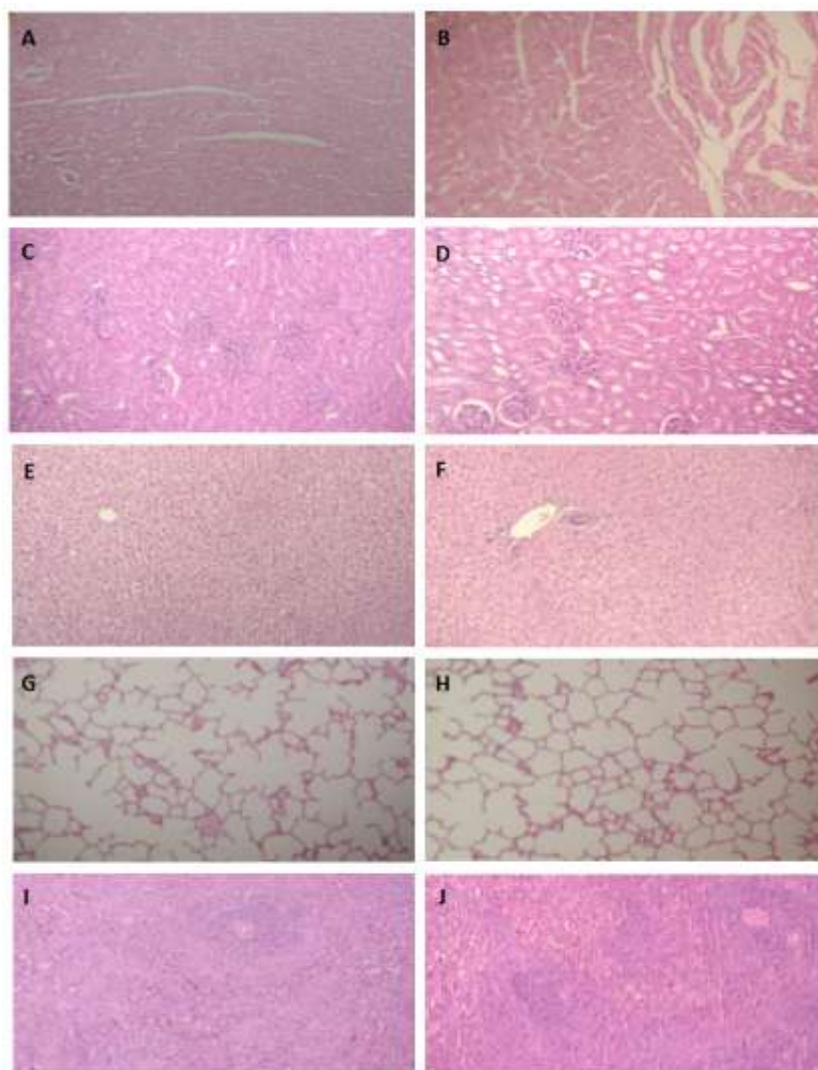
AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferases. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 3 / grupo). *Comparação dos grupos tratado/controle, não observou-se alterações estatisticamente significativas (*p < 0,05), (Teste “t” de Student).

Figura 35 - O exame histológico demonstrou que não foram observadas alterações nos coelhos machos devido à administração de 30 dias de ESN de *A. colubrina* no coração (A, B), rins (C, D), fígado (E, F), pulmão (G e H) E o baço (I e J)



Fonte: Imagens da pesquisa

Figura 36 - O exame histológico demonstrou que não foram observadas alterações nos coelhos fêmeas devido à administração de 30 dias de ESN de *A. colubrina* no coração (A, B), rins (C, D), fígado (E, F), pulmão (G e H) E o baço (I e J)



Fonte: Imagens da pesquisa

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os estudos toxicológicos não-clínicos agudos com as plantas *M. urundeuva*, *A. colubrina* e da *P. pyramidalis* mostraram que 2000 mg/kg dos infusos de folhas das drogas vegetais em diferentes tamanhos de partícula e seus extratos secos nebulizados das drogas vegetais nas dose de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg do animal em dose única em camundongos não causaram toxicidade sistêmica. De forma similar a administração dos ESN em doses repetidas de 2000 mg/kg/animal em camundongos e coelhos, não causaram toxicidade sistêmica, morte, alterações comportamentais e discrepância sobre os parâmetros avaliados em camundongos e coelhos machos/fêmeas tratados em relação aos seus respectivos controle.

Os extratos secos nebulizados foram padronizados com os marcadores quercetina para *M. urundeuva*, *A. colubrina* e canferol para *P. pyramidalis* mostraram-se viáveis para o desenvolvimento de formulações com baixa toxicidade. Esse trabalho contribui para uma melhor compreensão da toxicidade aguda das plantas *M. urundeuva*, *P. pyramidalis* e da *A. colubrina*, que são comumente utilizadas no Cariri paraibano.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ADEBAYO, J. O. *et al.* Effect of ethanolic extrat of bougainvillea spectabilis leaves on haematological and serum lipid variables in rats. **Biokemistri**, v.17, p.45-50, 2005.

AFANAS'EV, I. B. *et al.* Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

AGANATHAN, S. K.; MANDAL, M. Efeitos antiproliferativos do mel e dos seus polifenóis: uma revisão. **Journal Biomed Biotechnol**, 2009.

AGRA, M. F. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 18: 472- 508. 2008.

AGRA, M. F. Plantas da medicina popular dos cariris velhos (Paraíba – Brasil): espécies mais comuns. **Editora União**: João Pessoa, 1996.

AGRA, M. F. *et al.* Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 17 n. 1, p. 114-140. 2007.

AIYER, H. S. *et al.* Influência de Berry-Polyphenols na sinalização do receptor e Célula-Death Pathways: Implicações para a prevenção do cancro da mama." **Journal Agric Food Chem**. v.60, n.23, p.5693-708. 2012.

ALBUQUERQUE, R. J. M. *et al.* Chalcones from Myracrodruon urundeuva are efficacious in guinea pig ovalbumininduced allergic conjunctivitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 21, n. 6, p. 953-962. 2011.

ALBUQUERQUE, R. J. M. *et al.* Análise clínica e morfológica da conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 43-68, 2004.

ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. **Journal Ethnopharmacol**. v.114, n.3, p. 325–354, 2007.

ALMEIDA, A. C. *et al.* Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.40, n.200-203, 2010.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. *et al.* Medicinal plants popularly used in the Xingó region a semi-arid location in northeastern Brazil. **Journal Ethnobiol Ethnomed**. v.2, n.1, p.15. 2006.

ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* Diploflavone, a new flavonoid from Diplotropis ferruginea Benth.(Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n. 6B, p.1454-1457, 2005.

ALMEIDA, S. P. *et al.* Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **Embrapa-CPAC**, 1998. 188p.

ALSTCHUL, S. R. VILCA and its use. In: EFRON, Daniel H.; HOLMSTEDT, Bo; KLINE, Nathan S. **Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs**. New York: Raven Press, p. 468, 1979.

ALTSCHUL, S. V. R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray herbarium of Harvard University**, n. 193, p. 3-65, 1964.

ALVES, P. M. *et al.* Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 222-224, 2009.

ALVIANO, Wagner S. *et al.* In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 6, p. 545-552, 2008.

AMORIM, I. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. L. Fenologia de espécies lenhosas da caatinga do Seridó, RN. **Revista Árvore**, v.33, n.3, p.491-499, 2009.

AMORIM, S. L. *et al.* Estudo experimental com plantas cianogênicas em bovinos. **Pesq. Vet. Bras**, v. 24, p. 5-6, 2004.

ANDRADE, M. W. *et al.* Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ARAÚJO, E. R. D. *et al.* Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente à bactérias gram negativa e gram positiva. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.

ARAÚJO, E. L. *et al.* Diversidade de herbáceas em microhabitats rochoso, plano e ciliar em uma área de caatinga, Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, ArtMed v. 2, 2005.
BAHIA, M. V.; BATISTA, J. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Outros biflavonóides de *Caesalpinia pyramidalis***. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN – 210, Águas de Lindóia – SP, 2006.

BAHIA, M. V. *et al.* Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, 2005.

BAHIA, M. V.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1297-1300, 2010.

BAILEY, S. A.; ZIDELL, R. H.; PERRY, R. W. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. **Toxicologic pathology**, v. 32, n. 4, p. 448-466, 2004.

BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. New chalconoid dimers from *Myracrodruon urundeuva*. **Natural Product Letters**, v. 4, n. 2, p. 113-120, 1994.
BANDEIRA, M. A. M. **Myracrodruon urundeuva Allemão (Aroeira-do-sertão): Constituintes químicos da planta em desenvolvimento e adulta**. 2002. 174p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BARBOSA JUNIOR, A. M. et al. Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 17, n. 1, p. 120-132, 2015.

BARDOCZ, S. *et al.* The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 04, p. 613-626, 1996.

BARNES, D. G., DOURSON, M. L. Reference dose: Description and use in health risk assessments. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** 8, 471-486, 1988.

BEHLING, E. V. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BOELSTERLI, Urs A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **The Journal of toxicological sciences**, v. 28, n. 3, p. 109-121, 2003.

BORGES-DOS-SANTOS, Roberto Robson et al. Biological effect of leaf aqueous extract of *Caesalpinia pyramidalis* in goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BOTELHO, Marco Antonio et al. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 442-449, 2008.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste especialmente do Ceará**. 3a Edição. Coleção Mossoroense, Fortaleza-CE, Brazil, 1976.

BRAGA, R. Plantas do nordeste. 2ª edição. Fortaleza: **Imprensa Oficial do Ceará**. 540p. 1960.

BRANCO, A. C. S. C. *et al.* Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

BRANDÃO, M. G. L. Dossiê Técnico de Produção de chás e extratos de plantas medicinais. **Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC**. 1 ed, p.25. 2007.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. **Resolução-RDC nº 14, de 31 de março de 2010.** Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 05 abr. 2010.

BRASIL. **Aprovação da Portaria Interministerial nº 2.960 de 9 de Dezembro de 2008.** Ministério da Saúde. 2008.

BRASIL. Aprovação da **Portaria nº 971 de 3 de Maio de 2006.** Ministério da Saúde. 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia do Brasil**, 5ª edição, Brasília DF, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC nº 26 de 13 de maio de 2014.** Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. D.O.U. Brasília DF, 2014

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPICSUS.** Brasília DF, 2006b.

BRASIL. **Resolução nº 90 de 16 de março de 2004.** Dispõe sobre o Guia para os Estudos de Toxicidade de Medicamentos Fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Diário Oficial da União.** Brasília, 18 mar. 2004.

BRENAM, J. P. M. Notes of Mimosoideae: I. *Kew Bull*, v. 10, n. 2, p. 161-192, 1955.
BRUNETON, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia.* AS/Espanha: **Ed. Acribia**, p. 159-169. 1991.

CALDERON-MONTANO, M. J. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298-344, 2011.

CALOU, I. *et al.* Neuroprotective properties of a standardized extract from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.(Aroeira-Do-Sertao), as evaluated by a Parkinson's disease model in rats. **Parkinson's Disease**, v. 2014, 2014.

CÂMARA, A. C. L. *et al.* Embryotoxic effects of Poincianella (Caesalpinia) pyramidalis leaves on pregnant rats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 29, n 2, p. 137 – 142, 2017.

CAMPOS, Afonso Celso Soares. **Estudo do uso do creme vaginal de Aroeira do Sertão (myracrodruon urundeuva–All) em pacientes atendidas no ambulatório de Ginecologia de uma unidade básica de saúde em Fortaleza.** Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 2008.

CAMPOS, S.V.; AMARAL, L.M.S. Toxicidade sobre aguda e sub crônica. In: CORRÊA, Cristiana Leslie et al. **Bases científicas para a avaliação da toxicidade de agrotóxicos.** ILSI, cap 4. p. 95 – 130. 2009.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-dapraia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytother Res.** v. 27, n. 5, p. 692-698, 2013

CARLINI, E. A. *et al.* Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342. 2010.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, C. M. G. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2007.

CAVALCANTE, A. R. S. M. *et al.* Análise tensional e morfológica da anastomose colônica na colite induzida por ácido acético a 10%, em ratos Wistar, tratados com extrato aquoso de aroeira-do-sertão a 10% (*Myracrodruon urundeuva* fr. all.). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 180-186, 2005.

CAVALCANTE, Y. T. D. C. *et al.* Pesquisa de toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allem. frente à *Artemia salina*. **Revista Interdisciplinas Ciência e Saúde**. v.3, n. 2, p:146-150. 2016.

CHAVES, M. C. *et al.* Experimental evaluation of *Myracrodruon urundeuva* bark extract for antidiarrhoeal activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 8, p. 549-552, 1998.

CHAVES, T. P. *et al.* Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, 2013.

CHEN, S. S.; MICHAEL, A.; BUTLER-MANUEL, S. A. Avanços no Tratamento do Câncer de Ovário: Um Papel Potencial de Fitoquímicos Antiinflamatórios. **Discov Med** . v.13, n. 68, p. 7-17, 2012.

CNCFlora. **Centro Nacional de Conservação da Flora. Lista Vermelha.** Disponível em < <http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/pt-br/listavermelha>> Acesso em 15 de jan de 2017.

COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia**. 2. ed. Belém: CEJUP, 1994

CONCEIÇÃO, M. **As plantas medicinais no ano 2000**. 2. ed. São Paulo: TAO, 1982

- CORRÊA, C. L. *et al.* **Bases científicas para a avaliação da toxicidade de agrotóxicos.** ILSI, cap 3. p. 95 – 130. 2009.
- CORREA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 1, 1978.
- CRAVEIRO, A. C. S. *et al.* Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, n. supl, p. 739-743, 2008.
- CRUZ, M. C. S. *et al.* Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007.
- DANTAS, J. D. P. **Contribuição científica à medicina tradicional dos Tapebas do Ceará: *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. – (aroeira-do-sertão).** Trabalho de conclusão de curso (Monografia), Fortaleza, Universidade Estadual do Ceará, 2003.
- DESMARCHELIER, C. *et al.* Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.
- DINIZ, M.F. F. *et al.* Padronização do parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar. **Rev. bras. ciênc. saúde**, v. 10, n. 2, p. 171-176, 2006.
- DINIZ, P. B. F., THOMAZZI, S. M. **Avaliação de mecanismos envolvidos na gastroproteção induzida pelo extrato hidroalcoólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul.** Dissertação. Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, p.63, 2014.
- DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. **Pesq. Vet. Bras**, v. 4, n. 3, p. 89-96, 1984.
- EMANUELLI, M. P. *et al.* Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.
- FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SCHENKEL, E. P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 724, 2007.
- FAUSTMAN, E. M. *et al.* Dose-response assessment for developmental toxicity I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Toxicological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 478-486, 1994.

FIGUEIRÔA, J. M.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.3, p.573-580, 2004.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FREITAS, M. S. M. *et al.* Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 3, p. 30-34, 2004.

GAINO, A. P. S. C. *et al.* Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 5, p. 1631-1643, 2010.

GATTO, M. T. *et al.* Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 2, p. 269-272, 2002.

GEORGETTI, S. R. *et al.* Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1521-1527, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, p. 364, 2006.

GROSS E, CORDEIRO L., CAETANO FH. Ultraestrutura do nódulo e crescimento inicial de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. Var. *Falcata* (Benth.) Altschul. **Plantas infectadas com rizóbios**. v. 90, p 175-183, 2002.

GUO, Y. *et al.* Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 5, p. 896-905, 2013.

GUTIERREZ-LUGO, M. T. *et al.* Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta medica**, v. 70, n. 03, p. 263-265, 2004.

HALEAGRAHARA, N. *et al.* Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 38-46, 2017.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HOFF, Janet. **Methods of blood collection in the mouse**. 2000.

IBAMA. **Portaria nº 83, de 26 de setembro de 1991**. Diário Oficial da União. Brasília, 1991.

ISONO, Y.; ARAYA, G.; HOSHINO, A. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol fermentation on γ -alumina particles using a spray-dryer. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 743-746, 1995.

JANDÚ, J. J. B. *et al.* Myracrodruon urundeuva bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n. 8, p. 413-418. 2013.

JONES, C.T.; HUNT, D. H.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000.

KAHRAMAN, A. *et al.* The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, n. 1, p. 133-142, 2003.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego, Academic press, p. 932, 1997.

KOBORI, M. *et al.* Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 2, p. 300-312, 2016.

KUMAR, A. D. N. *et al.* Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H₂O₂ induced cytotoxicity in lung and liver cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 376, 2016.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In : SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária UFRGS/ UFSC, 5 ed. Cap. 1102. 2003.

LEE, E. S. *et al.* The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1169-1174, 2003.

LEITE, R. S. *et al.* Standardisation and stability evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* alemão obtained by a spray drier. **Int J PharmPharmSci**, n.9, v.2, p.154-159, 2017.

LIMA, C. R. *et al.* Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico sanativo®. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25 n.4 p 544-549, 2006.

LIMA, M. P. M. Morfologia dos frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Leguminosae-Mimosoideae) aplicada à sistemática. **Rodriguésia**, p. 53-78, 1985.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. L. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Braz J Food Technol**, v. 7, n. 2, p. 187-90, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, v. 4, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LUNA, J. S. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MACHADO, A. C. *et al.* Evaluation of tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) extracts: a histologic and edemogenic study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 4, p. 414-418, 2012.

MACÍA, M. J.; GARCÍA, E.; VIDAURRE, P. J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 337-350, 2005.

MAIA, G. N. **Caatinga arvores e arbustos e suas utilidades**. Leitura & Arte, 2004.

MATOS, F. J. A. *et al.* **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Editora UFC, Fortaleza, 2004.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Editora UFC, 2002.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In: Rahman, A. (Org.). **Studies in natural products chemistry**, v. 9, p. 383-409, 1991.

MEDEIROS, A. C. S. **Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma alongo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.)** Trabalho de conclusão de curso (Tese). Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1996.

MEDEIROS, J. G. F. *et al.* Fungos associados com sementes de flamboyant-mirim (*Caesalpinia pulcherrima*): incidência, efeito na germinação, transmissão e controle. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 71, p. 303, 2012.

MEDEIROS, R. M. T. *et al.* Toxic plants for ruminants in the state of Paraíba, northeastern Brazil. In: **World Buiatrics Congress (CD Rom)**, p. 10141-10150, 2000.

MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantanacamara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação). Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

MELLO, JRB et al. Estudo de extratos de *Nierembergia veitchii* Solanaceae sobre a fertilidade de ratas. **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, v. 12, p. 132, 1997.

MELLO, Márcia Sarpa de Campos. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. Trabalho de conclusão de curso (Tese), Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

MELO, I. R. B. U. *et al.* The pollen of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Is toxic to honeybees (*Apis mellifera*). **Arthropod-Plant Interactions**, v.7, p.463 – 466, 2013.

MENDES, C. C. *et al.* Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 205-207, 2000.

MENDONÇA, E. H. M. *et al.* Effect Of Different Sources And Concentrations Of Mineral Nitrogen on Growth and Nodulation of Two Angico Species. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 1996.

MENEZES, A. M.; RAO, V. S. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**. v. 21, n. 3, p. 531-533, 1987.

MENEZES, T. E. C. *et al.* Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 3, p. 300-305, 2010.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, 2005.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 173-186, 2006.

MORAIS, S. A. L. *et al.* Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 447-452, 1999.

MORETÃO, M. P. *et al.* Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, n. 2, p. 189-197, 2004.

MORTON, D.M. Importance of species selection in drugtoxicity testing. **Toxicology Letters**, v.102, p.545- 50, 1998.

MUTHUKALA, B.; SIVAKUMARI, K.; ASHOK, K. *In silico* docking of Quercetin compound against the Hela cell line proteins. **Int J Curr Pharm Res**, v. 7, p. 13-16, 2015.

NAPOLEÃO, T. H. *et al.* Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 52-59, 2011.

NEPOMUCENO, C. F. *et al.* Control of leaf abscission and in vitro morphogenesis in cultures of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

NETTO, E. M. *et al.* Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, n. 03, p. 9-17, 2013.

NILE, S. H. *et al.* Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. **Food Chemistry**, v. 235, p. 119-126, 2017.

NISHIMURO, H. *et al.* Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2345-2358, 2015.

NITIEMA, L. W. *et al.* In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. **Int J Microbiol Res**, v. 3, n. 3, p. 183-7, 2012.

OECD. **Guideline for testing of chemicals**. OECD 407 – Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008

OECD. **Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation**. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, September 2000.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420**. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001b.

OECD. **Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures**. OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT, n 33., p. 249, 2001a.

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. D. L. Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 384-386, 2007.

OLIVEIRA, J. C. S. **Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul (Leguminosae)**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Universidade Federal da Bahia, 2010.

PATREZE, C. M.; CORDEIRO, L. Simbioses micorrízicas fixadoras de nitrogênio e vesiculares-arbusculares em algumas leguminosas tropicais de tribo Mimoseae. **Forest EcolManag1**, v.96, p. 275-285, 2004.

PAULA, J. E. Estudo das estruturas internas das madeiras de dezesseis espécies da flora brasileira, visando seu aproveitamento para produção de álcool, carvão, coque e papel. **Brasil Florestal. Brasília**, v. 11, n. 47, p. 23-50, 1981.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. **Inflamações. Patologia**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.113-148, 2000.

PESSOA, J. G. *et al.* Avaliação da Toxicidade do Extrato Metanólico de *Caesalpinia Pyramidalis*, Submetido à Radiação Gama, frente à *Artemias Salinas*. **Associação Brasileira De Energia Nuclear – ABEN**, 2013.

PESSOA, W. S. *et al.* Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 27, n. 10, p. 655-670, 2012.

PRABU, P. C.; PANCHAPAKESAN, S.; RAJ, C. D. Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Assessment of the Hydroalcoholic Extract of *Withania somnifera* Roots in Wistar Rats. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1169-1178, 2013.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 1. ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, v. 1, p. 443, 2009.

RAZA, M. *et al.* Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

REIS TUROLLA, M. S.; DE SOUZA NASCIMENTO, Elizabeth. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

REIS, S. D. S. *et al.* Congenital malformations and other reproductive losses in goats due to poisoning by *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz (= *Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Toxicon**, v. 118, p. 91-94, 2016.

REMILI, H.; BOUSSARD, P.; DEVLEESCHOUWER, M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plant extracts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 5, p. 265-268, 1994.

RIBEIRO, A. R. S. *et al.* Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 383-388, 2013.

RIZZINI, C. T. **Arvores e madeiras uteis do Brasil; manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, p.296, 1971.

ROBINSON, W. F.; MAXIE, M.G. The cardiovascular system, p. 1-100. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. ; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. v. 3, 4th ed. Academic Press, San Diego. 1993.

RODRIGUES, E. R. *et al.* Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal.[XI. *Chiococca Alba* (L.) Hitchc]. **Rev. Bras. Pl. Méd**, v. 8, n. 4, p. 169-172, 2006.

RODRIGUES, P. A. *et al.* Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 113-122, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5a ed. Pharmaceutical Press, London/Chicago, 2006.

RUNHA, F. P. *et al.* Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. **Food and bioproducts processing**, v. 79, n. 3, p. 160-168, 2001.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. **The Principles of Humane Experimental Technique.**, p.238 1959.

SÁ, R. A. *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.

SÁ, R. A. **Constituintes químicos da madeira de lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos**. Trabalho de conclusão de curso (Doutorado). Recife, Universidade Federal de Pernambuco, p. 157, 2008.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. 2 ed. Porto alegre: Rigel, 1989.

SANTANA, D. G. *et al.* Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 445-455, 2012.

SANTIN, D. A.; LEITAO, F. H. F. Restabelecimento e revisao taxonomica do genero *Myracrodruon* Freire Allemao (Anacardiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 14, n. 2, p. 133-145, 1991.

SANTOS, C. A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1077-1083, 2011.

SANTOS, C. A. **Estudo farmacologico do extrato etanolico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul.(Leguminosae)**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) Universidade Federal de Sergipe, 2010.

SANTOS, J. P.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Richness and distribution of useful woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of arid environments**, v. 72, n. 5, p. 652-663, 2008.

SANTOS, J. S. *et al.* Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218-222, 2013.

- SANTOS, M. C.; SANTOS, F. R. Levantamento florístico e fitossociológico em sistema agrossilvipastoril como fonte de alimento para a ovinocultura no semi-árido sergipano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 15-20, 2012.
- SARAIVA, A. M. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae). **Biofar**, v.7, n.2, p 52-60, 2012.
- SARAIVA, M. E. *et al.* Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.
- SCHENKEL, E. P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 724, 2007.
- SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Manole, 2002.
- SHOSKES, D. A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents¹. **Transplantation**, v. 66, n. 2, p. 147-152, 1998.
- SILVA JÚNIOR, J. O. C. *et al.* Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. supl, p. 671-677, 2006.
- SILVA, M. D. **Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga em Pernambuco**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.
- SILVA, V. C. *et al.* Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2011.
- SILVA, C. G. *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.
- SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação). Universidade Federal do Piauí, p. 167, 2014.
- SILVA, L. B. *et al.* Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul.(Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, p.436-445 2009.
- SILVA, R. M. F. *et al.* Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

- SILVA, S. L. *et al.* Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SOOBRAATTEE, M. A. *et al.* Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1, p. 200-213, 2005.
- SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais: Astronium urundeuva (Anacardiaceae)**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 2012.
- SUCHAL, K. *et al.* Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1401-1408, 2016.
- TAN, W. *et al.* Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European journal of pharmacology**, v. 459, n. 2, p. 255-262, 2003.
- TEO, S. *et al.* A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.
- TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999.
- TOKARNIA, C. H. *et al.* Estudos experimentais com plantas cianogênicas em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 84-90, 2014.
- TORRES, C. M.; REPKE, D. B. **Anadenanthera: visionary plant of ancient South America**. Psychology Press, p. 256, 2006.
- TRENTIN, D. S. *et al.* Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. 1-13, 2013.
- TUROLLA, M. S. R., NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Cien Farm** 42: 189-306. 2006.
- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.
- TU, L. *et al.* The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano. **Scanning**, 2016.
- VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and cell**, v. 39, n. 3, p. 151-160, 2007.

VIANA, G. S. B. *et al.* Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 118-122, 1997.

VIANA, G. S. B. *et al.* Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. **Fortaleza: UFC**, 1995.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 2-3, p. 189-195, 2003.

VIEIRA, L. M. *et al.* Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 521-527, 2015.

WANG, C. *et al.* Os lignanos e os flavonóides inibem a enzima aromatase em pré-adipócitos humanos." **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** . v. 50, n. 3-4, p. 205-12, 1994.

WEBER, C. R. S. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.)**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

WHEATER, M. A.; BYARS, M. Kaempferol Effects on Human Gingival Fibroblasts. **J Oral Health Dent Care**, v. 1, p. 003, 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific, 1993.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. World Health Organization, Geneva, p 71, 2000.

XIAO, D.; ZHU, S.; GU, Z. Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 18, n. 3, p. 280-283, 1997.

YOSHIDA, M. *et al.* The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. **FEBS letters**, v. 260, n. 1, p. 10-13, 1990.

APÊNDICE

Original Article

THE STUDY OF THE ACUTE AND SUB-ACUTE ORAL TOXICITIES OF THE NEBULIZED EXTRACT OF *MYRACRODRUON URUNDEUVA* ALLEMÃO IN RABBITS

ISLAINE DE SOUZA SALVADOR^a, RENATA DA SILVA LEITE^b, VALMIR GOMES DE SOUZA^a, FABRÍCIO HAVY DANTAS DE ANDRADE^b, RAYANNE SALES DE A. BATISTA^a, FÁBIO SANTOS DE SOUZA^a, RUI OLIVEIRA MACEDO^a

^aDepartamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, Brazil, ^bDepartamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil
Email: islaîne_vst@yahoo.com.br

Received: 22 Oct 2016 Revised and Accepted: 27 Feb 2017

ABSTRACT

Objective: The aim of this research was to evaluate the acute and sub-acute oral toxicities of the nebulized dried extract of *Myracrodruon urundeuva* (NDEMU) leaf obtained by the spray drying technique on rabbits.

Methods: In the acute toxicity study, the amount of nebulized dried extract (NDE) administered was adjusted to a dose of 2000 mg/kg of leaf powder of *M. urundeuva* to 6 rabbits once orally and were observed for 14 days. In the sub-acute study, the amount of NDEMU administered was adjusted to a dose of 2000 mg/kg/day of 6 rabbits once daily for 30-day, orally. The appearance of toxic symptoms was observed every day, followed by each rabbits' food and drink intake. Haematological and biochemical analysis were observed and statistical analysis was performed on them. The rabbits were killed at the end of the study, and their organs were weighed and examined before organ histology were evaluated.

Results: No toxic signs and no mortality were observed in the acute and sub-acute study. In the sub-acute study, the amount of dried extract administered was adjusted to a dose of 2000 mg/kg of leaf powder of *M. urundeuva* to 6 rabbits once daily for 30 days, orally. No toxic signs and no mortality were observed. There were no significant changes ($p < 0.05$) in the body weights, organ weights and haematological-biochemical parameters in any of the dose levels. No related histo-pathological lesions were observed.

Conclusion: The results indicate that the treatment of repeated doses with the dried NDEMU showed low toxicity in rabbits.

Keywords: *Myracrodruon urundeuva*, Quercetin, Nebulized dried extract.

© 2017 The Authors. Published by Innovent Academic Science Periodic. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22225/ijpp.2017v9i4.16348>

INTRODUCTION

Myracrodruon urundeuva allemão (MUA) belongs to the tree family Anacardiaceae, commonly found in the northeast of Brazil [1]. Every plant contains a certain unique type of chemical substances/ compounds, which are produced during the normal growth and development of the plant body [2, 3]. In folk medicine, the plant is used in treatment of bleeding, respiratory and urinary infections, gastritis, gastric ulcers, cervicitis, vaginitis and hemorrhoids [2].

Studies with extracts of the stem of MUA identified diester, chalcone and tannins that have analgesic and anti-inflammatory activity [4]. It has been reported that ethanol extracts of the stem bark of MUA possess potential activity against rotaviruses [5]. Other studies have demonstrated healing activity, antioxidant and antitumorogenic effects [6-10]. The dry extract MUA showed anti-inflammatory activity in mice orally [11].

Phytochemical studies of the stem and leaf of MUA shown that have similar compounds which were analyzed in tannins, flavonoids, monoterpenes and sesquiterpenes, diterpenes and steroids, and leucoanthocyanidins condensed proanthocyanidins, and sugars [12]. Quercetin is a flavonoid identified in MUA [13].

Almeida et al. [14] demonstrated that MUA is highly toxic when administered intraperitoneally 8 mg/kg. However [4] demonstrated that aqueous and hydroalcoholic extracts of MUA exhibited low toxicity when administered orally in mice.

The production of herbal medicines has developed new technology for obtaining a dry extract. An advantage of new technologies is that it has allowed for lower storage costs and higher concentration and stability of the active substances, which allow longer storage periods and reducing shipping weights [15-17].

The present study was conducted to evaluate acute toxicity (14 d) and sub-acute (30 d) toxicity of the oral administration in rabbits of nebulized dry extracts of *M. urundeuva* leaves obtained by spray drying technique.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and chemicals

Myracrodruon urundeuva (Anacardiaceae) leaves were collected on the farm Catribas in Caruaru in the state of Paraíba, in Brazil. Entire plants were collected during the flowering stage, in May 2012. A representative sample of this species was deposited in the Lauro Freire Xavier herbarium of the federal university of Paraíba (UFPB) registration no. NC248. The botanical material was dried at 50±2 °C in circulating air oven and reduced to powder.

Solvents high-performance liquid chromatography (HPLC) grade were purchased from Tedia Co. (Phoenic, AZ-USA). The standard employed in the analyses was quercetin dehydrate CAS-117-30-5 (97% pure) that had been acquired by Merck, Brazil.

Preparation of dried extract

The leaves of the MUA were air-dried in shade and finely powdered. The leaves fluid extract were prepared by the maceration method using a proportion of 20% of leaves powder for solvent system ethanol-water (1:1) at 25 °C for 120 h. The extract was filtered with Whatman filter paper no 1 (Millipore, Malaysia) and adjacent colloidal silica on dioxide (SiO₂) were added to the dried residue at a proportion of 10% to yield the fluid mixture extract which were used to prepare dried extract. The spray-dried extracts were obtained in a spray drier (model SD-05 of LabPlant®) following operating conditions: flow of 3 ml/min; inlet temperature of 180 °C; spraying pressure of 2 bar; air flow of 62 m³/h.

Identification and quantification of quercetin by HPLC

The quercetin (Sigma-Aldrich) biomarker was monitored in hydroethanolic and sublimed dried extract (NDE) of MIA. The analysis of quercetin in extracts was carried out using an HPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) consisting of a model LC-20AD, a model SIL-20A autosampler, a model SPD-M20A diode array detector, DGU-20A5 in-line degasser and software Class VP (version 6.14) were used for data acquisition and analysis.

The injections 20 μ l were carried out on a Phenomenex (Torrance, California, USA) Luna C18 5 μ m (250 \times 4.6 mm) conditioned in a Shimadzu CTO-10AS VP column oven equilibrated at 40 °C, with detection at 370 nm. Solvent systems were acapied in isocratic conditions using a mixture of methanol/phosphoric acid 1% (47:53, v/v). The flow rate was 1.2 ml/min at 30 min. The identification of quercetin was compared the retention time and UV-Vis spectra of the peaks with those previously obtained by the injection of standards.

Quercetin quantitates determination were based on the external standard method by comparison with the standard retention time of pure quercetin ($y = 16948x - 6154.0$, $R^2 = 0.99$) [Sigma-Aldrich]. Parameters of validation such as selectivity, linearity, detection (LOD) and quantification limits (LOQ) and precision or relative standard deviation (RSD, %) were established [18-20]. The LOD and LOQ were evaluated on the basis of the noise obtained with analysis of non-spiked blank samples for quercetin $n = 3$. LOD and LOQ were defined as the concentration of the analyte that produced a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively [18]. The total quercetin the LOD and LOQ were estimated by the slope and mean standard deviation of quercetin concentrations used in the standard curves [19, 20]. The LOD for the quercetin was of 0.16 μ g/ml and the LOQ ranged 0.56 μ g/ml. Results of six parallel experiments indicated that precision or RSD were 2.5%.

Experimental animals

Adult healthy male and female *Cuniculus caryacus*, New Zealand rabbits (0 w, 1.4 and 1.3 kg, respectively) were used for the repeated dose toxicity experiments. They were came from the animal house of the Research Institute for Drugs and Medicines of UFPA and housed in plastic cages under normal laboratory conditions (12h light/dark cycle, 22 \pm 2 °C) for an acclimatization period of 7 d prior to the experiment. All the animals were given food and water *ad libitum*. The bioassay was conducted in accordance with the internationally acceptable guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines [21-23]. All experiments were performed in accordance with the protocol approved by the animal experimentation committee of the UFPA (number 0207/10).

Acute oral toxicity study

In order to study any possible toxic effect or changes in normal behaviour, two groups of 6 rabbits (3 males and 3 females) were used in this experiment. The control group received distilled water, and test groups received the NDEMU dissolved in water by the oral route. The amount of NDE administered was adjusted to a dose of 2000 mg/kg of leaf powder of MIA. This dose was equivalent to a concentration of quercetin of 142.6 μ g/ml. These doses were chosen after several screenings on mice.

The experimental animals were deprived of food for 2h prior to extracting administration. They were continuously monitored after administration in 0, 15, 30 and 60 min and every 4 h to 12 h and daily for 14 d thereafter for any signs of toxicity such as changes in behavior, breathing, piloerection, diarrhea, excessive salivation, hyperaesthesia, reduced mobility, aggressiveness, reaction to stress, weight loss, stasis and mortality. During that period, the animals were supplied food and water *ad libitum*.

Repeated-dose toxicity study

Healthy male and female rabbits were divided into two groups of 6 rabbits (3 males and 3 females). The control group received distilled water, and test groups received the NDEMU dissolved in water by

oral route for 30 consecutive days. The amount of NDE administered was adjusted to a dose of 2000 mg/kg/d of leaf powder of MIA.

During the treatment, the food consumption and water intake of the animals were recorded on an alternate day. Animals were observed twice daily for signs of toxicity, such as piloerection, diarrhea, and changes in locomotor activity, reaction to stimuli, stasis, loss of reflex and mortality. At the end of the 30-day treatment, they were then anesthetized with thiopental 35 mg/kg, and blood samples were obtained and collected in two tubes: one tube containing the anticoagulant ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) and one tube without anticoagulant for hematological and biochemical parameters, respectively. This work was carried out following the welfare of animals as recommended [21].

Hematological and biochemical analysis

Hematological analyses were carried out immediately after collection using an automatic hematology analyzer DC-3000 plus, Mindray®. Parameters included red blood cell (RBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), globular volume (GV) and platelet count. For biochemical analysis, blood was centrifuged at 3000 rpm for 5 min to obtain serum, and the following parameters were determined: glucose, uric acid, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol, triglycerides, total protein, total bilirubin, potassium, sodium and alkaline phosphatase. Dosages were made using an automatic biochemical analyzer BS 300 Mindray®.

Morphological study

After blood collection, the animals were euthanized with an excess of thiopental (140 mg/kg), and a necropsy was performed for macroscopic external evaluation of the heart, lungs, liver, kidneys and spleen. These organs were carefully removed and weighed individually. Organ weights were expressed in and relative terms (g/100 g of body weight).

Histological analysis

The organs described previously of each group were fixed in 10% formalin for one month and then, embedded in paraffin (Sigma-Aldrich). Sections of 5-6 μ m were routinely stained with hematoxylin (Sigma-Aldrich) and eosin (Sigma-Aldrich) and examined under a light microscope (Olympus CH2).

Statistical analysis

The values were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by comparison between two groups used the test "t" Student using the software Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA), and the results were considered significant when presented values of * $p < 0.05$.

RESULTS

Identification and quantification of quercetin by HPLC

HPLC analyses were performed to assess the extract composition after the drying process by a spray dryer, and flavonoid quercetin was monitored biomarker, this substance was identified and quantified as hydroethanolic and NDEMU. Chromatograms of the sample of standard chemical quercetin of the hydroethanolic extract and NDE of *M. arundinacea* are illustrated in Fig. 1. Peak retention times of quercetin in the standard sample, hydroethanolic extract and dry extract were 10.1, 9.7 and 9.7 min respectively.

From the spectra of GV, absorption of quercetin was obtained purity curves of the quercetin peak for extract samples, and peak purities indexes were 0.99 for the hydroethanolic extract and for dry extract. The concentrated hydroethanolic extract and NDEMU presented values for quercetin of 14.82 \pm 0.25 and 15.87 \pm 0.12 μ g/ml, respectively.

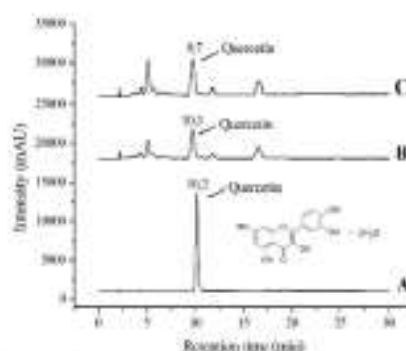


Fig. 1. Chromatograms for sample chemical standard quercetin (A), hydroethanolic extract (B) and dry extract (C) of *M. arundinacea*. For chromatographic conditions, see Section 2

Acute toxicity

No distal toxicity signs were observed in the extract treated group compared to the control group.

Table 1 show that oral administration of NDEMU at a dose 2500 mg/kg did not cause a significant change in water and feed consumption of the test rabbits when compared with their respective control group ($P < 0.05$).

Table 1. Effect of NDEMU treatment on the water intake and feed consumed by groups of rabbits

Parameters	Male			Female		
	Control	Test	p^a	Control	Test	p^a
Water (ml)	207.9±3.841	203.6±4.066	0.447	212.9±4.621	206.8±4.435	0.351
Feed (g)	228.2±13.05	228.5±13.20	0.601	231.8±13.24	224.9±13.92	0.721

Values are expressed as mean±SEM (n = 3/group). $^aP < 0.05$, when compared to control group treated with NDEMU (Analyzed by Student's t-test)

Repeated-doses toxicity

Oral administration at repeated doses of the NDEMU in rabbits of both sexes did not cause death or any clinical signs of toxicity. The oral ingestion of NDEMU over 30 d caused no significant changes in

weight of the organs in the treated as compared to the control animals ($P < 0.05$) the results are shown in table 2. The intake of NDE of *M. arundinacea* in the rabbits studied for 30 d did not cause significant changes in haematological parameters when compared to the control group ($P < 0.05$) the results are shown in table 3.

Table 2. Effect of the NDEMU on relative organ weight (g/100g of animal body weight) rabbits treated orally for 30-day

Parameters	Male			Female		
	Control	Test	p^a	Control	Test	p^a
Heart (g)	4.367±0.1054	4.933±0.2160	0.151	5.900±0.404	4.767±0.133	0.056
Liver (g)	51.67±2.576	52.50±3.900	0.969	73.60±3.329	69.17±3.282	0.396
Spleen (g)	0.660±0.011	0.770±0.109	0.370	1.143±0.307	0.795±0.0324	0.322
Kidney (g)	8.967±0.497	10.13±0.463	0.010	12.00±0.360	11.05±0.444	0.114
Lung (g)	5.600±0.472	11.53±0.640	0.073	8.067±0.633	8.050±0.259	0.211

Values are expressed as mean±SEM (n = 3/group). $^aP < 0.05$, when compared to control group treated with NDEMU (Analyzed by Student's t-test)

Table 3. Effect of NDEMU treatment on the haematological parameters of rabbits treated orally for 30-day

Parameters	Male			Female		
	Control	Test	p^a	Control	Test	p^a
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	4.960±0.115	4.390±0.688	0.387	4.433±0.284	4.700±0.264	0.530
Hemoglobin (g/dL)	12.10±0.6351	11.97±0.942	0.989	11.53±0.176	12.32±0.400	0.147
Hematocrit (%)	38.30±0.115	38.60±0.916	0.490	37.27±1.291	37.33±1.133	0.970
MCHC g/dL	34.00±0.560	33.63±0.310	0.653	34.60±0.750	34.57±0.240	0.969
GV ($10^3/\mu\text{L}$)	5.157±0.293	5.179±0.346	0.978	5.333±0.255	4.090±0.242	0.267
MCH [pg]	23.50±0.378	22.87±0.272	0.246	23.37±0.504	23.07±0.484	0.712
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	113.0±10.58	133.3±17.75	0.380	127.3±20.20	134.7±0.090	0.753
MCV [fL]	65.70±3.301	67.30±1.229	0.679	67.23±1.105	67.65±1.146	0.808

Values are expressed as mean±SEM (n = 3/group). $^aP < 0.05$, when compared to control group treated with NDEMU (Analyzed by Student's t-test). MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet and GV: globular volume.

The serum biochemical results in rabbits are presented in table 4. Results showed that the treatment did not affect the biochemical parameters of test rabbits when compared with the control group ($P > 0.05$).

The histopathology results were shown in fig 2 and fig 3. It was not observed morphological changes in kidney, heart, lung, spleen and liver in all rabbits from all groups of study.

Table 4: Effect of NDEMU treatment on the biochemistry parameters of rabbits treated orally with for 30-day

Parameters	Male		p ^a	Female		p ^a
	Control	Test		Control	Test	
Glucose mg/dL	116.5±2.590	121.3±14.72	0.762	122.3±3.59	145.7±3.383	0.171
Cholesterol mg/dL	38.00±0.577	34.67±2.180	0.360	42.00±5.059	50.90±2.887	0.070
Urea mg/dL	39.00±5.196	35.00±2.646	0.520	44.67±2.283	44.50±1.687	0.965
Creatinine mg/dL	1.207±0.219	1.267±0.249	0.854	1.373±0.073	1.552±0.975	0.166
Alkaline phosphatase mg/dL	61.50±12.59	32.67±2.337	0.894	62.33±15.21	51.33±9.442	0.505
Uric acid mg/dL	0.3267±0.079	0.4433±0.004	0.370	0.2067±0.035	0.3233±0.024	0.716
Potassium (mmol/l)	0.027±0.433	7.199±0.335	0.201	5.963±0.655	6.680±0.473	0.425
Sodium (mmol/l)	151.0±2.807	149.0±2.537	0.629	146.0±4.503	145.5±0.280	0.918
AST U/l	135.0±0.577	104.7±15.39	0.120	106.0±5.508	120.0±5.383	0.121
ALT U/l	113.0±25.11	114.7±21.13	0.961	133.0±11.79	124.2±1.878	0.509
Total protein g/dL	5.723±0.413	6.097±0.407	0.554	5.727±0.539	5.937±0.210	0.736
GGT U/l	14.67±3.180	11.67±1.453	0.439	35.33±1.856	14.17±1.382	0.633
Triglycerides mg/dL	62.00±1.105	65.67±2.25	0.897	60.00±10.26	81.33±15.44	0.595
Total bilirubin mg/dL	0.8500±0.028	0.02667±0.012	0.497	0.0209±0.011	0.02333±0.014	0.802

Values are expressed as mean±SEM (n = 3/group). $P > 0.05$, when compared to control group treated with NDEMU (Analysed by Student's t-test). AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase and GGT: gamma glutamyltransferase.

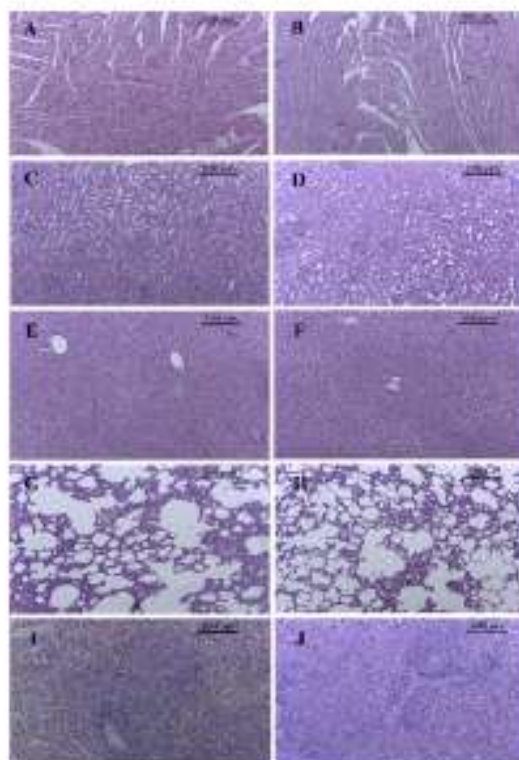


Fig. 2: Histological examination revealed that there were no changes observed of male rabbits due to the 30-day NDEMU administration in heart (A, B), kidneys (C, D), liver (E, F), lung (G and H) and the spleen (I and J)

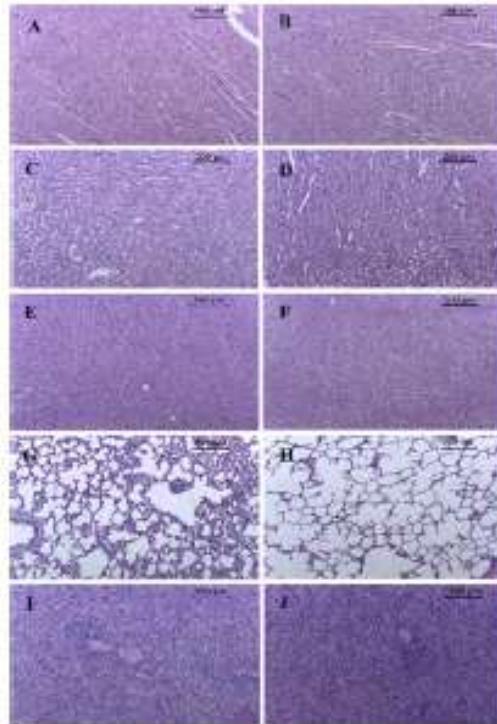


Fig. 3. Histological examination revealed that there were no changes observed of female rabbits due to the 20-day MDEMI administration in heart (A, B), kidneys (C, D), liver (E, F), lung (G and H) and the spleen (I and J)

DISCUSSION

Identification and quantification of quercetin by HPLC

Fig. 1 showed the chromatograms of the sample of standard quercetin of the hydroethanolic extract and NDEMI. Quercetin identification was based on comparing chromatographic behaviour (retention time) and UV-visible with an external standard. The concentrated hydroethanolic extract and NDEMI and the chromatographic profile remained similar after the drying process.

The standardization of plant extracts, through the identification and quantification of a substance for follow-up during the process, identification of the plant drug or to verify the presence of substances responsible for the pharmacological action is an indispensable parameter of evaluation for the quality control of plant products [24, 25]. The analytical method developed for the identification and quantification of quercetin by HPLC in the extract of *M. urundeuva* was efficient, fulfilling satisfactorily with the required quality parameters [26-28].

Acute toxicity

During the development of herbal medicine toxicology studies of pre-formulated products plant in animals are needed to ensure the use in humans. In the present study, there was the absence of observed toxic effects of NDEMI administered to rabbits making

possible its use for toxicological and pharmacological studies in humans by the oral route.

In the present work, the NDEMI did not induce changes in the water consumption of the female and food consumption of the male when compared with their respective control group (table 1). Acute intragastric administration of NDEMI at a dose equivalent to 2000 mg/kg of leaf powder weight to male and female rabbits caused no animal deaths and, therefore, it was not possible to determine LD₅₀.

Moreover, there were not observed signs of toxicity, including changes in behaviour, locomotion, respiration, piloerection, diarrhoea, drooling, altered muscle tone, hypoxic convulsions, hyper-rectability and writhing. There were no significant differences in the body weight gain between animals of the control and rats groups for 14 d monitoring. Meneses et al. [29] while working with alcoholic and aqueous extracts of *M. urundeuva* found no signs of toxicity in rats after acute administration (5000 mg/kg) or throughout a 20-day treatment (500 mg/kg).

Substances with LD₅₀ of 3000 mg/kg given orally are considered safe or of low toxicity [30]. Similarly, the chemical labeling and classification of acute systemic toxicity based on oral LD₅₀ values recommended by the organization for economic cooperation and development is considered relatively low acute toxicity LD₅₀ values between 2000 and 5000 mg/kg [31].

Repeated-dose toxicity

Oral administration at repeated doses 20 d of the NDEMU in rabbits of both sexes did not cause death or any clinical signs of toxicity.

In studies of repeated dose toxicity body weight gain and organ weight are considered important parameters and changes in these parameters can indicate a toxic effect of the drug [21]. Sub-acute toxicity study gives valuable information on the cumulative toxicity of a substance on target organs or physiological and metabolic effects of the compound at a low dose on prolonged exposure. A wide variety of adverse effects can be detected with sub-acute toxicity studies [22]. The oral ingestion of NDEMU over 30 d caused no significant changes in weight of the organs (i.e. liver, kidneys, heart, lung and spleen) in the treated as compared to the control animals (g/100 g of animal body weight) (table 2). Chronic toxicity studies with hydroethanolic bark extract of *M. urundeuva* stem in rats at doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg orally for 90 d showed mortality 20 and 30% and there were no changes in the histopathological and haematological parameters of animals [14].

The intake of NDEMU in the dose studied rabbits for 30 d did not cause significant changes in haematological parameters when compared to the control group (table 3). These data indicate that NDEMU had no effects on the circulating blood cells or on their production. The analysis of blood parameters is important for risk evaluation, as any changes in the haematological system have a higher predictive value for human toxicity when data are translated from animal studies [4].

The assessment of pathological changes in the organs of treated animals, both macro and microscopically, is the basis of a safety assessment [33]. The histopathology results were shown in fig 2 and fig. 3. There were no observed morphological changes in kidney, heart, lung, spleen and liver in all rabbits from all groups of study. According to the histopathological findings of the organs, significant morphological changes were not observed, indicative of cell or tissue damage in male and female rabbits compared to the control group animals indicating no toxicity in the organs studied. The absence of aspects and pathogenic mechanisms in tissues justified the values found in behavioural, haematological and biochemical testing when compared the control and the experimental groups.

Analysis of the biochemical parameters for the rabbits showed that the treatment did not affect serum levels of glucose, triglycerides, urea, total bilirubin, potassium, sodium, alkaline phosphatase, creatinine, AST, ALT, GGT, total cholesterol, VLDL, and total protein when compared with the control group indicating no change in the overall metabolism of the test animals (table 4). Since the enzyme AST was also found in a large number of tissues, such as heart, lung, skeletal muscle, and kidney, whereas ALT is primarily limited to hepatocytes, the latter is considered a highly sensitive indicator of hepatotoxicity [34]. Therefore the fact that the administration of *M. urundeuva* did not produce changes in these biomarkers suggests absence of renal and hepatic toxicity [35-37]. There was an increase of triglycerides and decreased alkaline phosphatase but the results are still within the range described for the species observed in other studies [36, 37].

Histopathological examination of the liver revealed the absence of congestion; cellular infiltrates that characterize an inflammation and absence of degenerations [38, 39]. The surface and staining the cellular composition of the kidneys did not have change; there was no presence of focal or multifocal hemorrhages. In the cortical and medullary layers were not observed congestion or degeneration and nephrosis [39-41]. The heart showed no congestion, the tunneled cardiac fibers, no eosinophilia or degeneration of bundles of cardiac fibers [40]. It was not observed in the lung congestion, pneumonia, edema, disappearance of ciliated cells of the bronchioles or deposition of refractive material, amorphous and eosinophilic [38].

CONCLUSION

The data suggest that oral administration of the NDEMU showed low toxicity in rabbits. The results showed an absence of acute oral toxicity of the NDEMU at the dose of 2000 mg/kg/day in rabbits. Based on the measurement of blood biochemical and haematological

parameters, and histological examinations of main organs that could eventually be affected by long-term administration of NDEMU indicate that administration of NDEMU not presented toxic effects for the rabbits. However further studies are needed to fully assess the safety of this product such as studies of chronic oral toxicity, reproductive toxicity, genotoxicity and carcinogenicity studies.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the fellowship received from Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

REFERENCES

1. Santos DA, Leido Filho HF. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* frente aléxico (*Anacardiaceae*). *Rev Bras Bot* 1981;14:133-45.
2. Lorenzi H, Matos TJA. Plantas medicinais no Brasil-culturas e exóticas. 1a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.
3. Diogo JM, Soares B, Amanda CS, Márcia IG, Claudete E. Medicinal plants of Brazil with analgesic activity. *J Crit Rev* 2010;3:1-4.
4. Viana GSB, Bandeira MAM, Matos TJA. Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Aléxico. *Phytomedicine* 2003;10:109-95.
5. Cecílio AB, Faria DB, Oliveira PC, Calder S, Oliveira DA, Sobral MEG, et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J Ethnopharmacol* 2012;141:975-81.
6. Carlini SA, Duarte-Azeite JM, Rodrigues E, Talach R. Antitumor effect of the pepper tree *Schinus molle* L. Raddi (*arsena-da-prata*) and *Myracrodruon urundeuva* Aléxico, *Anacardiaceae* (*arsena-da-verte*). *Rev Bras Farmacogn* 2010;20:148-6.
7. Demarcelleir C, Romão EL, Casado J, Ciccia G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts of medicinal trees used in the Catinga region in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 1999;67:69-77.
8. Cavalcante ARSM, Rodrigues LV, Mesones DB, Cunha MPSS, Goes ACAM. Taxonomic and morphological analysis of colonic anastomosis in 10% acetic acid-induced colitis in wistar rats treated with 33% *arsena-da-prata* aqueous extract (*Myracrodruon urundeuva* fr. All). *Acta Cir Bras* 2005;20:100-6.
9. Nobre-Junior HV, Oliveira RA, Maia FD, Nogueira MAS, Moraes MD, Bandeira MAM, et al. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem Res* 2009;34:1066-75.
10. Sá RA, Argolo ACC, Napoleão TR, Gomes FJ, Sanches NSG, Melo CML, et al. Antioxidant, fusarium growth inhibition and *Neisseria meningitidis* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva*. *Int Biodeterior Biodegrad* 2009;63:470-7.
11. Rosati S, Valmir GS, Azeite HO, José VCI, Ielaine SS, Rai OM, et al. Standardization and stability evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* Aléxico obtained by a spray-drier. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9:154-9.
12. Moreira JM, Lira Neto EMG, Amorim ELC, Strassmann RR, Araújo EL, Albuquerque UF. Tannin content in three sympatric medicinal tree species of the catinga. *Tree Magazine* 2005;29:995-1005.
13. Jandi JB, Silva LCN, Pereira APC, Souza RM, Silva Júnior CA, Figueiredo RCBQ. *Myracrodruon urundeuva* bark: antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxicity. *J Med Plants Res* 2012;7:413-8.
14. Almeida AC, Sobrinho EM, Pinho L, Souza FNS, Martins ER, Duarte ER, et al. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron coddingtonii* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. *Ciência Rural* 2010;40:260-3.
15. Andrade F, Albuquerque CAC, Maracichis M, Silva EL. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract:

- results of acute and 90 d subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol* 2012;50:328-34.
16. Shahina P, Anwar S, Anamica H, Vikas Y. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of methanolic leaf extract of *Coccoloba aquifolium* Vahl. *Asian J Pharm Clin Res* 2016;9:113-6.
 17. Gallo L, Lishor JM, Allemann D, Bacchi V, Pitta J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhannar purpurea* (Clematogragda) extract powder physical properties. *Powder Technol* 2011;209:205-14.
 18. American Chemical Society (ACS). Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem* 1980;52:2242-9.
 19. ICH Q2B. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation Research. Guidelines for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology. Rockville, 1995.
 20. Nigam S, Nouraj M. Development and validation of stability indicating a RP-HPLC method for determination of β -acyrylglycosin. *Int J Appl Pharm* 2017;9:54-9.
 21. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2000.
 22. Organization for economic cooperation and development (OECD). Revised dose 28-day oral toxicity test method guideline 407. In: OECD, Guidelines for testing of chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 1995.
 23. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals/Section 4: Health Effects Test No. 423: Acute oral toxicity-acute toxic class method. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2002.
 24. Koo MH, Park YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Bioact Biomed Chem* 1997;61:367-9.
 25. Ministério da Saúde, Agência-Brazil. Resolução n° 099-Gua para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Anvisa Brasília; 2003.
 26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa-Brazil). *Farmacopéia Brasileira*. 5th ed. Anvisa Brasília; 2010.
 27. Yuesong Z, Changping L, Yue F, Changlan Z. Simultaneous determination of Catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn [*Rhiphophae rhomboides* L.] leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:714-9.
 28. Martins S, Svetlana K, Trajce S. Assay of flavonols and quantification of quercetin in medicinal plants by HPLC with UV-DIODE array detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2001;24:2203-92.
 29. Messem MAS, Rao VSN, Fonteles MC. Antiinflammatory activity of *Azadirachta indica* Fr. AE: possible mechanisms involved. *Braz J Med Biol Res* 1995;30:861-4.
 30. Clarke EGC, Clarke ML. *Veterinary toxicology*. 3rd ed. London: Bailliere Tindall; 1975. p. 438.
 31. Jahn AJ, Gussel PKH. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. *Reprod Toxicol* 1997;11:171-8.
 32. Kuyurbakan S, Kavramci S. Acute and sub-acute toxicity study of aqueous methanolic leaf and bark extract of *Andropogon stramineus* (L.) *J Pharm Sci* 2015;7:63-5.
 33. Al-Habiri M, Al-Aghbari A, Al-Mansury M, Makki H. Toxicological evaluation of *Cordia alliodora* leaves a long-term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmac* 2002;83:289-97.
 34. Emmanelli MP, Lopes STA, Maciel RM, Garmatz BC, Taveira MO. Toxicological evaluation of *Cordia alliodora* leaves a long-term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmac* 2002;83:209-17.
 35. Havel RJ, Kita T, Kettle L, Kase JP, Hamilton RL. Serum concentration of alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, urea and creatinin in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ciências Animal Bras* 2000;9:251-5.
 36. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruz LM. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic; 1997. p. 895-9.
 37. Prabu PC, Panchapakesan S, Raj CD. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* root in Wistar rats. *Phytother* 2013;27:1169-78.
 38. Carlton WW, McGavin MD. *Patologia Veterinária*. Especial de Thomson. 2nd ed. Armaaz; 1996. p. 635.
 39. Dehreliner J, Pelozo PV, Tokarski CH. Experimental poisoning by *Arachidus obtusiloba* (Bignoniaceae) in rabbits. *Peq Vet Bras* 1994;4:89-96.
 40. Haxel MG. The urinary system. In: Jugg KVF, Kennedy FC, Palmer N. *Pathology of domestic animals*. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1983. p. 447-538.
 41. Jones TC, Hunt RD, King MW. *Patologia Veterinária*. 3rd ed. São Paulo: Malvine; 2000. p. 506.

How to cite this article

- Inês De Souza Salvador, Rosana De Silva Leite, Valmir Gomes De Souza, Fabrício Hany Dantas De Andrade, Rayanne Sales De A Batista, Fábio Santos De Souza, Rui Oliveira Maciel. The study of the acute and sub-acute oral toxicities of the methanolic extract of *Myrcorrhoea urundeuva* affenda in rabbits. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9(4):154-160.