

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO PRÉ – CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA E
DA ATIVIDADE DIURÉTICA ORAL DO EXTRATO AQUOSO
BRUTO DAS FOLHAS DA *Palicourea coriacea* (Cham.) K.
Schum (Rubiaceae) “*DOURADINHA DO CAMPO*”**

MARCELO ELIAS PEREIRA

GOIÂNIA
2011

MARCELO ELIAS PEREIRA

**AVALIAÇÃO PRÉ – CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA E
DA ATIVIDADE DIURÉTICA ORAL DO EXTRATO AQUOSO
BRUTO DAS FOLHAS DA *Palicourea coriacea* (Cham.) K.
Schum (Rubiaceae) “**DOURADINHA DO CAMPO**”**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
(Orientador)

**GOIÂNIA
2011**

MARCELO ELIAS PEREIRA

AVALIAÇÃO PRÉ – CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA E DA ATIVIDADE
DIURÉTICA ORAL DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DAS FOLHAS DA *Palicourea*
coriacea (Cham.) K. Schum (Rubiaceae) “DOURADINHA DO CAMPO”

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
(Orientador)

Aprovado em Goiânia em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Leila Maria Leal Parente

Bolsista de Pós - Doutorado / Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Élon Alves da Costa

Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozini

Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, antes de todas as coisas.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, meu orientador, pela amizade, competência, compreensão, paciência, dedicação e confiança em mim depositada, nestes dois anos.

Ao Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior e à Vânia, pelo apoio, pela paciência e dedicação na realização dos exames histopatológicos.

À Profa. Dra. Leonice pela ajuda na conclusão de minha dissertação.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula, pelo apoio, presteza, pelos ensinamentos e auxílio na identificação da *Palicourea coriacea* e no preparo do extrato.

Ao Prof. Dr. Edemilson e à Profa. Dra. Maria Teresa F. Bara, por terem aberto as portas de seu laboratório e me trataram como se eu fosse um de seus orientandos.

À Nádylla Zanon Gonçalves, que me ajudou em todos os experimentos que executei, sem ela não teria conseguido os resultados alcançados.

Aos meus amigos do NEPET, Fernando, Dorcas, Cristiane, Teresa, Daniela, Ana Flávia, Hugo, Hugo Basílio, Kely, Humberto, Jerônimo, pelo companheirismo e auxílio nas horas que precisei.

Aos meus amigos do LPPN, Bruno, Renê, Marcus, Ezequiane, Mariana, Frederico, Henrique, Luiza, pela compreensão e auxílio no preparo do meu extrato, pois muitas vezes deixaram de fazer seus experimentos para acompanharem o meu.

À secretária do programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFG, Fernanda M. F. Bellato, pela presteza e amizade nos atendimentos.

Aos profissionais do Laboratório do Hospital Veterinário da UFG.

À minha esposa pelo companheirismo, amizade e amor a mim dedicados, sem seu apoio e incentivo eu não teria conseguido.

Aos meus pais, que são meus alicerces de agora e sempre.

Aos meus padrinhos, João Pereira, Natália e Vivianne, pelo apoio no início da minha carreira, pelo incentivo e inspiração para ser um farmacêutico.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, foram os responsáveis pelo êxito na obtenção dos resultados desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Palicourea coriacea (Cham.) K. Schum, conhecida como douradinha ou douradinha-do-campo, é uma planta do Cerrado, na forma de subarbustos com flores amarelas, pertencente à família *Rubiaceae*. Suas folhas são utilizadas em preparações de remédios caseiros na forma de chás, no tratamento de cálculos renais, inflamação/infecção de uretra, rins, bexiga e como diurético. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a toxicidade aguda em ratos e camundongos, bem como, a atividade diurética em ratos do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Palicourea coriacea* (EABLPC). A toxicidade aguda oral do EABLPC foi investigada de acordo com a OECD 423. Para avaliação da atividade diurética três grupos de ratos receberam doses de EABLPC (80, 160 e 320 mg/kg), um grupo recebeu apenas solução salina e outro recebeu furosemida (20 mg/kg), administradas durante oito dias por gavagem, sendo feita a medição do volume urinário e a avaliação das concentrações de eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-), creatinina e uréia, na urina e no sangue. O extrato não desenvolveu sinais de toxicidade ou letalidade nos animais e não foram encontradas alterações histopatológicas. Na avaliação da atividade diurética observou-se um aumento do volume urinário, do consumo de água e da excreção dos eletrólitos, dos ratos tratados com EABLPC, em relação aos não tratados, mas não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nas amostras de sangue. Os resultados demonstraram que o extrato pertence à Classe 5 (substâncias com DL_{50} superior a 2000 mg/kg), sendo considerada de baixa toxicidade. O aumento do volume urinário, do consumo de água e da excreção de eletrólitos comprovou a atividade diurética do EABLPC. O presente estudo confirmou o uso etnofarmacológico do EABLPC.

Palavras – chaves: Plantas medicinais; *Palicourea coriacea*; Atividade diurética; Toxicidade aguda.

ABSTRACT

Palicourea coriacea (Cham.) K. Schum, known as douradinha or douradinha-do-campo, is a plant of Cerrado in the form of sub-shrubs with yellow flowers, belonging to the *Rubiaceae* family. Its leaves are used in preparations of home remedies in the form of teas, to treat kidney stones, inflammation / infection of the urethra, kidneys, bladder, and as a diuretic. This study aimed to evaluate the acute toxicity in rats and mice, as well as the diuretic activity in rats of the crude aqueous extract of dried leaves *Palicourea coriacea* (EABLPC). The acute oral toxicity EABLPC was investigated according to OECD 423. To evaluate the diuretic activity three groups of rats received doses of EABLPC (80, 160 and 320 mg / kg), one group received only saline solution, and another received furosemide (20 mg / kg) administered by gavage for eight days, being made volume measurement and evaluation of urinary concentrations of electrolytes (Na^+ , K^+ and Cl^-), creatinine and urea in urine and blood. The extract did not develop signs of toxicity or mortality in animals and found no pathological changes. In the evaluation of diuretic activity observed - an increase in urinary volume, water consumption and excretion of electrolytes, mice treated with EABLPC, compared to untreated, but not statistically significant differences were detected in blood samples. The results showed that the extract belongs to Class 5 (Substances with LD_{50} greater than 2000 mg / kg), being considered of low toxicity. The increase in urine volume, water consumption and excretion of electrolytes confirmed the diuretic activity of EABLPC. This study confirmed the use of ethnopharmacological EABLPC.

Keys - words: Medicinal plants; *Palicourea coriacea*; Diuretic activity, Acute toxicity.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- FIGURA 1** Aspecto geral da *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum p.20
“Douradinha do Campo”.
- FIGURA 2** Fluxograma do Teste toxicológico partindo e uma dose de 2000 p.26
mg/kg por peso corporal (OECD423).
- FIGURA 3** Médias diárias de eliminação urinária, após administração oral do p.56
extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para n = 6/grupo. * P < 0,01 em relação ao grupo controle, ** P < 0,001 em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).
- FIGURA 4** Somatório de todo o volume urinário, produzido por cada grupo p.57
tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para n = 6/grupo. ** P < 0,01 em relação ao grupo controle, * P < 0,001 em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).
- FIGURA 5** Médias diárias de consumo hídrico, após administração oral do p.59
extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para n = 6/grupo. * P < 0,01 em relação ao grupo controle, ** P < 0,001 em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).
- FIGURA 6** Somatório de todo o volume hídrico, consumido por cada grupo p.60
tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para n = 6/grupo. ** p < 0,01 em relação ao grupo controle, * p < 0,001 em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).
- FIGURA 7** Quantidade de sódio urinário (mEq) excretada diariamente após p.61
administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=6). * Estatisticamente significativo em relação à salina (P < 0,05), (ANOVA, Teste - t Student) EABLPC = extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea*.
- FIGURA 8** Somatório de todo sódio excretado por cada grupo tratado, após p.62
administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para n = 6/grupo. ** p < 0,01 em relação ao

grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

- FIGURA 9** Excreção urinária de potássio (mEq) diária após administração oral do EABLPC (80, 160, 320 mg/kg), furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, * * $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student). p.63
- FIGURA 10** Somatório de todo potássio excretado por cada grupo tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student). p.64
- FIGURA 11** Quantidade de cloro urinário (mEq) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, * * $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student). p. 65
- FIGURA 12** Quantidade de uréia urinária (mg) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, * * $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student). p.66
- FIGURA 13** Quantidade de creatinina urinária (mg) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo (ANOVA, $P = 0,38522$). p.67
- FIGURA 14** Cromatografia de camada delgada do extrato aquoso bruto liofilizado da *Palicourea coriacea*. p. 69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	Classificação e mecanismos de ação dos principais diuréticos.	p.30
QUADRO 2	Plantas medicinais com suposta atividade diuréticas, em levantamento realizado nos últimos 10 anos.	p.33
QUADRO 3	Avaliação do “Screening” hipocrático para o estudo de toxicidade aguda do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de <i>P. coriacea</i> (EABLPC), na dose de 2000mg/kg, em ratos <i>Wistar</i> e camundongos (n = 3).	p.87
QUADRO 4	Avaliações pré-teste de atividade diurética (médias do consumo de água e produção de urina em amostra de 30 animais do experimento, no período de 24h por 5 dias).	p.88
QUADRO 5	Resultados da uroanálise obtidos nos teste de atividade diurética, em urina do primeiro dia de tratamento (n=6 animais/grupo) após tratamento oral com EABLPC nas doses de 80 mg/kg, 160 mg/kg e 320 mg/kg.	p.92
TABELA 1	Evolução ponderal dos camundongos durante experimento de toxicidade aguda do EABLPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).	p.47
TABELA 2	Consumo de água, ração e produção de excretas de camundongos, tratados com EABLPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).	p.47
TABELA 3	Peso relativo dos órgãos/100g de peso corporal dos camundongos no experimento de toxicidade aguda, tratados com EABLPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).	p.48
TABELA 4	Alterações histopatológicas encontradas nos órgãos dos camundongos, utilizando o teste não paramétrico de Mann – Whitney.	p.49
TABELA 5	Evolução ponderal dos ratos durante experimento de toxicidade aguda do EABLPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).	p.50
TABELA 6	Consumo de água, ração e produção de excretas de ratos, tratados com EABLPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).	p.50

TABELA 7	Peso relativo dos órgãos/100g de peso corporal dos ratos no experimento de toxicidade aguda, tratados com EABLPC, expressos em média ± DPM para n = 3/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).	p.51
TABELA 8	Alterações histopatológicas encontradas nos órgãos dos ratos, utilizando o teste não paramétrico de Mann – Whitney.	p.52
TABELA 9	Médias diárias da produção de fezes em gramas.	p.53
TABELA 10	Médias diárias do consumo de ração em gramas.	p.53
TABELA 11	Médias diárias dos pesos dos ratos no experimento de atividade diurética.	p.54
TABELA 12	Médias diárias da produção de urina dos grupos estudados (n = 6) no teste de atividade diurética, após administração do EABLPC (80, 160, 320 mg/kg), furosemida (20mg/kg) e solução salina.	p.55
TABELA 13	Registro das médias diárias do consumo hídrico dos grupos estudados (n = 6) no teste de atividade diurética, após administração do EABLPC (80, 160, 320 mg/Kg), furosemida (20mg/Kg) e solução salina.	p.58
TABELA 14	Média das frações quantitativas dos parâmetros bioquímicos urinários obtidos após administração oral do EABLPC (80, 160 e 320 mg/kg), furosemida (20 mg/kg) (Cont+) e solução salina (Cont -), segundo os grupos de estudo (n = 6).	p.89
TABELA 15	Concentrações sanguíneas dos parâmetros bioquímicos obtidos após administração oral do EABLPC (80, 160 e 320 mg/kg), furosemida (20 mg/kg) e solução salina (C -), no final do estudo, segundo os grupos de estudo (n = 6).	p.93
TABELA 16	Peso relativo dos órgãos (fígado e rim) após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de <i>P. coriacea</i> (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média para n = 6 / grupo (ANOVA, fígado $p = 0,12596$, rim $p = 0,11814$).	p.68

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
a.C.	Antes de Cristo
ADH	Hormônio Antidiurético
BPL	Boas Práticas Laboratoriais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cont (-)	Controle Negativo
Cont (+)	Controle Positivo
d.C.	Depois de Cristo
DL₅₀	Dose letal mediana
DP	Desvio Padrão
EAPC	Extrato Aquoso Bruto Liofilizado da <i>Palicourea coriacea</i>
EPA	Environmental Protection Agency
EUA	Estados Unidos da América
GHS	<i>Globally Harmonised System</i> (Sistema de Harmonização Global)
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
I.V.	Administração Intravenosa
kD	Kilodalton
Md	Mediana
mEq	Miliequivalentes
MEDLINE	Base de dados da literatura internacional da área média e biomédica (produzida pela NLM - USA)
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MN	Mononuclerares
mOsm	Miliosmol
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas da UFG
nm	Nanômetros
OECD	Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômica
OECD 423	Guia para estudo da toxicidade aguda de classe da OECD
ONU	Organização das Nações Unidas
PAN	Peptídeo Natriurético Atrial

pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
P.O.	Administração por via oral
S - RAA	Sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 ETAPAS DE ELABORAÇÃO DE FITOTERÁPICOS	19
2.2 <i>Palicourea coriacea</i> (Cham.) K. Schum	20
2.3 ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA EM ANIMAIS	22
2.3.1 Método de classe de dose aguda tóxica	24
2.4 REGULAÇÃO RENAL E AÇÃO DIURÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS	27
3 OBJETIVOS	36
3.1 GERAIS	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	37
4.1.1 Coleta, Secagem e moagem	37
4.1.2 Preparação do extrato bruto e delineamento das doses	37
4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	38
4.3 DESCRIÇÃO DO ALOJAMENTO E MANEJO	38
4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA	39
4.4.1 Toxicidade aguda dose única – teste de classe	39
4.4.1.1 Análise Estatística da Toxicidade aguda	41
4.4.2 Teste para avaliação da ação diurética	41
4.4.2.1 Análise Estatística da ação diurética	43
5.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA	43
5.5.1 Prospecção de constituintes da planta	43
5.5.2 Cromatografia de camada delgada CCD	45
5 RESULTADOS	46
5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO LIOFILIZADO	46
5.2 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA	46
5.2.1 Toxicidade Aguda dos Camundongos	46
5.2.2 Toxicidade Aguda dos Ratos	50
5.3 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	53
5.3.1 Aclimação	53
5.3.2 Parâmetros Individuais de Fezes e Consumo de Ração	53

5.3.3 Efeito do tratamento com o EABLPC sobre o volume de excreção urinária e o consumo de água	54
5.3.4 Efeitos sobre o balanço eletrolítico urinário	61
5.3.5 Uroanálise	67
5.3.6 Efeitos sobre o balanço eletrolítico sanguíneo	67
5.3.7 Efeitos sobre o peso relativo dos órgãos	68
5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA	68
5.4.1 Prospecção de constituintes da planta	68
5.4.2 Cromatografia de camada delgada CCD	69
6 DISCUSSÃO	70
6.1 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA	70
6.2 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	72
6.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA	77
7 CONCLUSÕES	78
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICES	87
Apêndice – A	87
Apêndice – B	88
Apêndice – C	89
Apêndice – D	92
Apêndice – E	93

1 INTRODUÇÃO

O homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias há milhares de anos. Existem relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen – Ts'ao* do chinês Shen Nung (KO, 1999; TYLER, 1996; CUNHA, 2009). No “British Museum”, estão expostas placas de barro do código de Hamurabi, datadas com mais de 3000 anos antes da era cristã, onde se encontram escritos em caracteres cuneiformes, por ordem do rei assírio Ashurbanipal, documentos sumérios e babilônicos, em que já se descreve o ópio, o gálbano, a safétida, o meimendro e muitas outras plantas medicinais (CUNHA, 2009).

Cerca de 600 plantas medicinais, bem como produtos minerais e animais foram descritas, no ano de 78 d.C, pelo botânico grego Pedanjos Dioscorides no tratado *De Materia Medica*. Este tratado permaneceu como fonte de referência por mais de catorze séculos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER; 1996; TYLER, 1996).

Provavelmente a utilização das plantas como medicamento seja tão antiga quanto o aparecimento do próprio homem. A medicina esteve por muito tempo associada à prática mágica, mística e ritualística, o que tornou difícil delimitar com exatidão a evolução da arte de curar que possui numerosas etapas (DI STASI, 1996).

Os povos primitivos descobriram as propriedades terapêuticas de determinadas plantas através da observação e da experimentação, e estas foram sendo propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

No século XVI, o médico suíço Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, conhecido como Paracelsus (1493 - 1541), formulou a “Teoria das Assinaturas”, baseada no provérbio latim *similia similibus curantur*, “semelhante cura semelhante”. Com esta teoria acreditava-se que a forma, a cor, o sabor e o odor das plantas estavam relacionados com as suas propriedades terapêuticas, podendo dar indícios de seu uso clínico. Algumas destas plantas passaram a fazer parte das farmacopéias alopáticas e homeopáticas a partir do século XIX, quando se começou a investigar suas bases terapêuticas (ELVIN-LEWIS, 2001 apud TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O marco inicial do processo de extração de princípios ativos de plantas foi o isolamento da morfina da *Papaver somniferum* em 1803 pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner. A partir de então, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo, a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona* spp, 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, 1831, que passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER; 2001; TYLER 1996).

Toda planta que é administrada de alguma forma e, por qualquer via ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica qualquer é denominada de planta medicinal. As plantas medicinais sempre foram objetivo de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos (ALMEIDA, 1993). Um importante arsenal terapêutico foi construído de forma intuitiva pelo conhecimento das propriedades curativas das plantas, sendo resultado da rica sócio - biodiversidade brasileira (ELISABETSKY; SHANLEY, 1994).

É a partir do uso popular ou etnomédico das plantas medicinais que se iniciam pesquisas as quais podem levar a descoberta de novos princípios ativos. Estão sendo continuamente desenvolvidos estudos que visam à comprovação da autenticidade das informações populares, de forma que ao longo do tempo, uma gama de drogas de origem vegetal, inicialmente restritas ao uso populares e consideradas até mesmo tóxicas, está sendo incorporada ao arsenal terapêutico (FREIRE, 1992).

As plantas medicinais podem ser classificadas por categorias. De acordo com sua ação sobre o organismo temos: abortivo, adsorvente, anticatarral, antiespasmódico, antiflatulento, anti-reumático, antitussígeno, carminativo, catártico, colagogo, colerético, diaforético, diurético, drástico, emenagogo, emético, emoliente, estomacal, estomáquico, expectorante, febrífugo, galactogogo, laxante, mucolítico, obstipante (RUDDER, 2002).

As potencialidades do uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas, pois novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão, no reino vegetal soluções, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficácia (SCHENKEL et al., 2003).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº. 48 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, medicamentos fitoterápicos tradicionais são aqueles preparados a partir de plantas medicinais de uso alicerçado na tradição popular, sem evidências, conhecidas ou informadas, de risco à saúde do usuário, cuja eficácia é validada através de levantamentos etnofarmacológicos e de utilização, documentações tecnocientíficas ou publicações indexadas (BRASIL, 2004).

O professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, há mais de vinte anos, criou o primeiro programa de fitoterapia no Brasil o Programa Farmácias Vivas. É o primeiro programa de assistência social farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais desenvolvido no Brasil, tendo por objetivo produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis à população carente (MATOS, 1998).

No Brasil a população faz uso de aproximadamente 300 plantas medicinais, na forma *in natura* ou sob a forma de diferentes preparações, o que movimenta um mercado de mais de 400 milhões de dólares por ano. Mesmo a ONU recomendando e financiando pesquisas sobre fitoterápicos, ainda existe um descaso e desprezo da classe médica. Já a população leiga acredita no tratamento com plantas medicinais sem medo de possíveis problemas (CASTRO, 2005).

Os fitoterápicos são considerados produtos para a terapia complementar ou alternativa em saúde e seu uso têm sido crescente (CARVALHO et al., 2008). Também se pode observar atualmente que os produtos naturais são responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna, e considerando os fármacos antibióticos e antitumorais, essa porcentagem aumenta para aproximadamente 70% (YUNES; CALIXTO, 2001).

Atualmente o mercado mundial de fitoterápicos vem crescendo notadamente, girando em torno de 22 bilhões de dólares. Mesmo possuindo uma extensa e diversificada flora, possuindo quase um terço da flora mundial, o Brasil não se tem grande importância no mercado mundial de fitoterápicos, mas desenvolve-se um grande número de pesquisas que tem contribuído para o entendimento da química de produtos naturais (YUNES et al., 2001).

O uso de plantas medicinais, quando efetuado com critério, só tem a contribuir para a saúde de quem o pratica. Para se usar uma planta medicinal devem-se tomar certos cuidados, porque o uso inadequado de plantas medicinais pode muitas vezes não realizar o efeito desejado (DI STASI, 1996).

...] O uso popular não é suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobióticos sintético e sua preconização, ou autorização oficial do seu uso medicamentoso, deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que os riscos a que se expõem aqueles que a utilizam são suplantados pelos benefícios que possam advir. Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas lembrar, principalmente, os efeitos que se instalam a longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (ELISABETSKY; SOUZA, 2004, p. 108).

Faz-se então necessário o estudo detalhado das plantas medicinais, a fim de que se descubram seus potenciais efeitos colaterais e principais indicações. Desse modo, oferecer-se-á, à população, opções adicionais e acessíveis no combate às várias moléstias. Além disso, as plantas medicinais constituem grande esperança para o tratamento de enfermidades de causa desconhecida, muitas vezes ainda sem tratamento. Estima-se que existam no planeta cerca de 250.000 espécies botânicas. Destas, apenas um inexpressivo percentual foi investigado quanto à sua farmacologia e toxicologia (CUNHA, 2003).

Ressaltam Elisabetsky e Shanley (1994) outro agravante dos critérios utilizados pela legislação brasileira de fitoterápicos diz respeito à desvalorização da medicina popular, uma vez que a maior parte das plantas utilizadas tradicionalmente pela população ainda não foi avaliada do ponto de vista toxicológico e farmacológico, o que tornaria proibitivo o seu registro como fitoterápico.

Como podem ser observados, os dados mencionados são de grande importância e justificam a continuidade e o crescimento de pesquisas científicas com plantas medicinais, tanto para a identificação de espécies e sua etnofarmacologia, bem como para a validação dos efeitos terapêuticos e da toxicidade destas espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETAPAS DE ELABORAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

A pesquisa científica é o início do desenvolvimento de fitoterápicos, passando por uma revisão bibliográfica e experimentos práticos para obter resultados sobre aspectos agronômicos, fitoquímicos, toxicológicos e da atividade biológica do vegetal. Esta pesquisa é direcionada pelo conhecimento etnobotânico (OLIVEIRA et al., 2007).

A avaliação da toxicidade do futuro fitoterápico, bem como a verificação de sua ação, asseguram a aplicabilidade terapêutica do vegetal, através de ensaios pré-clínicos e clínicos imprescindíveis para a validação e o uso seguros das drogas vegetais (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

A fitoquímica, por sua vez, trata do isolamento e identificação, determinação e modificação estrutural dos constituintes mais importantes do vegetal, sem se preocupar com sua atividade biológica. Assim ela permite a identificação do vegetal, bem como analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas (OLIVEIRA et al., 2007).

Terminada a pesquisa científica, que comprovou a eficácia e a segurança da planta a ser utilizada como fitoterápico, tem início o cultivo segundo aspectos agronômicos já determinados, tais como identidade botânica correta, as variedades, formas e a época adequada de plantio, relacionados à quantidade de substância ativa. Quem faz o plantio é o fornecedor de matéria – prima para os produtores do medicamento fitoterápico (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

A produção do fitoterápico é uma fase importante, que leva em conta as normas de boas práticas de fabricação e de controle de qualidade. Sendo consideradas desde a avaliação da matéria – prima, a escolha da forma farmacêutica e determinação da forma de preparo, até a embalagem adequada, a rotulagem e a elaboração da bula (MIGUEL; MIGUEL, 2004; OLIVEIRA et al., 2007).

Ao efetivar o registro frente ao órgão de vigilância sanitária compete a confirmação de todas as etapas anteriores de elaboração do fitoterápico, seguindo a legislação vigente garantindo, portanto, o fornecimento de fitoterápicos de qualidade satisfatória para seu emprego como ferramenta terapêutica (OLIVEIRA et al., 2007).

2.2 *Palicourea coriacea*

De acordo com Ribeiro & Walter (1998), o Cerrado ocupa 23% do território nacional (dois milhões de km²), e se localiza basicamente no planalto central, além de ser considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica. Para Proença et al., (2000), o Cerrado é o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, pois, excetuando-se algumas pequenas áreas na Bolívia e no Paraguai, ele está totalmente inserido no território nacional.

A *Palicourea coriacea* é uma planta típica do Cerrado, usada popularmente para o tratamento de cálculos renais, inflamação/infecção de uretra, rins e bexiga e continência urinária (NUNES et al., 2003).

Pertencente a família *Rubiaceae*, que compreende cerca de 500 gêneros e aproximadamente 7.000 espécies, sendo, portanto uma das maiores famílias de angiospermas, estando distribuídas em todo o mundo, desde as regiões tropicais e temperadas até as regiões frias (JOLY, 2002). Na América do Sul são encontrados aproximadamente 50 gêneros com 200 espécies participantes desta família (SILVA et al., 2008).

A *Palicourea coriacea* é uma planta herbácea, perene, decídua e possui inflorescência terminal com flores brancas e brácteas amarelas. Os frutos são em drupa, cor azul. Suas folhas são simples, curto – pecioladas, ovadas ou elípticas, coriáceas, cor verde – amareladas (LAUREANO, 2001).

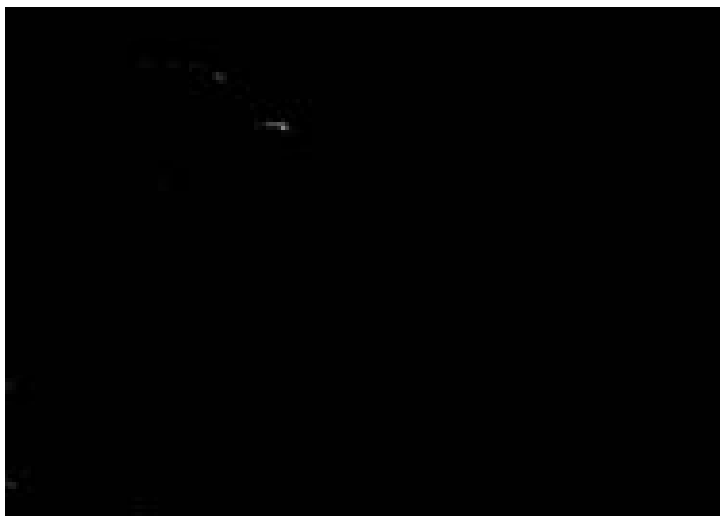


Figura 1 – *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum “Douradinha do Campo”. PAULA, J. R.

Douradinha e douradinha-do-campo, são nomes populares atribuídos a várias espécies medicinais incluindo a *Palicourea coriacea*. A utilização de suas folhas em preparações de remédios caseiros na forma de chás é prática consagrada tanto por comunidades rurais como por populações urbanas oriundas do Cerrado (RODRIGUES et al., 2002).

Souza e Felfili (2006), relatam que esta espécie além de indicada para problemas renais, também vem sendo utilizada no tratamento da obesidade e como calmante pela população da região de Alto Paraíso de Goiás.

Já Silva (2007), menciona em sua pesquisa o preparo das folhas de douradinha por decocção para o tratamento de transtornos dos rins.

O gênero *Palicourea*, contém espécies tóxicas, como é o caso da *Palicourea marcgravii* var. *pubescens* A. St.-Hil e *Palicourea rigida* Kunth (PEREIRA et al., 2006).

No entanto, a espécie *Palicourea coriacea*, objeto de nosso estudo, vem sendo utilizada, na forma de chá, há vários anos de acordo com inúmeros levantamentos populares, mas sem nenhum relato de efeitos tóxicos ou contra – indicações ao uso (BRANDÃO, 1980; DE LA CRUZ, 2008; PEREIRA et al., 2006; SILVA, 1998).

Estudo fitoquímico do extrato alcoólico das folhas da *Palicourea coriacea* identificou como principais constituintes químicos: saponinas, taninos, cumarinas, alcalóides, compostos redutores e polissacarídeos, mas quando a extração foi feita com água esses constituintes foram obtidos com maior evidência, principalmente os alcalóides (LAUREANO, 2001). Nascimento (2005), relatou a presença de alcalóides, taninos e cumarinas, compostos de interesse na terapêutica.

Um estudo do extrato etanólico bruto das raízes e folhas da *P. coriacea* possibilitou o isolamento de quatro alcalóides indólicos do tipo b-carbolínicos (ácido strictosidínico; ácido *epi*-strictosidínico; ceto-strictosidínico e ácido strictosidínico 4',3" – sacarose). O extrato bruto das folhas, raízes e flores forneceram o ácido ursólico como constituinte majoritário, um triterpeno bastante encontrado em vegetais superiores (OLIVEIRA et al., 2006).

Liu (1995), cita em seu trabalho que o ácido ursólico apresentou atividades antiinflamatória, de proteção hepática, antitumoral e anti – hiperlipêmica em experimentos realizados com animais.

Quanto à toxicidade aguda dois trabalhos foram realizados empregando o extrato etanólico bruto da *Palicourea coriacea* e ambos concluíram que o extrato era praticamente atóxico (PEREIRA et al., 2006; FREITAS et al., 2011).

Freitas et al., (2011) também fizeram a avaliação da atividade diurética do extrato etanólico bruto da douradinha, identificando um efeito dose dependente no volume de excreção urinária de 24 horas, bem como um aumento da excreção de eletrólitos urinários (Na^+ , K^+ e Cl^-).

Os extratos brutos etanólico das folhas e metanólicos das raízes de *P. coriacea* foram submetidos a ensaios antimicrobianos utilizando-se bioautografia. Os extratos inibiram o crescimento de bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (NASCIMENTO, 2005).

Passos et al., (2007) em seu estudo utilizando células somáticas de *Drosophila melanogaster*, concluíram que o extrato aquoso da *P. coriacea* apresentou ação citotóxica nem genotóxica, porém, observou - se ação antigenotóxica ou moduladora contra os danos genéticos induzidos por doxorubicina em co-tratamento.

Vários estudos etnobotânicos destacam que os compostos das folhas da douradinha são extraídos com água. Não foram encontrados registros de preparo na forma de garrafadas (BRANDÃO, 1980; DE LA CRUZ, 2008; LAUREANO, 2001; PEREIRA et al., 2006; SILVA, 1998).

2.3 ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA EM ANIMAIS

Em todo o mundo existem exemplos vários casos de intoxicação por diferentes tipos de substâncias, como por exemplo, em 1937, na Europa, houve intoxicação e morte de centenas de pessoas por dietilenoglicol, solvente usado na fabricação de sulfonamida. Entre 1959 e 1961 ocorreram numerosos casos de deformações congênitas em crianças devido ao uso de talidomida por suas mães no início da gestação (BARROS; DAVINO, 2008).

Instituições governamentais, de vários países, decidiram exigir maior rigor no controle da toxicidade de fármacos. No Brasil, o Conselho Nacional de Saúde, segundo a Resolução 1/78 (Diário Oficial 17/10/1978), determina cinco tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda, crônica, teratogênica / embriotoxicidade e estudos especiais (OGA et al., 2008).

...] Toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. De modo geral, a dose única é utilizada para determinar a potência da substância em casos de ingestão ou envenenamento acidental e as doses múltiplas são usadas para avaliar os efeitos cumulativos. A via oral é indicada, mas outras vias de administração podem ser escolhidas, considerando – se a exposição humana (BARROS; DAVINO, 2008, p. 64).

Os testes de toxicidade aguda são os primeiros a serem realizados na avaliação da toxicidade de novos compostos, propiciando quatro diretrizes: 1- uma estimativa quantitativa da toxicidade aguda (DL_{50}) para comparação com outras substâncias; 2- identificação do(s) órgão(s) alvo(s) e outras manifestações de toxicidade aguda; 3- conhecimento da reversibilidade da resposta tóxica e 4- delineamento da dosagem a ser utilizada em outros estudos (KLAASSEN; WATKINS, 2001; BARROS; DAVINO, 2008).

Segundo os autores Barros e Davino (2008), dois princípios devem ser levados em conta durante a experimentação de toxicidade de produtos em animais: os efeitos observados nos animais de laboratório devem ocorrer também no homem; e a exposição de animais de laboratório a dosagens altas de determinado agente tóxico é uma metodologia válida e necessária para a descoberta dos efeitos danosos ao homem.

Durante os testes de toxicidade, deve - se levar em consideração a relevância dos dados de toxicidade do agente químico em questão, observando a qualidade dos dados obtidos, o tipo de estudo executado, a via e a duração da exposição, as doses utilizadas e a reprodutibilidade do estudo. Com essa preocupação os estudos devem seguir protocolos (*Guidelines*) elaborados por Instituições Internacionais reconhecidas, tais como a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD – *Organisation for Economic Cooperation and Development*) ou a Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – *Environmental Protection Agency*), bem como serem conduzidos de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais (BPL) (CORRÊA et al., 2008).

No Brasil a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A fim de regulamentar as drogas fitoterápicas, a

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou normas, desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC nº 17 de 2000, e a Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. Baseado em conhecimentos populares e aliados à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, o uso tradicional de plantas medicinais, fez com que poucas fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O presente trabalho seguirá as diretrizes da OECD para o teste de classe de toxicidade aguda (*Acute Toxic Class Method* – OECD 423). Observará as indicações da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde, para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas e estudos de toxicidade de dose única de novas drogas, além de enquadrar nas exigências da RDC 14, de 31 de Março de 2010 da ANVISA/MS (BRASIL, 2010).

Adicionalmente, seguirá as diretrizes da Lei Arouca, Lei federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que rege a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica (BRASIL, 2008).

2.3.1 Método de classe de dose aguda tóxica (Guideline OECD 423, 2001)

Este é um método alternativo de toxicidade oral aguda, extensamente validada desde 1996, em que se utilizam três animais de determinado sexo, em cada etapa; ambos os sexos podem ser utilizados. A dose inicial é selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo aquela mais propensa a produzir mortalidade com base em relatos de dose com toxicidade evidente, quando possível, ou através de relatos evidenciados com base na estrutura química. Na ausência de ambas as informações, é iniciado o estudo de triagem com a dose de 300mg/kg.

Se as informações avaliadas sugerirem que a mortalidade significativa não é iniciada com o nível maior de dose (2000 mg/kg de peso corpóreo), o teste para se conhecer o limite é conduzido. Excepcionalmente, e somente quando justificado por

necessidades específicas, o uso de um nível de dose maior de 5000 mg/kg pode ser considerada.

A base da técnica consiste em se administrar a grupo de três animais doses seqüenciais menores a partir da máxima de 2000 mg/kg caso se observe a morte de mais de 1 animal, seguindo o fluxograma da figura 4. Isto possibilita a estimativa de uma DL_{50} conforme os padrões da GHS.

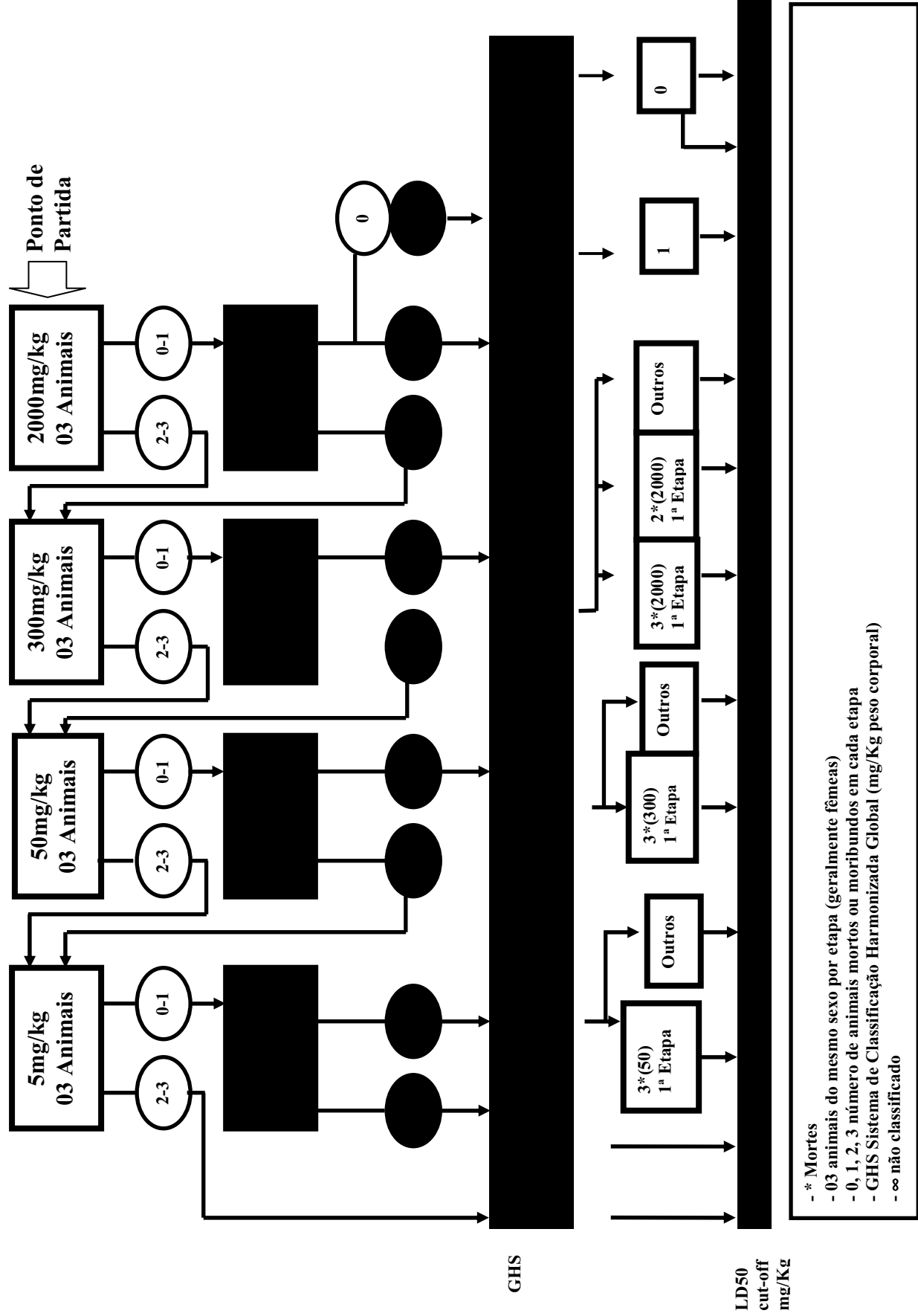


Figura 2 – Fluxograma do teste toxicológico partindo e uma dose de 2000mg/kg por peso corporal (OECD423)

O animal deve ser observado por um período mínimo de 24 horas e, mantidos sob observação por, no máximo, de 14 dias. Dependendo da mortalidade ou do estado moribundo dos animais outras doses intermediárias são necessárias para que se admita um critério da toxicidade aguda na substância-teste. A classificação da substância administrada é feita de acordo com o GHS (*Globally Harmonized System*). Uma das três ações será requerida: parar no teste que atribui a classificação do risco apropriado; testar em uma dose fixa maior ou em uma menor.

Em todas as etapas, os animais são observados em intervalos regulares e todos os sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos são registradas seguindo o *screening* hipocrático.

O *screening* hipocrático é um ensaio bastante útil, pois a análise dos dados obtidos permite: a) classificar os fármacos em estudo em categorias farmacológicas; b) estudar a toxicidade dos fármacos; c) determinar possíveis mecanismos de ação dos fármacos; d) auxiliar no direcionamento das investigações científicas posteriores, dentre outros. Neste ensaio podemos observar os efeitos produzidos por uma substância ou extrato desconhecido sobre: 1) estado de consciência e disposição; 2) atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular; 3) reflexos; 4) atividade no SNC e 5) atividade no SNA.

A histopatologia de órgãos é útil na determinação da causa de morte e identificar os órgãos-alvo. Se ocorrerem mortes um teste adicional com nível de dose menor pode ser necessário.

2.4 REGULAÇÃO RENAL E AÇÃO DIURÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS

A função mais conhecida dos rins consiste em livrar o corpo dos produtos de degradação que são ingeridos ou produzidos pelo metabolismo. Mas existe uma segunda função, que é bastante crítica, trata-se do controle do volume e a composição dos líquidos corporais (GUYTON; HALL, 2011).

É através de um sistema integrado complexo, que se dá o controle do equilíbrio hidroelétrico e da osmolaridade plasmática, que envolve as ações do Hormônio Antidiurético (ADH), do sistema renina - angiotensina - aldosterona e do mecanismo da sede (NAVES et al., 2003).

O Sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona (S - RAA) atua não só na regulação da pressão arterial como também no equilíbrio eletrolítico. Classicamente esse sistema exerce suas funções por meio da angiotensina II, que é gerada na circulação por uma cascata enzimática iniciada pela renina que é secretada pelas células justa - glomerulares dos rins após detectar o aumento da concentração de sódio no túbulo distal. A renina catalisa a formação de angiotensina I a partir do angiotensinogênio produzido no fígado. A angiotensina I após ser clivada por diferentes aminopeptidases origina diversos produtos (angiotensinas II a IV). Estas angiotensinas atuam sobre receptores específicos de membrana (vasos sanguíneos, rins, adrenais e o sistema nervoso simpático) distribuídos pelo organismo (HELOU, 1998; IRIGOYEN et al., 2001; NAVES et al., 2003).

Dentre esses produtos a angiotensina II, talvez seja o hormônio mais potente na retenção de sódio e água no organismo, auxiliando no controle da pressão sanguínea e do volume extracelular, através de três efeitos principais: estimulação da secreção de aldosterona pelas glândulas supra-renais, que promove a reabsorção de sódio e a eliminação de potássio nos túbulos distais; contração das arteríolas eferentes e estimulação direta da reabsorção de sódio nos túbulos proximais, nas alças de Henle, nos túbulos distais e nos túbulos coletores (GUYTON; HALL, 2011).

O Hormônio Antidiurético (ADH) ou vasopressina, é um polipeptídeo com peso molecular igual a 1.228 kD formado nos núcleos supra – ópticos e nos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sendo originário de um pré – pro – hormônio com 168 aminoácidos, cuja clivagem é mediada por duas principais enzimas: a ADH - neurofisina II e Co – peptina, com armazenamento e liberação feitos pela hipófise posterior (NAVES et al., 2003; GUYTON; HALL, 2011).

A secreção de ADH é mediada por neurônios do hipotálamo anterior que possuem osmorreceptores, esses são estimulados quando a pressão osmótica varia em 2% da sua faixa normal que é de 285 a 295 mOsm/kg. Estímulos não-osmóticos, como a barorregulação, reflexo nasofaringeano, estímulo nauseoso, mediadores químicos e fatores ambientais também têm importante papel na regulação da secreção de ADH (NAVES et al., 2003).

A barorregulação é menos sensível que a osmorregulação, sendo decorrente de uma queda de 8 a 10% no volume sanguíneo ou de reduções agudas, na pressão arterial, superiores a 5-10%. A origem do estímulo é proveniente de

receptores localizados no arco aórtico, carótidas, átrios e, provavelmente, grandes veias intratorácicas, terminando no centro vasomotor do tronco cerebral. O estímulo então chega aos núcleos supra - ópticos e paraventriculares, com aumento da secreção do ADH. Náuseas e vômitos podem elevar em 100 a 1000 vezes a secreção do ADH, já a hipoglicemia estimula ligeiramente a secreção desse hormônio (NAVES et al., 2003).

Neurotransmissores, drogas e outros agentes químicos também modulam a secreção do ADH via sistema nervoso periférico ou diretamente no sistema nervoso central, destacando – se: catecolaminas, opiáceos, prostaglandinas, anestésicos, hipoxemia, hipercapnia, angiotensina II, peptídeo natriurético atrial (PAN) e álcool (NAVES et al., 2003).

Quando a hipófise posterior libera ADH, este se liga a receptores específicos V_2 . (MAGALDI, 1996; GUYTON; HALL, 2011). Após a ligação aos receptores ocorre um aumento da permeabilidade da membrana luminal dos túbulos distais e ductos coletores à água. Isso permite a reabsorção de um grande volume de água para o meio intersticial, tanto pelas células quanto pelo espaço intercelular, chegando assim ao sangue; havendo diminuição do volume urinário, mas sem alterações acentuadas na taxa de excreção renal dos solutos (NAVES et al., 2003; GUYTON; HALL, 2011).

Os diuréticos são fármacos que têm como principal função causar o aumento do volume urinário. Deve – se atentar que existe um grupo muito restrito de drogas que provocam aumento do volume urinário atuando primariamente na hemodinâmica renal, afetando, dessa forma a função glomerular. No entanto, as drogas mais comumente usadas com finalidade diurética são as que agem predominantemente nos túbulos renais (LOPES; MARTINELLI, 2010). Estes agentes são úteis na redução dos sintomas de sobrecarga de volume, incluindo a ortopnéia e a dispnéia paroxística noturna, sendo usados também no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência renal, insuficiência cardíaca ou cirrose do fígado (HARVEY; CHAMPE, 1998).

Os diuréticos atuam aumentando a excreção de Na^+ e de água do corpo, através de uma ação sobre os rins. O efeito primário consiste em diminuir a reabsorção de Na^+ e de Cl^- do filtrado, sendo o aumento da perda de água secundário à excreção aumentada de NaCl. Devido à reabsorção de uma proporção

muito grande do NaCl e da água que penetra, no túbulo, no glomérulo, a ocorrência de uma pequena redução da reabsorção pode resultar em acentuado aumento na excreção. É importante observar que os diuréticos que exercem ação direta sobre as células do néfron atuam no interior da luz tubular e alcançam seus locais de ação ao serem secretados no túbulo proximal (RANG et al., 2007).

Assim, de forma geral, tem - se dois tipos de diuréticos, os que atuam diretamente nos túbulos renais, modificando a sua atividade secretora e absorvente; e aqueles que modificam o conteúdo do filtrado glomerular, dificultando indiretamente a reabsorção de água e sal. Os grupos que atuam diretamente nos túbulos são os diuréticos de alça, ou seja, agem na alça de Henle, porção ascendente; os tiazídicos que atuam no túbulo distal; os diuréticos poupadores de potássio que atuam nos receptores da aldosterona nos túbulos distais e os inibidores da anidrase carbônica, que inibem esta enzima nas células dos túbulos proximais. Os grupos que modificam o filtrado são os diuréticos osmóticos e deles participam substâncias hidrofílicas que retêm água por pressão osmótica (RANG et al., 2007). Os principais grupos de diuréticos estão listados no Quadro 1.

Quadro 1: Classificação e mecanismos de ação dos principais diuréticos.

Classificação	Mecanismo de Ação	Exemplo
Diuréticos tiazídicos	Inibição do cotransporte eletroneuro Na^+ - Cl^- (Túbulo contorcido distal)	Hidroclorotiazida, clortalidona e metolazona
Diuréticos da alça de Henle	Inibe o transportador de Na^+ - K^+ - 2Cl^-	Furosemida, bumetanida e torasemida
Diuréticos poupadores de K^+	Antagonismo da aldosterona (Duto coletor cortical)	Espironolactona e eplerenona
Diuréticos poupadores de K^+	Bloqueio dos canais de sódio (Duto coletor cortical)	Amilorida e triantereno
Inibidores da anidrase carbônica	Inibição da anidrase carbônica	Acetazolamida e benzolamida
Diuréticos osmóticos	Diminuição da reabsorção de água (Alça de Henle)	Manitol

Os diuréticos são indicados como medicamentos coadjuvantes para o tratamento de algumas condições clínicas, como por exemplo, na insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, cirrose hepática, edema idiopático, acidose tubular renal, hipertensão arterial, hipercalcúria idiopática, hipercalcemia, diabetes insípido, insuficiência renal e edema agudo de pulmão (RANG et al., 2007; LOPES; MARTINELLI, 2010).

O uso de diurético é, em geral, bem tolerado, porém podem apresentar efeitos adversos, tais como: alterações da concentração plasmática dos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio; alterações no equilíbrio ácido – base; hiperglicemia e intolerância à glicose; hiperuricemia e gota (LOPES; MARTINELLI, 2010).

Interações medicamentosas também são observadas, uma que se destaca é a interação de diuréticos não poupadores de potássio com digoxina, a hipocalcemia causada pelos diuréticos aumenta a sensibilidade dos digitálicos, o que aumenta os riscos de arritmia e efeitos e de efeitos tóxicos (RANG et al., 2007).

Portanto, há necessidade de pesquisas de novos diuréticos com menor potencial para o desenvolvimento de efeitos adversos, tais como as plantas medicinais com ação diurética, que são consideradas relativamente seguras (LAHLOU et al., 2006).

As plantas com atividade diuréticas são utilizadas na desintoxicação do organismo, no tratamento de infecções urinária, no tratamento da hipertensão arterial, no combate do envelhecimento, na congestão linfática, na prevenção de doenças de pele e muitas outras, através da ação farmacológica de eliminar líquidos em excesso no organismo (BENJUMEA et al., 2005). Relatos sobre atividade diurética de plantas medicinais estão descritos na literatura, destacando-se *Phyllanthus niruri* (MORAIS et al., 2005; TESKE; TRENTINI, 2001), *Palicourea coriacea* (FREITAS et al., 2011), *Equisetum arvense* (ALONSO, 2008), *Echinodorus macrophyllum* (TRESVENZOL et al., 2006), *Costus pictus* (MACHÍN et al., 2010) e *Polylepis australis* (THOENE et al., 2007).

Wright et al. (2007), fizeram uma revisão bibliográfica de 77 artigos publicados na base de dados MEDLINE, no período entre 1970 e 2005. Esta revisão visou fornecer uma visão geral do conhecimento atual em torno do uso de plantas medicinais como diuréticos, sendo encontrados mais de 100 extratos com suposta atividade diurética, e 21 com relatos de aumento do volume urinário e aumento da excreção de Na⁺ como efeitos simultâneos.

Para chegar a esses resultados vários parâmetros foram avaliados: como o modelo do estudo realizado, a duração do estudo, a dose e a via de administração, o tipo de extrato utilizado, o tipo e o tamanho populacional, a utilização de grupo controle (positivo e negativo), o volume urinário excretado e o volume de sódio excretado.

Com base nesse levantamento foi feita uma revisão bibliográfica de artigos relacionados com experimentos de atividade diurética foram selecionados e os dados organizados considerando – se: a via de administração, o controle positivo, o controle negativo e a duração do experimento constantes no Quadro 2. Esta revisão teve o intuito de dar diretrizes para a realização do presente estudo.

Quadro 2: Plantas medicinais com suposta atividade diurética, em levantamento realizado nos últimos 10 anos.

Referências	Planta	Origem da planta	Via	Controle Negativo	Controle Positivo	Duração	Estudo
SHENOY et al., 2011	<i>Morinda citrifolia</i>	Sudeste da Ásia e Austrália	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
FREITAS et al., 2010	<i>Palicourea coriacea</i>	Brasil	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
PUCCI et al., 2010	<i>Rudgea viburnoides</i>	Brasil	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
MACHIN et al., 2010	<i>Costus pictus</i>	América Central	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
RAMAMOORTHY et al., 2010	<i>Pavetta indica</i>	Índia	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	5 horas	Pré-clínico
ARMAS et al., 2009	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
MAZID et al., 2009	<i>Polygonum barbatum</i>	Sudeste da Ásia, Índia e Tailândia	P.O.	DMSO	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
SWAPNADEEP et al., 2009	<i>Limonia acidissima</i>	Índia	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 10 mg/kg	5 horas	Pré-clínico
THOENE et al., 2007	<i>Polylepis australis</i>	Argentina	P.O.	Água destilada	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
SIQUEIRA et al., 2006	<i>Cordia salicifolia</i>	Brasil, Argentina e Paraguai	P.O.	Água destilada	Não	13 dias	Pré-clínico
LAHLOU et al., 2006	<i>Carum carvi</i> e <i>Tanacetum vulgare</i>	Marrocos	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 10 mg/kg	8 dias	Pré-clínico
INTERSIMONE et al., 2005	<i>Phrygilanthus acutifolius</i>	Argentina	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
MAGHRANI et al., 2005	<i>Retama raetam</i>	Região Mediterrânea	I.V.	Solução salina 0,9%	Furosemida 0,1 mg/kg/h	4 horas	Pré-clínico
BENJUMEA et al., 2005	<i>Artemisia thuscula</i>	Ilhas Canárias	P.O.	Não	Hidroclorotiazida 10 e 15 mg/kg	8 horas	Pré-clínico

MARTIN et al., 2004	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Região Mediterrânea	P.O.	Água destilada	Furosemida 20 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
RATNASOORIYA et al., 2004	<i>Spilanthes acmella</i>	Índia	P.O.	Água destilada	Furosemida 13 mg/kg	5 horas	Pré-clínico
TESHOME et al., 2004	<i>Carissa edulis</i>	Quênia	P.O.	Solução salina 0,9%	Hidroclorotiazida 10 mg/kg	5 horas	Pré-clínico
CARDOSO et al., 2003	<i>Echinodorus grandiflorus</i>	Brasil	P.O.	Água destilada	Não	24 horas	Pré-clínico
NOLDIN et al., 2003	<i>Cynara scolymus</i>	Região Mediterrânea	P.O.	Água destilada	Hidroclorotiazida 25mg/kg	24 horas	Pré-clínico
AL-ALI et al., 2003	<i>Tribulus terrestris</i>	Região Mediterrânea e Iraque	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 120 mg/kg	24 horas	Pré-clínico
ÁLVAREZ et al., 2002	<i>Fabiana patagonica</i>	América do Sul	P.O.	Solução salina 0,9%	Furosemida 10 mg/kg	3 horas	Pré-clínico
GANAPATY et al., 2002	<i>Cocculus hirsutus</i>	Índia	P.O.	Solução salina 0,9%	Uréia 750 mg/kg	4 horas	Pré-clínico

Legenda: P.O. via oral (gavagem), I.V. intravenoso.

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, e esta diversidade desperta os interesses de comunidades científicas internacionais (MENDONÇA et al., 1998). Um exemplo disto é o bioma cerrado que contém mais de 6.000 plantas (MENDONÇA et al., 1998) muitas delas com valor alimentício e medicinal (ALMEIDA et al., 1998). Apesar disso, verifica-se no Quadro 2, que apenas a *Palicourea coriacea*, *Rudgea viburnoides*, *Passiflora edulis* e *Echinodorus grandiflorus* pertencem a flora brasileira, o que é muito pouco.

Os componentes das plantas representam uma fonte rica em produtos químicos bioativos, que no setor farmacológico, fornecem material para a produção de analgésicos, tranqüilizantes, diuréticos, laxativos, antibióticos, dentre outros. A diversidade da flora do cerrado brasileiro, o segundo mais importante bioma do país, tem sido pobremente estudada na validação da eficácia e de efeitos terapêuticos de extratos ou compostos isolados (ESPINDOLA et al., 2004; MESQUITA et al., 2005; NAPOLITANO et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a atividade farmacológica diurética e a toxicidade aguda oral do extrato aquoso bruto liofilizado da *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum (Rubiaceae) “Douradinha do Campo”.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estudar o perfil pré-clínico da toxicidade aguda em dose única em ratos e camundongos de ambos os sexos, do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Palicourea coriacea* (EAPC).
- Avaliar a atividade diurética em ratas do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Palicourea coriacea* (EAPC) em doses múltiplas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

4.1.1 Coleta, secagem e moagem

Folhas de *Palicourea coriacea* foram coletadas, em agosto de 2009, de espécimes adultos localizados na região do município de Bonfinópolis – Goiás, Brasil, com as coordenadas; altura: 845m, latitude: 16° 37' 04,3" sul, longitude: 48° 48' 45,3" oeste.

O material botânico coletado na Região foi identificado pelo Professor Dr. José Realino de Paula – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás (UFG) e uma exsicata depositada no Herbário da UFG sob o número 42247.

O material botânico foi processado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da UFG, sendo seco a 40 °C em estufa (Fanem 315 SE) e pulverizado em moinho de facas (Marconi), obtendo 354g de pó das folhas.

4.1.2 Preparação do extrato bruto de *Palicourea coriacea* e delineamento das doses

As folhas secas e pulverizadas foram extraídas por refluxo, usando um balão de fundo redondo e um condensador, a uma concentração de 5% planta/água, e uma temperatura de 80°C por 40 minutos (OLIVEIRA; AKISUE, 1998). Em seguida o extrato foi filtrado a vácuo, concentrado no liofilizador (Micromodulyo – THERMO electron corporation) por aproximadamente 20 horas e armazenado a -20°C.

Para a determinação da doses a serem testadas foram considerados os dados do uso popular.

Em geral, a população faz uso da *Palicourea coriacea* na forma de chás, para essa preparação são utilizadas de 10 a 15 folhas por litro de água.

Assim, foram pesadas cinco amostras com dez folhas cada, obtendo-se um peso médio de $3,36 \pm 0,11$ g de folhas. Considerando que o rendimento na preparação do extrato aquoso foi em torno de 5%, isso equivale aproximadamente a uma dose administrada de 160 mg do extrato aquoso.

Desta forma, o protocolo experimental da atividade diurética utilizou as seguintes padronizações:

- Volumes de administração: 0,1 mL/100g;
- Concentração das soluções administradas por grupo: 80, 160, 320 mg/mL.

Foram realizadas a medida do pH e as dosagens de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ nas soluções administradas, na solução salina e na água que os animais tomaram.

4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG segundo protocolo de nº 233/2010.

Os grupos experimentais de ratos e camundongos, provenientes do Biotério Central da UFG, foram compostos ao acaso, com animais de diferentes ninhadas, com o cuidado de que a variação de peso entre eles não excedesse a 20% do peso médio.

Para o experimento de toxicidade aguda foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, raça *Wistar*), pesando 180 - 259 g e camundongos, pesando 26 - 42g, machos e fêmeas, os quais foram divididos em grupos de 3 animais por gaiola.

Para o experimento de atividade diurética foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, raça *Wistar*), pesando 154 - 227 g, fêmeas, os quais foram colocados individualmente em gaiolas semi - metabólicas.

4.3 DESCRIÇÃO DO ALOJAMENTO E MANEJO

Os animais foram alojados na sala de manutenção de animais do NEPET (Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas da UFG / Faculdade de Farmácia), alimentados com ração Purina Labina[®], água filtrada, temperatura ambiente controlada 25 ± 2°C, com monitoramento do ciclo claro-escuro de 12h cada. O período de aclimatação foi de 5 dias.

4.4 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E DA ATIVIDADE DIURÉTICA

4.4.1 Toxicidade aguda dose única – teste de classe (OECD Guidelines 423, 2001; BRITO. 1994; BRASIL, 1996; BRASIL, 2004)

O teste de toxicidade aguda foi realizado segundo protocolo experimental *Guideline 423* (OECD, 423) e desenvolvido seguindo normas de cuidados com animais de laboratório, bem estar e biossegurança na experimentação animal proposta pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2009).

Experimentos independentes foram realizados para avaliação da toxicidade aguda oral dose única (método de gavagem) em ratos e camundongos machos e fêmeas, agrupados em 3 (três) animais por gaiolas de polipropileno.

Nesse teste, a administração do EAPC foi realizada após solubilização do extrato em solução fisiológica 0,9% e em todos os testes foi incluído um grupo controle, tratado apenas com o veículo. O volume administrado aos animais não excedeu a 1 mL/100g de peso corporal.

Iniciou - se com a dose de 2000 mg/kg por que na revisão bibliográfica não foram encontrados relatos de intoxicação ou reações adversas pela população que fez uso da *P. coriacea* como planta medicinal.

Antes da administração os ratos foram privados de alimento por 12 horas e os camundongos por 2 horas, os animais também foram pesados. O alimento foi restituído 3 horas após a administração da droga para os ratos e 2 horas após para os camundongos. Excetuando-se este período de jejum, os animais tiveram acesso livre à ração e à água.

Após a administração do extrato, os animais foram observados em intervalos regulares e todos os sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram registradas. O peso dos animais e o consumo de água e ração também foram registrados no início do tratamento, no sétimo dia e no final do experimento.

Observações comportamentais sistemáticas (*screening* hipocrático) conforme Quadro 3 – Apêndice A, foram realizadas a intervalos variados no dia de administração da droga (10 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h) e, à partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia.

As intensidades dos eventos foram tabuladas de zero a 3, correspondendo, respectivamente a: 0 - ausente, 1 - discreto, 2 - moderado, 3 - acentuado. As alterações encontradas na observação comportamental e exame clínico sistemático dos animais foram registrados em protocolo. Esta lista e a pesquisa de sinais foram baseadas no modelo proposto por Malone, 1977.

Procurou-se observar, também, a dose máxima em que não foram expressas reações adversas nos animais de experimentação.

Os resultados foram comparados na tentativa de evidenciar qualquer diferença entre gêneros quanto à toxicidade aguda. O período total de observação após administração da dose única foi de 14 dias.

Ao final do experimento de toxicidade aguda, todos os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g [8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL)], conforme protocolo da Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education (FLECKNELL, 1996; KOHN, et al., 1997), e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada a necropsia com avaliação geral dos órgãos e retirada do fígado e rins para análise macroscópica.

Em seguida, foi realizada a necropsia (com pesagem do fígado, rins, coração e baço), avaliação à vista desarmada e retirada de fragmentos de órgãos para o estudo histopatológico (fígado, pulmão, coração, rim, baço, intestino grosso, intestino delgado, estômago, pâncreas).

Para o exame histopatológico, as amostras coletadas foram fixadas, por no mínimo 24 horas, em solução de formol tamponado a 10% (100 mL de formaldeído 37%: 900 mL de água destilada; 4,0 g de fosfato de sódio monobásico; 6,5 g de fosfato de sódio dibásico anidro), na proporção de 20 vezes o volume do fixador em relação ao volume das peças.

Após a fixação, os fragmentos foram lavados em água corrente por cinco minutos, iniciando-se assim o processo de desidratação em álcool etílico, em série crescente desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente procedeu - se a clarificação com xilol e inclusão em parafina histológica.

Os blocos selecionados foram seccionados com uma espessura de três a cinco micrômetros, em micrótomo rotativo (*American Optical*®, modelo Spencer 820 – EUA), utilizando - se de navalhas descartáveis (*Leica Instruments*®, modelo 818 – EUA).

Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (LUNA, 1968) e a leitura realizada em fotomicroscópio óptico de campo claro (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

O processamento histopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia do IPTSP da UFG.

4.4.1.1 Análises Estatísticas da toxicidade aguda

Os resultados da avaliação histopatológica do estudo da toxicidade aguda foram expressos através de mediana, organizados e resumidos na forma de tabelas, sendo atribuídos valores numéricos para a intensidade das alterações patológicas (0 – ausente, 1 – discreto, 2 – moderado e 3 - acentuado). As diferenças significativas entre os grupos estudados, na categorização das variáveis, foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Mann – Whitney, aplicado, por meio de *software* “Sigmastat 2.03”.

4.4.2 Teste para avaliação da ação diurética

O protocolo foi desenvolvido de acordo com LAPA et al., (2001); AGUNU et al., (2005); LAHLOU et al., (2006) com modificações, com duração de oito dias e doses únicas diárias em ratas.

Os animais foram acondicionados em gaiolas semi – metabólicas de aço inoxidável e fundo de grade, nas quais foi possível monitorar o consumo de água, variação de peso e produção de urina.

O EAPC foi administrado aos animais por gavagem (1 mL/kg). Cinco grupos (n = 6) foram formados, três grupos foram tratados com doses diferentes de EAPC (80 mg/kg, 160 mg/kg e 320 mg/kg), um grupo foi tratado com Furosemida (20 mg/kg) controle positivo e controle negativo recebeu apenas o veículo de administração (solução fisiológica 0,9%). Antes do início da administração dos extratos (fase pré - tratamento) o consumo de água e a produção de urina foram monitorados para a verificação da homogeneidade destes parâmetros entre os grupos.

Uma vez que os roedores têm atividade noturna, a coleta de urina e a avaliação do consumo de água foram realizadas pela manhã. A contaminação da urina pelas fezes eliminadas foi minimizada principalmente em vista das dosagens iônicas. Nesse sentido, manteve – se gases dentro do funil coletor de urina e as mesmas eram trocadas todos os dias.

Análises físico-químicas foram realizadas todos os dias nas amostras de urina. Os parâmetros analisados foram: pH, densidade, nitritos, proteínas, glicose, cetonas, urobilinogênio, bilirrubina e hemoglobina, através de fita reagente UROFITA 10DL, (Prodimol).

Diariamente foram feitas dosagens bioquímicas: uréia, creatinina e eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-) nas amostras de urina.

No final do experimento também foi realizada coleta sanguínea por punção cardíaca nos animais, utilizando – se tubos de coleta sem anticoagulante para dosagens bioquímicas: uréia, creatinina e eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-), efetuando – se uma correlação com a eliminação urinária dos mesmos.

As dosagens bioquímicas (sangue e urina) foram realizadas no Laboratório do Hospital da Escola de Medicina Veterinária da UFG, segundo as metodologias analíticas descritas abaixo:

- Sódio e Potássio (Fotometria de chama em equipamento Celm);
- Cloro (metodologia colorimétrica Labtest e leitura em equipamento Celm, com sensibilidade do kit cloro: 0,215 mEq/L);
- Uréia (cinético UV marca Laborclin em equipamento automatizado Autolab);
- Creatinina (cinético ponto final em equipamento automatizado Autolab);

Para obter a ação e a atividade diurética do extrato em cada dose, foram utilizadas as seguintes fórmulas (TESHOME et al, 2004):

$$\text{Ação diurética} = \frac{\text{Volume de urina do grupo tratado}}{\text{Volume de urina do grupo controle negativo}}$$

$$\text{Atividade diurética} = \frac{\text{Volume de urina do grupo tratado}}{\text{Volume de urina do grupo controle positivo}}$$

Ao final dos experimentos os animais foram anestesiados, conforme protocolo já descrito (FLECKNELL, 1996; KOHN, et al., 1997), para a coleta de sangue intracardíaca e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada a necropsia com avaliação geral dos órgãos e retirada do fígado e rins para análise macroscópica.

4.4.2.1 Análises Estatísticas da ação diurética (CENTENO, 1990)

Os resultados para o estudo da atividade diurética foram expressos através de Média \pm DP, organizados e resumidos na forma de gráficos e tabelas. Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, foram aplicados, por meio de *software* "Microcal ORIGIN 6.0" os testes de análise de variância (ANOVA). Quando detectada diferença significativa entre os grupos, comparado ao controle negativo, foi aplicado o Teste - t Student - não pareado.

Para todos os grupos considerou-se resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica seguiu o protocolo proposto por Matos (1997), sendo que o EABLPC foi solubilizado em água destilada para facilitar o processo de análise e acondicionado em frasco de vidro.

4.5.1 Prospeção de constituintes da planta

a) Esteróides /triterpenóides

Os testes para Esteróides/triterpenóides foram realizados pela reação de Lieberman - Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 2 ml do extrato e misturando-o a 2 ml de clorofórmio, em seguida a solução clorofórmica

foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. Em tubo de ensaio, adicionou-se 1 ml de anidrido acético, agitando suavemente, e acrescentou-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado, agitando suavemente e observando, se haveria desenvolvimento de cores.

Coloração azul evanescente seguida de verde indicou a presença de esteróides/triterpenóides respectivamente.

b) Flavonóides

Realizou-se o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e magnésio). Onde adicionou a 2 ml do extrato, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita com 2 ml de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação deu-se pelo término de efervescência.

Aparecimento de coloração que variou de parda a vermelha indicou a presença de flavonóides no extrato.

c) Taninos

Em um tubo de ensaio contendo 2 ml do extrato adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 , agitando fortemente, observou-se qualquer variação de cor.

Precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, e verde, a presença de taninos condensados.

d) Saponinas

Em 2 ml do extrato adicionou-se 2 ml de clorofórmio e 5 ml de água destilada logo após filtrou-se para um tubo de ensaio. Em seguida a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos e observado a formação de espuma.

Espuma persistente e abundante (colarinho) indicou a presença de saponina.

e) Alcalóides

Utilizou-se 2 ml do extrato aquoso em tubo de ensaio, alcalinizado com quinze gotas de hidróxido de sódio a 1% e acrescido de 2 ml de água, e adicionou-se 2 ml de clorofórmio. A fração aquosa foi desprezada e a fração clorofórmica acrescida de quinze gotas de ácido clorídrico a 1%, em seguida extraída com 2ml de

água. Essa fração clorofórmica foi desprezada e os testes foram realizados com a fração aquosa ácida, onde se acrescentou três gotas do reagente de Drangendorff para a verificação da presença de alcalóides.

A formação de precipitados insolúveis e floculosos confirmou a presença de alcalóides.

4.5.2 Cromatografia de camada delgada CCD

Foram utilizadas placas de sílica gel F254, de espessura de 0,25 mm. A aplicação da amostra na placa foi feita com o auxílio de um tubo capilar. Tocou-se a extremidade na superfície de fase estacionária e o líquido foi transferido por capilaridade para a superfície da placa, penetrando-a.

Para o desenvolvimento da fase móvel foram usados como solventes hexano / acetato (8:2); clorofórmio / metanol (9:1); clorofórmio / metanol / água (6,5:3,0:0,5). Os cromatogramas foram obtidos por uma técnica de ascensão, na qual a placa foi imersa até uma profundidade de 0,5 cm no solvente de desenvolvimento em um frasco de vidro que funcionou como uma cuba cromatográfica. Em seguida foram retiradas e levadas a secar para então serem aplicados os reveladores adequados com o auxílio de frasco borrifador.

Os reveladores utilizados foram específicos para cada classe de metabólito pesquisada. Para flavonóides e compostos de natureza terpenoídica, foi utilizado solução de Sulfato Cérico. Para taninos, borrifou-se a placa com solução de Cloreto Férrico. Para a identificação de alcalóides utilizou-se o reagente de Drangendorffi como revelador e para esteróides/triterpenóides, usou-se o reagente de Lieberman-Burchard. As substâncias coloridas foram obtidas diretamente quando possível pelo contraste com a fase estacionária. Quando as manchas envolvidas no processo cromatográfico não foram possíveis de visualizar, usou-se a técnica de aquecer as placas, a 100 °C por 10 min, até o surgimento de manchas coloridas.

5 RESULTADOS

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO LIOFILIZADO

Foram obtidos 18,55g do Extrato Aquoso Bruto Liofilizado das folhas de *Palicourea coriacea* (EAPC), com um rendimento de aproximadamente 5,24%.

Os resultados da medida do pH, bem como das dosagens de Na⁺, K⁺ e Cl⁻, estão descritos abaixo:

- **Solução (EAPC – 80 mg/kg)**

pH = 5,0; Na⁺ = 198 mEq/L; K⁺ = 110 mEq/L, Cl⁻ = 130 mEq/L;

- **Solução (EAPC – 160 mg/kg)**

pH = 5,0; Na⁺ = 164 mEq/L; K⁺ = 90 mEq/L, Cl⁻ = 149 mEq/L;

- **Solução (EAPC – 320 mg/kg)**

pH = 5,0; Na⁺ = 182 mEq/L; K⁺ = 170 mEq/L, Cl⁻ = 163 mEq/L.

- **Solução Salina**

pH = 7,0; Na⁺ = 146 mEq/L; K⁺ = abaixo da sensibilidade, Cl⁻ = 143 mEq/L.

- **Água para hidratação dos animais**

pH = 6,7; Na⁺ = 91 mEq/L; K⁺ = abaixo da sensibilidade, Cl⁻ = 155 mEq/L.

5.2 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA

Para este experimento foi administrada um dose única do extrato aquoso bruto liofilizado da *Palicourea coriacea* na concentração de 2000 mg/kg para grupos de três animais de ambos os sexos, ratos e camundongos.

5.2.1 Toxicidade Aguda dos Camundongos

Observou – se que nenhum animal morreu durante o experimento.

Na avaliação do Screening hipocrático Não verificou – se nenhuma alteração nos animais durante todo o período de experimentação.

Apenas os camundongos machos apresentaram um aumento de peso de $4 \pm 2,65$ g, sendo diferente estatisticamente em relação ao grupo controle (Tabela 1), que teve perda ponderal de $- 8 \pm 4,36$ g. As fêmeas tratadas e do grupo controle

apresentaram perda ponderal de $- 0,33 \pm 2,52$ g e $- 3,34 \pm 2,08$ g respectivamente, mas sem diferença estatística.

Tabela 1: Evolução ponderal dos camundongos durante experimento de toxicidade aguda do EAPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo.

Parâmetros	Controle macho	Tratado macho	Controle fêmea	Tratado fêmea
Peso inicial (g)	37,7 \pm 3,8	35,7 \pm 5,9	27,7 \pm 2,1	26,3 \pm 0,6
Peso final (g)	29,7 \pm 1,2	39,7 \pm 3,2	24,3 \pm 1,2	26,0 \pm 2,7
Evolução ponderal (g)	- 8,0 \pm 4,4	4,0 \pm 2,7 *	- 3,3 \pm 2,1	- 0,3 \pm 2,5

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).

Os dados do consumo de água, do consumo de ração e da produção de excretas apresentados na Tabela 2 não demonstraram alterações no comportamento dos animais.

Nenhum dos grupos tratados apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controle.

Tabela 2: Consumo de água, ração e produção de excretas de camundongos, tratados com EAPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo

Parâmetros	Controle macho	Tratado macho	Controle fêmea	Tratado fêmea
Água (mL)	22,5 \pm 3,54	25 \pm 7,07	22 \pm 0	20 \pm 0
Ração (g)	16,5 \pm 2,12	18 \pm 1,41	15,5 \pm 3,54	14,5 \pm 0,71
Excretas (g)	3,5 \pm 0,71	4 \pm 1,41	6 \pm 1,41	5 \pm 4,24

. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).

Os pesos dos órgãos em relação a 100 g de massa corporal dos camundongos estão expressos na Tabela 3. Foram avaliados os pesos do fígado, rim, coração e baço dos animais, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 3: Peso relativo dos órgãos/100g de peso corporal dos camundongos no experimento de toxicidade aguda, tratados com EAPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo.

ÓRGÃOS	Controle Macho	Tratado Macho	Controle Fêmea	Tratado Fêmea
FÍGADO	6,47 \pm 0,52	5,34 \pm 0,69	6,59 \pm 0,5	5,31 \pm 0,46
RIM	1,62 \pm 0,15	1,58 \pm 0,17	1,8 \pm 0,22	1,6 \pm 0,13
CORAÇÃO	0,67 \pm 0,16	0,56 \pm 0,03	0,57 \pm 0,17	0,58 \pm 0,1
BAÇO	0,5 \pm 0,11	0,42 \pm 0,02	0,34 \pm 0,1	0,58 \pm 0,12

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).

A análise histopatológica dos órgãos dos camundongos (coração, fígado, rins, intestino grosso, intestino delgado, estômago, pâncreas e baço) mostrou algumas alterações que estão indicadas na Tabela 4, mas sem relevância estatística em relação aos grupos controle.

Tabela 4: Alterações histopatológicas encontradas nos órgãos dos camundongos, utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney (* = p < 0,05).

ÓRGÃOS Alterações Histopatológicas	Tratados machos			Controle macho			Tratados fêmeas			Controle fêmea		
	C1	C2	C3	Md	C1	C2	C3	Md	C1	C2	C3	Md
PULMÃO												
Espessamento dos septos alveolares (MN)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
FÍGADO												
Infiltrado inflamatório PMN focal no parênquima	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0
Infiltrado inflamatório PMN perivascular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
INTESTINO GROSSO												
Infiltrado inflamatório PMN na mucosa	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN focal na mucosa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RIM												
Aumento de nº células mesangiais glomérulo	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Observações: PMN: polimorfonuclear, MN: mononuclear, Md: mdiana, 0 – ausente, 1 – discreto, 2 – moderado e 3 - acentuado

5.2.2 Toxicidade Aguda nos Ratos

Observou – se que nenhum animal morreu durante o experimento.

Na avaliação do *screening* hipocrático Não verificou – se nenhuma alteração nos animais durante todo o período de experimentação.

Foi constatado um aumento de peso nos ratos, mas com variação estatística significativa apenas entre as fêmeas, pois o grupo tratado apresentou ganho ponderal de $16 \pm 4,58$ g e o controle de $3,67 \pm 5,03$ g.

Tabela 5: Evolução ponderal dos ratos durante experimento de toxicidade aguda do EAPC, expressos em média \pm DPM para $n = 3/\text{grupo}$.

Parâmetros	Controle macho	Tratado macho	Controle fêmea	Tratado fêmea
Peso inicial (g)	248,33 \pm 11,02	219,33 \pm 6,81	193,67 \pm 16,5	185 \pm 8,66
Peso final (g)	274,67 \pm 13,32	250,66 \pm 9,81	197,33 \pm 11,93	201 \pm 4,58
Evolução ponderal (g)	26,33 \pm 3,06	31,33 \pm 3,5	3,67 \pm 5,03	16 \pm 4,58 *

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).

As diferenças encontradas, entre os grupos de ratos, em relação ao consumo de água e ração e produção de excretas, expressas na Tabela 6, não foram estatisticamente significativas.

Tabela 6: Consumo de água, ração e produção de excretas de ratos, tratados com EAPC, expressos em média \pm DPM para $n = 3/\text{grupo}$.

Parâmetros	Controle macho	Tratado macho	Controle fêmea	Tratado fêmea
Água (mL)	105 \pm 7,07	130 \pm 28,28	101 \pm 1,41	85 \pm 21,21
Ração (g)	60,5 \pm 2,12	50 \pm 1,41	45 \pm 1,41	40,5 \pm 0,71
Excretas (g)	44,5 \pm 12,02	42,5 \pm 4,95	23 \pm 2,83	27 \pm 1,41

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).

Em relação ao peso dos órgãos/100g dos ratos, pode – se detectar diferenças estatisticamente significativas apenas entre os pesos dos corações das ratas utilizadas no experimento.

As ratas tratadas com EAPC (2000 mg/kg, p.o.) apresentaram coração com pesos relativos aumentados em relação ao grupo controle negativo (solução salina 1mL/kg), com valor de $0,48 \pm 0,26$ g do grupo tratado com EAPC e de $0,41 \pm 0,01$ g do coração do grupo controle negativo (Tabela 7).

Tabela 7: Peso relativo dos órgãos/100g de peso corporal dos ratos no experimento de toxicidade aguda, tratados com EAPC, expressos em média \pm DPM para n = 3/grupo

ÓRGÃOS	Controle Macho	Tratado Macho	Controle Fêmea	Tratado Fêmea
FÍGADO	$4,62 \pm 0,51$	$4,84 \pm 0,40$	$4,72 \pm 0,85$	$3,72 \pm 0,12$
RIM	$0,91 \pm 0,00$	$0,94 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,00$	$0,72 \pm 0,33$
CORAÇÃO	$0,35 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,26$ *
BAÇO	$0,24 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,05$

. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (ANOVA, Teste - t Student).

A análise histopatológica dos órgãos dos camundongos (coração, fígado, rins, intestino grosso, intestino delgado, estômago, pâncreas e baço) mostrou algumas alterações que estão indicadas na Tabela 8, mas sem diferença estatística em relação aos grupos controle.

Tabela 8: Histopatologia dos órgãos dos ratos, utilizando o teste não paramétrico de Mann – Whitney (* = p < 0,05).

ÓRGÃOS	Tratados machos			Controle macho			Tratados fêmeas			Controle fêmea							
	R1	R2	R3	Md	R1	R2	R3	Md	R1	R2	R3	Md	R1	R2	R3	Md	
Alterações Histopatológicas																	
PULMÃO																	
Hiperemia	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Espessamento dos septos alveolares (MN)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Espessamento dos septos alveolares (PMN)	0	0	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0
Macrófagos espumosos	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
Infiltrado inflamatório PMN focal	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
Infiltrado inflamatório MN focal	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
Infiltrado inflamatório PMN difuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN perivascular	0	2	0	0	0	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório MN perivascular	0	1	2	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN nos alvéolos	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório MN nos alvéolos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN nos bronquíolos	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FÍGADO																	
Hiperemia	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Aumento nº células de Kupffer	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN focal no parênquima	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório MN focal	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN periportal	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INTESTINO GROSSO																	
Infiltrado inflamatório PMN na mucosa	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado inflamatório PMN focal na mucosa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RIM																	
Hiperemia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Cilindro Hialino	0	2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
Aumento de nº células mesangiais glomérulo	2	2	1	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0

. Observações: PMN: polimorfonuclear, MN: mononuclear, Md: mediana, 0 – ausente, 1 – discreto, 2 – moderado e 3 - acentuado

5.3 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

5.3.1 Aclimação

Durante a aclimação, os animais foram observados por cinco dias com o objetivo de estabelecer para os grupos experimentais, um padrão fisiológico de ingestão hídrica e de produção de urina. Conforme mostra o quadro 4 – Apêndice B, verificou-se que as médias de ingestão hídrica e produção de urina, para os trinta animais que participaram do experimento, foram de $27,8 \pm 3,98$ mL e $7,1 \pm 2,8$ mL respectivamente.

5.3.2 Parâmetros Individuais de Fezes e Consumo de Ração

Durante o experimento foram medidos a produção de fezes e consumo de ração dos animais, estando esses dados descritos nas Tabelas 9 e 10 respectivamente.

Tabela 9: Médias da produção de fezes (g).

Dias	Grupos				
	80mg/kg	160mg/kg	320mg/kg	Controle negativo	Furosemida
1° - 2°	3,8±0,6	3,9±0,7	3,4±0,5	4,0±1,4	4,3±0,6
3° - 5°	6,3±0,7	7,5±0,6	6,9±0,8	7,3±0,8	6,1±0,9
6° - 8°	6,8±0,6	7,2±0,4	6,4±1,2	7,3±1,1	6,1±0,8

* ANOVA – $p < 0,05$

Tabela 10: Médias do consumo de ração (g).

Dias	Grupos				
	80mg/kg	160mg/kg	320mg/kg	Controle negativo	Furosemida
1° - 3°	24±2,26	22,8±1,83	25,6±2,01	27±2,66	27,1±1,86
4° - 6°	25,5±2,99	26,2±2,42	25,2±1,81	25,7±1,59	24,7±1,82
7° - 9°	24,1±2,06	23,7±1,69	26,2±1,87	27,4±2,36	27,4±1,83

* ANOVA – $p < 0,05$

Em todos os dias de realização do experimento, foram aferidos os pesos dos animais, conforme apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Médias diárias dos pesos dos ratos no experimento de atividade diurética.

Dias	Grupos				
	80mg/kg	160mg/kg	320mg/kg	Controle negativo	Furosemida
1º	176,2±13,86	182,3±6,92	180,7±11,69	202±11,1	211,3±8,24
2º	178,8±13,8	185,2±6,97	180,2±11,34	204,3±11,78	210,3±8,85
3º	179,3±14,07	186±6,81	181,5±11,84	204,5±11,71	210,8±8,66
4º	179,5±13,85	186,3±6,47	182,8±11,58	204,8±12,56	213,2±7,6
5º	180,5±14,18	186,8±5,85	183,5±11,11	204,7±14,47	213,5±8,04
6º	181,8±14,06	188,3±6,98	183,7±11,64	205,3±14,6	214±7,95
7º	183,0±15,01	188,8±7,36	185,0±12,85	206,0±14,9	215,8±7,47
8º	184,8±16,09	191,8±8,5	187±13,81	208,2±14,95	218,5±8,09
9º	186,7±16,27	194±9,98	188,8±15,25	209,7±15,25	221,2±9,28

* ANOVA – $p < 0,05$

Foi constatado que não houve diferença significativa entre os grupos, que receberam o EAPC (80, 160, 320 mg/kg), a furosemida (20 mg/kg) e solução salina 0,9% (controle negativo) em relação a produção de fezes, ao consumo de ração e aos pesos das ratas.

5.3.3 Efeito do tratamento com o EAPC sobre o volume de excreção urinária e o consumo de água

A tabela 12 apresenta os registros das médias diárias do volume de excreção urinária, atividade diurética e ação diurética, com a administração do EAPC, durante oito dias. O grupo controle negativo apresentou valor final de produção de 4,1± 0,96 mL de urina e o grupo controle positivo, tratado com furosemida, apresentou uma média de 15,4 ± 4,74 mL. Já nos grupos de animais tratados com 80, 160, 320 mg/kg de EAPC, a média final do volume urinário foi de 6,0 ± 1,12 mL, 8,8 ± 4,21 mL e 10,3 ± 3,81 mL, respectivamente.

Tabela 12 – Registro das médias diárias da produção de urina dos grupos estudados (n = 6) no teste de atividade diurética, após administração do EAPC (80, 160, 320 mg/kg), furosemida (20mg/kg) e solução salina.

GRUPOS N = 6	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	MÉDIA ± DP	Ação diurética	Atividade diurética
80mg/kg	4,5	8,3	6,0	6,7	5,5	5,7	5,2	5,3	6,8	6,0±1,12*	1,46	0,39
160mg/kg	6,9	17,8	7,6	9,0	5,5	5,3	7,5	5,8	13,5	8,8±4,21*	2,14	0,57
320mg/kg	6,7	18,0	8,1	8,3	7,5	7,5	11,5	10,9	14,6	10,3±3,81*	2,51	0,67
Controle Negativo	4,2	4,3	4,7	4,7	2,0	4,9	3,8	3,2	4,8	4,1±0,96	1,00	-
Furosemida	10,4	25,3	14,1	16,4	9,1	16,5	12,8	16,7	17,4	15,4±4,74*	3,75	-

*Estatisticamente significativo em relação ao grupo da salina (ANOVA, Teste - t Student, $p < 0,05$)

No Figura 3 observa-se que os animais tratados com EAPC apresentaram uma média final de volume urinário superior à do grupo controle, de forma significativa, mas inferior ao resultado médio do grupo tratado com furosemida durante o período de aferição do volume urinário.

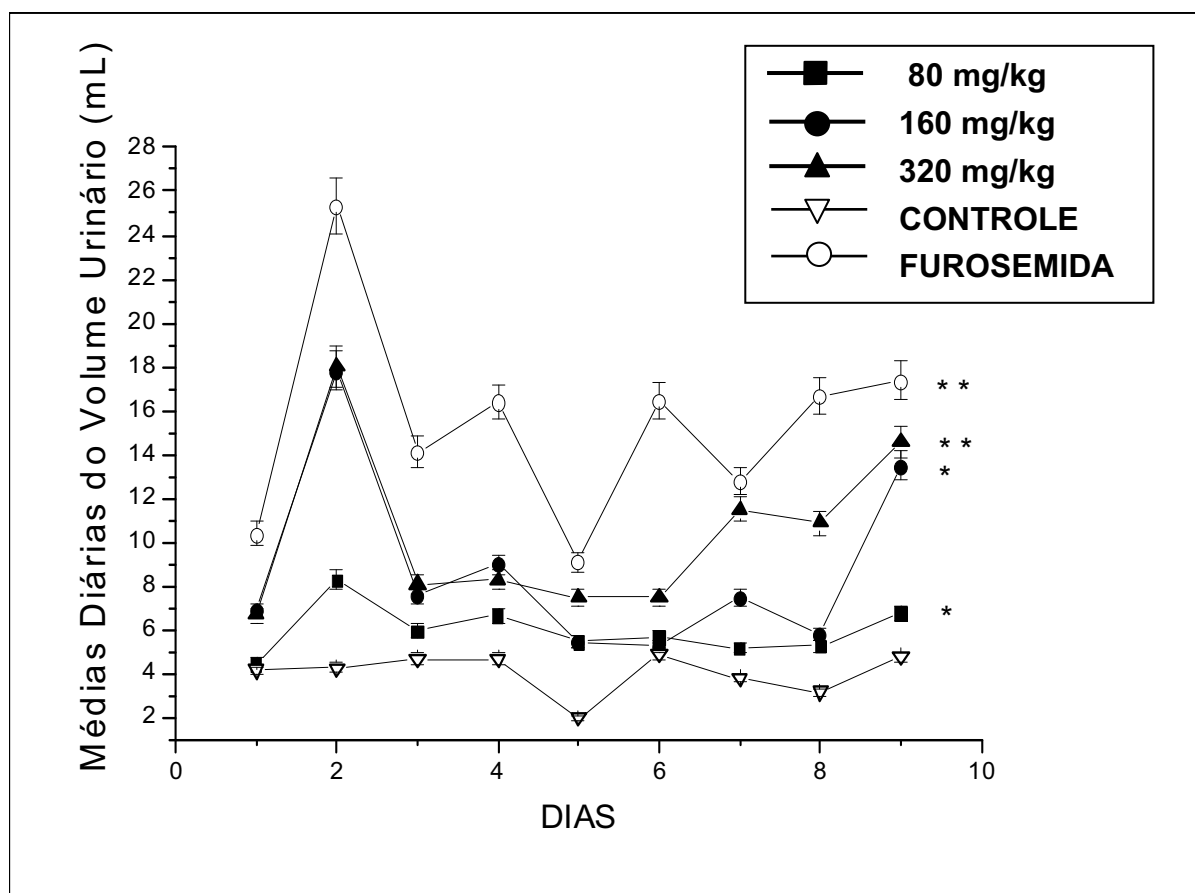


Figura 3 – Médias diárias de eliminação urinária, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

Na Figura 4, apresenta-se o somatório de todo o volume urinário produzido pelos grupos tratados com o EAPC (80, 160, 320 mg/kg), com furosemida e o grupo controle. Verificou-se que à medida que houve aumento a dose do extrato a produção urinária aumentou, com valores superando os 300 mL para os grupos tratados com EAPC 80, 160 e 320 mg/kg. Já o grupo tratado com Furosemida (20 mg/kg) apresentou produção urinária acima de 800 mL.

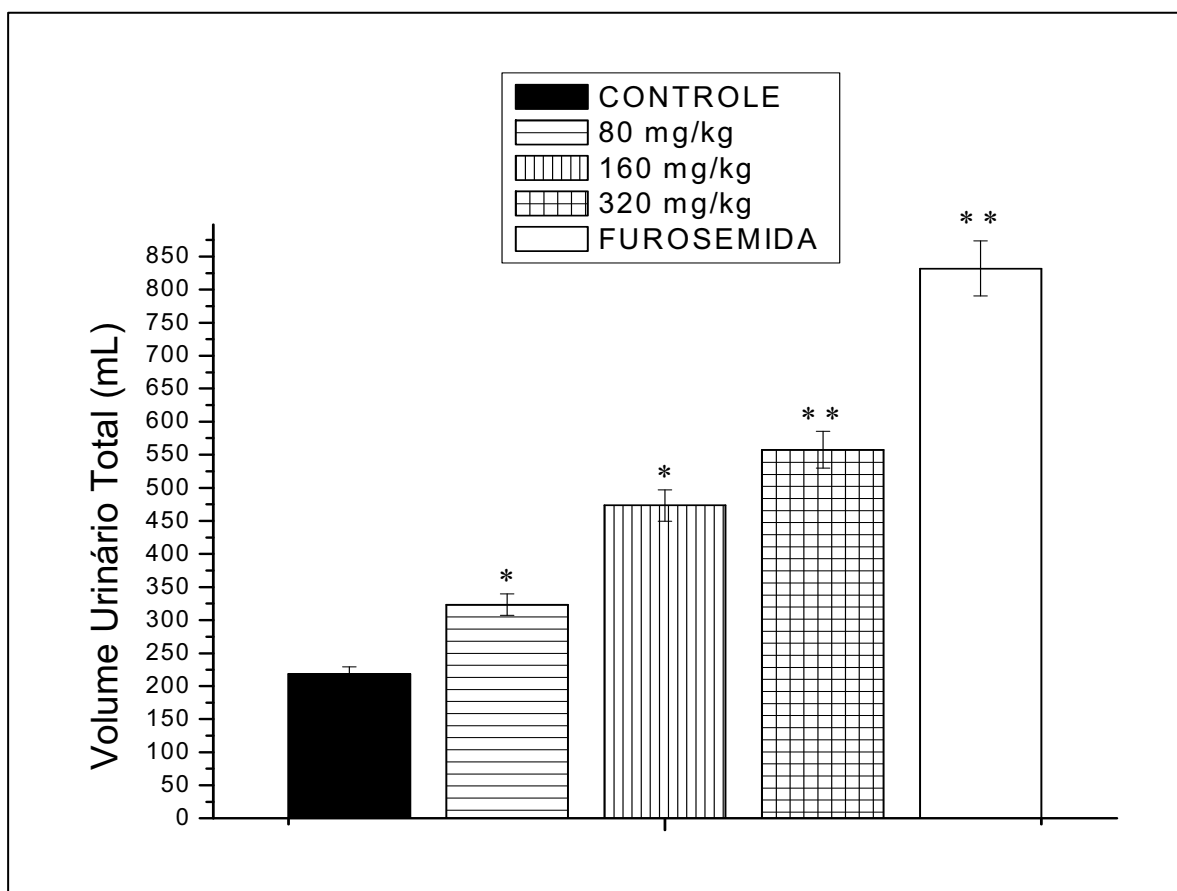


Figura 4 – Somatório de todo o volume urinário, produzido por cada grupo tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

Em relação ao consumo hídrico, a tabela 13 expressa os dados das médias diárias desse consumo, observando-se um valor final significativo desse parâmetro, nos grupos tratados com o EAPC e, da mesma forma, o tratado com furosemida, em relação ao controle.

Tabela 13 – Valores médios diários do consumo hídrico dos grupos estudados (n = 6) no teste de atividade diurética, após administração do EAPC (80, 160, 320 mg/kg), furosemida (20m g/kg) e solução salina.

GRUPOS N = 6	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	MÉDIA ± DP	% em relação à salina
80mg/kg	31,2	26,8	28,3	30,0	31,7	26,5	22,5	31,7	44,2	30,3±6,0*	123,67*
160mg/kg	27,5	29,2	28,3	31,7	31,2	26,7	25,5	34,3	45,3	31,1±6,0*	126,94*
320mg/kg	30,0	29,2	26,7	26,7	34,3	29,2	30,8	36,3	48,3	32,4±6,8*	132,24*
Controle Negativo	29,7	25,0	24,2	25,3	22,8	23,8	20,7	22,3	26,7	24,5±2,6	100
Furosemida	38,3	43,3	35,8	43,3	41,8	45,0	35,5	38,2	54,3	41,7±5,8*	170,2*

*Estatisticamente significativo em relação ao grupo da salina (ANOVA, $p = 0,0412$, Teste - t Student, $p < 0,05$)

A Figura 5 esboça as médias dos nove dias em que o volume hídrico foi aferido. Isso deixa bem claro o maior consumo dos grupos tratados com o extrato em relação ao controle. Quando o consumo de água é comparado com o do grupo tratado com furosemida, fica evidente que a furosemida faz aumentar a ingestão hídrica, ocorrendo diferenças compatíveis àquelas observadas na produção de urina.

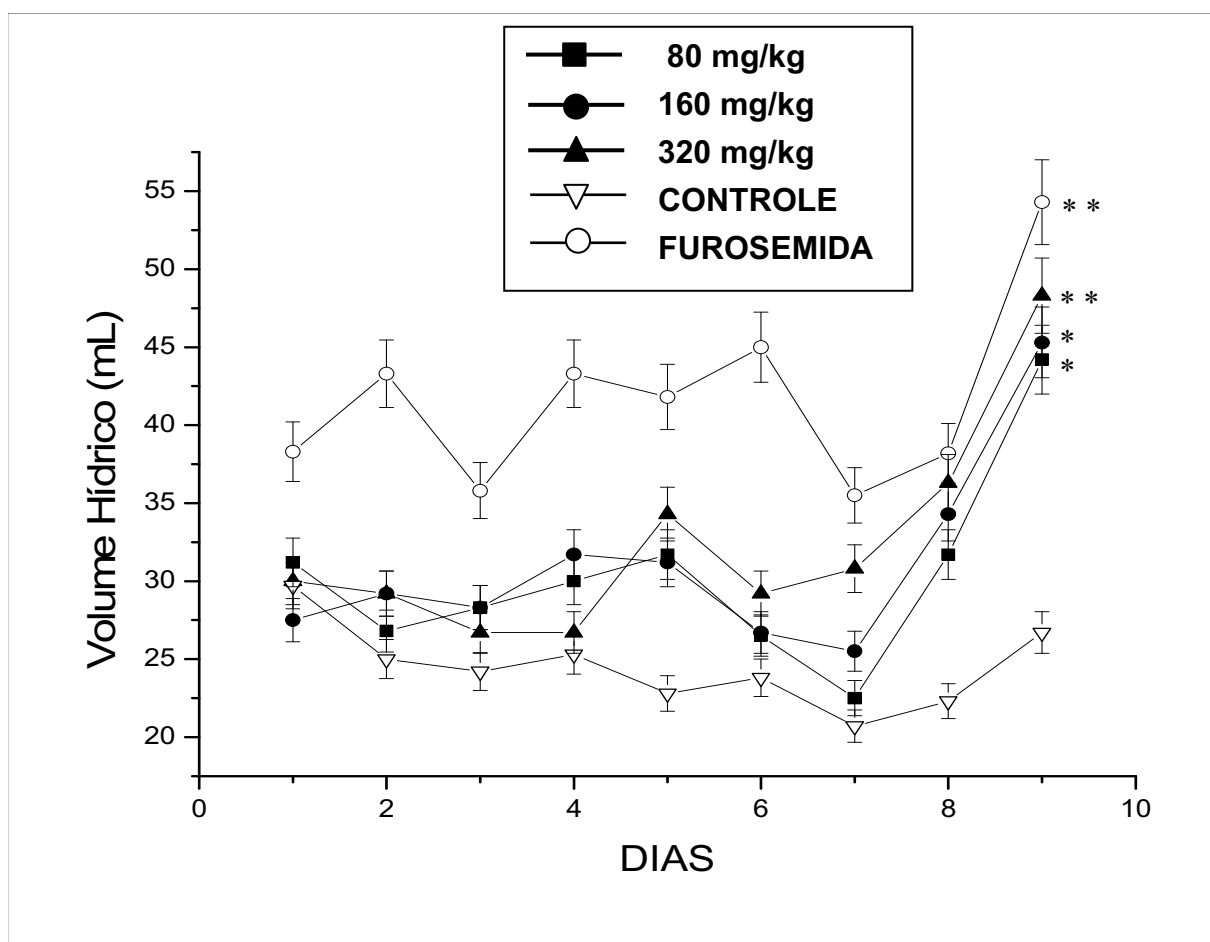


Figura 5 – Médias diárias de consumo hídrico, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

Na Figura 6, apresenta-se o somatório de todo o volume hídrico consumido pelos grupos tratados com o EAPC (80, 160, 320 mg/kg), com furosemida e o grupo controle. Com isso verificou-se que nos grupos tratados com *P. coriacea*, à medida que houve aumento a dose do extrato, resultou em maior ingestão de água, com valores superando os 1600 mL para os grupos: EAPC 80, 160 e 320 mg/kg, e acima de 2200 mL para o grupo que recebeu Furosemida (20 mg/kg).

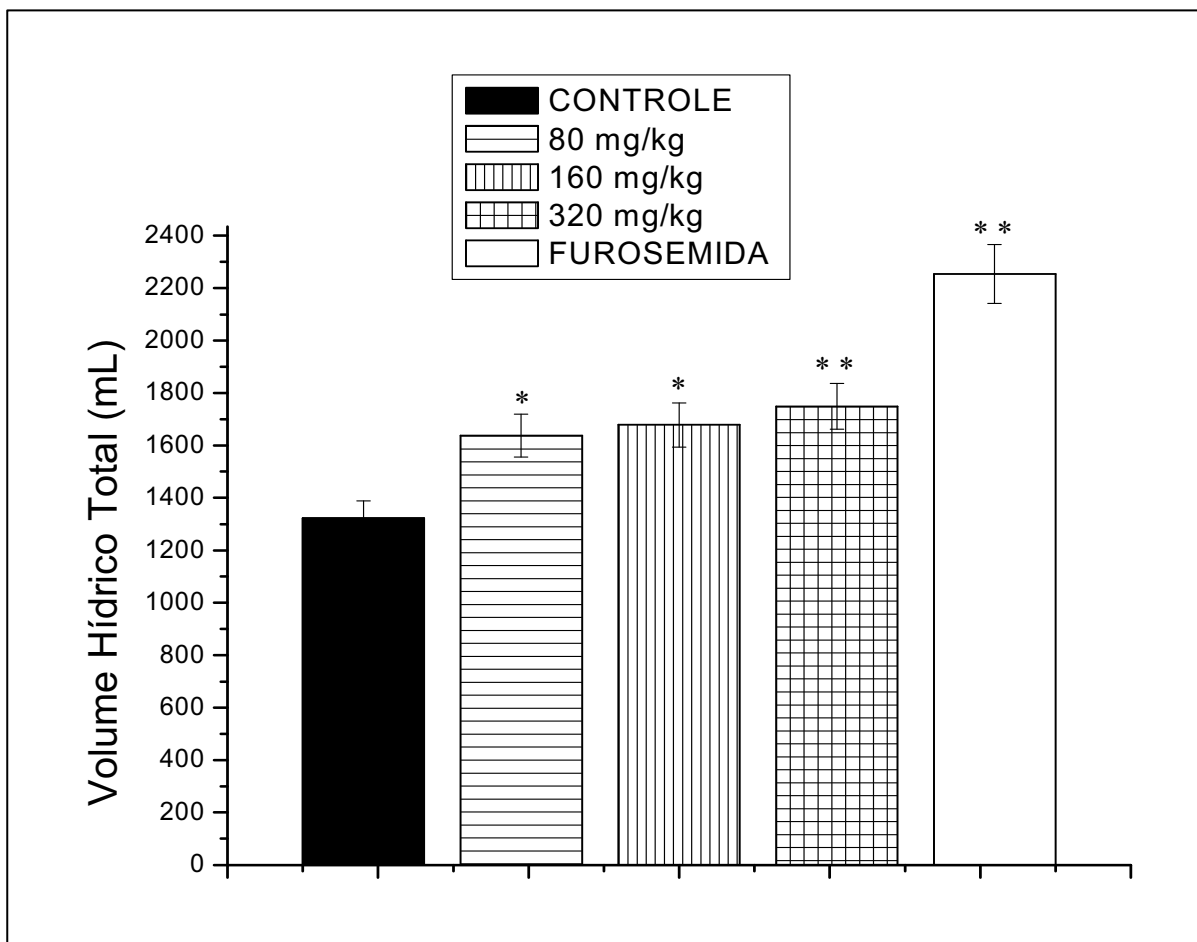


Figura 6 – Somatório de todo o volume hídrico, consumido por cada grupo tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

5.3.4 Efeitos sobre o balanço eletrolítico urinário.

Os valores das médias e desvios padrões para os parâmetros bioquímicos urinários (Na^+ , K^+ , Cl^- , uréia e creatinina) dos oito dias de tratamento estão apresentados na Tabela 14 – Apêndice C.

Conforme apresentado no Figura 7, verifica-se que em paralelo ao efeito sobre o volume acumulado de urina, houve uma significativa excreção urinária de sódio, estimulada tanto pela furosemida, quanto pelo extrato, nas doses de 160 mg/kg ($10,9 \pm 5,4$ mEq) e 320 mg/kg ($13,9 \pm 6,6$ mEq) em relação ao grupo administrado com salina, sendo que a dose 80 mg/kg ($5,1 \pm 2,9$ mEq) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

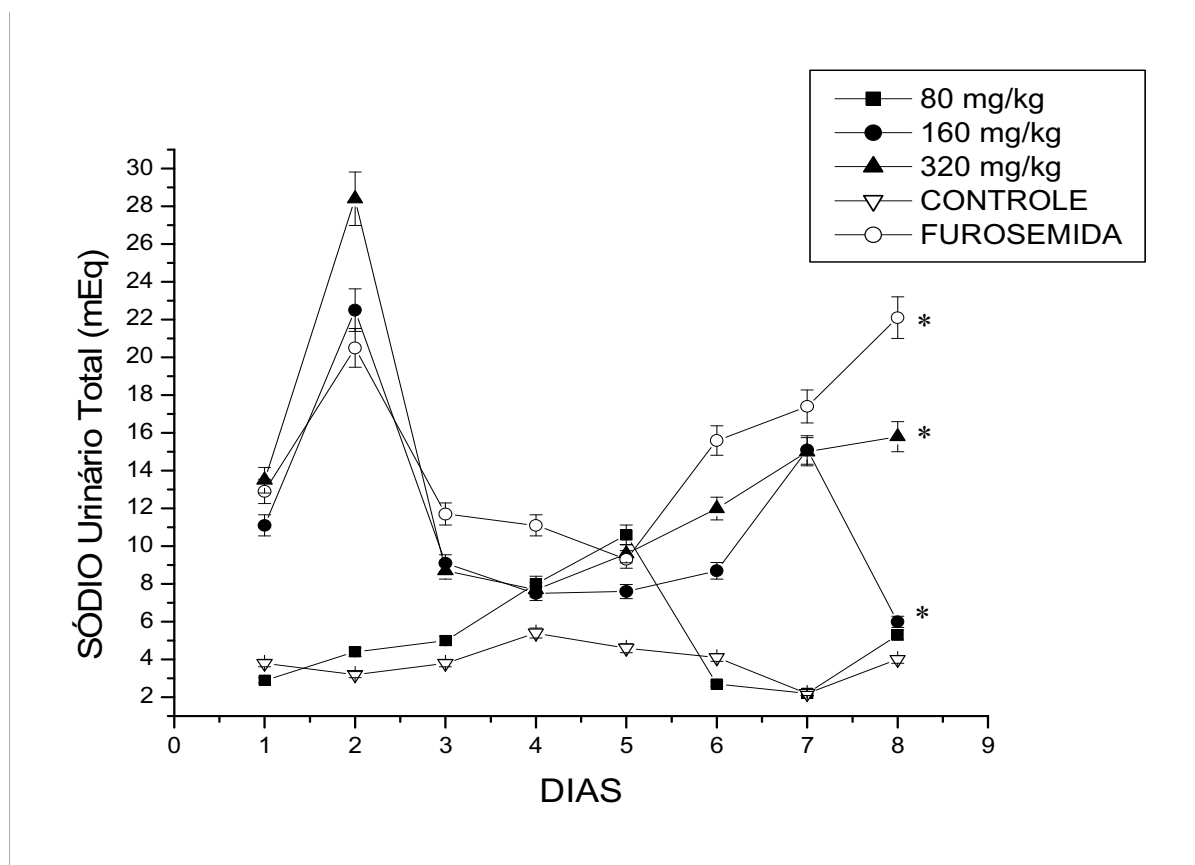


Figura 7 – Quantidade de sódio urinário (mEq) excretada diariamente após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=6). * Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,05$), (ANOVA, Teste - t Student).

Na Figura 8, apresenta-se o somatório de todo o sódio excretado pelos grupos tratados com o EAPC (80, 160, 320 mg/kg), com furosemida e o grupo controle. Assim verificou-se que nos grupos tratados com *P. coriacea*, à medida que houve aumento a dose do extrato, resultou em maior excreção de sódio, sendo o grupo que excretou a maior quantidade, o tratado com a maior dose do EAPC (320 mg/kg) 971,2 mEq, acima até do grupo que recebeu Furosemida (20 mg/kg).

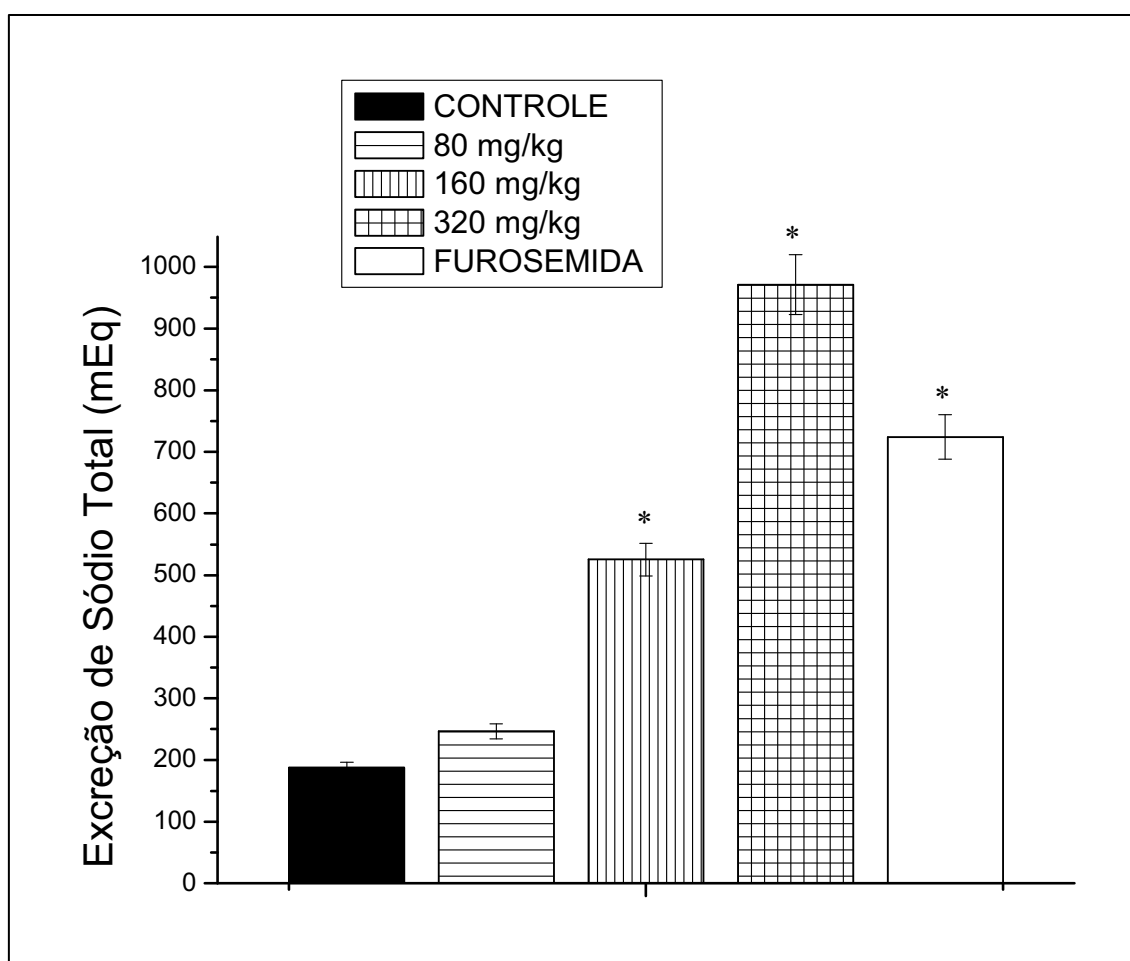


Figura 8 – Somatório de todo sódio excretado por cada grupo tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

Os grupos tratados com as doses de 160 e 320 mg/kg do EAPC e o grupo tratado com furosemida apresentaram médias de excreção de potássio ($23,8 \pm 10,4$, $36,3 \pm 11,8$ e $37,6 \pm 13,5$ mEq respectivamente) significantes em relação ao grupo controle negativo (Figura 9).

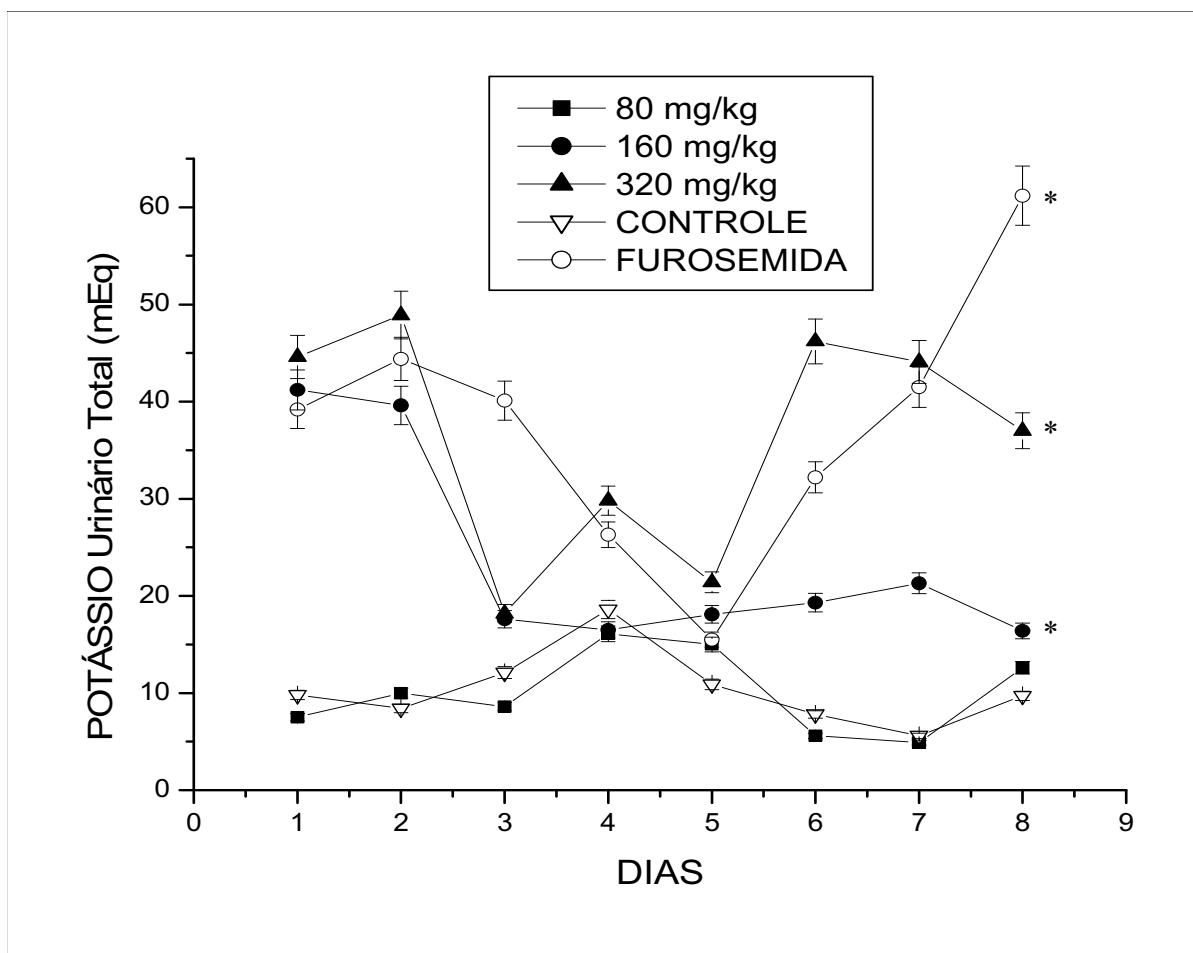


Figura 9 – Quantidade de potássio urinário (mEq) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

A Figura 10 apresenta o somatório de todo o potássio excretado pelos grupos tratados com o EAPC (80, 160, 320 mg/kg), com furosemida e o grupo controle. A medida que a dose do EAPC foi aumentada aumentou – se a excreção deste eletrólito, mas o grupo que excretou a maior quantidade durante todo o experimento o grupo tratado com Furosemida (20 mg/kg).

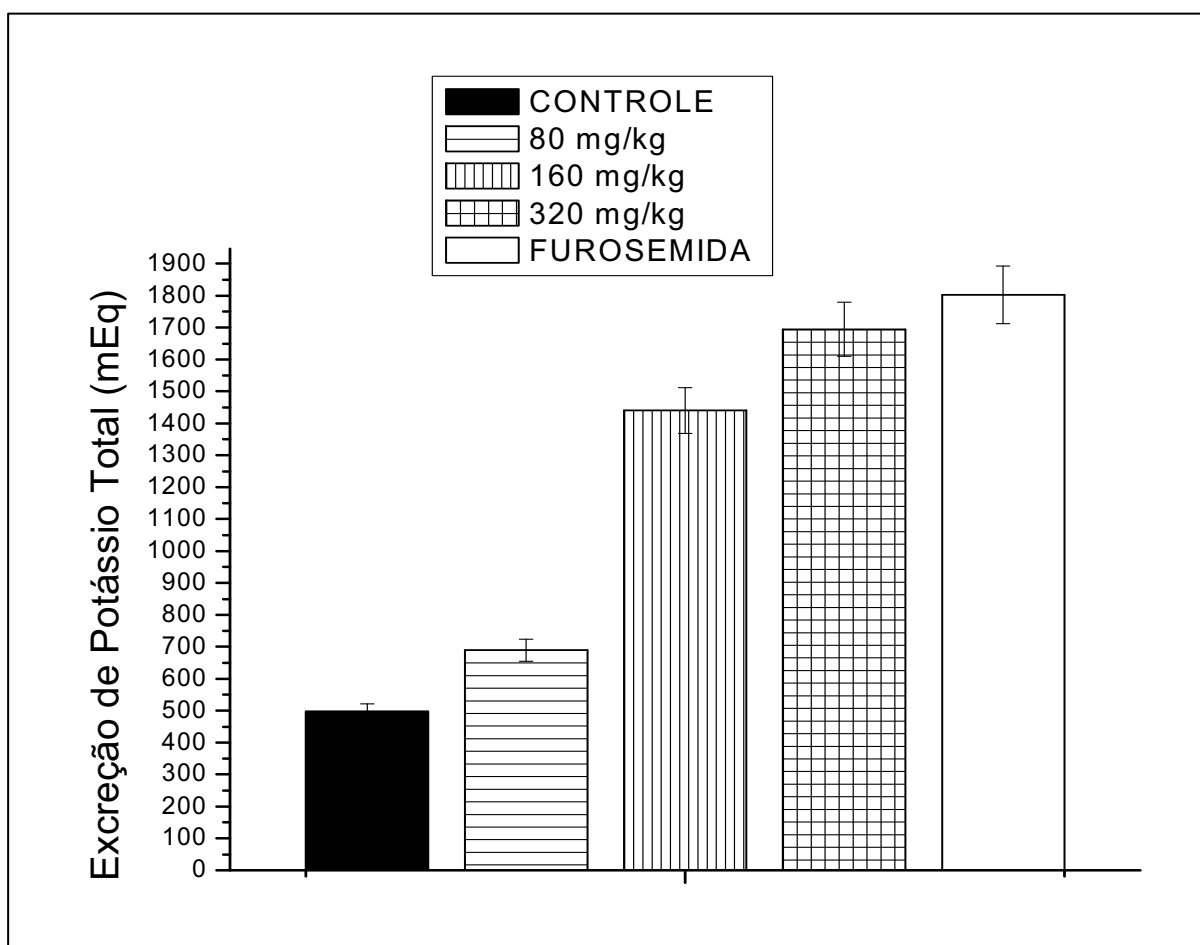


Figura 10 – Somatório de todo potássio excretado por cada grupo tratado, após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6/\text{grupo}$. * * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

O grupo que recebeu a dose 320 mg/kg do EAPC ($20,0 \pm 15,0$ mEq) obteve a maior média de excreção de cloreto (Cl^-) entre todos os grupos avaliados e apenas o grupo que recebeu a menor dose do EAPC (80 mg/kg) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo, tendo uma média final de $7,4 \pm 6,8$ mEq. Os dados da exceção de cloreto estão no Figura 11.

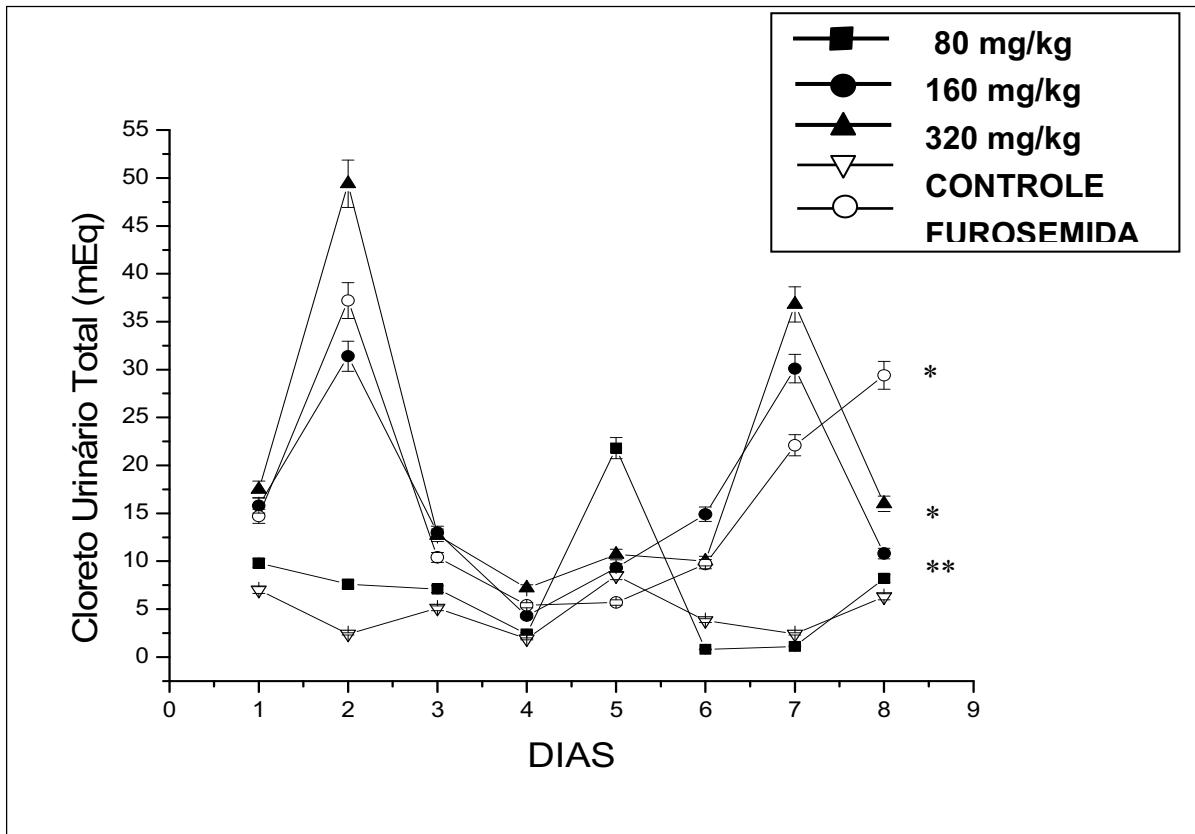


Figura 11 – Quantidade de cloro urinário (mEq) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student).

Em relação à excreção urinária de uréia (Figura 12), apenas os grupos tratados com 320 mg/kg de EAPC ($93,4 \pm 44,7$ mg) e furosemida ($190,5 \pm 6,8$ mEq) apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo controle negativo ($44,5 \pm 16,1$ mg). As outras duas doses do EAPC (80 e 160 mg/kg) não tiveram médias de excreção significativas ($46,0 \pm 31,3$ e $74,7 \pm 50,2$ mg respectivamente).

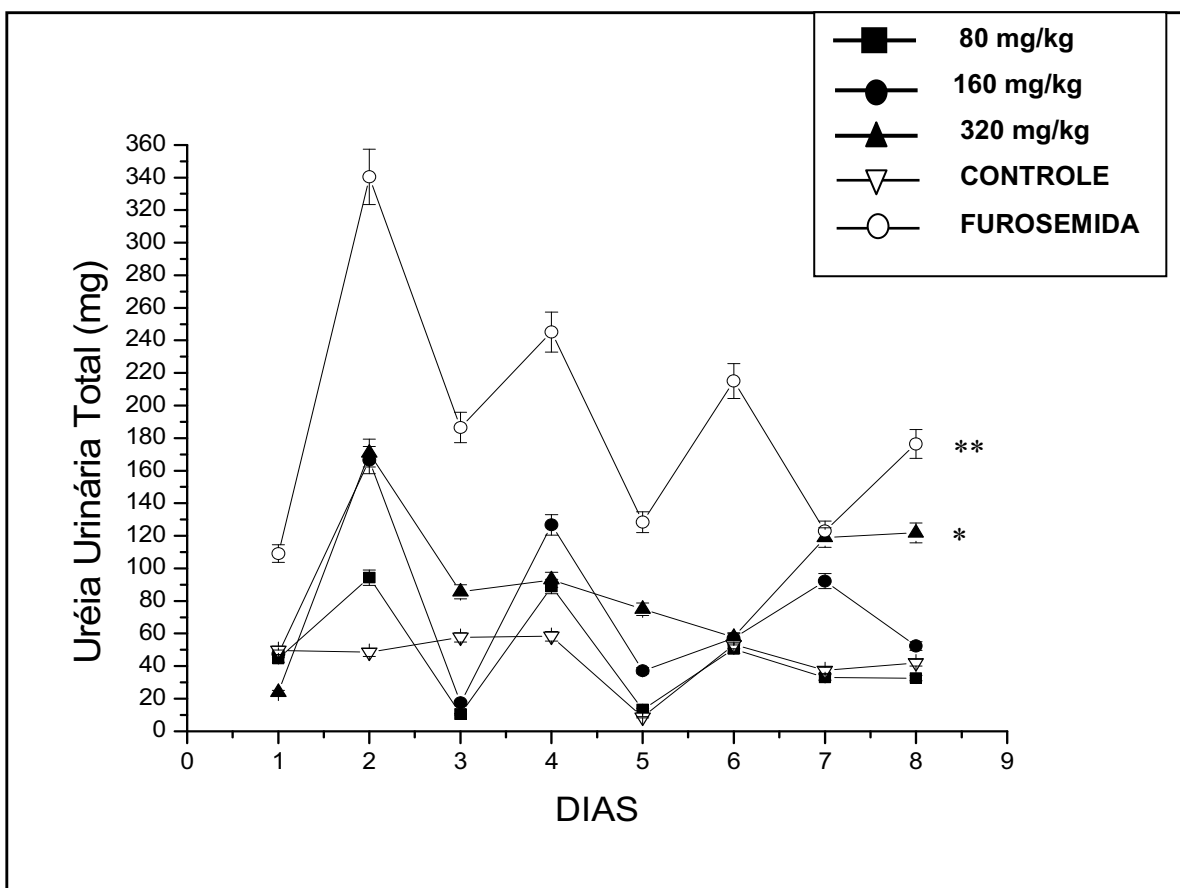


Figura 12 – Quantidade de uréia urinária (mg) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6$ /grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste - t Student, $p < 0,05$).

Por outro lado, na excreção urinária de creatinina, cujos dados estão apresentados no Figura 13, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p = 0,38522$).

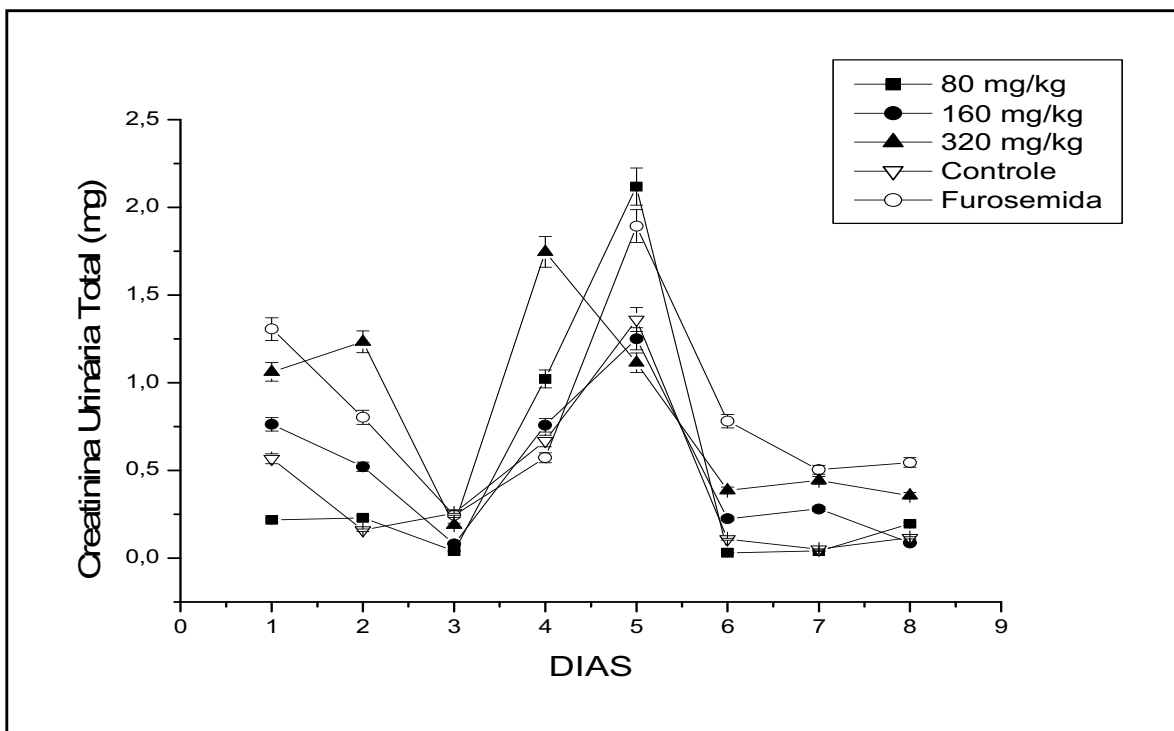


Figura 13 – Quantidade de creatinina urinária (mg) excretada diariamente após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão da Média para $n = 6/\text{grupo}$ (ANOVA, $p = 0,38522$).

5.3.5 Uroanálise

Os resultados encontrados na uroanálise estão expressos na Quadro 5 – Apêndice D, sendo que, dentre os aspectos avaliados, obteve-se valores de pH entre 6,0 e 7,0 e densidade entre 1,005 a 1,015. Já os demais parâmetros analisados não apresentaram alterações.

5.3.6 Efeitos sobre o balanço eletrolítico sanguíneo.

Os valores das médias e desvios padrões para os parâmetros bioquímicos sanguíneos estão apresentados na Tabela 15 – Apêndice E.

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos, após a administração de uma dose diária oral da furosemida 20 mg/kg e do EAPC 80, 160 e 320 mg/kg sobre a bioquímica do sangue (Na^+ , K^+ , Cl^- , uréia e creatinina), durante os 8 dias de tratamento.

5.3.7 Efeitos sobre o peso relativo dos órgãos.

No final do experimento, após o sacrifício dos animais, o fígado e o rim foram coletados, avaliados macroscopicamente e pesados, não havendo diferenças entre as massas relativas (g/100 g de peso vivo) dos órgãos (Tabela 16).

Tabela 16 – Massas relativas dos órgãos (fígado e rim) após administração oral do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (80, 160, 320 mg/kg) comparados à furosemida (20 mg/kg) e controle negativo. Valores expressos em média para n = 6 / grupo (ANOVA, fígado $p = 0,12596$, rim $p = 0,11814$).

Grupos	Órgãos (massa relativa g/100 g peso vivo)	
	Fígado	Rins
80mg/kg	5,08 ± 0,29	1,17 ± 0,10
160mg/kg	5,09 ± 0,44	1,03 ± 0,13
320mg/kg	4,78 ± 0,53	1,13 ± 0,10
Controle	4,53 ± 0,33	1,04 ± 0,10
Furosemida	4,86 ± 0,41	1,17 ± 0,15

5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

5.4.1 Prospecção de constituintes da planta

Os resultados foram considerados positivos pela formação de precipitados, surgimento de coloração ou espuma.

Para as saponinas os testes foram considerados positivos pela formação permanente de espuma ou colarinho após a solução ser agitada. Realizando testes para alcalóides de acordo com a metodologia utilizada os resultados foram considerados positivos pela formação de precipitado floculoso ou turvação da solução. Os testes para taninos foram considerados positivos pela formação de uma coloração azulada. Em relação a esteróides/triterpenóides, aos flavonóides os resultados foram negativos, pois quando em comparação com o extrato bruto, não notou-se o surgimento de nenhuma coloração.

5.4.2 Cromatografia de camada delgada CCD

De acordo com os dados obtidos nas análises por CCD, verificou-se a presença metabólitos secundários, tais como esteróides/triterpenóides, taninos, terpenos, flavonóides e alcalóides.

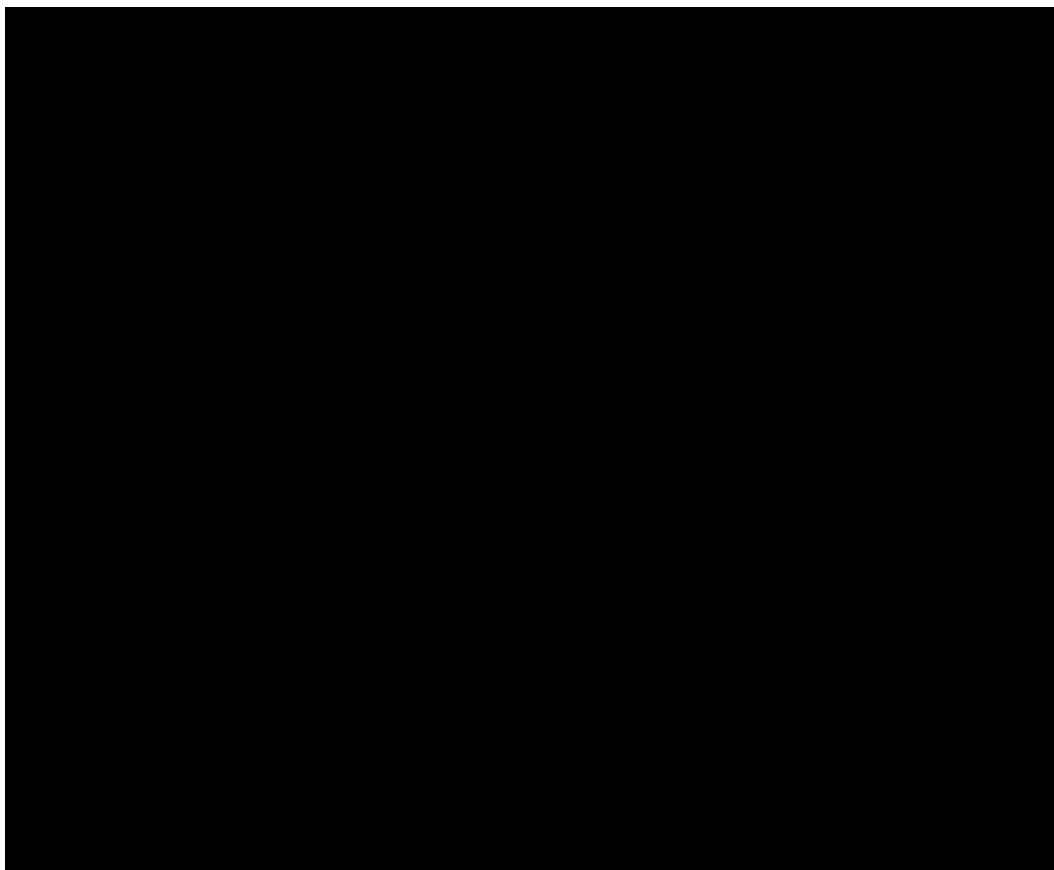


Figura 14: Cromatografia de camada delgada do extrato aquoso bruto liofilizado da *Palicourea coriacea*. Resultados positivos: 1 - alcalóides; 2 - flavonóides; 3 - esteróides/triterpenóides; 4 - taninos.

6 DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA

O uso de plantas medicinais como formas alternativas de tratamento de diversas enfermidades é antigo, mas essa prática é feita de forma empírica, sem preocupações em relação à forma de cultivo, ao cuidado com o solo, à forma de coleta das plantas, à forma de preparo, às doses e aos riscos de toxicidade.

Apesar das técnicas de síntese química terem evoluído muito, as plantas ainda constituem um grande arsenal de substâncias potencialmente terapêuticas ou de seus precursores, que têm sido utilizadas tanto na forma de plantas medicinais quanto na forma de insumos para as indústrias farmacêuticas (INTERSIMONE et al., 2005).

Por isso o interesse sobre o estudo destas plantas com atividades farmacológicas vem crescendo atualmente e os pesquisadores procuram responder se estas plantas possuem efeitos benéficos ou não e quais os mecanismos responsáveis por esses efeitos e, principalmente, se além de efeitos benéficos, essas plantas apresentam efeitos indesejáveis e qual o grau de toxicidade.

A escolha de espécies vegetais para a pesquisa tendo como base o uso popular serve como um atalho para a descoberta de novos fármacos, já que a aplicação destas plantas como medicamentos caseiros evidencia efeitos terapêuticos em humanos, mesmo sabendo que estes não estão isentos de efeitos colaterais ou tóxicos (MIGUEL; NODARI, 2004).

Tais pesquisas vêm confirmando a atividade diurética de plantas ou de seus derivados, que já eram do arsenal terapêutico popular há séculos na região Centro – Oeste.

A *Palicourea coriacea* é utilizada há anos como diurético, no tratamento de cálculos renais, inflamação/infecção de uretra, rins e bexiga e continência urinária pelas populações do Cerrado, mas poucos estudos sobre sua toxicidade foram feitos (PEREIRA et al., 2006; FREITAS et al., 2011).

Vários estudos evidenciam a ocorrência de toxicidade de algumas plantas pertencentes ao mesmo gênero da *Palicourea coriacea*.

Tokarnia et al. (2000), relata casos de intoxicação de bovinos com exemplares do gênero *Palicourea*, tais como a *Palicourea grandiflora* (H. B. k.)

Standl, a *Palicourea juruana* Krause e a *Palicourea marcgravii* St. Hil, sendo esta última considerada a planta de maior interesse agropecuário do Brasil, devido a sua extensa distribuição geográfica, boa palatabilidade, alta toxicidade (0,6 g/kg de folhas frescas para bovinos) e efeito cumulativo.

Na avaliação da toxicidade aguda oral do extrato aquoso bruto liofilizado da *Palicourea coriacea*, a administração do extrato, na dosagem de 2000 mg/kg, não gerou efeitos tóxicos e as observações comportamentais sistemáticas estiveram na escala 0 no *screening* hipocrático.

Freitas et al. (2011), em seu trabalho sobre a toxicidade aguda oral, em ratos, do extrato etanólico da *Palicourea coriacea* também não encontrou nenhum sinal de toxicidade ou mesmo letalidade nos animais no período de observação do experimento.

Já Pereira et al. (2006), avaliando a toxicidade aguda, em camundongos machos, do extrato etanólico da *Palicourea coriacea*, por administração intraperitoneal, observou que o grupo tratados com a dose mais baixa aplicada (500 mg/kg), apresentou perda de sensibilidade ao toque e atividade motora reduzida, além de quadro diarréico brando após 15 min da aplicação da droga que persistiu por 12 h. O grupo que recebeu a dose intermediária (750 mg/kg), diferentemente do grupo anterior, não apresentou quadro diarréico, persistindo apenas a perda de sensibilidade ao toque e a atividade motora reduzida nos 12 min iniciais. No grupo que recebeu a maior dose (1000 mg/kg), observou-se em todos os animais uma relativa perda de sensibilidade ao reflexo, com atividade motora reduzida e ptose palpebral em 40% dos animais durante os primeiros quinze minutos. Em 3 minutos, todos os animais apresentaram uma defecação aquosa intermitente. Este quadro persistiu por cerca de 12 h.

Essas diferenças no *screening* hipocrático, entre os três experimentos, podem ser justificadas pela via de administração escolhida, pois os efeitos mais intensos foram observados no trabalho em que os animais receberam as doses por via intraperitoneal, já nos trabalhos que escolheram a via oral não apresentaram alterações, provavelmente em decorrência de diferenças farmacocinéticas (velocidade e extensão de absorção, metabolismo – possibilidade de eliminação pré-sistêmica).

Nenhum animal dos grupos estudados, tanto ratos quanto camundongos, chegou a óbito durante os 14 dias seguintes de observação e o extrato aquoso de

Palicourea coriacea foi considerado com praticamente atóxico para ratos e camundongos por via peroral.

Na avaliação ponderal dos animais, alguns camundongos apresentaram uma redução de peso, principalmente os três animais machos do grupo controle, o que pode ser explicado, provavelmente, pelo stress do experimento.

Na análise histopatológica, algumas alterações foram encontradas, mas sem diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

Perante todos estes resultados, entendemos que o EAPC pode ser enquadrado à Classe 5 (substância com DL50 superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerado de baixa toxicidade, em contraposição dos relatos de que algumas espécies deste gênero são altamente tóxicas para bovinos.

6.2 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

Previamente à administração do EAPC, foram observados por um período de 5 dias, a produção urinária e o volume de ingestão hídrica dos animais dos grupos experimentais a fim de se verificar o padrão fisiológico destes e comparar com os estabelecidos na literatura.

Os grupos experimentais apresentaram médias dos volumes de ingestão hídrica de $27,8 \pm 3,98$ mL e da produção urinária de $7,1 \pm 2,8$ mL (Quadro 4 – Apêndice B) e estão muito próximos dos referenciados na literatura (Valores de referência - Consumo hídrico / 24 h: 24 a 35 mL. Produção urinária / 24 h: 2 a 15 mL/24 h), revelando assim um bom padrão fisiológico dos animais para o início dos experimentos (AGUNU et al., 2005; BENJUMEA et al., 2005; LAHLOU et al., 2006; OECD 32/2000).

Observou-se, neste trabalho, um efeito dose-dependente no volume de excreção urinária total, bem como no consumo de água.

Com relação ao consumo hídrico, observou-se que, em relação às médias no período do pré-teste, a administração do EAPC nas doses de 80, 160 e 320 mg/kg, promoveu um aumento da taxa de ingestão hídrica em relação a salina, em função da maior excreção urinária promovida pelo extrato. Pode-se verificar que a administração do EAPC 80 mg/kg promoveu uma ingestão hídrica 23,67% superior ao grupo controle, já as doses de 160 e 320 mg/kg e furosemida, promoveram um

aumento de 26,94%, 32,24% e 70,2%, respectivamente, superiores ao grupo controle.

Tanto o fármaco controle quanto o extrato em suas diferentes doses, apresentaram maior ação diurética que o controle negativo variando numa faixa de 46% - 275% (Tabela 12), sendo mais expressiva para as administrações da furosemida (275%), e do EAPC nas doses de 160 mg/kg (114%) e 320 mg/kg (151%). Diferente do que foi demonstrado por Freitas et al. (2011), em seu estudo da atividade diurética do extrato etanólico da *Palicourea coriacea*, cuja dose de 80 mg/kg produziu um aumento no volume urinário 37% superior ao que foi observado pela administração da furosemida.

Isso pode ter ocorrido por que a extração etanólica obteve os compostos responsáveis pela atividade diurética em maior quantidade. Mas acredita – se que esses compostos sejam polares, pois tanto o extrato aquoso quanto o etanólico apresentaram atividade diurética. Outra explicação para essa diferença na atividade diurética é que o trabalho de Freitas et al. (2011), foi realizado na forma de administração em dose única e não dose múltipla, não havendo tempo para adaptação do organismo dos animais.

Em paralelo ao efeito diurético demonstrado pela administração do extrato aquoso da *P. coriacea*, verificou – se um aumento significativo e dose – dependente da excreção eletrolítica (Na^+ , K^+ e Cl^-), justificando assim, o aumento do volume de urina apresentados pelos grupos tratados. Os maiores valores de eliminação de eletrólitos foram detectados na urina dos animais tratados com as maiores doses do extrato.

Esse aumento na excreção eletrolítica se deu porque o efeito primário dos diuréticos em geral consiste em diminuir a reabsorção de sódio e de cloro do filtrado, sendo o aumento da perda de água secundário à excreção aumentada de sal. Devido à reabsorção de uma proporção muito grande do sal e da água que penetra no túbulo e no glomérulo, a ocorrência de uma pequena redução da reabsorção pode resultar em acentuado aumento na excreção (BERNDT; STITZEL, 2005; HANG, 2004).

Se forem levados em conta os somatórios totais da excreção de sódio e potássio durante todo o experimento fica claro que, o grupo tratado com o EAPC na dose de 320 mg/kg, apresentou uma excreção de sódio bem superior ao grupo que recebeu furosemida e inferior ao mesmo em relação à excreção de potássio, o que

leve a crer que o EAPC apresenta atividade diurética semelhante à furosemida, mas sem os principais efeitos colaterais causados pela excessiva excreção de potássio.

Sabe-se que a relação Na^+ / K^+ serve como um indicador para comparar o efeito de diferentes diuréticos, e que para furosemida (diurético de alta eficiência) essa relação seria aproximadamente igual a 1, devido à alta excreção destes íons. Para os tiazídicos essa proporção é inferior a 1, aumentando a concentração de potássio na urina, alterando a relação Na^+ / K^+ . No caso dos poupadores de potássio esta relação é maior que 1, pois a quantidade deste íon na urina é diminuída (RATNASOORIYA et al., 2004).

O EAPC apresentou valor de Na^+ / K^+ menor que 1 (80 mg/kg – 0,35 / 160 mg/kg – 0,36 / 320 mg/kg – 0,59), o que indica um efeito diurético semelhante ao dos tiazídicos, de forma parecida aos resultados encontrados por Thoene et al (2007), pois seu extrato de *Polylepis australis* apresentou valor da relação Na^+ / K^+ inferior a 1.

Freitas et al. (2011), na avaliação da atividade diurética do extrato etanólico da *P. coriacea*, Ratnasooriya et al (2004) estudando a *Spilanthes acmella* e Machín et al. (2010) em seu trabalho com a *Costus pictus*, encontraram a relação Na^+ / K^+ próxima a 1, o que indica um efeito diurético semelhante ao da furosemida.

Já ITERSIMONE et al. (2005), obtiveram valores maiores que 1, caracterizando o efeito diurético da *Phrygilanthus acutifolius* semelhante aos poupadores de potássio.

No presente estudo, o grupo tratado com furosemida não apresentou a razão Na^+ / K^+ próximo a 1, o que pode ser explicado levando-se em consideração que o teste foi realizado com doses múltiplas durante oito dias, tendo havido adaptação da fisiologia dos animais à excreção desses eletrólitos, para manter seu equilíbrio eletrolítico, o que não ocorreu nos trabalhos citados anteriormente, que tiveram duração de 24 h com dose única.

Em relação à excreção urinária de uréia, apenas os grupos tratados com 320 mg/kg de EAPC e furosemida (20 mg/kg) apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo controle, aumento provavelmente decorrente do incremento do volume urinário excretado. Quanto à excreção urinária de creatinina, não houve diferença entre os grupos (ANOVA, $P = 0,38522$). Tal resultado explica-se por ser a creatinina uma substância endógena que sofre filtração glomerular

completa com mínimas secreção e reabsorção tubulares, o que explica a não influência dos diuréticos em sua excreção (LOPES; MARTINELLI, 2010).

Gonçalves (2011), obteve dados semelhantes na excreção de uréia, bem como da creatinina, confirmando a inatividade dos diuréticos na excreção desta última.

Houve um incremento na excreção urinária dos eletrólitos e os valores de eletrólitos no plasma foram semelhantes de todos os grupos analisados. Portanto, a resposta diurética não é devido a um efeito salino ou ao aumento do consumo hídrico, mas sim de atividade intrínseca.

Na avaliação da uroanálise das amostras dos animais do experimento (quadro 5 – Apêndice D), verificou-se que o pH urinário variou entre 6,0 – 7,0 e a densidade, entre 1,005 à 1,015. Em relação aos demais parâmetros, não foram observados sinais de alterações patológicas, pois uma revisão bibliográfica mostrou que os parâmetros encontrados em nosso experimento estão de acordo com informações pesquisadas (DANTAS et al., 2006). Em síntese, a uroanálise e as avaliações macroscópicas realizadas sugerem que não houve alterações indicativas de lesões ou alterações nos rins e fígado.

Nas dosagens de eletrólitos no plasma não foi observado aumento nas concentrações de sódio, potássio e cloreto quando da administração do extrato e da furosemida. Esse resultado é favorável visto que os diuréticos devem promover sua ação diurética sem alterar o equilíbrio eletrolítico no sangue.

As dosagens plasmáticas de creatinina e uréia quando da administração da furosemida e do extrato também não tiveram aumento em suas concentrações, dado importante que sugere uma adequada atividade renal dos animais e a não interferência no metabolismo de proteínas (LOPES; MARTINELLI, 2010).

Analisando estes dados obtidos, ficou clara a atividade diurética do extrato aquoso bruto liofilizado da *Palicourea coriacea*, em esquema de dose múltipla, confirmando assim os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, num estudo sobre atividade diurética do extrato etanólico da *Palicourea coriacea* (dose única), em que a mesma apresentou resultados semelhantes, tanto no volume urinário e de consumo de água quanto na excreção de eletrólitos, uréia e creatinina (FREITAS et al, 2011).

Essa atividade diurética pode ser justificada pela presença do ácido ursólico como constituinte majoritário do extrato de *Palicourea coriacea* (OLIVEIRA

et al., 2006), já que há informações importantes, afirmando que o ácido ursólico e seu isômero, o ácido oleanólico, possuem atividade diurética (ALVARES et al., 2002), ação antibacteriana (KOWALEWSKI et al., 1976), antifúngica (JEONG et al., 1999; TANG et al., 2000), anti-HIV (KASHIWADA et al., 2000), protetora do fígado, antiinflamatória, anti – hiperlipêmica e antitunoral (LIU, 1995).

6.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica confirmou a presença de esteróides/triterpenóides, taninos, terpenos, flavonóides e alcalóides no extrato aquoso de *P. coriacea*.

Resultados semelhantes aos obtidos por Laureano (2001) que fez o estudo fitoquímico do extrato alcoólico das folhas da *Palicourea coriacea* identificando como principais constituintes químicos: saponinas, taninos, cumarinas, alcalóides, compostos redutores e polissacarídeos, mas quando a extração foi feita com água esses constituintes foram obtidos com maior evidência, principalmente os alcalóides.

Outro autor, Nascimento (2005) relatou a presença de alcalóides, taninos e cumarinas, compostos de interesse terapêutico, na avaliação do extrato etanólico das folhas de *P. coriacea*.

7 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o extrato pertence à Classe 5 (substância com DL50 superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerada de baixa toxicidade.

O efeito diurético (aumento de volume urinário, aumento do consumo hídrico e aumento da excreção de eletrólitos e uréia) do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Palicourea coriacea* foi dose-dependente.

O EAPC não alterou as concentrações sanguíneas de sódio, potássio, cloreto, uréia e creatinina, demonstrando não provocar desequilíbrio hidroeletrólítico.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a *Palicourea coriacea* é bastante utilizada pela população por via oral, na forma de extrato aquoso, no tratamento de várias patologias esse estudo preliminar dá certa segurança ao uso popular devendo ser complementado com novos estudos de toxicidade subaguda, crônica e de toxicidade aguda em outra espécie não roedora como estabelecido pela ANVISA Portaria 116/96, tanto do extrato etanólico quanto do aquoso.

Os resultados obtidos são úteis para ajudar a validar a utilização etnofarmacológica e tradicional da *Palicourea coriacea*, na forma de decocto, para a obtenção de efeito diurético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUNU, A.; ABDURAHMAN, E. M.; ANDREW, G. O.; MUHAMMED, Z. Diuretic activity of the stem-bark extracts of *Steganotaenia araliácea hochst (apiaceae)*. **J. Ethnopharmacol.**, v.96, n.3, p.471-475, 2005.
- AL- ALI, M.; WAHBI, S.; TWAIJ, H.; AL-BADR, A.; *Tribulus terrestris*: preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with *Zea mays*. **J. Ethnopharmacol.**, v.85, p.257–260, 2003.
- ALMEIDA, E. R. – **Plantas medicinais Brasileiras**. São Paulo: Ed. Hemus, 1993. 341 p.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464 p.
- ALONSO, J.R. **Fitomedicina: curso para profissionais da área da saúde**. São Paulo: Pharmabooks, 2008. 195 p.
- ALVARES, M. E.; MARIA, A. O.; SAAD, J. R. Diuretic activity of *Fabiana patagonica* in rats. **Phytother. Res.**, v.16, p.71-73, 2002.
- ARMAS, J. R.; ACEVEDO, J. A.; VALIENTE, M. A. A. Diuretic activity of the methanol extract from maracuyá leaves (*Passiflora edulis* Sims) in rats. **Rev Cubana Plant Med**, v.14, p.4, 2009.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.61–70.
- BENJUMEA, D.; ABDALA, S.; HERNANDESZ, L. F. Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic canary species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, 2005.
- BERNDT, W. O.; STITZEL, R. E. Água, Metabolismo dos Eletrólitos e Diurético. In: CRAIG, C. R.; STITSEL, R. E. **Farmacologia Moderna**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- BRANDÃO, M. **Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais**. Inf. Agropec.: Belo Horizonte, 1980. 60 p.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **RDC N° 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05/09/2011.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **RDC nº 17, 24 de fevereiro de 2000**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 14/02/2011.
- BRASIL, Presidência da República – Casa Civil. Lei nº **11.794, de 8 de outubro de 2008**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/11794.htm. Acesso em: 16/02/2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n.º116 de 08 de Agosto de 1996**. Dispõe sobre a Norma para o estudo de toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 17/02/2011.
- BRITO, A. S.; **Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo**. Campinas-SP: Editora da UNICAMP, 1994. 122 p.

- CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. e Schl] Mitch, Alismataceae). **Rev. Bras. Farmcogn.**, v.84, n.1, p.5-7, 2003.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, Brasil, v.18, p.314-319, 2008.
- CASTRO, M. S. A. Farmacologia de produtos naturais. In: FRANCISCHI et al. **A Farmacologia em nossa vida**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. p.115-135.
- CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada á biologia**. Goiânia: CEGRAF-UFG, 1990. 188 p.
- COBEA. **Colégio Brasileiro de Experimentação Animal**. Disponível em: www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos. Acesso em: 17/02/2011.
- CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R. M. S. Avaliação do Risco. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.73-79.
- CUNHA, L. C. **Estudo farmacognóstico e da atividade antitumoral, antiinflamatória e toxicidade pré-clínica do *Synadenium umbellatum***. 2003. 128 f. Projeto de Pesquisa – CNPq, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.
- CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. p. 5.
- DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Science Health Science**, v. 28, n. 2, 2006.
- DE LA CRUZ, M. G. **Plantas medicinais de Mato Grosso: a farmacopéia popular dos raizeiros**. Cuiabá: Carlini e Caniato, 2008.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p.
- ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacol Ther**, Brasil, v.64, p.201-214, 1994.
- ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e Editora da UFSC, 2004, 108 p.
- ELVIN-LEWIS, Memory. Should we be concerned about herbal medicines? **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.75, p.141-164, 2001.
- ESPINDOLA, L. S.; VASCONCELOS JUNIOR, J. R.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Med.**, v.70, p.1093-1095, 2004.
- FLECKNELL, P. **Laboratory animal anesthesia**. 2.ed. New York: Academic Press, 1996. 274 p.

- FREIRE, S. M. F. **Atividades analgésicas, antiinflamatórias e cardiovasculares da *Scoparia dulcis* L. (vassourinha). Estudos químicos e farmacológicos.** 1992. 120 f. Dissertação (mestrado em ciências) – USP, São Paulo, 1992.
- FREITAS, P. C. M.; PUCCI, L. L.; VIEIRA, M.S.; LINO JR. R. S. ; OLIVEIRA, C. M .A.; CUNHA, L. C. PAULA, J. R. VALADARES, M. C. Diuretic activity and acute oral toxicity of *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum. **J. Ethnopharmacol.**, v.134, n.2, p.501-503, 2011.
- GANAPATY, S.; DASH, G. K.; SUBBURAJU, T.; SURESH, P. Diuretic, laxative and toxicity studies of *Cocculus hirsutus* aerial parts. **Fitoterapia.** v.73, p.28-31, 2002.
- GONÇALVES, N. Z. **Avaliação da Toxicidade Oral Aguda e Atividade Diurética de *Celtis iguanaea* (Jacq). Sargent.** Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – UFG, Goiás. 2011. 90 p.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Formação de Urina pelos Rins. In: **Tratado de Fisiologia Médica.** 12.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011. Cap 26.
- HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia Ilustrada.** 2.ed. São Paulo: Artmed, 1998. 478 p.
- HELOU, C. M. B. Revisão/Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal: Efeito da angiotensina II na microcirculação renal. **J. Bras. Nefrol.** São Paulo, v.20, n.1, p.49-54, 1998.
- INTERSIMONE, N. H.; THOENE, A. D.; RIERA, A. S. Efecto diurético de extractos acuosos y alcohólicos de flores de *Phrygilanthus acutifolius* (corpo) en ratas. **Rev Cubana Plant Med.** Havana, v.10, p.3-4, 2005.
- IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev. Bras. Hipertens.** São Paulo, v.8, n.1. p.55-62, 2001.
- JEONG, T. S.; HWANG, E. I.; LEE, H. B.; LE, E. S.; KIM, Y. K.; MIN, B. S.; BAE, K. H.; BOK, S. H.; KIM, S. U. Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. **Planta Med.** v.65, p.261-263, 1999.
- JOLY, A. B., **BOTÂNICA:** introdução à taxonomia vegetal. 13.ed. São Paulo: Editora Nacional, 2002. 570 p.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123 p.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. Casarett & Doull's (Toxicologia) – **A ciência básica dos tóxicos** – Compêndio. 5.ed. Portugal: McGraw-Hill, 2001. p.13–26.
- KASHIWADA, Y.; NAGAO, T.; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, Y.; OKABE, H.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. **J. Nat. Prod.** v.63, p.1619-1622, 2000.
- KO, R.J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Clin. Toxicol.**, New York, v.37, n.6, p.697-708, 1999.
- KOHN, D. F. et al. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals.** New York: Academic Press, 1997. p.313-336.
- KOWALEWSKI, Z.; KORTUS, M.; EDIZA, W.; KONIAR, H. Antibiotic action of beta-ursolic acid. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** v.24, p.115-119, 1976.

- LAHLOU, S. et al. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.110, n.3, p.458-463, 2006.
- LAPA, A.J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador-BA: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), SPPC, 2001. 74 p.
- LAUREANO, L. C. **Caracterização morfoanatômica, perfil fitoquímico e aspectos etnobotânicos das espécies medicinais do cerrado: *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum.; *Rudgea virbunoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae)**. 2001. 138 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v.49, n.2, p.57-68, 1995.
- LOPES, A. A.; MARTINELLI, R. Farmacologia dos Diuréticos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 70.
- LUNA, L. G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York: MacGraw Hill, 1968. 258 p.
- MACHÍN, M. P.; OYARZUN, M. L. S.; CÁRDENAS, M. B.; RODRÍGUEZ, F. M.; AMADOR, M. C. V.; JIMÉNEZ, E. E. M.; MONTEAGUDO, G. L. Actividad diurética de una decocción de *Costus pictus* D. Don. **Rev Cubana Plant Med**, Havana, v.15, n.2, p.3-12, 2010.
- MAGALDI, A. J. B. Revisão/Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal: Regulação hormonal da reabsorção de água no ducto colector. **J. Bras. Nefrol**, v.18, n.4, p.401-404, 1996.
- MAGHRANI, M.; ZEGGWAGH, N. A.; HALOUI, M.; EDDOUKS, M. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.31-35, 2005.
- MALONE, M. H. "Pharmacological Approaches to Natural Products Screening and Evaluation" in **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**. Springer-Verlag, Berlin: Edited by Wagner, H. and Wolff, 1977. p. 23-53.
- MARTÍN, S. M. M.; NARANJO, J. P.; SALVADÓ, A. S.; RUIZ, C. M. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. En ratas. **Rev Cubana Plant Med**, v.9, n1, 2004.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 1998.
- MAZID, M. A.; DATTA, B. K.; NAHAR, L.; KHAIRUL BASHAR, S. A. M.; BACHAR, S. C.; SARKER, S. D. Antinociceptive, anti-inflammatory and diuretic properties of *Polygonum barbatum* (L.) Hara var. barbata. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn**, v.19, n.3, 2009.
- MENDONÇA, R.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. N. Flora vascular do Cerrado. In: Sano & Almeida (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p.287-556.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; BLOND, A.; BROUARD, J. P.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; MAMBU, L. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. **Bioorg Med Chem**, v.13, p.4499-4506, 2005.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. Ribeirão Preto: Editora Tecmedd, 2004. 115 p.

MIGUEL, P. G. ; NODARI, R. O. Biodiversidade : aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia** : da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS e Editora UFSC, 2004. Cap. 1.

MORAIS, I. C.; SILVA, L. D. G.; TRESVENZOL, L. M. F.; et al. Levantamento sobre Plantas Medicinais Comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). **Rev. Eletr. de Farmácia**, v. 2, n.1, p.13-16, 2005.

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; DE SOUZA, M. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the brazilian Cerrado. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.37-41, 2005.

NASCIMENTO, C.A do. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Palicourea coriacea* (RUBIACEAE)**. 2005. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

NAVES, L. A.; VILAR, L.; COSTA, A. C. F.; DOMINGUES, L.; CASULARI, L. A. Distúrbios na secreção e ação do hormônio antidiurético (revisão). **Arp. Bras. Endoc. Metab.** v.47 n.4, p.467-481, 2003.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil. **Quim. Nova**, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

NUNES, G. P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.83-92, 2003.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 32**. Guidance notes for analysis and evaluation of repeat-dose toxicity studies. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2000.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423**. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2001.

OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 64 p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998. 159 p.

OLIVEIRA, C. M. A.; TANAKA, C. M. A.; NASCIMENTO, C. A. do; SILVA, C. C. da; LEÃO, L. M.; KATO, L. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. **Achum. J. of Chem. Sciences**, v.61b, p.1443-1446, 2006.

- OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acad.**, v.7, n.2, 2007.
- PEREIRA, N. R. RIBEIRO, A. L. T.; BARBOSA, C. E. S.; KATO, L.; LACERDA, E. P. S. Avaliação da Toxicidade Aguda de *Palicourea Coriacea* (Cham) K. Schum em camundongo Swiss. **Rev. Eletr. de Farmácia**, v.3, n.2, p.56-58, 2006.
- PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Brasília: Ed. UnB, 2000.
- PUCCI, L. L.; CUNHA, L. C.; TRESVENZOL, L. M.; DE PAULA, J. R.; BOZINIS, M. C. V.; FREITAS, P. C. M. Avaliação da Toxicidade Aguda Oral e da Atividade Diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (congonha-de-bugre). **Lat. Am. J. Pharm.** v.29, n.1, p.30, 2010.
- RAMAMOORTHY, J.; VENKATARAMAN, S.; MEERA, R.; CHIRISTINA, A. J. M.; CHIDAMBARANATHAN, N. Physio- Phytochemical screening and Diuretic activity of leaves of *Pavetta indica* Linn. **J. Pharm. Sci. & Res**, v.2, n.8, p. 506-512, 2010.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. O Rim. In: **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007. p. 375.
- RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R. A. C.; Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.91, p.317-320, 2004.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano & Almeida (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. p.87-166.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996. p.1-14.
- RODRIGUES, L. A.; CARVALHO, A C.; GOMES, J. L.; BOTREL, R. T. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias, MG. **Bol. Agropecuário**, Lavras/MG, n.52, p.1-34, 2002.
- RUDDER, E. A. M. C. **Guia compacto das plantas medicinais**. São Paulo: Editora Riddel, 2002. 478 p.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 371-400.
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**. 4.ed. New York, Berlin: Springer, 2001. p. 1-39.
- SHENOY, J. P.; PAI, P. G.; SHOEB, A.; GOKUL, P.; KULKARNI, A.; KOTIAN, M. S. An evaluation of diuretic activity of *Morinda citrifolia* (Linn) (Noni) fruit juice in normal rats. **Int. J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sci.**, v.3, n.2, 2011.
- SILVA, S. R. **Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília: Fundação Pró – Natureza – FUNATURA, 1998. 109 p.
- SILVA, C. S. P. **As Plantas Medicinais do Município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil: Uma Abordagem Etnobotânica**. 2007. Dissertação (Mestrado em

Botânica) – Departamento de Pós - Graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2007. Disponível em: <<http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/2368/3/2007CristianeSoaresPereiradaSilva.PDF>> Acesso em: 14 fev. 2011.

SILVA, V. C.; CARVALHO, M. G.; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). **The Japan. Society of Pharmacog. and Springer**, v.62, p.356-357, 2008.

SIQUEIRA, V. L. D.; CORTEZ, D. A. G.; OLIVEIRA, C. E.; NAKAMURA, C. V.; BAZOTTE, R. B. Pharmacological Studies of *Cordia salicifolia* Cham in Normal and Diabetic Rats. **Braz. Arch. of Bio. and Tech.**, v.49, n. 2, p.215-218, 2006.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Bot. Brasílica**, v.20, n.1, p.135-142, 2006.

SWAPNADEEP PARIAL; JAIN, D. C.; JOSHI, S. B. Diuretic activity of the extracts of *Limonia acidissima* in rats. **Rasayan Journal Chem**, v.2, n.1, p.53-56, 2009.

TANG, H. Q.; HU, J.; YANG, L.; TAN, R. X. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. **Planta Med**, v.66, p.391-393, 2000.

TESHOME, N.; NEGUSSU, M.; KELBESSA, U. Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats. **J Ethnopharmacol**, v.95, p.57-61, 2004.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium: compêndio de fitoterapia**. 4.ed., Curitiba: Herbarium, Laboratório Botânico, 2001. 317 p.

THOENE, A. D.; INTERSIMONE, N. H.; RIERA, A. S. Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). **Rev Cubana Plant Med**, Havana, v.12, n.4, 2007.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2000. 320 p.

TRESVENZOL, L. M. et al. **Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, p. 23-28, 2006. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufg.br/revista/geral/home.htm>>. Acesso em: 02 maio 2011.

TUROLLA, M. S. R; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. de Ciências Farm.**, São Paulo, v.42, n.2, p.289-306, 2006.

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

WRIGHT, C.I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C.I.; KONING, M.M.G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **J. Ethnopharmacol.**, v.114, 2007.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

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

APÊNDICE A

Quadro 3 – Avaliação do *screening* hipocrático para o estudo de toxicidade aguda do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *P. coriacea* (EABLPC), na dose de 2000mg/kg, em ratos Wistar e camundongos (n = 3).

CAIXA	1			Controle		
	R1	R2	R3	C1	C2	C3
Nº dos animais						
Peso (g)						
Atividade geral						
Frênilo vocal						
Irritabilidade						
Resposta ao toque						
Aperto de cauda						
Contorção						
Trem posterior						
Endireitamento						
Tônus corporal						
Força de agarrar						
Ataxia						
Reflexo auricular						
Reflexo corneal						
Tremores						
Convulsões						
Estimulações						
Straub						
Hipnose						
Anestesia						
Letargia						
Coma						
Lacrimação						
Salivação						
Ptoses						
Micção						
Defecação (diarréias)						
Piloereção						
Hiotermia						
Respiração						
Cianose						
Nº de mortos						

Gradação: 0- ausente; 1-raros; 2- poucos; 3 – moderado; 4 – intenso

Data: ___/___/___; Dose:___; N.º de animais com sinais de toxicidade:_____

Momento da morte:_____ Tempo de Observação:_____ Outras reações: _____

APÊNDICE B

Quadro 4 – Avaliações pré-teste de atividade diurética (médias do consumo de água e produção de urina em amostra de 30 animais do experimento, no período de 24h por 5 dias).

GRUPOS (n = 6)	Consumo médio de água (mL)	Produção média de urina (mL)
G 1 - 1	29,4	4,5
G 1 - 2	32,4	8,0
G 1 - 3	30,6	6,3
G 1 - 4	30,8	10,4
G 1 - 5	30,8	6,1
G 1 - 6	31,6	10,9
G 2 - 1	29,0	4,5
G 2 - 2	24,0	3,3
G 2 - 3	21,0	4,6
G 2 - 4	28,6	7,1
G 2 - 5	24,6	5,3
G 2 - 6	27,0	3,4
G 3 - 1	26,0	7,7
G 3 - 2	25,0	6,0
G 3 - 3	24,0	7,2
G 3 - 4	29,0	7,2
G 3 - 5	24,0	5,4
G 3 - 6	22,6	4,0
G 4 - 1	26,4	7,9
G 4 - 2	23,0	4,5
G 4 - 3	36,3	7,9
G 4 - 4	27,4	10,1
G 4 - 5	36,4	14,0
G 4 - 6	24,6	5,2
G 5 - 1	32,6	7,8
G 5 - 2	27,0	6,1
G 5 - 3	29,6	12,7
G 5 - 4	32,0	10,9
G 5 - 5	26,0	8,3
G 5 - 6	23,0	3,5
MÉDIA ± DP	27,8 ± 3,98	7,1 ± 2,8

Valores de referência:

- Consumo hídrico / 24h: 24 – 35 mL.
- Produção urinária / 24: 2 – 15 mL.

(Fontes: AGUNU et al., 2005; BENJUMEA et al., 2005; LAHLOU et al., 2006; OECD 32/2000)

APÊNDICE C

Tabela 14 – Média das frações quantitativas dos parâmetros bioquímicos urinários obtidos após administração oral do EAPC (80, 160 e 320 mg/kg), furosemida (20 mg/kg) (Cont+) e solução salina (Cont -), segundo os grupos de estudo (n = 6).

Parâmetro Bioquímico	Grupo	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	Média ± DP	
Na ⁺ (mEq)	80mg	2,9	4,4	5,0	8,0	10,6	2,7	2,2	5,3	5,1 ± 2,9	
	160mg	11,1	22,5	9,1	7,5	7,6	8,7	15,1	6,0	10,9 ± 5,4	
	320mg	13,5	28,4	8,7	7,7	9,6	12,0	15,0	15,8	13,9 ± 6,6	
	Cont (-)	3,8	3,2	3,8	5,4	4,6	4,1	2,2	4,0	3,9 ± 1,0	
	Cont (+)	12,9	20,5	11,7	11,1	9,3	15,6	17,4	22,1	15,1 ± 4,6	
		80mg	7,5	10,0	8,6	16,1	15,0	5,6	4,9	12,6	10,0 ± 4,2
K ⁺ (mEq)	160mg	41,2	39,6	17,6	16,5	18,1	19,3	21,3	16,4	23,8 ± 10,4	
	320mg	44,6	48,9	18,2	29,8	21,4	46,2	44,1	37,0	36,3 ± 11,8	
	Cont (-)	9,8	8,4	12,1	18,6	10,9	7,8	5,6	9,7	10,4 ± 3,9	
	Cont (+)	39,2	44,4	40,1	26,3	15,5	32,2	41,5	61,2	37,6 ± 13,5	
		80mg	7,5	10,0	8,6	16,1	15,0	5,6	4,9	12,6	10,0 ± 4,2
		160mg	41,2	39,6	17,6	16,5	18,1	19,3	21,3	16,4	23,8 ± 10,4

Continuação da Tabela 14

Parâmetro Bioquímico	Grupo	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	Média ± DP
Cl ⁻ (mEq)	80mg	9,8	7,6	7,1	2,4	21,8	0,8	1,1	8,2	7,4 ± 6,8
	160mg	15,8	31,4	13,0	4,3	9,3	14,9	30,1	10,8	16,2 ± 9,7
	320mg	17,5	49,4	12,7	7,2	10,7	10,0	36,8	16,0	20,0 ± 15,0
	Cont (-)	7,0	2,4	5,1	1,9	8,5	3,8	2,4	6,3	4,7 ± 2,4
	Cont (+)	14,7	37,2	10,4	5,4	5,7	9,7	22,1	29,4	16,8 ± 11,7
Uréia (mg)	80mg	44,7	94,4	10,5	88,9	13,4	50,5	33,1	32,7	46,0 ± 31,3
	160mg	47,5	166,5	17,5	126,7	37,2	57,1	92,2	52,4	74,7 ± 50,2
	320mg	23,9	170,9	85,6	93,0	75,0	57,7	118,9	121,8	93,4 ± 44,7
	Cont (-)	49,7	48,5	57,7	58,4	8,7	53,3	37,4	42,1	44,5 ± 16,1
	Cont (+)	109,1	340,4	186,5	245,1	128,4	215,1	123,0	176,4	190,5 ± 6,8

Continuação da Tabela 14

Parâmetro Bioquímico	Grupo	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	Média ± DP
	80mg	0,2178	0,2295	0,0396	1,0225	2,1185	0,0306	0,0407	0,1956	0,49 ± 0,73
	160mg	0,7633	0,5212	0,0811	0,7579	1,2505	0,2251	0,2803	0,0877	0,50 ± 0,41
Creatinina (mg)	320mg	1,0614	1,2334	0,1888	1,7465	1,1149	0,3862	0,4434	0,3560	0,82 ± 0,55
	Cont (-)	0,5664	0,1592	0,2574	0,6684	1,3603	0,1081	0,0507	0,1161	0,41 ± 0,45
	Cont (+)	1,3065	0,8029	0,2441	0,5727	1,8934	0,7815	0,5042	0,5453	0,8 ± 0,53

APÊNDICE D

Quadro 5 - Resultados da uroanálise obtidos nos teste de atividade diurética, em urina do primeiro dia de tratamento (n=6 animais/grupo) após tratamento oral com EAPC nas doses de 80 mg/kg, 160 mg/kg e 320 mg/kg.

GRUPO	Animal	pH	Densidade	Leucócitos	Nitrito	Proteína	Glicose	Cetona	Urobilinogênio	Bilirrubina	Hemácias	Hemoglobina
EAPC 80 mg/kg	1.	7	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAPC 160 mg/kg	7.	7	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10.	7	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAPC 320 mg/kg	13.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15.	7	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17.	7	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina	19.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21.	6	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22.	6	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23.	6	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24.	6	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furosemida	25.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27.	7	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28.	7	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29.	6	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30.	7	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE E

Tabela 15 – Concentrações sanguíneas dos parâmetros bioquímicos obtidos após administração oral do EAPC (80, 160 e 320 mg/kg), furosemida (20 mg/kg) e solução salina (C -), no final do estudo, segundo os grupos de estudo (n = 6).

		ANIMAIS						
Parâmetro Bioquímico	Grupo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Média ± DP
Na ⁺ (mEq/ml)	80mg	118	132	118	128	136	127	126,5 ± 7,3
	160mg	121	127	129	121	134	118	125 ± 6,0
	320mg	132	127	136	127	147	138	134,5 ± 7,6
	Cont(-)	138	122	181	150	127	164	147 ± 22,6
	Cont(+)	147	161	114	127	127	121	132,8 ± 17,6
K ⁺ (mEq/ml)	80mg	98,8	96,3	100,8	96,8	96,3	96,1	97,52 ± 1,9
	160mg	95	100,4	98,1	98	105,6	88,2	97,55 ± 5,8
	320mg	90,3	90,7	111,9	97,3	80,9	101,3	95,4 ± 10,7
	Cont(-)	100,8	100,9	105,6	97	88,1	96,5	98,15 ± 5,9
	Cont(+)	98,6	104,5	98,6	98,4	95	99,8	99,15 ± 3,1

Continuação da **Tabela 15**

Parâmetro Bioquímico	Grupo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Média ± DP
Cl ⁻ (mEq/ml)	80mg	70	48	97	47	43	47	58,67 ± 21,1
	160mg	51	75	117	49	56	55	67,17 ± 26,1
	320mg	58	41	53	44	71	60	54,5 ± 11,0
	Cont(-)	29	39	46	42	39	53	41,3 ± 8,0
	Cont(+)	39	52	63	96	121	41	68,67 ± 33
Uréia (mg/mL)	80mg	64	73	68	56	59	58	63 ± 6,6
	160mg	48	64	60	56	74	58	60 ± 8,7
	320mg	47	50	53	58	63	57	54,67 ± 5,8
	Cont(-)	69	61	44	52	41	60	54,5 ± 10,8
	Cont(+)	68	60	60	66	65	67	67,67 ± 2,1
Creatinina (mg/mL)	80mg	0,82	0,51	0,62	0,51	0,51	0,51	0,58 ± 0,13
	160mg	0,58	0,7	0,82	0,55	0,58	0,7	0,66 ± 0,10
	320mg	0,86	0,55	0,58	0,58	0,43	0,51	0,59 ± 0,15
	Cont(-)	0,43	0,43	0,43	0,43	0,62	0,55	0,48 ± 0,08
	Cont(+)	0,55	0,55	0,66	0,78	0,82	0,62	0,66 ± 0,11