

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

LIUBA LAXOR PUCCI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DAS ATIVIDADES
DIURÉTICA E ANTIOXIDANTE DA *Rudgea viburnoides* (CHAM.)
BENTH.
(CONGONHA-DE-BUGRE)**

**GOIÂNIA
2009**

LIUBA LAXOR PUCCI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DAS ATIVIDADES
DIURÉTICA E ANTIOXIDANTE DA *Rudgea viburnoides* (CHAM.)
BENTH.
(CONGONHA-DE-BUGRE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

GOIÂNIA

2009

LIUBA LAXOR PUCCI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DAS ATIVIDADES
DIURÉTICA E ANTIOXIDANTE, DA *Rudgea viburnoides* (CHAM.)
BENTH.
(CONGONHA-DE-BUGRE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em Goiânia em 16/06/2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Leonice Manrique Tresvenzol
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Rosângela de Oliveira Alves
Escola de Veterinária / Universidade Federal de Goiás

Aos meus maiores tesouros, Mamãe e Papai; Janiri Laxor Pucci e Russell Pucci, acredito eu, os melhores do mundo. As minhas queridas e amadas irmãs, Christiane, Dargett e Aloma por estarem presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, meu orientador e amigo, pela competência, paciência, compreensão, carinho, dedicação e confiança em mim depositada, em todos estes anos.

À Prof. Dr. Marize Campos Valadares pela amizade, incentivo, pelas sugestões e ajudas dadas durante o percurso deste trabalho.

Aos professores José Realino de Paula, Leonice Manrique Faustino Tresvenzol e Maria Teresa F. Bara pela colaboração em todos os momentos que precisei, pela amizade, simplicidade e presteza.

Ao professor Ruy de Souza Lino e aos técnicos Simone e Erildo pela imensa colaboração.

Aos colegas de pós-graduação Paulo César Mendonça de Freitas e Alexandre P. dos Santos, pela amizade, pelo incentivo, colaboração, sugestão e paciência, tanto nas horas de trabalho quanto nas horas de descontração.

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

Agradeço a todos que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando, direta ou indiretamente, com carinho e dedicação.

*De todos os julgamentos, o mais importante
é o que fazemos sobre nós mesmos
Nathaniel Branden*

*Nunca tenha medo de tentar algo novo. Lembre-se de que um amador solitário construiu a
Arca. Um grande grupo de profissionais construiu o Titanic.
Luís Fernando Veríssimo*

RESUMO

A *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae), popularmente conhecida como “congonha, congonha-de-bugre ou bugre”, é utilizada na medicina popular como diurética, hipotensora, anti-reumática e depurativa do sangue (chá das folhas). Essa espécie vem sendo comercializada como “porangaba” e utilizada em regimes de emagrecimento. Este trabalho teve como objetivos estudar a toxicidade aguda e as atividades diurética e antioxidante da *R. viburnoides*. O teste de toxicidade aguda, em dose única, foi realizado com o extrato etanólico bruto, administrado por via oral, nas concentrações de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg em camundongos e ratos, de ambos os sexos pelo teste de Classe. Para o teste de atividade diurética, em ratas, utilizou-se o extrato etanólico bruto das folhas nas concentrações de 40 mg/kg, 80 mg/kg e 160 mg/kg e a furosemida 20 mg/kg como controle positivo. O doseamento dos fenóis totais do extrato bruto e das frações (hexânico, diclorometano, acetato de etila e metanol/água) foi realizado pelo método de Hagerman e Butler e a avaliação da atividade antioxidante realizada pelo método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os resultados possibilitaram concluir que o extrato etanólico bruto das folhas não provocou toxicidade aguda nas doses testadas, podendo ser classificado como atóxico; que o extrato etanólico apresentou efeito diurético dose dependente e superior à furosemida utilizada como controle positivo. O extrato etanólico bruto apresentou 0,84% de fenóis totais, a fração hexânica 0,44%, a fração diclorometano 1,91%, a fração acetato de etila 15,43% e a fração metanol/água 7,92%. A fração acetato de etila apresentou melhor ação antioxidante. Os resultados obtidos até o momento podem justificar a utilização popular da *Rudgea viburnoides* como diurética.

Palavras-chave: Plantas medicinais. *Rudgea viburnoides*. Atividade diurética. Atividade antioxidante. Toxicidade aguda.

ABSTRACT

The *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae), popularly known as "congonha, congonha-de-Bugre or Bugre" is used in folk medicine as diuretic, hypotensive, anti-rheumatic and depurative of blood (leaves tea). This species is being traded as "porangaba" and used in weight loss programs. This work aimed to study the acute toxicity, the diuretic and antioxidant activities of *R. viburnoides*. The test for acute toxicity in single dose was performed with the ethanolic crude extract, administered orally, at concentrations of 2000mg/kg and 5000mg/kg in mice and rats of both sexes by the test of Class. To test for diuretic activity in rats, it was used the crude ethanolic extract of the leaves at concentrations of 40mg/kg, 80mg/kg and 160mg/kg, and furosemide 20mg/kg as positive control. The determination of total phenols of the crude extract and fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol/water) was performed by the method of Butler and Hargerman and the evaluation of antioxidant activity performed by the method of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH). There was no acute toxicity of crude ethanolic extract of the leaves and it was classified as non toxic. The results has shown that the ethanolic extract presented dependent dose diuretic effect higher than furosemide, used as positive control. The crude ethanolic extract showed 0.84% of total phenols, the fraction hexanic 0.44%, the dichloromethane fraction 1.91%, the fraction of ethyl acetate fraction 15.43% and the fraction methanol/water 7.92%. The ethyl acetate fraction showed better antioxidant action. The results obtained so far may justify the popular use of *Rudgea viburnoides* as diuretic.

Keywords: Medicinal plants. *Rudgea viburnoides*. Diuretic activity. Antioxidant activity. Acute toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Rubiaceae, aspecto geral. 19
- FIGURA 2** Exemplos de doenças relacionadas com a geração de radicais livres 34
- FIGURA 3** Esqueleto básico dos Flavonóides ($C_6C_3C_6$) 36
- FIGURA 4** Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides* 41
- FIGURA 5** Volume de excreção urinária em 24h, após administração oral nos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,05$), (ANOVA, teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*. 54
- FIGURA 6** Volume de excreção urinária acumulada em 24 h, após a administração oral nos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,01$), (ANOVA, teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*. 57
- FIGURA 7** Quantidade de sódio urinário (mEq) excretado de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*. 61
- FIGURA 8** Quantidade de potássio urinário (mEq) excretado de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*. 62
- FIGURA 9** Quantidade de cloro urinário (mEq) excretado de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*. 63

FIGURA 10 Quantidade de uréia urinária (mg) excretada de forma cumulativa 64 após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina (p < 0,001), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

FIGURA 11 Quantidade de creatinina urinária (mg) excretada de forma 65 cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina (p < 0,001), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

FIGURA 12 Curva padrão para o doseamento de fenóis totais no extrato e 69 frações de *R. viburnoides*. Concentração de ácido tânico versus absorvância. Equação da reta: Absorvância = A + B . c. Erro de ajuste (R^2) = 0,9983.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Rendimento dos extratos e frações	50
TABELA 2	Volume de ingestão hídrica e produção de urina, no período de 24 h antes da realização do experimento (valores basais), nos grupos dos animais de experimentação (n=5; Média ± DP). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (ANOVA, teste de Dunnett).	53
TABELA 3	Volume de urina no teste de atividade diurética (Média ± desvio padrão), após administração oral nos grupos: salina (1 mL), furosemida (20 mg/kg) e EEBFRV (Extrato etanólico bruto das folhas de <i>R. viburnoides</i>) nas doses de 40, 80 e 160 mg/kg segundo os grupos de estudo (n=5), **Estatisticamente significativo em relação asalina ($p < 0,01$), (ANOVA, Teste Dunnett).	55
TABELA 4	Volume de ingestão hídrica nos grupos em estudo, no período de 24 h após a administração. (n=5; Média ± DP). *Estatisticamente significativo em relação ao grupo da salina ($p < 0,01$) (ANOVA, teste de Dunnett).	58
TABELA 5	Parâmetros bioquímicos urinários (Médias ± desvios padrões) obtidos após administração oral de furosemida (20 mg/kg), controle negativo (1 mL/salina) e EEBFRV (40, 80 e 160 mg/kg), segundo os grupos de estudo (n=5). *Estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$; ** $p < 0,001$), (ANOVA, Teste Dunnett).	60
TABELA 6	Resultados da uroanálise obtidos nos teste de atividade diurética, em urina de 24h (n=5 animais/grupo) após tratamento oral com EEBFRV nas doses de 40 mg/kg, 80 mg/kg e 160 mg/kg.	67
TABELA 7	Doseamento de fenóis totais expressos em porcentagem (p/p).	68
TABELA 8	Percentual de atividade antioxidante frente ao radical DPPH [·] .	70
TABELA 9	Concentração efetiva 50% calculada através de regressão linear, logarítmica.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AA%	Atividade antioxidante percentual
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-ácido 6-sulfônico).
ABIC	Associação brasileira da indústria do café
ANOVA	Análise de variância
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CE_{50%}	Concentração eficiente 50%
CI_{50%}	Concentração inibitória 50%
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CUPRAC	Capacidade antioxidante e redutora do ácido cúprico
DL₅₀	Dose letal mediana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2, 2-difenil-1-picril-hidrazil
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching (Recuperação de fluorescência após fotocloreamento)
ECVAM	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
EEBFRV	Extrato etanólico bruto das folhas de <i>Rudgea viburnoides</i>
FAE_f	Fração acetato de etila das folhas
FH_f	Fração hexânica das folhas),
FMet/H₂O_f	Fração Metanol Água das Folhas
FDM_f	Fração Diclorometano das Folhas
Glic.	Glicose
Hb	Hemoglobina
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagencial de Validação de Métodos Alternativos
Kg	Kilogramas
MEDLINE	Base de dados da literatura internacional da área médica e biomédica (produzida pela NLM – USA)
mEq	Miliequivalentes
mg	Miligrama
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milimoles
nm	Nanômetros
NICEATM	Centro Interagencial de Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos
OECD	Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica
OECD 423	Guia para estudo da toxicidade aguda de classe da OECD
ORAC	Capacidade de absorvência do radical oxigênio
TDF	Teste de dose fixa
TAC	Toxicidade aguda de classe
TUD	Teste “UP” and “DOWN”
TRAP	Perfil de afinidade alvo-relacionado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 FAMÍLIA RUBIACEAE	17
2.1.1 <i>Rudgea viburnoides</i> (Cham.) Benth., (Rubiaceae)	18
2.2 ESTUDO DE TOXICIDADE	20
2.2.1 Toxicidade aguda	21
2.2.2 Dose letal mediana (DL ₅₀)	23
2.2.3 Métodos modificados de determinação da DL ₅₀	24
2.2.4 Parâmetros não-letais	25
2.2.5 Método de classe de dose aguda tóxica (OECD 423)	25
2.3 ATIVIDADE DIURÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS	26
2.3.1 Fisiologia e regulação da função renal	27
2.3.2 Equilíbrio ácido-base	29
2.3.3 Fármacos diuréticos	30
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVOS GERAIS	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES	40
4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	41
4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA DOSE ÚNICA – TESTE DE CLASSE (OECD 423)	42
4.3.1 Observação dos sinais de toxicidade	43
4.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	44
4.4.1 Análises estatísticas	45
4.5 TESTE DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
4.5.1 Doseamento de fenóis totais	46
4.5.2 Avaliação da capacidade de reação com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	48

4.5.3 Cálculo da concentração efetiva 50% (CE ₅₀)	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E SUAS FRAÇÕES	50
5.2 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA	51
5.2.1 Classificação toxicológica, observações de sinais e sintomas	51
5.3 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	52
5.3.1 Avaliação da bioquímica urinária	58
5.3.2 Uranálise	66
5.4 TESTE DE DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	68
5.4.1 Fenóis totais	68
5.4.2 Atividade antioxidante percentual (AA%)	69
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
RELAÇÃO DE ANEXOS	84
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG	85
ANEXO B - Fluxograma – Teste toxicológico partindo de uma dose de 200 mg/Kg peso corporal	86

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga. A terapêutica moderna, atualmente constituída por um grande número de medicamentos, com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual sem o auxílio dos produtos de origem natural, em especial os provenientes das plantas superiores (SIANI, 2003).

Esse recurso tornou-se uma utilização terapêutica alternativa de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à sociedade médica desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (BARROS, 1982; CECHINEL; YUNES, 1998).

As plantas medicinais são importantes também por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar chances de se obterer moléculas protótipo considerando os inúmeros constituintes presentes nelas. Entretanto, espécies vegetais que são usadas em fórmulas fitoterápicas necessitam de um controle de qualidade adequado, pois a literatura científica indica que muitas delas podem conter substâncias tóxicas, que, dependendo da dose, podem causar reações indesejáveis e inclusive levar pessoas à morte. Podem ainda, possuir composição química variável, com princípios ativos que são responsáveis pelo seu potencial tóxico como por exemplo: alcalóides, saponinas, taninos, entre outros (BARROS, 1982; HOEHNE, 1939; SCHENKEL et al., 2003).

Assim, apenas a utilização popular não valida eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. A sua preconização 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 desse uso. 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 que os efeitos podem se manifestar em longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (BIAZZI, 1995; BRANDÃO, 2003).

Aliar o conhecimento popular ao científico em busca de novos medicamentos é um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais. Isso é benéfico para as famílias que habitam os ecossistemas florestais, que podem obter dos recursos naturais e da sua conservação seu desenvolvimento sustentado, e para a população em geral, pelo acesso a novos e eficazes remédios (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O levantamento etnobotânico é um dos métodos mais utilizados na seleção de plantas para avaliação de suas propriedades medicinais. Esse estudo aborda a maneira como um grupo social interage com as plantas e como as emprega no processo saúde-doença, possibilitando uma integração entre os pesquisadores das ciências naturais e das ciências humanas. A etnobotânica aplicada ao estudo de plantas medicinais trabalha com outras disciplinas correlatas, como, por exemplo, a etnofarmacologia que consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (BRUNHN; HOLMSTEDT, 1980; CUNHA, 2003; DI STASI, 1996). Em levantamentos etnobotânicos, quanto mais detalhadas forem as informações, maiores as chances de sucesso nas pesquisas que avaliarão a

eficácia e a segurança do uso de plantas para fins terapêuticos (DI STASI, 1996; SIQUEIRA, 1988).

Morais et al. (2005) realizaram entrevistas com raizeiros da cidade de Goiânia (GO) e selecionaram as plantas que apresentaram cerca de 90% de coincidência nas indicações terapêuticas populares. Nesse estudo verificou-se que dentre as 34 espécies mais indicadas pelos raizeiros, 10 eram utilizadas para problemas nos rins, principalmente como diurético, destacando-se nesse grupo a congonha-de-bugre (*Rudgea viburnoides*) e a douradinha (*Palicourea coriacea*), ambas da família Rubaceae.

Um estudo realizado em ratos mostrou que *P. coriacea* apresentava atividade diurética dose-dependente *in vivo* em relação ao volume de excreção e de eliminação de eletrólitos em urina de 24 horas, o que justificava sua utilização pela população como diurético (Freitas, 2008). Entretanto, nenhuma informação sobre a atividade farmacológica e toxicidade foi obtida para a *R. viburnoides* nas bases de dados consultadas.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade oral aguda e as atividades diurética e antioxidante de *R. viburnoides* e verificar a segurança de sua utilização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA RUBIACEAE

A família Rubiaceae apresenta distribuição cosmopolita, centrada nos trópicos, abrangendo aproximadamente 550 gêneros e 9000 espécies. Cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, ocorrem no Brasil, configurando uma das principais famílias da nossa flora. Entre os seus representantes encontram-se ervas, subarbustos, arbustos ou árvores, e em menor frequência as lianas (SOUZA; LORENZI, 2005).

No cerrado destacam-se os gêneros *Palicourea*, *Tocoyena* e *Alibertia*. Exemplos de *Declieuxia* e *Psyllocarpus* são encontrados nos campos rupestres, nas florestas úmidas são comuns os gêneros *Psychotria* e *Rudgea*. Trabalhos realizados em filogenia evidenciaram que a família Rubiaceae é monofilética (SOUZA; LORENZI, 2005).

Morfologicamente as espécies dessa família apresentam folhas opostas, simples, ocasionalmente transformadas em espinhos, como ocorrem em *Randia* e *Chomelia*. A inflorescência frequentemente é cimosa, às vezes formando glomérulo ou reduzida a uma flor. As flores podem ser vistosas ou não, bissexuadas ou unissexuadas, actinomorfas e geralmente diclamídeas. O fruto apresenta formato de cápsula com esquizocarpo, drupa ou baga (SOUZA; LORENZI, 2005; YOUNG et al., 1998).

Como principal espécie de importância econômica da família Rubiaceae destaca-se o café (*Coffea spp.*), uma das bebidas mais usadas no mundo (ABIC, 2007), além de espécies ornamentais, invasoras e algumas medicinais. Muitas

plantas dessa família são tóxicas, principalmente para o gado (ALVES et al., 2004; DELPRETE, 2004; SOUZA; LORENZI, 2005).

Espécies como *Alibertia edulis* (marmelada-bola), *Alibertia sessilis* (marmelada-preta), *Palicourea coriacea* (douradinha) e *Palicourea rigida* (douradão), todas pertencentes à família Rubiaceae são amplamente utilizadas pela medicina tradicional (NETO; MORAIS, 2003).

2.1.1 *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae)

Congonha, congonha-de-bugre ou bugre são nomes populares atribuídos a várias espécies medicinais incluindo *Rudgea viburnoides* (Figura 1), (CORRÊA, 1984). Essa espécie é bastante comum no Cerrado brasileiro, sendo as folhas e as cascas utilizadas tradicionalmente no Brasil pela medicina popular sob a forma de chá, devido às suas propriedades antirreumáticas e antissifilítica, bem como, para o tratamento da dispepsia (YOUNG et al., 1998), como diuréticas, hipotensoras e depurativas do sangue (BALBACH, 1980; SIQUEIRA, 1981). A espécie também vem sendo comercializada como porangaba e utilizada para regimes de emagrecimento (ALVES et al., 2004).

Rudgea viburnoides é uma árvore com 4 - 5 m, de altura, dotada de copa globosa densa, com ramos novos denso-tomentosos. O tronco é curto e tortuoso com de 15 - 25 cm de diâmetro, casca espessa, mais ou menos suberosa e fissurada superficialmente. As folhas são opostas simples, curto-pecioladas, grossas e rugosas, discolores, glabras na face superior e fusco-tomentosas com nervuras salientes na face inferior e possuem de 9 - 17 cm de comprimento por 3 - 8 cm de largura. As flores são brancas, perfumadas e se reúnem em inflorescências

do tipo panículas, terminais e nas axilas da extremidade dos ramos. O fruto uma drupa ovóide, de cor vermelho-escura ou preta quando maduro, tem polpa carnosa e uma única semente. A espécie floresce em mais de uma época do ano, porém predominando durante os meses de agosto a setembro. Os frutos amadurecem, predominantemente, em junho e julho, sendo muito procurados pelos pássaros (LORENZI, 1998).



Figura 1. *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Rubiaceae, aspecto geral.

Anatomicamente, verificou-se que folhas de *R. viburnoides* apresentam epiderme pilosa com estrias cuticulares e estômatos paracíticos. Idioblastos com ráfides foram observados no mesófilo e cistólitos e canais mucilaginosos na medula da nervura central. Estudos histoquímicos evidenciaram presença de flavonóides e saponinas (ALVES et al., 2004). A prospecção fitoquímica e o perfil cromatográfico

realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciaram a presença de taninos, flavonóides, triterpenos, esteróis e saponinas (ALVES et al., 2004).

Os alcalóides encontrados em diversas espécies medicinais da família Rubiaceae, como o ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Strokes), a quina (*Cinchona spp*) e a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* DC), não foram detectados nas folhas de *R. viburnoides* (ALVES et al., 2004).

Em estudo realizado por Young et al. (1998), um novo triterpeno, a viburgenina, foi isolado a partir do extrato do fruto maduro de *R. viburnoides* juntamente com as saponinas arjunglucosídeo e traquelosperosídeo B-1 e E-1 e os triterpenos traquelosperogíneo B e o arjungenino. O traquelosperogino foi obtido como produto da hidrólise enzimática, sendo descrito pela primeira vez na literatura como produto natural. O composto inédito viburgenina apresentou moderada atividade antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides*, um ascomiceto da ordem Eurotiales, entomopatogênico de ocorrência natural, amplamente usado no controle biológico de diversas espécies de insetos.

2.2 ESTUDO DE TOXICIDADE

Os estudos da toxicidade de produtos fitoterápicos, bem como seus protocolos deverão seguir as determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, no que diz respeito à Resolução nº 01/88 do Conselho Nacional de Saúde, bem como atender aos princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios de farmacologia clínica humana segundo as normas de boas práticas clínicas. Deve observar também as diretrizes da Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de

1996 (BRASIL, 1996) e da Resolução nº 48, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004), que estabelece a necessidade de ensaios toxicológicos pré-clínicos e clínicos para o registro de fitoterápicos.

2.2.1 Toxicidade aguda

Além das provas de eficácia, um fitoterápico necessita possuir estudos toxicológicos pré-clínicos para oferecer aos pesquisadores clínicos alguma segurança sobre as doses nas quais aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório (BRITO, 1996).

Em geral, os testes de toxicidade aguda são conduzidos antes que os ensaios farmacológicos sejam iniciados, e proporcionam uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, realizados geralmente em roedores machos e fêmeas e ocasionalmente em coelhos. Seu propósito é identificar uma dose claramente tóxica, sub-letal ou letal, identificar os órgãos alvos das substâncias químicas em estudo e gerar um guia para seleção de doses em testes subseqüentes de toxicidade, levando em conta que os números de animais em cada teste devem seguir as orientações da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), e orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (BRESOLIN; FILHO, 2003; BRITO, 1996; COBEA, 1991).

Segundo o *guideline* de toxicidade aguda oral (método de classe de dose aguda tóxica) (*Acute Toxic Class Method* - OECD 423), a toxicidade aguda é definida como “o efeito adverso que ocorre em um breve período da administração

oral de uma dose única de uma substância ou múltiplas doses fornecidas durante 24 horas” (HAYES; DiPASQUALE, 2001).

O teste de toxicidade aguda em dose única serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre a toxicidade aguda (doses repetidas), a toxicidade subcrônica e a toxicidade crônica, bem como, fornecer informações iniciais sobre o modo da ação tóxica da substância-teste (BRITO, 1994).

Na avaliação da dose-resposta, são utilizados dados quantitativos (Ex: letalidade e incidência de sinais de toxicidade) como também dados gradativos, que são contínuos e que também podem ser determinados quantitativamente (Ex: atividade enzimática, concentração protéica, peso corpóreo, concentração eletrolítica) (HAYES; DiPASQUALE, 2001; KLAASSEN, 2001).

Os objetivos dos testes de toxicidade aguda são: definir a toxicidade intrínseca do composto químico; predizer o risco para espécies não-alvo ou a toxicidade a espécies alvo; determinar as espécies mais susceptíveis; identificar órgãos alvo; proporcionar informações sobre a avaliação de risco da exposição aguda ao produto químico; proporcionar informações para o desenho e seleção de níveis de doses para estudos prolongados e o mais importante e prático de todos, proporcionar informação valiosa aos clínicos para predizer, diagnosticar e prescrever tratamentos para exposição aguda (envenenamento) a produtos químicos. Do ponto de vista regulatório, os dados de toxicidade aguda são essenciais na classificação, rotulagem e transporte de produtos químicos. Do ponto de vista da pesquisa científica, um adequado desenho de estudo de toxicidade aguda pode sempre proporcionar pistas do mecanismo de toxicidade e a relação

estrutura-atividade para uma classe particular de substâncias químicas (HAYES; DiPASQUALE, 2001).

Um estudo bem desenhado de toxicidade aguda deve incluir considerações sobre a relação dose-resposta de ambos os parâmetros (letais e não-letais). Avaliação bioquímica, em testes agudos, pode adicionar uma elucidação do mecanismo de ação tóxica; a histopatologia de órgãos pode ser útil na determinação da causa de morte e identificar os órgãos-alvo (KLAASSEN, 2001).

2.2.2 Dose letal mediana (DL₅₀)

A Dose Letal Mediana (DL₅₀) é definida pela OECD como o valor obtido estatisticamente de uma dose única de uma substância em que se espera causar morte em 50% dos animais de uma população estudada (KLAASSEN; WATKINS, 2001).

A DL₅₀ descreve assim a resposta letal de um composto em uma população particular e em condições experimentais específicas. Por alguns anos a DL₅₀ foi utilizada amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias, tornando-se assim um teste pré-requisito para várias agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. Embora imprecisa, a utilização dos valores de DL₅₀ é suficiente para todos os propósitos práticos, sendo que a maior ênfase deve ser dada nos sinais de toxicidade, órgãos alvos e outros fatores. Sobretudo, cabe ressaltar que o valor numérico da DL₅₀ não é equivalente à toxicidade de determinada substância, já que

a letalidade é apenas um dos parâmetros de referência da toxicidade (KLAASSEN, 2001).

2.2.3 Métodos modificados de determinação da DL₅₀

O objetivo destes testes é o de obter informação adequada dos sinais de toxicidade, aproximação dos valores de DL₅₀ e em alguns casos, a inclinação da curva dose-resposta. Esses estudos fornecem dados importantes sobre toxicidade e letalidade utilizando menor quantidade de animais que o método clássico de determinação da DL₅₀ (HAYES; DiPASQUALE, 2001).

Segundo Valadares (2006) em um trabalho de discussão da avaliação da toxicidade aguda sistêmica após a eliminação do teste clássico da DL₅₀, a partir de 2002, realizado em um levantamento bibliográfico entre a OECD, o Comitê de Coordenação Interagencial de Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, 2001) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), o teste da DL₅₀ foi substituído pelos atuais testes alternativos: O Teste Dose Fixa (TDF) (OECD 420), o teste de Toxicidade Aguda de Classe (TAC) (OECD 423) e o Teste *Up and Down* (TUD) (OECD 425).

O TDF (OECD 420) tem como objetivo final a avaliação do aparecimento de sinais claros de toxicidade decorrentes da exposição à menor de uma série de doses fixas, fornecendo informações sobre a natureza, o tempo de início, duração e desfecho dos sinais de toxicidade, para fins da avaliação de risco. O TAC (OECD 423) também utiliza o conceito de doses fixas, porém o objetivo final é a avaliação da menor dose que cause a mortalidade dos animais. O TUD (OECD 425) objetiva estimar o valor da DL₅₀ testando, seqüencialmente, animais individuais, com a dose

para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior, neste teste também há uma relativa redução da mortalidade de animais, devido à introdução no protocolo de regras claras para a conclusão do experimento (KLAASSEN; WATKINS, 2001; VALADARES, 2006). Segundo Valadares (2006), as informações obtidas por esses três métodos alternativos, não são idênticas, e a escolha do método deve ser feita com base no entendimento claro da proposta científica e regulatória para o teste de toxicidade aguda oral.

2.2.4 Parâmetros não-letais

Na avaliação da toxicidade aguda parâmetros não-letais que afetem o bem-estar geral do animal devem ser considerados na avaliação de risco de determinado composto.

Assim, outros parâmetros são imprescindíveis, senão mais críticos, na avaliação da toxicidade em comparação à DL_{50} . A inclinação da curva dose-resposta, o momento da morte, os sinais da farmacotoxicidade e os achados patológicos são dados importantes que devem ser levados em consideração na avaliação da substância química estudada. (KLAASSEN, 2001).

2.2.5 Método de classe de dose aguda tóxica (OECD 423)

Este é um método alternativo de toxicidade oral aguda, em que se utilizam três animais de determinado sexo, em cada etapa; ambos os sexos podem ser utilizados. A dose inicial é selecionada de um dos três níveis fixados: 25, 200 ou

2000 mg/kg de peso corpóreo, e deve ser escolhida para produzir alguma mortalidade. Se a informação existente sugerir que a mortalidade é improvável na dose de 2000 mg/kg, então um teste limite naquele nível deve ser conduzido com três animais de cada sexo. Se ocorrerem mortes um teste adicional com nível de dose menor pode ser necessário (HAYES; DIPASQUALE, 2001).

2.3 ATIVIDADE DIURÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS

Wright et al. (2007) realizaram uma revisão sistemática de 77 artigos científicos com o objetivo de proporcionar uma avaliação geral dos estudos e identificar, nos mesmos, quais extratos de plantas evidenciaram efeitos diuréticos (em termos de volume de excreção urinária e de eletrólitos), bem como, levantar quais pesquisas eram necessárias na área. Segundo os autores, os extratos de 21 espécies foram identificados e confirmados, em experimentações animais, com potencial diurético. As espécies estudadas foram tradicionalmente utilizadas no tratamento de algum tipo de disfunção renal. Dos extratos que mostraram potencial diurético destacaram-se as espécies pertencentes aos gêneros *Equisetum*, além de *Spergularia purpurea*, *Foeniculum vulgare* (PEREZ GUTIERREZ et al., 1985), *Fraxinus excelsior* (JOUAD et al., 2001), *Hibiscus sabdariffa* (EDDOUKS et al., 1999; El BARDAI et al., 2001), *Petroselinum sativum* (EDDOUKS et al., 1999) e *Sambucus* (El BARDAI et al., 2001).

Dentre algumas considerações importantes levantadas pelos autores no estudo realizado, cita-se: a necessidade da confirmação da eficácia do efeito diurético em humanos; o conhecimento dos sítios da ação farmacológica dos princípios ativos dos extratos sobre os rins; a influência de fatores relacionados com

o modelo empregado nos estudos, tais como: a utilização ou não de grupos controle/placebo; comparação dos efeitos com um fármaco diurético conhecido; o tipo de extrato pesquisado; as determinações de volume de excreção urinária e de eletrólitos; o nível das doses administradas e a duração do estudo. Uma outra consideração importante diz respeito à segurança do consumo dos extratos por seres humanos considerando a interação com alimentos e outros medicamentos (LAHLOU et al., 2006; WRIGHT et al., 2007).

2.3.1 Fisiologia e regulação da função renal

O rim tem como unidade funcional cerca de dois milhões de néfrons. Esse por sua vez é dividido em duas partes funcionalmente distintas: o corpúsculo renal (formado pelo glomérulo, que é uma rede capilar e pela cápsula de Bowman, que envolve o glomérulo) e o túbulo renal. A pressão do sangue no interior do glomérulo é cerca de 60 mm/Hg, que é valor pressórico bastante alto, o que faz com que grandes quantidades de líquido, chamado de filtrado glomerular, sejam filtrados para fora do capilar, sendo coletadas pela cápsula de Bowman. Nesse filtrado glomerular é encontrada a maioria dos produtos finais do metabolismo que devem ser eliminados dos líquidos orgânicos (GUYTON; HALL, 2008; SOARES et al., 2005; WRIGHT et al., 2007).

A função renal é a de filtrar grandes quantidades de líquidos do plasma, reabsorvendo aqueles constituintes que são necessários, e descartando os que não são necessários. Cerca de 180 litros de filtrado glomerular são formados a cada dia, mas menos de 1% dessa quantidade, cerca de 1,5 litros por dia, é eliminado como urina. Apesar disso, esse pequeno volume ainda contém a maior parte dos produtos

finais do metabolismo, altamente concentrados. Alguns desses produtos finais do metabolismo de maior importância são: a uréia, o ácido úrico, os fosfatos, os sulfatos e o excesso de ácidos (GUYTON; HALL, 2008; HANG, 2004). O rim também é responsável por controlar as concentrações da maior parte das substâncias iônicas no líquido extracelular, inclusive de íons como o sódio, o potássio e o hidrogênio (HARVEY; CHAMPE, 1998). Em síntese sua função é reabsorver uma grande variedade de constituintes plasmáticos filtrados pelo glomérulo. Cerca de 99% da água e sal filtrados são reabsorvidos (BERNDT; STITZEL, 2005; WRIGHT et al., 2007). Assim, através do desenvolvimento do sistema de filtração - reabsorção - secreção é que o rim é praticamente o único responsável pela manutenção da composição do meio interno fisiológico (BERNDT; STITZEL, 2005).

O valor normal da osmolaridade plasmática (P_{osm}) é cerca de 287 mOsm/kg água. Usualmente, esse nível é mantido dentro de limites estreitos, pois alterações de apenas 1 a 2% da P_{osm} são sentidas pelos neurônios especializados e osmoticamente sensíveis (osmorreceptores) localizados no hipotálamo anterior, iniciando uma cascata de reações que atuam de duas maneiras: deflagrando a sede, aumentando a ingestão de água e aumentando a secreção do hormônio antidiurético ou arginina - vasopressina (ADH ou AVP), diminuindo a excreção renal de água por ação ao nível renal, nos túbulos coletores distais (REEVES et al., 1998; SOARES et al., 2005).

O mecanismo da barorregulação é menos sensível que o da osmorregulação: a diminuição do volume plasmático (hipovolemia) leva à diminuição da pressão arterial, que acarretará a redução da secreção do fator atrial natriurético (FAN), responsável pelo aumento na excreção renal de sal e água e

também estimulando a secreção do ADH, regulando a hipovolemia (REEVES et al., 1998). Já o aumento do volume plasmático (hipervolemia) leva a um conseqüente aumento da pressão arterial, inibindo o sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona (S-RAA), responsável pelo aumento da reabsorção renal de sal e água (NAVES et al, 2003).

Duas das anormalidades mais comuns do rim, que provocam a excreção diminuída dos produtos finais do metabolismo, são: destruição ou perda total de néfrons e glomerulonefrite (AIRES, 1999; GUYTON; HALL, 2008).

2.3.2 Equilíbrio ácido-base

O mecanismo renal de compensação do equilíbrio ácido-base é o mais lento e demorado, embora definitivo. Quando o pH do sangue se altera, os rins eliminam urina ácida ou alcalina, conforme as necessidades, contribuindo para regular a concentração de íons hidrogênio do sangue e demais líquidos orgânicos. Os três principais mecanismos funcionais do sistema renal são: a filtração glomerular, a reabsorção tubular e a secreção tubular (GUYTON; HALL, 2008). No primeiro, o sangue que alcança os glomérulos é filtrado para os túbulos renais. O filtrado é transformado em urina à medida que atravessa os túbulos renais; no segundo cerca de 99% do filtrado glomerular são reabsorvidos para o sangue. O restante, cerca de 1,8 litros constitui a urina, que representa um concentrado do filtrado glomerular e por fim o terceiro, a secreção tubular atua em direção oposta à reabsorção tubular. As substâncias são transportadas do interior dos capilares sanguíneos para a luz dos túbulos para mistura com a urina e subseqüente

eliminação. Esse transporte ativo de substâncias, a secreção tubular, é desempenhado pelas células dos túbulos renais (NAVES et al., 2003).

A secreção tubular é fundamental à manutenção do equilíbrio ácido-base. Através do mecanismo de secreção tubular, os rins transformam o dióxido de carbono em ácido carbônico ionizado. O íon hidrogênio é eliminado para a urina em troca por sódio ou potássio que se combinando ao íon bicarbonato, retorna ao líquido extracelular, para alcançar a corrente sanguínea (SOARES et al., 2005).

Quando há bicarbonato em excesso no sangue, os rins eliminam o íon bicarbonato em conjunto com o íon hidrogênio, o que torna a urina alcalina e contribui para a regulação das bases existentes (GUYTON; HALL, 2008; SOARES et al., 2005).

2.3.3 Fármacos diuréticos

Segundo Berndt e Stitzel (2005) o termo diurético é geralmente restrito a agentes que atuam diretamente sobre o rim e, do ponto de vista terapêutico, os diuréticos são considerados substâncias que auxiliam na remoção do excesso de líquido e eletrólitos extracelulares; fundamentalmente, exercem essa ação ao diminuir a reabsorção de sal e água nos túbulos, sendo classificados de acordo com o local onde atuam no rim.

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. 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 (BERNDT; STITZEL, 2005; HANG, 2004).

Os diuréticos, em combinação com outros fármacos ou sozinhos são validados no tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, ascite e edema pulmonar. Esses fármacos estão associados com efeitos adversos, como o desequilíbrio eletrolítico e as alterações metabólicas. Hipocalcemia é o efeito colateral mais comum, revelando que há ligação desta com ocorrência de arritmia cardíaca. Além de desenvolvimento de diabetes, ativação do sistema neuroendócrino renina-angiotensina e prejuízo na função sexual, entre outros (KAU et al., 1991; SOARES et al., 2005).

Em síntese, há 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 da água e sal. Os grupos que atuam diretamente nos túbulos são os diuréticos de alça que agem na alça de Henle (porção do ramo ascendente espesso) bloqueando a bomba de sódio-potássio-2-cloreto ($\text{Na}^+/\text{k}^+/2\text{Cl}_2^-$); os diuréticos que interferem na ação do ADH (túbulo distal e ducto coletor); os tiazídicos atuam no túbulo distal por inibição do transporte ativo de íons; já os diuréticos poupadores de potássio hormonais atuam nos receptores da aldosterona (inibição competitiva) nos túbulos distais, enquanto os não hormonais afetam a reabsorção de Na^+ na porção mineralocorticóide independente do túbulo distal, e os inibidores da anidrase carbônica inibem esta enzima nas células dos túbulos proximais. Os grupos que modificam o filtrado são os diuréticos osmóticos que são

compostos de substâncias hidrofílicas que retêm água por pressão osmótica (HANG, 2004).

Como exemplo dos diuréticos mais extensamente utilizados temos a furosemida, derivada do ácido antranílico, quem tem uma atuação ao nível da alça de Henle, também denominada de diurético de alça, inibindo o cotransporte de sódio, cloro e potássio existente na membrana luminal da alça espessa ascendente, e em menor grau nos túbulos contornados proximal e distal. Tal inibição impede a reabsorção de sódio e cloro, o que causa diminuição da pressão osmótica no sentido de reabsorção de água, a qual é então excretada em maior quantidade (SOARES et al., 2005).

Os principais efeitos colaterais da furosemida são os decorrentes do aumento da diurese e desbalanceamento eletrolítico, como por exemplo, hipocalcemia e hiponatremia. Como a furosemida tende a diminuir os níveis de potássio, muitas vezes ela é administrada em conjunto com suplementos minerais. Outros efeitos colaterais mais freqüentes são: náuseas e vômitos, hipotensão, taquicardia ou arritmia, sede e boca seca, alterações gastrintestinais, câimbras e fadiga muscular, fraqueza e letargia, tontura e agitação (GUYTON; HALL, 2008).

Assim, embora esse fármaco, como outros, tenham uma boa relação risco-benefício, pesquisas visando a descoberta de novos diuréticos, com menos efeitos colaterais, são de suma importância.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo quanto a própria espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é

relativamente recente fazendo com que cresça a investigação científica nessa área (SILVA et al., 2005).

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, desempenhando um papel importante na saúde por meio de seus efeitos na modulação dos processos oxidativos que ocorrem no organismo sendo a inibição de radicais livres um dos exemplos (PIETTA, 2000).

Os radicais livres são moléculas muito reativas, derivadas do oxigênio, formado fisiologicamente no corpo humano (BHOOLA et al., 2003). São moléculas eletricamente carregadas, as quais exteriorizam e capturam elétrons de outras substâncias para neutralizar-se. Embora o ataque inicial faça com que o radical torne-se neutralizado, outro radical livre é formado no processo, resultando numa reação em cadeia (KALIORA et al., 2006).

As oxidações biológicas são caracterizadas pela atuação do oxigênio como acceptor final do H^+ gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como os radicais: superóxido (O_2^-), hidroxila (OH), peroxila (RO_2) e hidroperoxila (HO_2). Nestes processos, quando os mecanismos de defesa antioxidante não erradicam eficientemente os radicais livres formados, surge o estresse oxidativo. Este por sua vez, leva os danos a lipídeos, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações de estrutura e funções celulares (GOUVÊA, 2004).

Uma série de doenças decorre desse desequilíbrio entre a produção e a erradicação ERO e de outros radicais formados durante a reação em cadeia da peroxidação lipídica. Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas

tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (Figura 2) (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Figura 2. Exemplos de doenças relacionadas com a geração de radicais livres

Artrite reumatóide	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

Fonte: (BIANCHI; ANTUNES, 1999 ; SANTOS; MELLO., 2004)

Os processos responsáveis pelo controle das reações oxidativa, denominados varredores de radicais livres, podem ser enzimáticos e não enzimáticos e produzem a eliminação ou então impedem a transformação desses radicais em produtos mais tóxicos para as células. Como exemplo dos primeiros, encontra-se a ação das enzimas orgânicas, descobertas em 1968: superóxido dismutase (SOD), que é uma enzima específica para a remoção catalítica de um radical de oxigênio, juntamente com as outras duas a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT) (LIMA et al., 2006; WANG et al., 2008), e que são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores.

Podendo atuar positivamente sobre todos os processos degenerativos a SOD é uma enzima com efeito antienvhecimento e têm papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

A enzima GSH-Px descoberta por Mills em 1959, em mamíferos, contém dois tipos de glutathione peroxidase, sendo uma delas selênio dependente. Também não se observa sua presença em plantas ou bactérias, embora seja encontrada em algas e fungos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Quanto à enzima CAT, ela está presente na maioria das células aeróbicas e nos animais concentram-se principalmente no fígado, rins e eritrócito (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Quanto aos processos não enzimáticos, há os antioxidantes sintéticos e os naturais. Dentre os antioxidantes naturais, alguns fitocomponentes que apresentam atividade antioxidante são o ácido ascórbico, os flavonóides, os derivados do ácido cinâmico e outros compostos fenólicos e polifenólicos (RICE-EVANS et al., 1996).

Os compostos fenólicos se encontram dentre as diversas classes de substâncias que vem recebendo grande atenção nos últimos tempos, sobretudo por inibirem a lipooxigenase *in vitro* e a peroxidação lipídica. São compostos formados por um ou mais anéis aromáticos carregando grupos hidroxilas, sendo capazes de quelar metais e eliminar radicais livres. A presença dos elétrons- π , que auxiliam na estabilização do radical formado pela oxidação do fenol ao perder um átomo de hidrogênio, ajuda a explicar a grande atividade antioxidante desses compostos. Vários fenóis que apresentam mais de 3 hidroxilas ligadas ao anel benzênico, os chamados polifenóis, estão distribuídos na natureza e apresentam ação antioxidante sendo associados com a redução de doenças crônicas. Dentre eles, os flavonóides, têm se mostrado como os antioxidantes mais abundantes e eficazes, estando presente nos vegetais, principalmente em frutas e verduras, temperos e chás. A estrutura comum (Figura 3), descrita como unidade básica de 15 carbonos

(C₆-C₃-C₆), apresenta um núcleo de dois anéis fenólicos (A e B), ligados por uma cadeia de átomos de carbono. Essa cadeia, por sua vez, fecha-se em um terceiro anel, C, heterocíclico do tipo pirano, com um átomo de oxigênio (SOUZA et al., 2007).

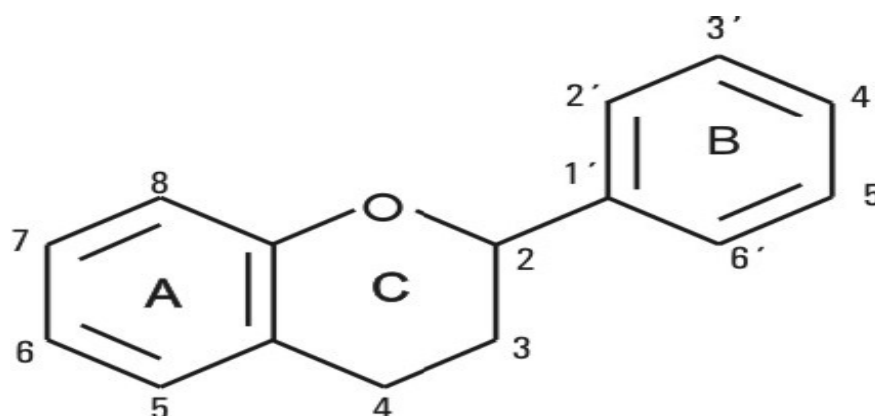


Figura 3. Esqueleto básico dos flavonóides
Fonte: BRESOLIN; FILHO (2003).

Presentes entre os metabólitos secundários de vegetais em quantidades relevantes, várias funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Dentre elas podemos citar: proteção contra insetos, fungos e bactérias, proteção contra a incidência dos raios ultravioleta e visível e inibidores de enzimas. A esses compostos são atribuídas propriedades farmacológicas tais como: antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antiespasmódica, antimicrobiana, antimutagênica, antiúlcera, antiviral, estrogênica e tripanossomicida (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004 *apud* SIMÕES et al., 2004).

A importância de plantas com atividade antioxidante vem crescendo diante da perspectiva de sua utilização para prevenção de certas doenças. Com isto o desenvolvimento de métodos para a determinação da capacidade antioxidante de espécies vegetais vem se intensificando. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), no poder de redução do metal (FRAP, CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), na captura do

radical orgânico (ABTS, DPPH), na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do beta-caroteno), entre outros. Entre os métodos mais usados atualmente temos: ABTS, FRAP, DPPH e ORAC (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2002).

Dentre as técnicas *in vitro* utilizadas na determinação da atividade antioxidante, encontra-se o método de detecção pelo 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), um método fácil e rápido. Trata-se de um método espectrofotométrico no qual se verifica o consumo do radical cromógeno (de coloração púrpura), que ao se reduzir, apresenta descoloração e perda da absorbância em 517 nanômetros (nm). Esse método é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante ao radical estável, sendo também denominado como atividade de seqüestro radicalar; o método assim avalia o poder redutor do antioxidante que ao doar o elétron se oxida. As determinações do decaimento da absorbância do radical (DPPH•) frente a uma amostra e a um controle-positivo resultam na avaliação da porcentagem de atividade antioxidante (AA%) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; WILLIAMS et al., 1995).

A atividade antioxidante, ou concentração efetiva 50% (CE₅₀) é definida como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do DPPH em 50% (WILLIAMS et al., 1995). O consumo do DPPH é assim uma estimativa das concentrações de agentes redutores nas amostras avaliadas, sendo uma aproximação do efeito *in vivo* já que a capacidade antioxidante dos extratos vegetais não está relacionada apenas à somatória das atividades de cada fitocomponente, antes, depende do microambiente em que se encontra o composto, sendo que estes interatuam produzindo efeitos sinérgicos ou inibitórios. (KUSKOSKI et al., 2005).

O método do DPPH apresenta uma estabilidade, embora seja um método que avalie apenas a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica. Os tempos de medida empregados nesse método são em geral breves (até 30 minutos), e em alguns casos, de até 60 minutos, quando se objetiva comprovar a influência do tempo na medida dos valores da atividade antioxidante. Essas diferenças de tempo de reação refletem a quantidade e a reatividade dos antioxidantes presentes nas amostras analisadas (KUSKOSKI et al., 2005).

Além de o teste ser simples e amplamente empregado, esse ensaio de atividade seqüestradora do radical livre DPPH se apresenta como um teste de predição de uma potencial atividade antioxidante e pode ser empregado para *screening* de compostos químicos sintéticos e produtos naturais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a toxicidade aguda e as atividades diurética e antioxidante da *R. viburnoides*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a toxicidade aguda em dose única do extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides* (EEBFRV) em ratos e camundongos;
- ✓ Avaliar a atividade diurética através da administração oral única do EEBFRV, em ratos;
- ✓ Dosar os fenóis totais e avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do EEBFRV e frações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES

Para a realização dos estudos, o material botânico constituído por folhas jovens e adultas de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth foi coletado na FLONA IBAMA de Silvânia - GO, (16°, 38' 33,3" sul, 48° 39' 07" oeste, 950 m altitude) e identificada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob número UFG-24328.

O material foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar 40 °C, durante 72 horas e posteriormente pulverizada em moinho de facas.

O extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides* (EEBFRV) foi obtido por maceração em etanol 95% (PA) na proporção 1:5, sob agitação por 4 h, seguido de filtração. A extração foi repetida por mais duas vezes para garantir o esgotamento das substâncias extraíveis pelo etanol. O solvente foi evaporado em rotaevaporador a 40 °C sob pressão reduzida (FERRI, 1996).

Para obtenção das frações, 40 g do EEBFRV foram solubilizadas em uma mistura metanol/água (7:3), e essa mistura submetida partições líquido-líquido sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila. Desta forma, foram obtidas 4 frações: hexânica (FH_f), diclorometano (FDM_f), acetato de etila (FAE_f), e metanol/água (FMet/H₂O_f) (Figura 4). As frações obtidas foram empregadas no teste de atividade antioxidante através da reação com DPPH:

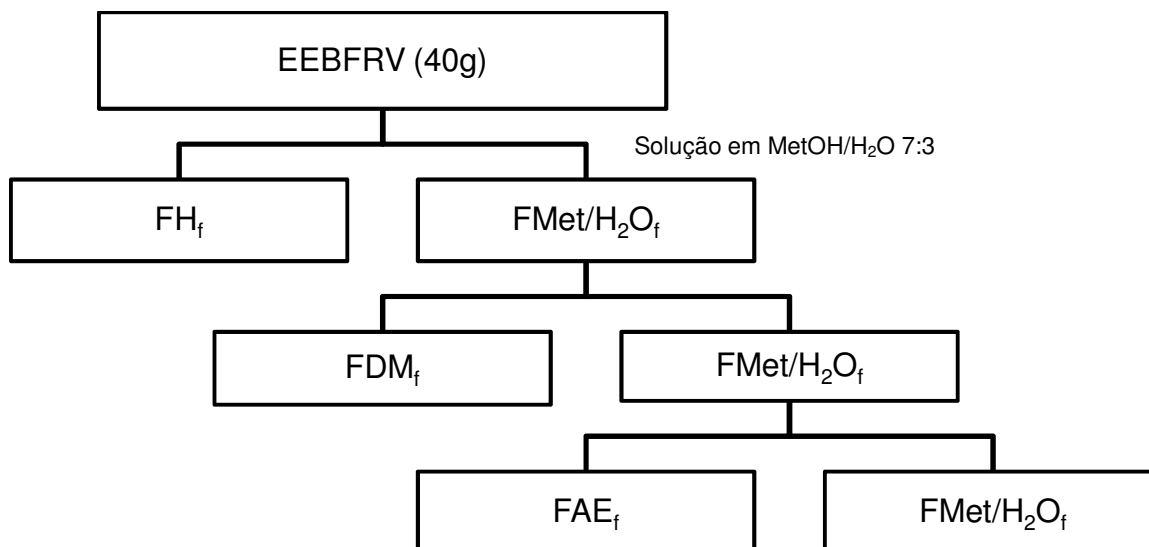


Figura 4. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*

EEBFRV - extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*; **FH_f** - fração hexânica das folhas, **FMet/H₂O_f** - fração metanol/água das folhas; **FDM_f** - fração diclorometano das folhas; **FAE_f** - fração acetato de etila das folhas.

4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

O Projeto abordando a avaliação da toxicidade aguda e a avaliação da atividade diurética da *R. viburnoides* foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG segundo protocolo de nº 128/2007 (Anexo A).

Foram utilizados para os experimentos ratos da espécie *Wistar* e camundongos da espécie *Swiss*, de ambos os sexos (fêmeas nulíparas e não grávidas), provenientes de colônias mantidas pelo Laboratório de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília-DF (UNICEUB) (n=37). Os animais eram adultos jovens com 8 a 10 semanas de idade e com peso de cada um não excedeu a 20% da média dos grupos. Os animais passaram por um período de aclimação de cinco dias antes do início dos experimentos para averiguação do comportamento, hábitos alimentares e fisiológicos e das condições sanitárias.

Todos os experimentos foram realizados no NEPET (Núcleo de Estudo e Pesquisa Tóxico-Farmacológica da UFG) sob condições ambientais controladas (temperatura ambiente de 23 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 50 – 70% e o ciclo claro/escuro de 12 horas cada).

Os animais foram alimentados com ração de boa qualidade adequada às necessidades dos mesmos e água filtrada. Privados de alimentação 4 horas antes e 2 horas depois da administração das amostras teste. A água foi oferecida *ad libitum* até o término dos experimentos.

4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA DOSE ÚNICA – TESTE DE CLASSE (OECD 423)

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 propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e por Frajblat (2006).

Os quatro grupos experimentais (n=3) de camundongos, pesando de 20 a 25 g e ratos, pesando de 150 a 200 g, de ambos os sexos foram divididos de forma aleatória respeitando o sexo, em caixas de polipropileno.

Nesse teste, a administração do EEBFRV foi realizada em dose única por via oral (método de gavagem), após solubilização do extrato em solução fisiológica 0,9%. O volume administrado aos animais não excedeu a 1mL/100g de peso corporal.

Iniciando-se com uma dose de 2000 mg/kg, e na ausência de mortalidade e ou sinais de toxicidade a dose foi aumentada para 5000 mg/kg.

Para melhor entendimento, o procedimento do teste pode ser observado iniciando com a dose de 2000 mg/kg no: Anexo B.

4.3.1 Observação dos sinais de toxicidade

Observações comportamentais sistemáticas foram realizadas de acordo com o “*screening*” hipocrático: atividade geral, frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tonus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte. Foram realizadas observações a intervalos variados no dia de administração da droga (10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h) e, a partir de então, periodicamente, até o décimo quarto dia (MALONE, 1962; MALONE, 1977; CUNHA et al., 2006).

A intensidade dos eventos foi semi-quantificada de zero a 4, correspondendo, respectivamente a: ausente, raro, pouco, moderado e intenso de acordo com o modelo proposto por Malone e Robichaud 1962 e Malone 1977.

No 14^o dia, 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 submetidos à eutanásia 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 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

Os grupos experimentais constituídos por ratos fêmeas, pesando de 150 a 200 g, foram compostos ao acaso, com animais de diferentes ninhadas e acondicionados em gaiola semimetabólica de aço inoxidável e fundo de grade, nas quais foi possível monitorar o consumo de água, variação de peso e produção de urina.

Segundo Lahlou (2006) com modificações, os cinco grupos (n=5) foram formados da seguinte forma: três grupos foram tratados com dose diferentes do EEBFRV (40 mg/kg, 80 mg/kg e 160 mg/kg) solubilizadas em solução fisiológica 0,9%; um grupo (controle - positivo) foi tratado com furosemida (20 mg/kg) e o outro grupo (controle - negativo) foi tratado apenas com o veículo da administração (1 mL de solução salina 0,9%). As administrações foram feitas pela via oral, através do método de gavagem (1 mL/kg). Antes do início da administração dos extratos (fase de pré-tratamento) o consumo de água e excreção de urina foi monitorado para verificação da homogeneidade destes parâmetros.

A coleta de urina foi realizada nos intervalos: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h após a administração dos tratamentos. O volume de urina e o consumo de água foram monitorados nesses mesmos intervalos. Análises físico-químicas foram realizadas nas amostras parciais e na urina de 24 h. Os parâmetros analisados foram: pH, densidade, nitritos, proteínas, glicose, cetonas, urobilinogênio, bilirrubina e hemoglobina (fita reagente Accu-Tell). Essas amostras também foram submetidas a dosagens bioquímicas visando quantificar os eletrólitos sódio, potássio (fotometria de chama, Fotômetro de chama Celm), cloro (colorimetria, Kit Labtest) e os analitos

uréia (U) e creatinina (C) (método enzimático, kit Laborclin em equipamento automatizado Autolab).

As dosagens bioquímicas foram realizadas 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);
- pH (tira indicadora de pH 0 -14 marca J. Prolab).

Ao final do experimento, 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, rins e baço para análise macroscópica.

4.4.1 Análises Estatísticas (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, foi aplicado, por

meio de *software* “Graphpad Instat Prism 5” os testes de análise de variância (ANOVA). Quando detectada diferença significativa entre os grupos, comparado ao controle negativo, foi aplicado o teste de Dunnett e Teste T-não pareado.

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

4.5 TESTE DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Doseamento de fenóis totais

O doseamento de fenóis totais do EEBFRV e de suas frações foram realizados em triplicata segundo o método de Hagerman e Butler (MOLE e WATERMAN, 1987).

Para o preparo das soluções a serem dosadas, pesou-se 100 mg de cada amostra (EEBFRV e frações FH_f, FDM_f, FAE_f, FMet/H₂O_f) em seguida transferiu-se cada amostra para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com 40 mL de metanol 50% (V/V) e o restante com água destilada, foi efetuada filtração com auxílio de papel de filtro.

Adicionou-se a um tubo de ensaio 2 mL de solução de lauril sulfato de sódio/trietanolamina¹ e 1 mL de solução cromogênica de FeCl₃². Adicionou-se a esse tubo 1 mL da solução da amostra obtida anteriormente. Deixou-se em repouso por 15 minutos e fez-se a leitura da absorbância a 510 nm. Utilizou-se como branco

¹ Lauril sulfato de sódio 1% (p/V), trietanolamina 5% (V/V) e isopropanol 20% (V/V) em quantidade suficiente de água destilada para completar o volume de 100 mL.

² 1,62 g de FeCl₃ em 1 L de solução de HCl 0,001M.

uma solução contendo 2 mL de solução de lauril sulfato de sódio/trietanolamina e 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 e 1 mL de água destilada.

Curva padrão de ácido tânico: pesou-se 100 mg de ácido tânico e transferiu-se para um balão de 100 mL, completou-se o volume com 40 mL de metanol 50% (V/V) e o restante com água destilada. Retirou-se alíquotas desta solução entre 200 μL a 800 μL , dependendo da faixa de concentração que se pretendia cobrir, e transferiu-se para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de lauril sulfato de sódio/trietanolamina e 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 e completou-se o volume para 4 mL com água destilada. Deixou-se em repouso por 15 minutos e fez-se a leitura da absorvância a 510 nm. Confeccionou-se uma curva padrão de ácido tânico utilizando o programa “GraphPad Prism 5”.

Através da curva padrão de ácido tânico e das diluições das amostras a porcentagem de fenóis totais foi calculada, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$c = \frac{\text{Absorbância} - A}{B}$$
$$\% \text{ fenóis totais} = c \times \frac{100}{0,1} \times 10^{-3} \times 100$$

Onde: c = concentração de ácido tânico em mg/mL; A = intersecção com o eixo y; B = coeficiente angular (inclinação da reta).

Os resultados apresentado para o doseamento dos fenóis totais correspondem à média das três repetições (n=3) \pm desvio padrão da média.

4.5.2 Avaliação da capacidade de reação com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Para avaliar o potencial antioxidante, foram feitos e testados o EEBFRV e as 4 frações FH_f, FDM_f, FAE_f, FMet/H₂O_f. A avaliação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] foi realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical livre, na presença de possíveis substâncias antioxidantes (BRAND-WILLIAMS et al., 1995), com modificações. As amostras foram diluídas em duplicata, com concentrações variando de 25 mg mL⁻¹ à 0,0122 mg mL⁻¹ (12 concentrações no total) em metanol, partindo-se da solução-mãe de 50 mg mL⁻¹. Uma solução metanólica de DPPH[•] a 100 mM foi preparada, e alíquotas de 1 mL, foram adicionadas em cubetas contendo 50 µL de cada amostra (A), à cada concentração. As reações transcorreram à temperatura ambiente (em torno de 25 °C) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Depois de transcorridos os 30 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias, a 517 nm. Metanol (1,0 mL) e 50 µL de cada amostra em cada concentração foram usados como brancos (B) e a solução de DPPH[•] (1,0 mL; 100 mM) e metanol (50 µL) foi usada como controle (C). Os valores de absorbância foram convertidos em atividade antioxidante percentual (AA%) usando a seguinte fórmula (MENSOR et al., 2001).

$$AA\% = 100 - \left\{ \left[(ABS_A - ABS_B) \times 100 \right] / ABS_C \right\}$$

A vitamina E (α -tocoferol) foi usada como controle-positivo, com concentrações variando de 25 mg mL⁻¹ à 0,0122 mg mL⁻¹. Uma alíquota contendo apenas metanol foi utilizada como branco para zerar o espectrofotômetro.

4.5.3. Cálculo da concentração efetiva 50% (CE_{50})

Utiliza-se o resultado de CE_{50} para obtenção de parâmetros numéricos que permitam verificar no modelo teste se a planta possui substâncias antioxidantes e/ou observar sua eficiência frente a radicais livres. O programa “GraphPad Prism 5” foi utilizado para relacionar os valores de AA% e das concentrações de cada amostra, obtendo-se, para cada amostra a concentração efetiva 50%. A determinação da CE_{50} foi obtida, por regressão linear dos pontos plotados graficamente (MENSOR et al., 2001). Para a plotagem dos pontos, foram usados os valores de AA% obtidos de duplicatas realizadas para cada um dos testes. A mensuração de CE_{50} configura o valor necessário para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para as amostras testadas (VICENTINO e MENEZES, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E SUAS FRAÇÕES

Partindo-se de 1700 g do pó das folhas de *R. viburnoides* processadas por meio da técnica de maceração, seguida da rota-evaporação, obteve-se 163 g de extrato etanólico bruto, com rendimento de 9,6%.

Após o fracionamento de 40 g do EEBFRV obtido da amostra coletada, obteve-se os rendimentos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento dos extratos e frações.

Amostra	Rendimento (%)
Extrato Etanólico Bruto da Folha (163 g)	9,6
Fração Hexânica da Folha (4 g)	10
Fração Diclorometano da Folha (3,58 g)	8,95
Fração Acetato de Etila da Folha (4,6 g)	11,5
Fração Metanol/Água da Folha (14 g)	35

5.2 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA

5.2.1 Classificação toxicológica, observações de sinais e sintomas

No estudo de avaliação da toxicidade aguda, de acordo com a ANVISA, Portaria 116/96 (BRASIL, 1996), e o guia da OECD 423 a toxicidade aguda é a bioatividade capaz de causar danos na estrutura celular ou genética dos seres vivos pouco tempo depois de uma única exposição, tipicamente de curta duração. Verificou-se que após as administrações orais do EEBFRV nas doses de 2000 mg/kg e posteriormente 5000 mg/kg ($DL_{50} > 5000 \text{ mg/Kg}$), não foram observados sinais de toxicidade e as observações comportamentais sistemáticas estiveram na escala 0 no *screening* hipocrático, ou letalidade nos animais experimentais, tendo assim como classificar na categoria 5 ou não classificada. Sensibilidade entre as espécies e sexo dos animais não foram constatadas.

Considerando que para a determinação da DL_{50} , os valores obtidos visam verificar a existência de um percentual de 50% de letalidade nos animais; no presente experimento não foi necessário determiná-la, visto que as novas diretrizes para determinação da toxicidade aguda sistêmica, como por exemplo, dose fixa – OECD 423, aponta a tendência do desuso do cálculo da DL_{50} , como descrito por Valadares (2006).

Segundo trabalho citado por Santos (2008) estudos pré-clínicos são de extrema importância, pois a partir deles alia-se a segurança à eficácia e potência de um produto fitoterápico, incluindo a não menos importante toxicologia do fitoterápico em estudo.

Na análise macroscópica dos órgãos, realizada a partir da necropsia sugerida pela OECD 423, não foram constatadas alterações no fígado e nos rins, órgãos importantes no metabolismo e excreção de xenobióticos (HAYES; DIPASQUALE, 2001), não sendo necessária a remoção de fragmentos dos órgãos para o estudo histopatológico.

Desta forma, uma vez que o extrato foi classificado como categoria 5 ou não classificada não foram necessárias as preparações de cortes histológicos para o exame histopatológico segundo preconizado pela OECD 423.

Considerando que a *R. viburnoides* é bastante utilizada pela população pela via oral no tratamento de várias patologias e devido à inexistência de outros estudos com esta espécie, os resultados deste experimento são de extrema importância para a saúde pública coletiva e uma vez complementado com novos estudos (toxicidade sub-aguda e crônica) poderão garantir a segurança na utilização etnofarmacológica da *R. viburnoides*, bem como estimular novas pesquisas visando avaliar seu potencial para o desenvolvimento de um novo fitoterápico.

Em um estudo realizado por Freitas (2008) para avaliação da toxicidade aguda da *Palicourea coriacea*, esta também se mostrou sem sinais de toxicidade ou mortes nos animais investigados, sugerindo assim uma segura utilização destas espécies pela população, em contraposição dos relatos de que algumas espécies destes gêneros são altamente tóxicas para bovinos.

5.3 ESTUDO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

No estudo da atividade diurética, foi observado por um período de 24 h previamente à administração do EEBFRV, 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 (AGUNU et al., 2005; BENJUMEA et al., 2005; LAHLOU et al., 2006; OECD 32/2000), revelando assim o padrão fisiológico dos animais para o início dos experimentos (CV % = 1,85 e 5,5, para ingestão hídrica e produção urinária, respectivamente). Conforme demonstrado na Tabela 2, as médias do volume de ingestão hídrica e da produção urinária nos grupos experimentais estão muito próximas das referenciadas na literatura segundo os autores citados acima (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 e adicionalmente.

Tabela 2. Volume de ingestão hídrica e produção de urina, no período de 24 h antes da realização do experimento (valores basais), nos grupos dos animais de experimentação (n=5; Média \pm DP). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (ANOVA, teste de Dunnett).

GRUPO (N=5)	Volume de ingestão hídrica, mL (Média \pm DP)	Produção de urina, mL (Média \pm DP)
Furosemida 20 mg/kg	35,8 \pm 5,675	11,26 \pm 2,046
Salina	34,4 \pm 4,159	11,9 \pm 1,084
EEBFRV 40 mg/kg	36 \pm 2,915	10,74 \pm 1,880
EEBFRV 80 mg/kg	35,8 \pm 2,280	10,66 \pm 1,024
EEBFRV 160 mg/kg	35,2 \pm 5,541	11,98 \pm 1,006
Média \pm DP	35,44 \pm 0,6549	11,31 \pm 0,6219
(CV %)	(1,85 %)	(5,5 %)

CV % = coeficiente de variação percentual.

A administração da furosemida na dose de 20 mg/kg, salina (1 mL) e do EEBFRV nas doses de 40 mg/Kg, 80 mg/Kg e 160 mg/kg produziu excreção urinária nos grupos experimentais em um período de 24 h.

No experimento pode-se verificar que, tanto a furosemida, quanto o EEBFRV nas diferentes doses, apresentou um acentuado potencial de atividade excretora urinária em relação ao do grupo administrado com salina.

Verificou-se que com a administração do EEBFRV nas doses de 40 mg/Kg, 80 mg/Kg e 160 mg/Kg ocorreu um incremento relativo no volume urinário de 24 h na ordem de 58%, 75% e 104%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (salina), ou seja, um efeito dose-dependente. No grupo tratado com a dose de 160 mg/Kg o efeito diurético foi 45% superior ao da Furosemida (Teste t-não pareado, $p = 0,0012$), conforme descrito na Figura 5 e na Tabela 3.

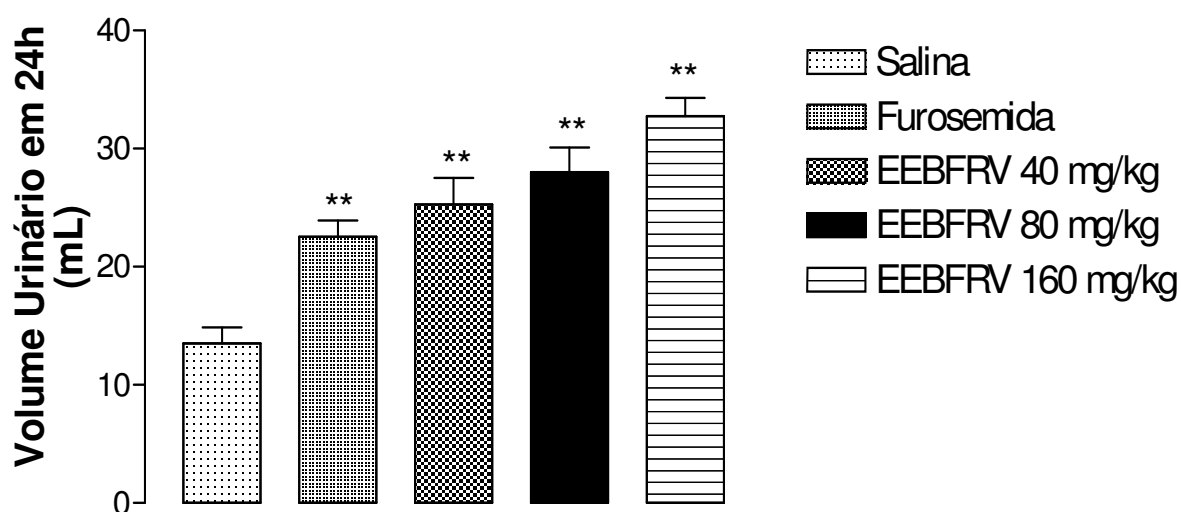


Figura 5. Volume de excreção urinária em 24h, após administração oral nos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,05$), (ANOVA, teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

Tabela 3. Volume de urina no teste de atividade diurética (Média \pm desvio padrão), após administração oral nos grupos: salina (1 mL), furosemida (20 mg/kg) e EEBFRV (Extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*) nas doses de 40, 80 e 160 mg/kg segundo os grupos de estudo (n=5), ** Estatisticamente significativo em relação a salina (p<0,01), (ANOVA, Teste Dunnett).

GRUPO	1h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	Total
	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)	Vol. Urina (mL)
Salina	1,96 \pm 0,3341	1,5 \pm 0,1924	0,96 \pm 0,1517	1,36 \pm 0,2302	1,64 \pm 0,2966	2,24 \pm 0,2510	4,0 \pm 2,550	13,52 \pm 3,013
Furosemida	6,42 \pm 0,7003**	1,8 \pm 0,1378	1,32 \pm 0,2168	1,28 \pm 0,4604	1,54 \pm 0,5899	2,72 \pm 0,4604	7,46 \pm 1,576**	22,54 \pm 3,11**
Extrato 40 mg/Kg	0,9 \pm 0,2915	1,14 \pm 0,1568	3,18 \pm 0,5633**	2,54 \pm 0,9762	1,52 \pm 0,6870	5,4 \pm 1,71**	10,66 \pm 1,918**	25,28 \pm 4,972**
Extrato 80 mg/Kg	1,24 \pm 0,2015	1,88 \pm 0,3153	3,68 \pm 1,867**	3,44 \pm 1,683**	1,56 \pm 0,1949	4,5 \pm 1,225	11,72 \pm 0,9757**	28,02 \pm 4,645**
Extrato 160 mg/Kg	1,0 \pm 0,2966	1,38 \pm 0,2905	3,5 \pm 0,5**	2,3 \pm 0,7874	1,3 \pm 0,3464	5,96 \pm 1,727**	17,3 \pm 0,8602**	32,74 \pm 3,438**

Em relação à cinética de excreção urinária em 24 h, a Figura 6 nos mostra os volumes de excreção urinária acumulado onde a furosemida, por ser um potente diurético de alça, apresentou ação rápida (cerca de 60 minutos após a administração), devido à sua boa biodisponibilidade (pela rápida velocidade de absorção gastrointestinal, distribuição e alcance do sítio de ação pela secreção ao nível dos túbulos renais) e de curta duração.

Enquanto a ação farmacológica nos grupos tratados com o EEBFRV nas diferentes doses, embora mais lenta, foi contínua, o que pode ser explicado pela menor velocidade de absorção e distribuição dos princípios ativos vegetais, os quais, em relação à furosemida, podem apresentar diferenças acentuadas com relação ao caráter químico, lipossolubilidade, hidrossolubilidade; pKa e tamanho molecular; fatores estes que fazem variar grandemente os parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição e excreção dos mesmos.

Outras considerações farmacocinéticas importantes podem ser levantadas em relação à maior duração deste efeito diurético; como a possível existência de metabólitos ativos no extrato ou o fato de que os componentes ativos teriam uma meia-vida de eliminação mais longa. Como há ainda a possibilidade da ação prolongada ter decorrido da acumulação de princípios ativos do extrato no sítio de ação. Assim foi observado que o EEBFRV nas diferentes doses teve um início de ação diurética superior ao da furosemida, a partir das 2 h da administração, tendo um efeito contínuo até 6 h. Verifica-se ainda que o volume acumulado a partir das 8 h para o extrato nas concentrações de 40 mg/Kg, 80 mg/Kg e 160 mg/kg, foi bem mais significativo, considerando que neste período ocorreu a mudança do ritmo circadiano dos animais, já que no período noturno a produção urinária é mais efetiva, sendo possível visualizar melhor o efeito diurético do extrato.

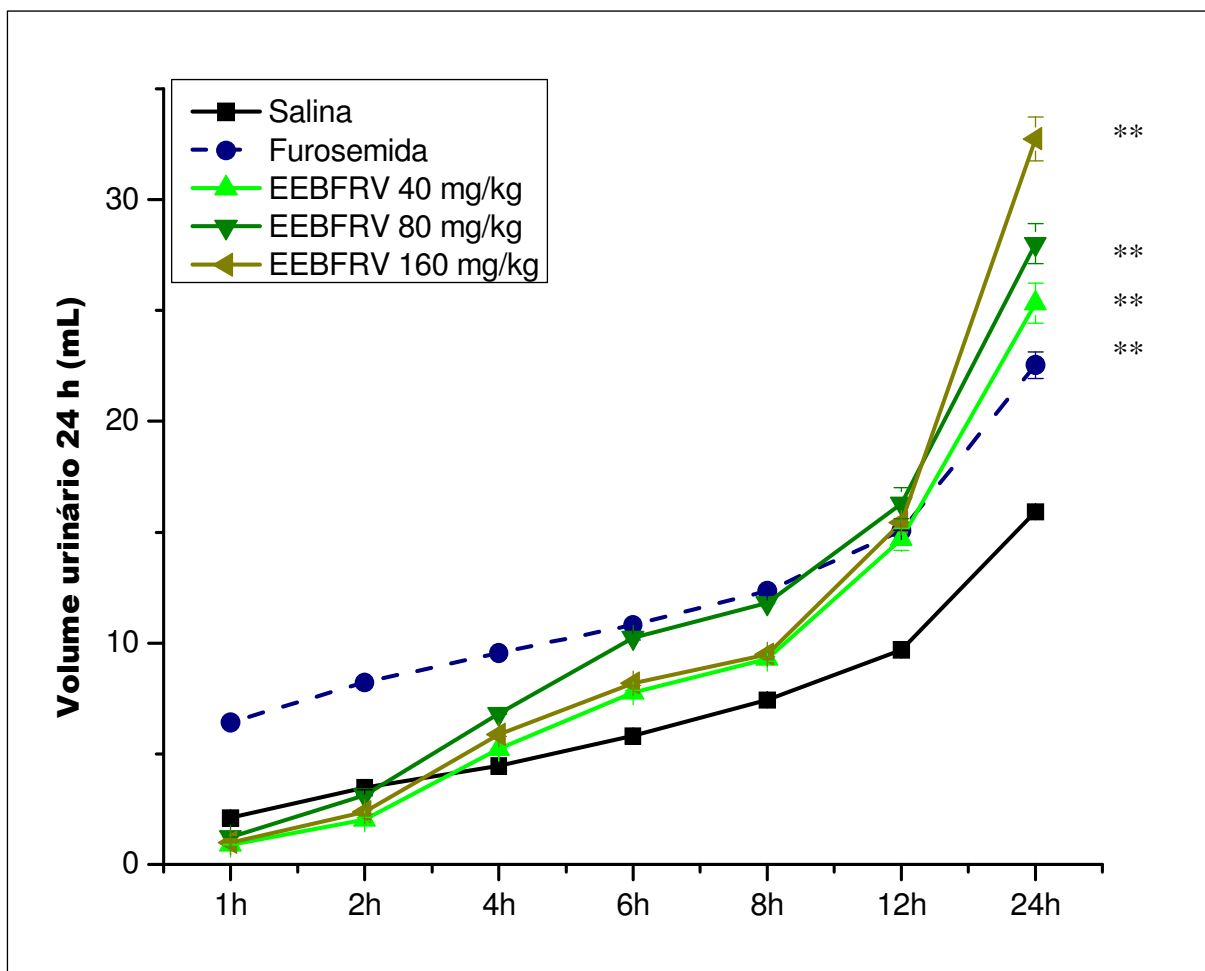


Figura 6. Volume de excreção urinária acumulada em 24 h, após a administração oral nos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,01$), (ANOVA, teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

Com relação ao consumo hídrico durante o experimento, observamos que em relação às médias no período do pré-teste, a administração do EEBFRV nas doses de 40, 80 e 160 mg/kg, promoveu um aumento da taxa de ingestão hídrica (Tabela 4), em relação a salina, em função da maior excreção urinária promovida pelo extrato. Pode-se verificar que a administração do EEBFRV 40 e 80 mg/kg promoveu uma ingestão hídrica similar à da furosemida = $67 \pm 4,47$ mL, enquanto a

maior dose administrada do extrato promoveu uma ingestão hídrica superior a da furosemida.

Tabela 4. Volume de ingestão hídrica nos grupos em estudo, no período de 24 h após a administração. (n=5; Média \pm DP). *Estatisticamente significativo em relação ao grupo da salina ($p < 0,01$) (ANOVA, teste de Dunnett).

GRUPO	VOLUME INGESTÃO HÍDRICA PÓS-TESTE (Média \pm DP)	VOLUME INGESTÃO HÍDRICA PÓS-TESTE (% em relação à salina)
Furosemida	67 \pm 4,47*	134,53*
Salina	49,8 \pm 8,25	100
EEBFRV 40 mg/kg	69 \pm 7,41*	138,55*
EEBFRV 80 mg/kg	69,9 \pm 11,9*	140,36*
EEBFRV 160 mg/kg	79 \pm 7,41*	158,63*

5.3.1 Avaliações da bioquímica urinária

Os valores das médias e desvios padrões para os parâmetros bioquímicos urinários estão apresentados na Tabela 5.

O efeito promovido por uma dose única oral da furosemida 20 mg/kg e do EEBFRV 40, 80 e 160 mg/kg sobre a bioquímica urinária de 1 - 24 h (Na^+ , K^+ , Cl^- , uréia e creatinina) estão representados nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11.

Conforme apresentado nas figuras, verifica-se que em paralelo ao efeito sobre o volume acumulada de urina excretada, houve uma significativa excreção bioquímica urinária/24h (acumulada), estimulada tanto pela furosemida, quanto pelo extrato, nas diferentes doses em relação ao grupo administrado com salina, sendo que a furosemida promoveu uma elevada excreção dos eletrólitos sódio e cloreto na primeira hora após a administração: Na^+ (0,72 \pm 0,01 mEq / 0,14 \pm 0,01 mEq); Cl^- (0,93 \pm 0,01 mEq / 0,16 \pm 0,005 mEq), enquanto que para o potássio este fármaco apresentou uma discreta ação poupadora ao longo do estudo; para os demais parâmetros bioquímicos, a estimulação foi significativa (uréia e creatinina) no

período de 12 h ($10,1 \pm 0,2050$ e $17 \pm 0,005$ mg) e 24 h ($29,6 \pm 0,59$ e $0,37 \pm 0,002$ mg).

Também pode ser observado que a excreção estimulada pelo extrato nas doses de 40 mg/Kg, 80 mg/Kg e 160 mg/Kg no período de 12 às 24 h superou à da furosemida, podendo-se propor a seguinte relação do potencial excretor eletrolítico: furosemida 20 mg/kg < EEFRV 40 mg/kg < EERFV 80 mg/Kg < EEFRV 160 mg/kg, levando em consideração que o fármaco possui ação imediata.

A ação diurética da furosemida resulta da inibição da reabsorção de Cl^- e Na^+ no segmento da alça de Henle. Como resultado a excreção fracionada de Na^+ pode alcançar 35% da filtração glomerular de sódio. Os efeitos secundários do aumento da excreção de sódio são: excreção urinária aumentada e aumento discreto da secreção tubular distal de potássio. Em uma dose oral a furosemida começa o seu efeito diurético dentro de 1 h e sua duração vai de 3 a 6 hs após administração da dose oral (GUYTON; HALL, 2008). Observando-se assim que a planta em estudo apresenta uma boa ação diurética e devendo ser mais profundamente estudada para sua melhor utilização.

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos urinários (Médias \pm desvios padrões) obtidos após administração oral de furosemida (20 mg/kg), controle negativo (1 mL/salina) e EEBFRV (40, 80 e 160 mg/kg), segundo os grupos de estudo (n=5). *Estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$; ** $p < 0,001$), (ANOVA, Teste Dunnett).

Parâmetro Bioquímico	Grupo	1h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	0-24 h
Na (mEq)	Furosemida	0,72 \pm 0,016**	0,21 \pm 0,005**	0,18 \pm 0,003**	0,16 \pm 0,002*	0,13 \pm 0,004**	0,19 \pm 0,005**	0,71 \pm 0,026**	0,68\pm0,02**
	Salina	0,14 \pm 0,006	0,02 \pm 0,001	0,03 \pm 0,001	0,22 \pm 0,002	0,3 \pm 0,004	0,36 \pm 0,005	0,94 \pm 0,003	0,1\pm0,06
	40mg/kg	0,07 \pm 0,007**	0,03 \pm 0,001	0,17 \pm 0,003**	0,27 \pm 0,01	0,16 \pm 0,006**	0,56 \pm 0,027**	1,89 \pm 0,022**	0,37\pm0,06**
	80mg/kg	0,12 \pm 0,003	0,08 \pm 0,004	0,16 \pm 0,004**	0,6 \pm 0,033**	0,23 \pm 0,003*	0,51 \pm 0,002**	2,12 \pm 0,003**	0,57\pm0,06**
	160mg/kg	0,11 \pm 0,005	0,05 \pm 0,004	0,16 \pm 0,001**	0,5 \pm 0,015**	0,25 \pm 0,003*	1,01 \pm 0,045**	3,15 \pm 0,016**	0,57\pm0,11**
K (mEq)	Furosemida	0,14 \pm 0,01**	0,08 \pm 0,001	0,09 \pm 0,002	0,17 \pm 0,001**	0,13 \pm 0,008**	0,21 \pm 0,005**	0,64 \pm 0,023**	0,71\pm0,085**
	Salina	0,03 \pm 0,002	0,04 \pm 0,002	0,12 \pm 0,001	0,21 \pm 0,001	0,31 \pm 0,002	0,39 \pm 0,005	1,07 \pm 0,025	0,07\pm0,03
	40mg/kg	0,03 \pm 0,002	0,08 \pm 0,001	0,6 \pm 0,002**	0,29 \pm 0,009	0,18 \pm 0,003**	0,61 \pm 0,03**	1,88 \pm 0,031**	0,28\pm0,03**
	80mg/kg	0,03 \pm 0,001	0,15 \pm 0,008	0,34 \pm 0,012**	0,43 \pm 0,014**	0,24 \pm 0,004**	0,53 \pm 0,022**	1,83 \pm 0,045**	0,36\pm0,05**
	160mg/kg	0,02 \pm 0,002	0,06 \pm 0,004	0,45 \pm 0,003**	0,28 \pm 0,013	0,25 \pm 0,003**	1,17 \pm 0,022**	2,66 \pm 0,024**	0,41\pm0,05**
Cl (mEq)	Furosemida	0,93 \pm 0,014	0,25 \pm 0,003**	0,14 \pm 0,002	0,32 \pm 0,009**	0,33 \pm 0,014**	0,33 \pm 0,009*	1,04 \pm 0,017	0,41\pm0,04**
	Salina	0,16 \pm 0,005	0,06 \pm 0,004	0,15 \pm 0,001	0,21 \pm 0,002	0,21 \pm 0,001	0,41 \pm 0,003	1,00 \pm 0,024	0,11\pm0,02
	40mg/kg	0,06 \pm 0,004	0,12 \pm 0,003	0,57 \pm 0,004**	0,27 \pm 0,006*	0,15 \pm 0,006*	0,68 \pm 0,024**	1,71 \pm 0,033**	0,28\pm0,05**
	80mg/kg	0,11 \pm 0,003	0,3 \pm 0,01**	0,57 \pm 0,008**	0,43 \pm 0,012**	0,23 \pm 0,003	0,76 \pm 0,015**	2,12 \pm 0,02**	0,32\pm0,04**
	160mg/kg	0,11 \pm 0,006	0,25 \pm 0,006**	0,53 \pm 0,002**	0,38 \pm 0,009**	0,25 \pm 0,002*	1,2 \pm 0,012**	3,54 \pm 0,019**	0,37\pm0,09**
Uréia (mg)	Furosemida	4,43 \pm 0,13**	2,47 \pm 0,06**	4,67 \pm 0,086**	5,53 \pm 0,067	5,32 \pm 0,201	10,1 \pm 0,205	29,6 \pm 0,59**	8,87\pm9,43
	Salina	2,36 \pm 0,062	1,52 \pm 0,046	1,31 \pm 0,03	5,2 \pm 0,012	5,45 \pm 0,043	12,2 \pm 0,073	31,8 \pm 0,486	8,55\pm10,9
	40mg/kg	1,37 \pm 0,075**	2,2 \pm 0,022**	6,1 \pm 0,075**	8,89 \pm 0,217**	4,97 \pm 0,174*	26,5 \pm 1,181**	57,7 \pm 0,959**	15,4\pm20,5*
	80mg/kg	2,20 \pm 0,086	2,93 \pm 0,085**	6,39 \pm 0,104**	14,4 \pm 0,237**	5,24 \pm 0,025	25,3 \pm 0,278**	52,3 \pm 0,461**	15,5\pm18,1*
	160mg/kg	2,01 \pm 0,152	1,59 \pm 0,068	7,91 \pm 0,131**	10,2 \pm 0,234**	5,72 \pm 0,074	32,5 \pm 0,3**	70,3 \pm 0,282**	18,6\pm25,1*
Creatinina(mg)	Furosemida	0,03 \pm 0,001	0,02 \pm 0,001	0,03 \pm 0,001	0,05 \pm 0,003	0,06 \pm 0,003	0,17 \pm 0,005**	0,37 \pm 0,009	0,33\pm0,05**
	Salina	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,001	0,01 \pm 0,001	0,07 \pm 0,001	0,04 \pm 0,001	0,08 \pm 0,001	0,22 \pm 0,002	0,04\pm0,03
	40mg/kg	0,01 \pm 0,002	0,01 \pm 0,001	0,06 \pm 0,001**	0,12 \pm 0,003**	0,07 \pm 0,002	0,24 \pm 0,014**	0,44 \pm 0,004	0,14\pm0,02**
	80mg/kg	0,01 \pm 0,001	0,03 \pm 0,001	0,07 \pm 0,003**	0,18 \pm 0,007**	0,08 \pm 0,001	0,22 \pm 0,004**	0,42 \pm 0,005*	0,20\pm0,01**
	160mg/kg	0,01 \pm 0,001	0,03 \pm 0,002	0,11 \pm 0,001**	0,13 \pm 0,004**	0,07 \pm 0,003	0,32 \pm 0,015**	0,60 \pm 0,003*	0,25\pm0,03**

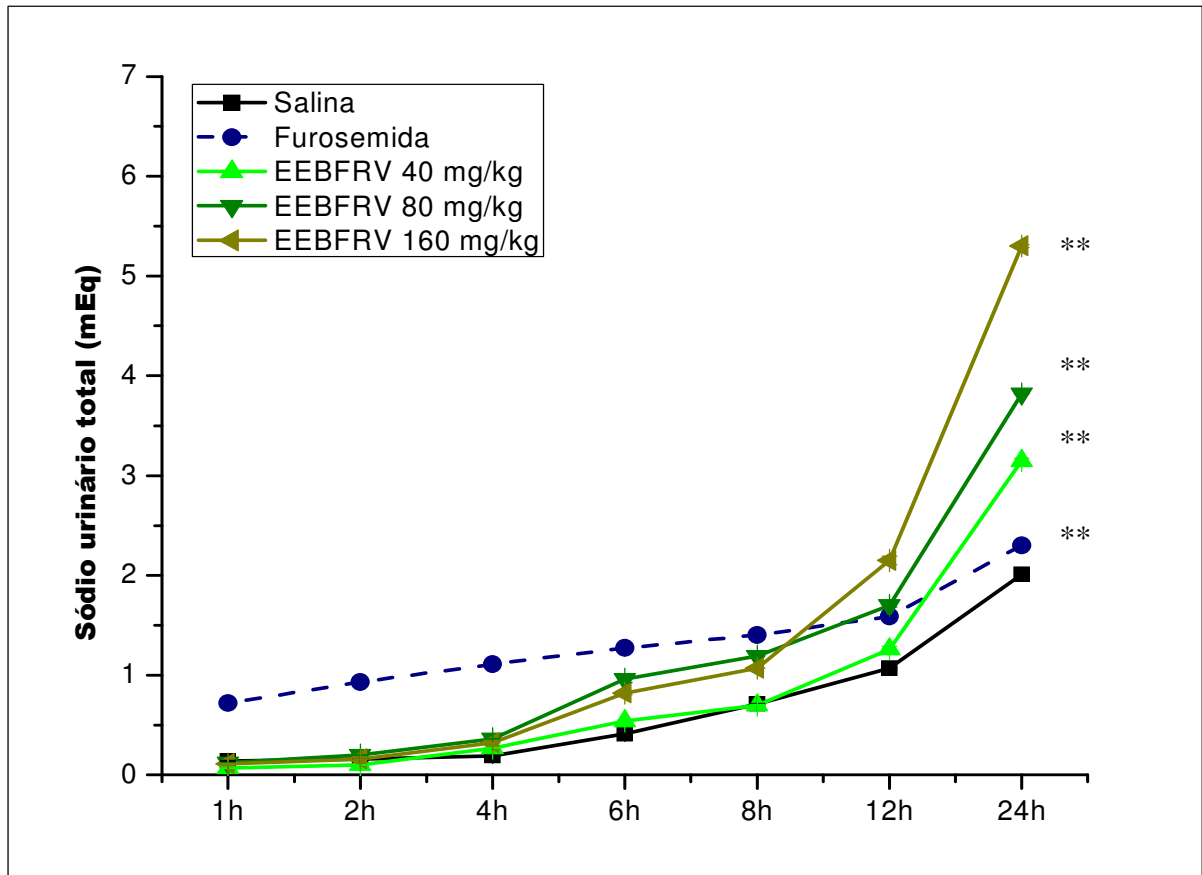


FIGURA 7. Quantidade de sódio urinário (mEq) excretado de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

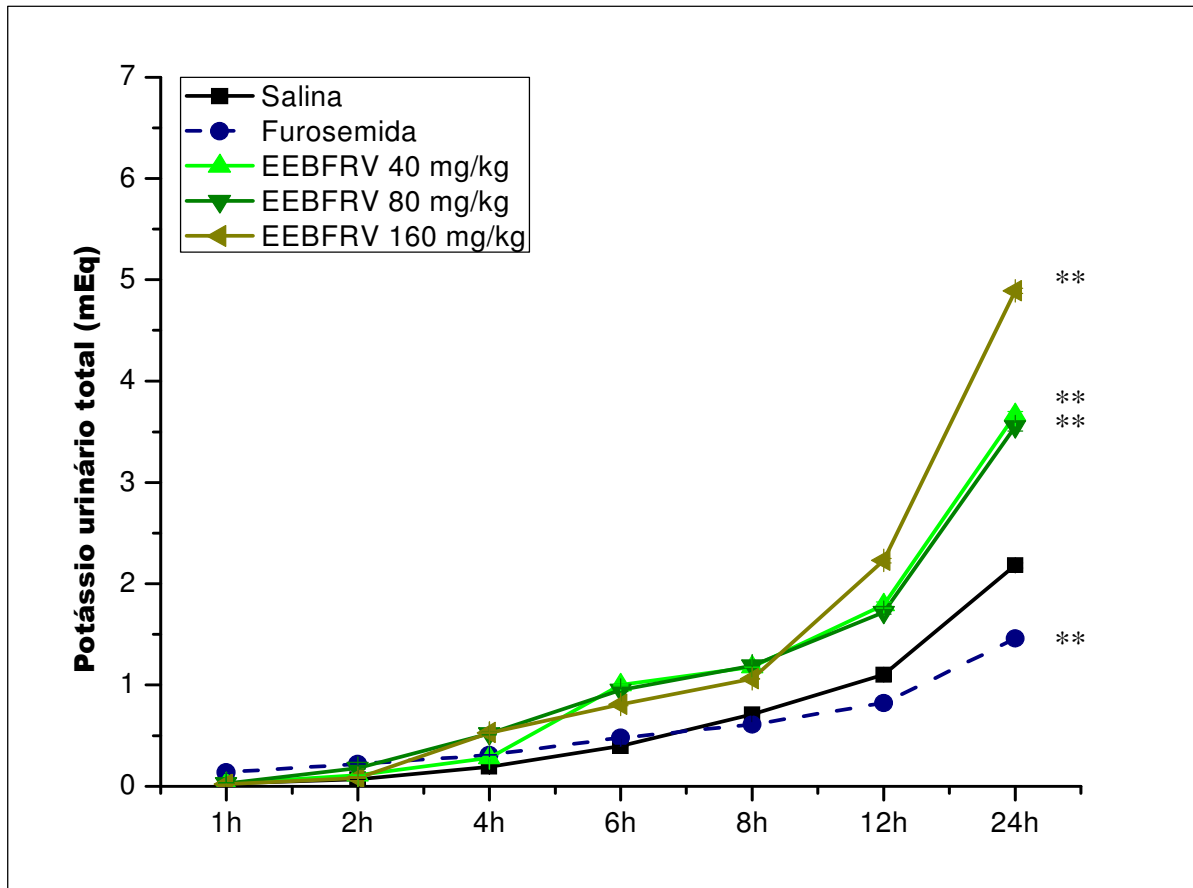


FIGURA 8. Quantidade de potássio urinário (mEq) excretado de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

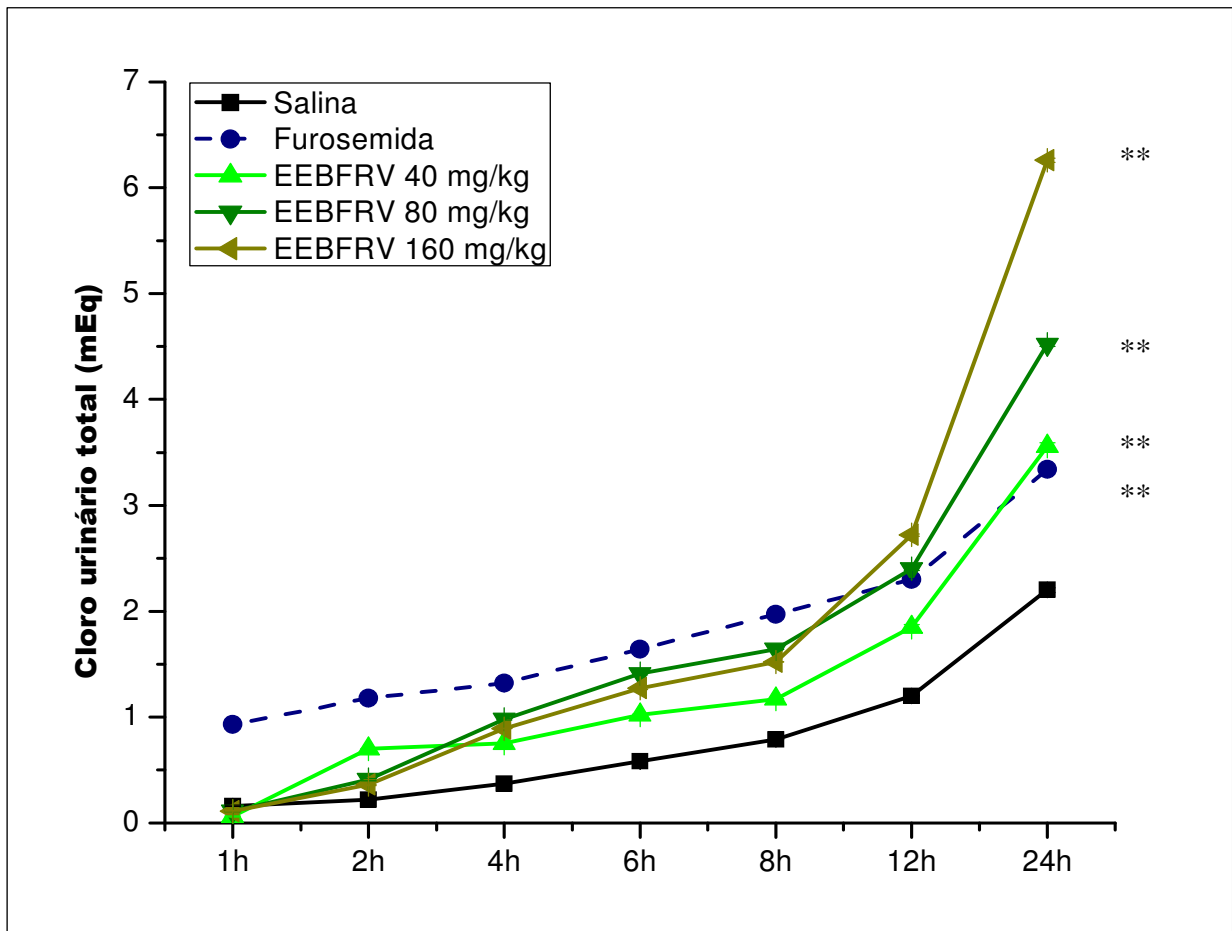


FIGURA 9. Quantidade de cloro urinário (mEq) excretado de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

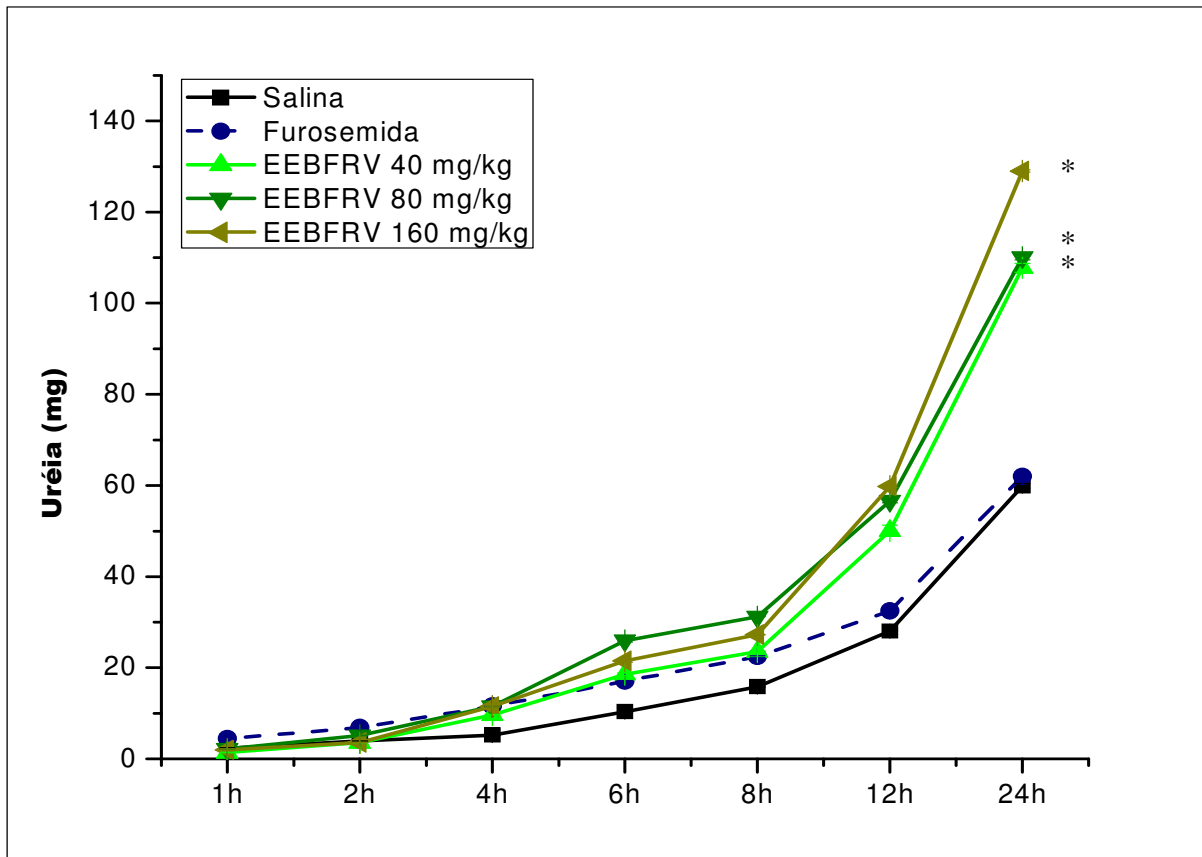


FIGURA 10. Quantidade de uréia urinária (mg) excretada de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). *Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

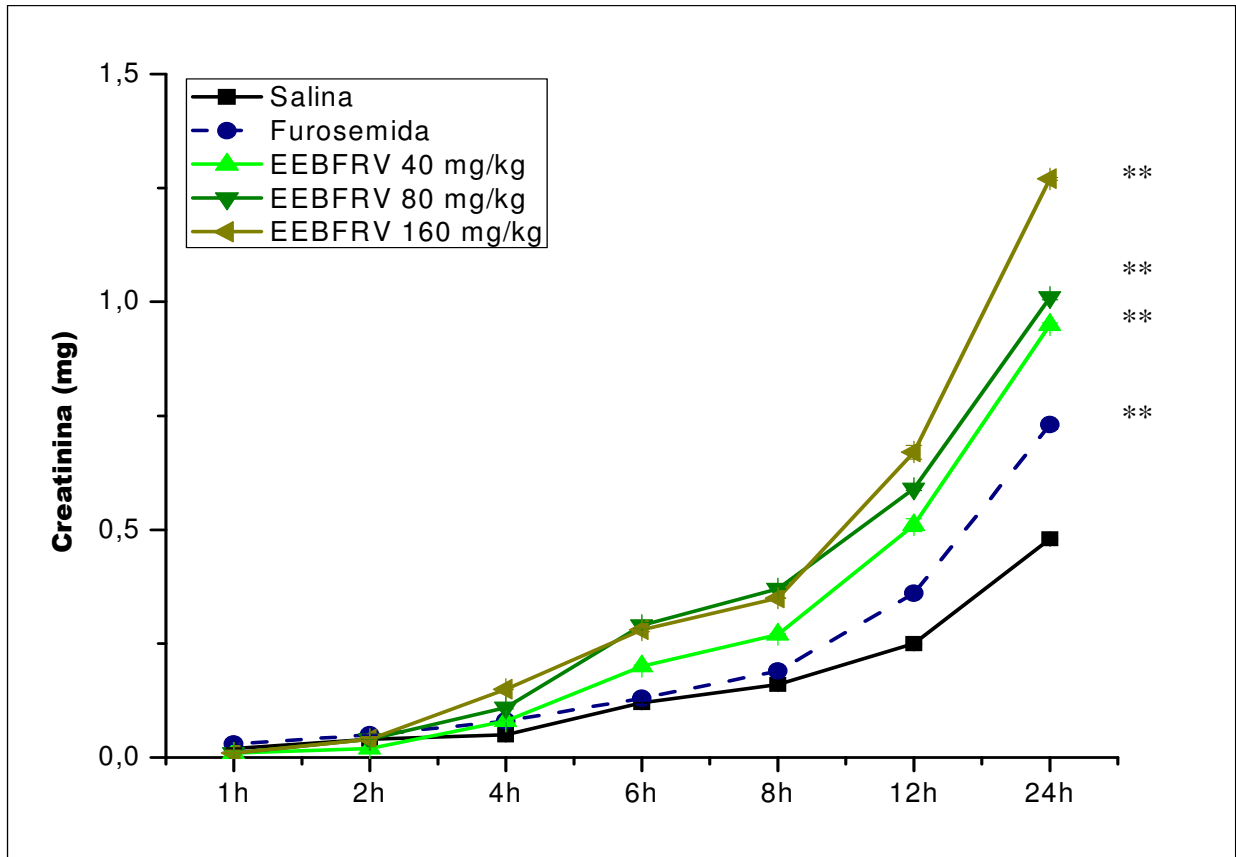


FIGURA 11. Quantidade de creatinina urinária (mg) excretada de forma cumulativa após administração oral aos grupos em estudo. Valores expressos em média \pm DP (n=5). **Estatisticamente significativo em relação à salina ($p < 0,001$), (ANOVA, Teste de Dunnett). EEBFRV = extrato etanólico bruto das folhas de *R. viburnoides*.

5.3.2 Uranálise

Na avaliação dos animais do experimento com respeito à uroanálise, verifica-se que o pH urinário permaneceu ligeiramente ácido à neutro, variando entre 6,0 – 7,0. Quanto à densidade, esta esteve entre 1,005 à 1,015, com relação aos demais parâmetros da uroanálise, não foram observadas sinais de alterações patológicas, haja visto que em uma revisão literária vários trabalhos foram consultados para a verificação de alguns parâmetros fisiológicos de referência (DANTAS, 2006). Analisando estes trabalhos foi verificado que estes parâmetros encontrados em nossos resultados estão de acordo com as diferentes bibliografias pesquisadas. Em síntese, a uranálise sugere que não houve alterações indicativas de lesões ou alterações nos rins, fígado e baço segundo análises macroscópicas realizadas. Todos os parâmetros físicos, químicos ou sedimentoscópicos como já mencionado anteriormente, variaram discretamente, dentro dos padrões de normalidade, para cada um dos animais dos grupos estudados (Tabela 6).

As plantas com atividade diuréticas apresentam a propriedade farmacológica de eliminar líquidos que estão em excesso no organismo, ajudando na desintoxicação dos rins e no tratamento de infecções urinárias. Além disso, são indicadas para combater o envelhecimento, a congestão linfática, previne doenças de pele, entre outras (BENJUMEA et al., 2005). Relatos sobre atividade diurética de plantas medicinais estão descritos na literatura, destacando-se *Phyllanthus niruri* (MORAIS et al., 2005; TESKE e TRENTINI, 2001), *Palicourea coriacea* (FREITAS, 2008), *Equisetum arvense* (ALONSO, 2008) e *Echinodorus macrophyllum* (TRESVENZOL et al., 2006).

Tabela 6. Resultados da uroanálise obtidos nos teste de atividade diurética, em urina de 24h (n=5 animais/grupo) após tratamento oral com EEBFRV nas doses de 40 mg/kg, 80 mg/kg e 160 mg/kg.

GRUPO	Animal	pH	Densidade	Leucócitos	Nitrito	Proteína	Glicose	Cetona	Urobilinogênio	Bilirrubina	Hemácias	Hemoglobina
Furosemida	1.	6,5	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.	7,0	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.	6,5	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4.	6,5	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.	6,5	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salina	6.	6,5	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7.	7,0	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8.	7,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9.	6,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10.	6,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EEBFRV 40 mg/kg	11.	6,5	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.	7,0	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13.	7,0	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14.	6,0	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15.	6,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EEBFRV 80 mg/kg	16.	6,5	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17.	7,0	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18.	6,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19.	6,0	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20.	6,0	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EEBFRV 160 mg/kg	21.	7,5	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22.	7,0	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23.	6,5	1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24.	6,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25.	6,5	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Hemácias: (*) 5 – 10 mil células / μL ; (**) 25 mil células / μL ; (***) 250 mil células / μL ;

5.4 TESTE DE DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.4.1 Fenóis totais

A Tabela 7 abaixo, expressa os resultados do doseamento dos fenóis totais, e a Figura 12 a curva padrão do ácido tânico empregado no doseamento pelo método Hargerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987).

Tabela 7. Doseamento de fenóis totais expressos em porcentagem (p/p).

Amostras	% de fenóis totais \pm DP*
Extrato Etanólico Bruto da Folha	0,8416 \pm 0,07
Fração Hexânica da Folha	0,444 \pm 0,04
Fração Diclorometano da Folha	1,91 \pm 0,38
Fração Acetato de Etila da Folha	15,43 \pm 0,239
Fração Metanol/Água da Folha	7,92 \pm 0,04

*DP Desvio Padrão da média correspondente às três repetições

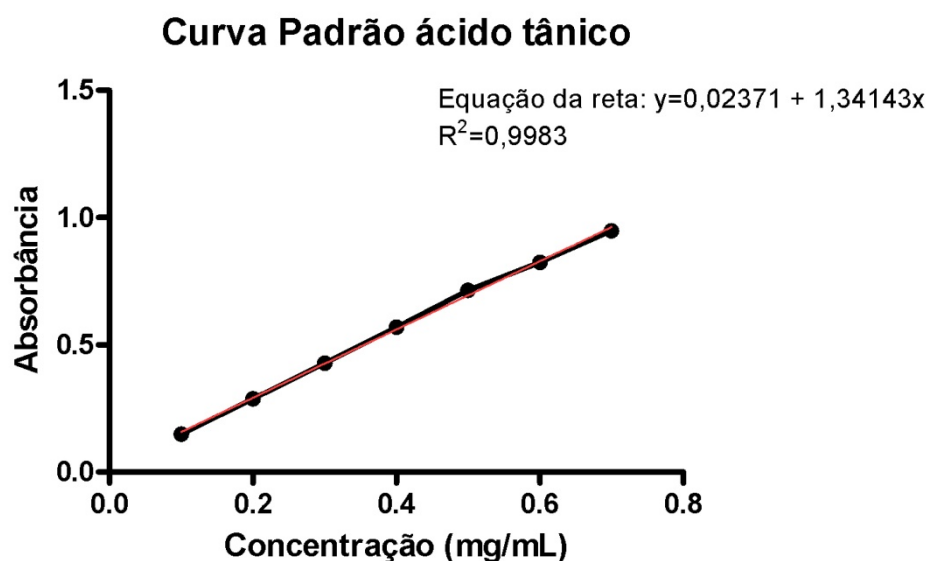


Figura 12. Curva padrão para o doseamento de fenóis totais no extrato e frações de *R. viburnoides*. Concentração de ácido tânico versus absorbância. Equação da reta: Absorbância = A + B . c. Erro de ajuste (R^2) = 0,9983.

Constatou-se que a fração acetato de etila é a que acumulou a maior concentração de fenóis, onde estes, por possuírem capacidade de doar átomos de hidrogênio, inibem as reações em cadeia dos radicais livres (BALASUNDRAM et al., 2006).

5.4.2 Atividade antioxidante percentual AA%

A média das absorbâncias obtidas referentes a cada concentração foi utilizada para calcular a AA% conforme já descrito em material e métodos. Os valores de porcentagem de atividade antioxidante das amostras e do padrão (25 a 0,0122 mg/mL) frente ao radical livre DPPH[•] estão representada na Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de atividade antioxidante frente ao radical DPPH

Concentração mg/mL	Atividade antioxidante %					
	EEBF	FH _f	FDM _f	FAE _f	FMet/H ₂ O _f	Padrão α -tocoferol
25 mg/mL	95,44	95,24	95,00	95,60	93,77	92,94
12,5 mg/mL	95,12	80,41	94,23	95,15	92,95	92,85
6,25 mg/mL	94,70	42,27	94,18	94,05	90,81	92,64
3,125 mg/mL	91,91	21,70	91,63	91,90	89,13	92,55
1,56 mg/mL	61,89	8,892	65,30	88,81	87,70	92,43
0,78 mg/mL	33,09	7,993	37,19	86,71	61,17	92,38
0,39 mg/mL	16,27	5,425	19,69	72,77	33,77	92,21
0,1953 mg/mL	17,78	4,109	11,78	41,85	21,07	83,75
0,0976 mg/mL	7,993	1,508	4,846	24,52	13,92	75,68
0,0488 mg/mL	5,008	0,802	2,551	14,28	7,653	51,82
0,0244 mg/mL	7,800	0,481	0,714	10,28	4,591	39,11
0,0122 mg/mL	0,032	0,192	0,204	9,490	2,857	32,78

EEBF: Extrato etanólico da folha; FH_f: Fração hexânica da folha; FDM_f: Fração diclorometano da folha; FAE_f: Fração acetato de etila da folha; FMet/H₂O_f: Fração metanol-água da folha.

Verificamos que o padrão, α -Tocoferol (vitamina E) apresentou atividade antioxidante na faixa de concentrações entre 0,39 mg/mL à 25 mg/mL. O extrato etanólico bruto e suas diversas frações apresentaram atividade antioxidante (AA%) dose-dependente. Os resultados (Tabela 8), mostram que a fração acetato de etila das folhas (FAE_f) conforme também verificado no teste de doseamento de fenóis totais, por ser a fração mais rica nestes constituintes químicos, teve maior poder antioxidante de radicais livres.

Neste teste, verificamos ainda que o EEBFRV, que apresenta uma rica composição em pigmentos vegetais como a clorofila e os carotenóides, apresentou uma atividade antioxidante que pode ser explicada tanto pela composição fenólica quanto pela ação destes pigmentos que apresentam uma alta capacidade redutora.

Quanto à fração FDM_f, sabe-se que a mesma no processo de fracionamento do extrato bruto, efetua também a separação de compostos polares, justificando a atividade antioxidante observada, o que é comprovado pelo acúmulo

de compostos terpênicos já descritos em literatura para esta fração exibindo significativa atividade antioxidante.

Os resultados da tabela 8 nos permitiram calcular o valor de CE50 (concentração necessária para inibir 50% da atividade do DPPH[•]). Os valores obtidos a partir desta mensuração podem ser observados na Tabela 9, onde é possível analisar o perfil traçado pelos valores de CE50, ou seja, quanto menor for o resultado maior será sua atividade antioxidante.

A evolução das reações cinéticas com o DPPH depende da natureza do antioxidante testado (em especial sua conformação estrutural) sendo verificado três tipos de comportamento das reações cinéticas destes: os que agem rapidamente, atingindo o estado de equilíbrio em menos de 1 minuto como exemplo temos o ácido ascórbico, isoascórbico e isoeugenol; o segundo tipo de comportamento é o intermediário que atinge o equilíbrio na faixa de 5 minutos (ácido rosmarínico) a 30 minutos (δ -tocoferol) e o terceiro grupo é formado por compostos que reagem mais lentamente (Ex: guaiacol, BHT, protocatequina) com o equilíbrio sendo atingido entre 1 à 6 horas de reação. A eficiência anti-radical, no desenvolvimento das reações de compostos do terceiro grupo, está ligada a processos como a dimerização, complexação e deslocamento intramolecular de elétrons e de radicais hidrogênicos (ASCOLI, et.al., 2007; WILLIAMS et al., 1995).

Outro fator importante na caracterização da eficiência dos agentes antioxidantes constitui o meio utilizado no desenvolvimento das reações. Com raras exceções, agentes antioxidantes lipofílicos são mais ativos em meios polares, enquanto antioxidantes polares são mais ativos em meios lipofílicos (WILLIAMS et al., 1995).

No presente teste, ainda faz-se necessário considerarmos que a ação antioxidante da maioria dos extratos vegetais, no teste de DPPH, pode ser devido ao conjunto de efeitos dos diferentes compostos químicos ativos existentes no mesmo (DELIRA et al.,2003).

Tabela 9. Concentração efetiva 50% calculada por meio de regressão linear, logarítmica.

Amostras Estudadas	CE50*
Extrato Etanólico Bruto das Folhas	1,16
Fração Hexânica das Folhas	6,34
Fração Diclorometano das Folhas	0,93
Fração Acetato de Etila das Folhas	-4,05
Fração Metanol/Água das Folhas	0,20
Padrão – α -tocoferol	-3,62

CE50* = Concentração efetiva 50% calculada por meio de regressão linear, logarítmica do gráfico obtido com os valores encontrados de %AA para cada concentração.

6 CONCLUSÕES

Através das análises dos resultados verificou-se que:

- ✓ não se observou toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das folhas, sendo o mesmo classificado como praticamente atóxico;
- ✓ os animais que receberam o extrato etanólico bruto das folhas da *Rudgea viburnoides* nas concentrações de 40 mg/kg e 80 mg/kg apresentaram uma ingestão hídrica semelhante à furosemida e os que receberam 160 mg/kg do referido extrato apresentou uma ingestão hídrica superior;
- ✓ o efeito diurético (aumento de volume urinário e aumento da excreção de eletrólitos, creatinina e uréia) do extrato etanólico bruto das folhas da *Rudgea viburnoides* foi significamente dose-dependente, sendo a atividade diurética proporcionalmente mais elevada que a da furosemida;
- ✓ a fração acetato de etila apresentou melhor ação antioxidante e essa ação pode estar relacionada com a quantidade de fenóis totais (15, 43%);

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: out de 2007.

AGUNU, A. et al. Diuretic activity of the stem-bark extracts of *Steganotaenia araliacea* hochst [Apiaceae]. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 96, 2005.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

ALONSO, J.R. **Fitomedicina**: curso para profissionais da área da saúde Pharmabooks. São Paulo, 2008.

ALVES, R. M. S. et al. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, 2004.

ASCOLI, B. et al. **Estudo do potencial antioxidante de *Hypericum polyanthemum* através do método do DPPH**. Disponível em: <<http://www.Cori.unicamp.Br/jornadas/completos/UFRGS/Bruna%20Maria%20Ascol.doc>>. Acesso em: out 2007.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plantas and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potencial uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, n.1, 2006.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 17. ed. São Paulo: Edel, 1980.

BARROS, M. A. Flora medicinal do Distrito Federal. **Brasil Florestal**, v. 50, 1982.

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.

BHOOLA, K. D.; ODHAV, B.; REDDY, L. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, 2003.

BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, 1999.

BLAZZI, E. S. **Saúde Pelas Plantas**. 7. ed. São Paulo: Casa Publicadora Brasileira, 1995.

BRANDÃO, M. G. L. **Plantas medicinais e fitoterapia**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v.28, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº116 de 08 de Agosto de 1996**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/elegis>>. Acesso em: abr 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48 de 16 de Março de 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/elegis>>. Acesso em: abr 2008.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.

BRITO, A. R. S. Toxicologia Pré-Clinica de Plantas Medicinais In.: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. São Paulo: Unicamp, 1994.

BRUNHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology: objectives, principles and perspectives. In: BEAL, J. L.; REINHARD, E. **Natural Products as Medicinal Agents**. Journal Medics P.I.; Journal Natural Products, 1980.

CECHINEL, F.; YUNES, R. A. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Química Nova**, v. 21, n. 3, 1998.

CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada á biologia**, 1. reimp. Goiânia: CEGRAF-UFG, 1990.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Os princípios éticos da experimentação animal**. São Paulo, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

CUNHA, L. C. **Estudo farmacognóstico e da atividade antitumoral, antiinflamatória e toxicidade pré-clínica do *Synadenium umbellatum***. 2003. 65f. (Projeto de Pesquisa – CNPq) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

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.

DELIRA, R. A. et al. Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. minor Benth. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 47, abr/jun 2003.

DELPRETE, P. G. Rubiaceae. In: SMITH N. et al. Flowering Plants of the Neotropics. **The New York Botanical Garden**. Bronx, 2004.

DI STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema caroteno, Ácido Linoléico e método de seqüestro de radicais livres. **Ciência e Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 26, abr/jun 2006.

EDDOUKS, M. et al. Effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 17, 1999.

EL BARDAI, S. et al. **Pharmacological evidence ethnopharmacology**, v. 76, 2001.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DISTASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anesthesia**. New York: Academic Press, 1996.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. I. I.; RIVERA, E.A.B. Bem Estar em Animais de Laboratório. In: CHRISTOFOLETTI R.; BECK A. A. H. (Org.). **Ética, Ciência e Desenvolvimento**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

FREITAS, P. C. M. **Avaliação das atividades diurética e antioxidante e da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das folhas da *palicourea coriacea* (cham.) K schum, “douradinha do campo”**. 2008. 96 f. (Dissertação de mestrado) – Instituto de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J.; SOUZA S.H. Plantas tóxicas de interesse agropecuário: *Palicourea marcgravii*. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 39, 1987.

GOUVÊA, C.M.C.P. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: CARVALHO, J. C. T. (Coord.). **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, 1990.

HANG, H. P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. São Paulo: Artmed 1998.

HAYES, W. A.; DiPASQUALE, L.C. Acute toxicity and eye irritation. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graph cars, 1939.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM), **Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity**. NIH Publication N. 01-4500. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2001.

JOUAD, H. et al. Effects of *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously, 2001.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**. v .187, 2006.

KAU, S. T., HOWE, B. B., JOHNSTON, P. A. **Renal and Antihypertensive Effects of a Novel Eukalemic Diuretic**, ICI 207, 828, 1991.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 6. ed. Portugal: Mc Graw-Hill, 2001.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Casarett & Doull's: Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos**. Compêndio. 5. ed., Portugal: Mc Graw-Hill, 2001.

KOHN, D. F. et al. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. New York: Academic Press, 1997.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Revista ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, out/dez 2005.

LAHLOU, S. et al. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006.

LAPA, A. J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Experimental, 2001.

LIMA, R. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bandana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, out/dez 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1998.

MALONE, M. H. – Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: H. Wagner, Wolf Springer–Verlag, 1977.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. **Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante**. Curitiba: B. CEPPA, v. 22, n. 2, 2004.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, 2001.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, Berlim, v. 72, 1987.

MORAIS, I. C. et al. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 2, 2005. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufg.br/revista/geral/home.htm>>. Acesso em: 03 mar 2008.

MORAES, R.L.F. **Comprovação Química e Biológica da Presença de Monofluoracetato nas Folhas de *Palicourea marcgravii***. 1993. 83 f, Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

NAVES, L. A. et al. **Distúrbios na secreção e ação do hormônio antidiurético: revisão**. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo, v. 47, n. 4, ago 2003.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 4, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **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.

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

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

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

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Product**, v. 63, n. 7, 2000.

POTT, A., E. AFONSO. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD44.html>>. Acesso em: out 2008.

REEVES, W.B.; BICHET, D.G.; ANDREOLLI, T.E. The posterior pituitary and water metabolism. In: WILSON, J.D. et al. **Williams textbook of endocrinology**. 9. ed. Philadelphia. 1998.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonóides and phenolic acids. **Free radical biology medical**, New York, v. 2, n. 7, p. 933-956, 1996.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 76, p. 270-276, 2002.

SANTOS, A. P. **Estudo farmacognóstico, avaliação da atividade antioxidante e da toxicidade aguda dos extratos etanólicos brutos das cascas do caule e folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)**. 2008, 146 f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2008.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Rio Grande do Sul: UFRGS; Santa Catarina: UFSC, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO/COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (SBCAL/COBEA). **Princípios Éticos de Experimentação Animal**, 1991. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>>. Acesso em: abr 2009.

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. 2003. p. 371- 400.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. p. 97.

SILVA, B. A.; et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food chemistry**, v. 90, n. 1-2, 2005.

SIQUEIRA, J. C. **Plantas medicinais: identificação e uso das espécies dos cerrados**. São Paulo. 1988.

SIQUEIRA, J.C. **Utilização popular das plantas do cerrado**. São Paulo: Loyola, 1981.

SOARES, A. S. et al. Equilíbrio Hídrico-Eletrolítico. Santa Catarina: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. Disponível em: <<http://www.odontologia.com.br/artigos/angle.html>>. Acesso em: 24 set 2008.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira**. Nova Odessa: Plantarum, 2005.

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

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: 01 mar 2008.

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

TOLEDO, R. C. P. et al **Caracterização morfológica e isopletia de *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae) no Cerrado do Brasil Central**. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, VIII. Anais... Caxambu, 2007.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 3, p. 384-387, 2007.

WANG, D. et al. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). **Food Chemistry**, v.107, 2008.

WILLIAMS, W. B.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Lebensm-Wiss: Utechnol. v. 28, p. 25-30, 1995.

WRIGHT, C. I. et al. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, 2007.

YOUNG, M. C. M. et al. Triterpenes and Saponins from *Rudgea viburnoides*. **Journal Natural Product**, v. 61, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (ORG) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. e ampl. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFSC, 2004. p. 577-614.

RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO A



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PROTOCOLO
128/2007

Goiânia, 08 de abril de 2008

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: Avaliação diurética e estudo da toxicidade aguda método de classe do estrato etanólico de *rudgea virbunoides* (Cham) benth

Pesquisador Responsável: Liuba Laxor Pucci

Pesquisador Participante: Paulo C. M. de Freitas- FF/UFG
Luiz Carlos Cunha - FF/UFG
Marize C. Valadares - FF/UFG
Marcelo de S. Vieira - FF/UFG

Local de realização: NEPET

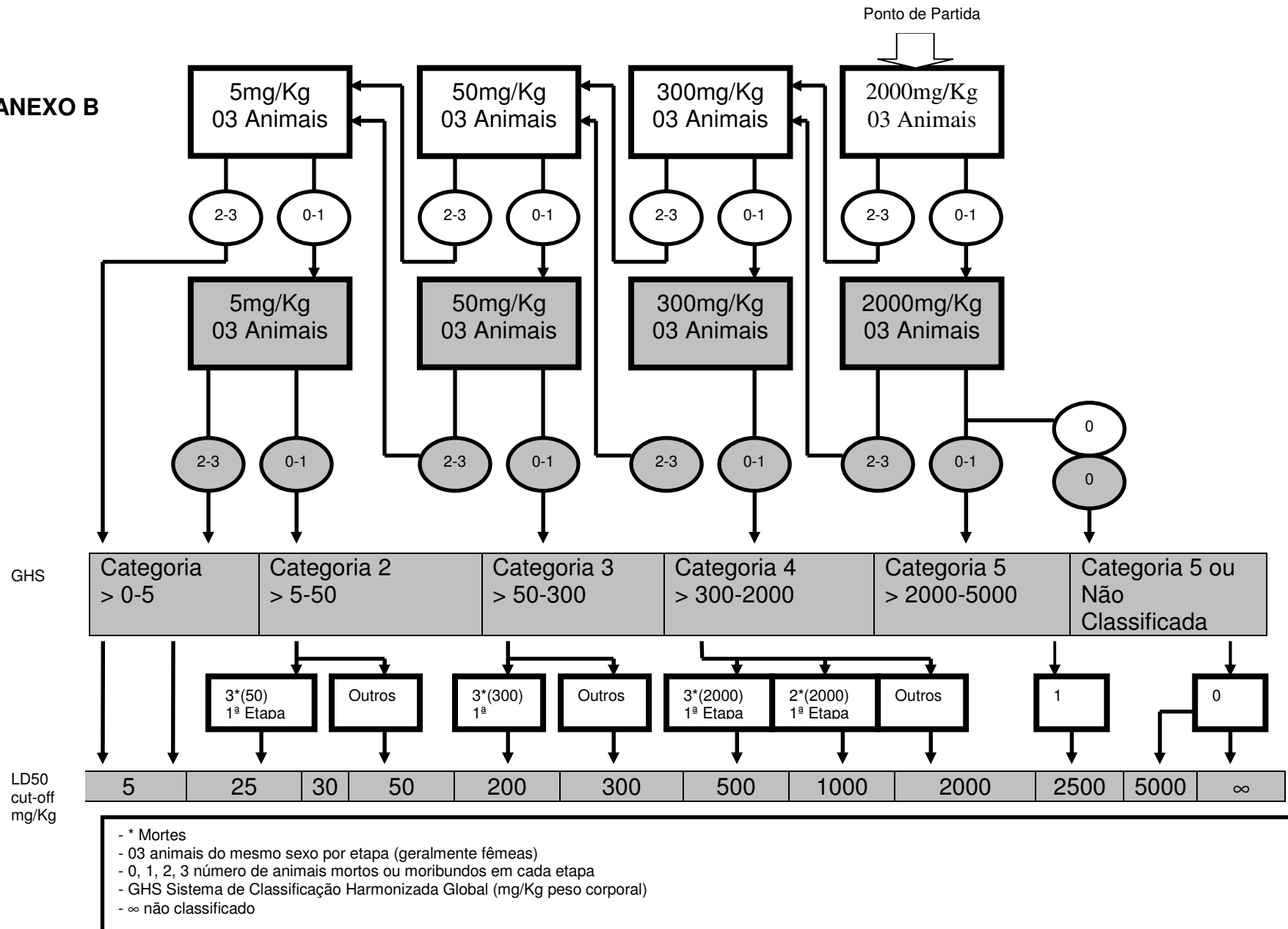
Área Temática:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, após análise, das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto de acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).


Profa Dra Rita Gorêti Amaral
Coordenadora do CEP/UFG

ANEXO B



Fluxograma -Teste toxicológico partindo de uma dose de 2000 mg/kg peso corporal.