

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Gilvana Cristina de Barros

**Estudo fitoquímico e avaliações
da toxicidade aguda e atividades
biológicas da raiz do vetiver
(*Vetiveria zizanioides* L. Nash)
Poaceae**

Goiânia
2008

Gilvana Cristina de Barros

**Estudos fitoquímicos e avaliações da toxicidade
aguda e atividades biológicas da raiz do vetiver
(*Vetiveria zizanioides* L. Nash) Poaceae**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade
de Farmácia da Universidade Federal
de Goiás, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Teresa
Freitas Bara**

Goiânia

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Barros, Gilvana Cristina de.
B277e Estudo fitoquímico e avaliações da toxicidade aguda e atividades biológicas da raiz do vetiver (*Vetiveria zizanoides* L. Nash) Poaceae [manuscrito] / Gilvana Cristina de Barros. – 2008.
97 f. : il., figs., qds., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2008.

BIBLIOGRAFIA: F.83-92.
Inclui lista de figuras, quadros, tabelas, abreviaturas e símbolos.
Apêndices e anexo.

1. PLANTAS MEDICINAIS 2. FLAVONÓIDES 3. DIURÉTICOS 4. ANTIBACTERIANO NATURAL 5. ÓLEOS ESSENCIAIS I. BARA, MARIA TERESA FREITAS. II. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. **FACULDADE DE FARMÁCIA** III. TÍTULO.

CDU: 615.32

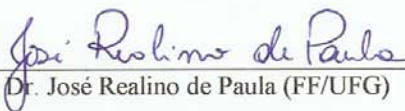
Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 23 de março de 2009, pela mestranda Gilvana Cristina de Barros.

Banca Examinadora:



Profª. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG)
Presidente



Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)



Profª. Dra. Paula Melo Martins (UEG)



Profª. Dra. Leonice Manrique Faustino Tresvensol (FF/UFG)

À Deus por cada passo dessa caminhada; à minha família, em especial à minha mãe Iraci, minha irmã Guiomar e aos meus irmãos Gilsomar e Gilmar pelo apoio e incentivos.

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Maria Jersa Freitas Bara pela orientação, paciência e dedicação.
- Ao Professor Dr. Luis Carlos da Cunha, do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, pela orientação nas pesquisas toxicológicas e diurese.
- Ao Professor Dr. José Realino de Paula, do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, pelo auxílio na interpretação dos espectros.
- À Professora Dr. Leonice Manrique Faustino Jresvenzol, do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, pelo auxílio durante as práticas laboratoriais.
- Ao Professor Dr. Pedro Henrique Ferri, do Departamento de Química, pela contribuição na análise do óleo essencial por Cq-FM.
- À Professora Msc. Marta Regina Magalhães, do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Universidade Católica de Goiás, pela disponibilização do liofilizador para preparação da amostra.
- Aos professores do curso de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia pela formação.
- Aos colegas do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pela colaboração técnica, em particular ao Alexandre, Marcelo, Tiago, Daniel e Flúbia.
- Às acadêmicas Denice, Cyndi, Ana Carolina, Beatriz, Emmeline e Rosineide
- A todos os professores, funcionários e amigos pela convivência durante este período.

RESUMO

O uso de plantas medicinais no controle de doenças tem revelado o seu potencial para a descoberta de novos medicamentos. Dentre as espécies vegetais utilizadas no Hospital de Medicina Alternativa (HMA/SES-GO) destaca-se o vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash), uma planta aromática da família Poaceae, utilizada como anti-hipertensivo leve e diurético. Neste trabalho investigou-se a composição química do extrato hidroalcoólico de vetiver, do extrato aquoso liofilizado e do óleo essencial das raízes de *V. zizanioides*. No extrato hidroalcoólico foram encontrados compostos terpenóides e/ou saponinas, flavonóides e ácido fenólico. No extrato aquoso liofilizado verificou-se presença de flavonóides e fenóis. No óleo essencial foram identificados 38 compostos, sendo khusimol, palustrol, khusimona, epi-zizanona e α -vetivona os constituintes majoritários. Na avaliação da toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólico e no extrato aquoso liofilizado da raiz de *V. zizanioides*, concluiu-se que esses extratos não apresentaram toxicidade na dose de 2000 mg/kg. O extrato aquoso liofilizado das raízes de *V. zizanioides* não demonstrou ação diurética estatisticamente significativa nas doses testadas. Na investigação da atividade antimicrobiana, o óleo essencial da raiz de *V. zizanioides* apresentou potente atividade inibidora do crescimento de *Staphylococcus aureus* com CIM de 0,15 mg/mL. Para o extrato etanólico bruto verificou-se uma ação antimicrobiana com CIM de 0,19 mg/mL para *Micrococcus roseus* e *Bacillus cereus* e 0,39 mg/mL para *Micrococcus luteus*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. A fração hexano apresentou ação antimicrobiana mais intensa contra as cepas de *M. luteus*, *M. roseus*, *S. aureus* e *B. cereus*. Com este estudo foi possível comprovar que o óleo essencial, o extrato etanólico bruto e a fração hexano provenientes da raiz de *V. zizanioides* apresentaram potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: plantas medicinais, flavonóides, diuréticos, antibacteriano natural e óleos essenciais.

ABSTRACT

The use of medicinal plants in controlling the diseases has shown its potential for the discovery of new medicines. Among the plant species used in the Hospital de Medicina Alternativa (HMA / SES-GO) highlights the vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash), an aromatic plant of the family Poaceae, used as a mild anti-hypertensive and diuretic. In this work it was investigated the chemical composition of the hydroalcoholic extract of vetiver, the freeze-dried aqueous extract and the essential oil from the roots of *V. zizanioides*. In the hydroalcoholic extract were found terpenoids compounds and / or saponins, flavonoids and phenolic acid. In the freeze-dried aqueous extract was observed the presence of flavonoids and phenols. In the essential oil 38 compounds were identified, and khusimol, palustrol, khusimona, zizanona and epi- α -vetivona were the major constituents. In the assessment of the acute toxicity of the hydroalcoholic extract and the freeze-dried aqueous extract of root of *V. zizanioides*, it was concluded that these extracts showed no toxicity at a dose of 2000 mg / kg. The freeze-dried aqueous extract of the roots of *V. zizainoides* showed no statistically significant diuretic action in the doses tested. In the investigation of antimicrobial activity, the essential oil of the root of *V. zizanioides* showed potent activity to inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* with MIC of 0.15 mg / mL. The crude ethanolic extract showed an antimicrobial activity with MIC of 0.19 mg / mL for *Bacillus cereus* and *Micrococcus roseus* and 0.39 mg / mL for *Micrococcus luteus*, *S. aureus* and *Bacillus subtilis*. The hexane fraction showed stronger antimicrobial activity against strains of *M. luteus*, *M. roseus*, *S. aureus* and *B. cereus*. This study could prove that the essential oil, the crude ethanol extract and hexane fraction from roots of *V. zizanioides* showed antimicrobial potential.

Keywords: medicinal plants, flavonoids, diuretics, natural antibacterial and essential oils.

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. (A) Aspecto geral da espécie <i>V. zizanioides</i> cultivada no Hospital de Medicina Alternativa. (B) Detalhe de suas raízes fasciculadas	19
Figura 2. Gaiola semi-metabólica utilizada para acondicionamento de animais no experimento de diurese com o extrato aquoso liofilizado de <i>V. zizanioides</i>	41
Figura 3. Tubos apresentando resultado dos testes de Kedde nas frações puras obtidas da cromatografia em coluna com a mostra direcionada para heterosídeos digitálicos, obtidas da raiz de <i>V. zizanioides</i>	49
Figura 4. CCDA das frações eluidas com diclorometano e reveladas com Kedde	50
Figura 5. Curva padrão de rotina para doseamento de flavonóides do extrato liofilizado de <i>V. zizanioides</i>	52
Figura 6. Média dos volumes urinários excretado em 24 horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de <i>V. zizanioides</i> nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (n=5, *p<0,05, análise de Dunnett comparado com controle negativo)	57
Figura 7. Média dos volumes urinários excretado, em cada intervalo de tempo, nos grupos controle negativos, positivos e grupos onde foram administrados os extratos de <i>V. zizanioides</i> nas doses de 20mg/kg, 40mg/kg e 80mg/kg	57

- Figura 8. A concentração plasmática de sódio (A), potássio (B) e cloretos (C) nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *V. zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (Resultados em média $\pm$ DP, n=5, análise de Dunnett comparado com controle negativo) 58
- Figura 9. A concentração de sódio (A), potássio (B) e cloretos (C) na urina em mg/24horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *V. zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (Resultados em média $\pm$ DP, n=5, ***P<0,01, análise de Dunnett comparado com controle negativo) 59
- Figura 10. A concentração plasmática de uréia (A) e creatinina (B) em nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *V. zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (Resultados em média $\pm$ DP, n=5, análise de Dunnett comparado com controle negativo) 60
- Figura 11. A concentração de uréia (A) e creatinina (B) na urina em mg/24horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *V. zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (Resultados em média $\pm$ DP, n=5, ***P<0,01, análise de Dunnett comparado com controle negativo) 61

LISTA DE QUADROS

	pág
Quadro 1. Sistema de eluentes para cromatografia em coluna realizada com o extrato da raiz de <i>Vetiveria zizanioides</i>	32
Quadro 2. Microrganismos usados na avaliação da concentração inibitória mínima do extrato etanólico bruto, das frações e óleo essencial de <i>Vetiveria zizanioides</i>	44
Quadro 3. Resultados dos testes de Kedde realizados nas diferentes frações coletadas na cromatografia em coluna eluída com o extrato direcionado para digitálicos extraído da raiz de <i>Vetiveria zizanioides</i>	48
Quadro 4. Esquematização do perfil cromatográfico do extrato da raiz de <i>Vetiveria zizanioides</i> direcionado para digitálicos e revelação em diferentes reveladores	51
Quadro 5. Verificações bioquímicas e de pH na urina dos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de <i>Vetiveria zizanioides</i> nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg	63
Quadro 6. Concentração inibitória mínima (CIM) (mg/mL) do óleo essencial (OE), extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (Ac) e metanol/água (M) da raiz de <i>Vetiveria zizanioides</i>	65

LISTA DE TABELAS

	pág
Tabela 1. Teor e classificação dos componentes do óleo essencial das raízes de <i>V. zizanioides</i> cultivada no Hospital de Medicina Alternativa/SES-GO	53
Tabela 2. Relação peso dos órgãos/peso dos animais nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de <i>Vetiveria zizanioides</i> nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg	64
Tabela 3. Volume urinário excretado nos intervalos determinados e volume total excretado em 24 horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de <i>Vetiveria zizanioides</i> nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg	94
Tabela 4. Dosagens bioquímicas de uréia, creatinina e eletrólitos no soro em mmol/L e urina em mg/24 horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de <i>Vetiveria zizanioides</i> nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg	95

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APG	Angiosperm Phylogeny Group
AS	Anisaldeído Sulfúrico
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CCDA	Cromatografia de Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia de Camada Delgada Preparativa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standart Institute
DMSO	Dimetilssulfóxido
NCCLS	National Comitte for Clinical Laboratory Standart
NP	Natural product (Diphenylboryethylamine)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

RESUMO	04
ABSTRACT	05
LISTA DE FIGURAS	06
LISTA DE QUADROS	08
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	10
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 FAMÍLIA POACEAE	17
1.2 ESPÉCIE <i>Vetiveria zizanioides</i>	18
1.3 ESPÉCIE <i>Vetiveria zizanioides</i> : USO POPULAR	20
1.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ESPÉCIE <i>Vetiveria zizanioides</i>	21
1.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE <i>Vetiveria zizanioides</i>	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	28
3.2 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO SOLO DO HORTO DO HOSPITAL DE MEDICINA ALTERNATIVA	28
3.3 ESTUDO QUÍMICO DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	29
3.3.1 Obtenção do extrato direcionado para heterosídeo digitálico	29
3.3.2 Obtenção do extrato aquoso liofilizado	29
3.3.3 Obtenção do extrato etanólico bruto	29
3.3.4 Fracionamento do extrato etanólico bruto	30

3.3.5	Obtenção do óleo essencial	31
3.3.6	Pesquisa de heterosídeos digitálicos	31
3.3.7	Fracionamento direcionado para heterosídeos digitálicos	31
3.3.8	Análise fitoquímica do extrato aquoso liofilizado	34
3.3.9	Quantificação de flavonóides no extrato aquoso liofilizado adaptado de Rolin et al. (2006)	35
3.3.10	Estudo da composição química do óleo essencial da raiz de <i>Vetiveria zizanioides</i>	36
3.4	ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA DE <i>Vetiveria zizanioides</i> SEGUNDO AS DIRETRIZES DA OECD 423 (2001)	37
3.4.1	Extratos utilizados no teste de toxicidade aguda	37
3.4.2	Descrição dos animais	37
3.4.3	Alojamento e manejo dos animais	37
3.4.4	Descrição do protocolo experimental	38
3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	40
3.5.1	Extrato aquoso liofilizado	40
3.5.2	Descrição dos animais	40
4.5.3	Alojamento e manejo dos animais	40
3.5.4	Descrição do protocolo experimental	41
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	43
3.6.1	Obtenção do óleo essencial e dos extratos	43
3.6.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	43
3.6.2.1	Microorganismos utilizados	43
3.6.2.2	Preparo do inóculo	44

3.6.2.3	Avaliação da atividade antimicrobiana	45
4.	RESULTADOS	47
4.1	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO SOLO DO HORTO DO HOSPITAL DE MEDICINA ALTERNATIVA	47
4.2	ESTUDO QUÍMICO DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	47
4.2.1	Pesquisa de Heterosídeos Digitálicos	47
4.2.2	Fracionamento direcionado para heterosídeos digitálicos	48
4.2.3	Pesquisa fitoquímica no extrato aquoso liofilizado	52
4.2.4	Estudo da composição química do óleo essencial	52
4.3	ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA DE <i>Vetiveria zizanioides</i> SEGUNDO AS DIRETRIZES DA OECD 423 (2001)	55
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	55
4.5	AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	64
5.	DISCUSSÃO	68
5.1	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	68
5.2	ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	72
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA	74
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Vetiveria zizanioides</i>	79
6.	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	APÊNDICE A: TABELA 3	94
	APÊNDICE B: TABELA 4	95
	ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO	96

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na arte de curar constitui uma forma de tratamento de origens muito antigas (CUNHA et al., 2003). Antes de quaisquer estudos científicos, nossos antepassados perceberam o poder das plantas na cura de seus males (ELISABETSKY & SOUZA, 2004; VEIGA JUNIOR et al., 2005). Ao longo de gerações, informações sobre o uso de produtos de origem vegetal foram sendo incorporadas às terapêuticas populares e hoje se torna evidente a realidade dos tratamentos embasados em práticas alternativas com o uso de plantas (PINTO et al., 2002; REIS et al., 2004).

A fitoterapia é definida como “uma terapia caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substância ativa isolada, ainda que de origem vegetal”. Essa prática terapêutica além de ser reconhecida e consolidada a nível de seu uso tradicional está incorporada pela população em geral que busca tratamento de origem natural possivelmente devido a menor quantidade de efeitos colaterais e preço mais acessível, o que nos respalda a pensar na necessidade de ampliação da utilização desta importante prática alternativa de tratamento (YUNES et al., 2001; PINTO et al., 2002).

O Ministério da Saúde, por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica, vem desenvolvendo diversas ações voltadas ao desenvolvimento de cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos, com vistas à ampliação do acesso à produtos e serviços para usuários do Sistema Único de Saúde. A aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, prevendo o tratamento com Plantas Medicinais

e Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS), conforme disposto na portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006a), bem como da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813 de 22 de julho de 2006, constituem incentivos sem precedentes à Fitoterapia (BRASIL, 2006b).

O Hospital de Medicina Alternativa (HMA-SES/GO) constitui-se de uma Unidade de Saúde Pública, pioneira em práticas médicas não convencionais. Foi criado para funcionar como serviço terapêutico alternativo, eficaz e de baixo custo, à disposição da comunidade (BARBOSA, 1990). O HMA como importante colaborador das práticas de fitoterapia em Goiás, vem tentando desenvolver trabalhos pertinentes às Práticas Integrativas e Complementares pleiteadas pelo Sistema Único de Saúde, na perspectiva da prevenção de agravos e da promoção e recuperação da saúde, estando aberto também a estágios, pesquisas e intercâmbio técnico-científico entre órgãos competentes, visando aprendizado mútuo e melhoria da qualidade dos produtos fitoterápicos. Esse Hospital dispõe de ambulatorios médicos em suas dependências, um horto de plantas medicinais e laboratório de manipulação magistral.

Uma das plantas utilizadas na terapêutica deste Hospital é o vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash), que é uma planta aromática, da família Poaceae muito encontrada no norte da Índia e utilizada na fitoterapia ayurvédica (CHOPRA et al., 1982).

Devido à existência de informações quanto ao modo de utilização da raiz do vetiver pelas populações (MELO, 2005), essa planta foi selecionada para esse trabalho, pois a possibilidade de sucesso nos resultados é maior tendo em vista observações etnobotânicas sobre seu uso tradicional (BRITO, 1996;

CECHINEL FILHO, 2000; MONTANARI & BONZANI, 2001; MACIEL et al., 2002).

Martinez et al. (2004) questionou a valorização do vetiver brasileiro, destacando que no Brasil a produção de vetiver é baixa, e apenas ocasionalmente destinada à exportação, sendo que a variabilidade na qualidade do óleo é muito alta.

Pesquisas promovendo melhorias na qualidade das matérias-primas vegetais, estudos direcionados ao isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos e trabalhos investigando atividades biológicas poderão contribuir para o conhecimento e usos das plantas medicinais (BRITO, 1996; MACIEL et al., 2002; VEIGA JR et al., 2005).

1.1 FAMÍLIA POACEAE

O sistema de classificação *Angiosperm Phylogeny Group* (APG) II, de 2003, inclui a família Poaceae na ordem Poales. Essa família possui 668 gêneros com 10.035 espécies e compreende cerca de 20% da vegetação que cobre a terra. No Brasil, ocorrem cerca de 180 gêneros e 1500 espécies desta família (STEVENS, 2008).

O aspecto externo das plantas da família Poaceae é caracterizado por caule do tipo colmo, com uma clara divisão em nós engrossados e entrenós longos, rodeados pelas bainhas alargadas das folhas, longas e estreitas, ordenadas em duas séries ao longo do caule. As inflorescências, freqüentemente, são muito ramificadas. As flores, pouco vistosas, reunidas em pequenas espigas também chamadas espiguihas, espículas, ou espiqueiras rodeadas por órgãos foliares secos (glumas), costumam ser intensamente

involuídas, mostrando os caracteres típicos de anemofilia. Em geral, sua base é rodeada por duas glumas. Segue-se depois um número variado de lemas, em cujas axilas se assentam as respectivas flores. As flores são geralmente ermafroditas e cada uma das flores consiste em uma pálea ou glumela superior, com dois órgãos estéreis (lodículas ou glumélulas), 3 estames e um ovário súpero. Este leva dois estigmas transversais, muitas vezes plumosos, e contém rudimento seminal que, no momento da maturação, se funde com a parede do ovário, dando lugar a um fruto de tipo núcula, denominado cariopse. A raiz, considerada normalmente como raiz principal, deve ser então a primeira das raízes laterais caulógenas. Devido à sua origem endógena, esta circundada, inicialmente, por tecido do eixo germinativo e da radícula (WEBERLING & SCHWATES, 1986).

1.2 ESPÉCIE *Vetiveria zizanioides*

A espécie *V. zizanioides* é conhecida popularmente como capim-vetiver, capim-de-cheiro, grama-das-índias, falso-pachuli (ou, simplesmente, pachuli) e raiz-de-cheiro (CORREIA, 1984).

Corrêa (1984) discorre sobre duas possíveis origens da espécie vegetal *Vetiveria zizanioides*, sendo que a primeira possibilidade poderia ser a de que esta espécie vegetal teria sua origem asiática, considerada indiana, mas que também poderia ser aceita a possibilidade de o capim vetiver ter sua origem na Malásia e que os árabes o tivessem introduzido na Índia como espécie econômica há mais de oito séculos. Quanto à introdução no Brasil deve ter ocorrido logo depois do descobrimento, pois ela ocorre de forma subespontânea nas praias da ilha Marajó e desde a Amazônia até São Paulo.

A espécie *Vetiveria zizanioides* é uma planta perene cespitosa com folhas mais ou menos basilares, invaginantes no caule, estreitas, lineares, agudas, erectas, as vezes dobradas com até 70 cm de comprimento, lisas, inodoras, glabras, escabrosas e serradas nas margens. Inflorescência em panícula ampla, terminal, erecta, cônica, com 15-35 cm, esverdeadas, compostas de numerosos racimos espiciformes, 8-12 verticilados, tendo os interiores mais de 20 raios; espigas formadas por espiqueiras violáceas compostas de 2 flores e reunidas em grupos de 2-3; glumas coriáceas, espinescentes sobre uma das palhas e ciliadas sobre a outra; fruto cariopse oblongo, livre entre as glumelas (Figura 1A). O rizoma se apresenta lenhoso, esponjoso, pardacento, flexível, fortemente aromático, comprido e muito fino, revestido de epiderme amarelo-pálido (Figura 1B) (CORRÊA, 1984).



Figuras 1: (A) Aspecto geral da espécie *Vetiveria zizanioides* cultivada no Hospital de Medicina Alternativa. (B) Detalhe de suas raízes fasciculadas.

Numa análise microscópica da raiz principal de *V. zizanioides* foi observada a presença de uma região esclerênquimática e um aerênquima bem

evidente; o cilindro central está constituído por elementos de metaxilema e a região medular composta de células contendo grãos de amido (ALENCAR et al., 2005).

1.3 ESPÉCIE *Vetiveria zizanioides*: USO POPULAR

Um estudo etnobotânico realizado por Lans (2006) em Trinidad e Tobago, apresentou a espécie *Vetiveria zizanioides* como uma planta indicada para tratamentos de problemas urinários. Lans (2007) descreveu a mesma planta sendo usada em casos de infertilidade e para auxiliar na expulsão da placenta durante o trabalho de parto.

Amoroso (2002) e Moraes e Guarim Neto (2003) realizaram levantamento etnobotânico de espécies medicinais utilizadas no cerrado mato-grossense, sendo que nesses trabalhos, plantas do gênero *Vetiveria* foram citadas.

A raiz da espécie *Vetiveria zizanioides* tem sido utilizada, principalmente na Índia, para tratamentos diversos como: estimulante, anti-séptico, febrífugo, tônico, insetífugo, calmantes das enxaquecas e das nevralgias (CORRÊIA, 1984).

Segundo o manual de Fitoterapia do Sistema Ayurveda (SUDS-GO, 1988), a raiz do Vetiver é utilizada como tônico cardíaco, no tratamento de hipertensão leve e como diurético. Carneiro (2007) indica a espécie *Vetiveria zizanioides* para tratamento de hipertensão arterial. De acordo com os princípios da Ayurveda, as plantas diuréticas têm propriedades de eliminar líquidos em excesso no organismo, ajudam no processo de detoxificação pelos rins e ajudam no tratamento de afecções urinárias tais como disúria, litíase e infecções urinárias. Em geral os diuréticos também são usados para doenças

associadas com o envelhecimento e congestão linfática, doenças de pele, doenças venéreas e reumáticas. Além disso, aumentam a diurese, ajudam na purificação do sangue e são úteis em casos de infecções, icterícia e hepatite. Essas plantas ajudam a aumentar a sudorese e podem ser úteis no tratamento de doenças febris. Como o excesso de líquido na cavidade abdominal pode debilitar o poder de digestão, algumas são úteis para desordens gastrintestinais (MELO, 2005; CARNEIRO 2007).

Além de seus usos terapêuticos, o vetiver tem seu emprego justificado podendo ser importante na conservação do solo de terrenos sob erosão ou terrenos alagados. Suas folhas podem ser usadas na pastagem, alimentando o gado e na confecção de arranjos ornamentais. De suas raízes pode ser extraído o óleo essencial para fabricação de perfumes e também servir como matéria-prima para a produção de pesticidas botânicos (METHACANON et al., 2003).

1.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ESPÉCIE *Vetiveria zizanioides*

Em um estudo de prospecção fitoquímica, visando estabelecer parâmetros para o controle de qualidade da raiz do vetiver cultivada no Hospital de Medicina Alternativa, foi detectada a presença de alcalóides, flavonóides, esteróides e triterpenos, digitálicos e cumarinas (ALENCAR et al. 2005).

Champagnat et al. (2007), estudando o gênero *Vetiveria* isolou 5 flavonóides, sendo que quatro destes flavonóides (carlinosídeo, neocarlinosídeo, 6,8-di-C-arabinopirasiluteolina e tricin-5-O-glucosídeo) foram isolados tanto na espécie *Vetiveria zizanioides*, quanto de *Vetiveria nigrítana* Benth. e ainda o componente isoorientina encontrado somente na espécie

Vetiveria zizanioides. Os componentes carlinosídeo, neocarlinosídeo e 6,8-di-C-arabinopirasiluteolina foram isolados do extrato metanol/água das partes aéreas das espécies *Vetiveria nigrítana* e *Vetiveria zizanioides*. O componente isoorientina foi isolado do extrato metanol/água da parte aérea de *Vetiveria zizanioides* e o componente tricín-5-O-glucosídeo foi extraído do extrato etanólico das raízes das duas espécies do gênero *Vetiveria*.

Um estudo realizado por Methacanon et al. (2003) analisou os constituintes químicos das folhas da *Vetiveria zizanioides* e apresentou como resultado os polissacarídeos, hemicelulose (38%) e a celulose (27%) encontrados nessa planta. O teor protéico foi de 5% e o teor de lignina foi de 10%. A porcentagem de cinzas totais foi de 3%, sendo 50% destas cinzas constituídas por sílica. Alencar et al (2005) analisou o teor de água, cinzas e cinzas insolúveis em ácido clorídrico da raiz da *Vetiveria zizanioides*, encontrando como resultado valores de 9,70% para água, 3,51% para cinzas totais e 1,33% para cinzas insolúveis em ácido clorídrico.

Uma das classes químicas mais estudadas da *Vetiveria zizanioides* é o óleo essencial de sua raiz. Em 2000, Weyerstahl et al. identificaram 155 constituintes do óleo essencial da *Vetiveria zizanioides* coletado no Haiti, incluindo um sesquiterpeno com um novo esqueleto, denominado 1,7-ciclogermacra-4-dien-15-al. Huang et al. (2004) encontraram em uma amostra de raiz da *V. zizanioides*, uma quantidade maior de valenceno (30,36%), enquanto que no broto e nas folhas os constituintes majoritários foram o 9-octadecenamido (33,50%), 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno (27,46%) e ácido 1,2-benzendicarboxílico, diisocetil éster (18,29%).

Champagnat et al. (2006) realizaram uma análise comparativa da composição da *Vetiveria zizanioides* cultivados no Brasil, China, Haiti, Índia, Java, Madagascar, México, El Salvador e observaram que a composição dos constituintes majoritários (khusimol, β -vetiveneno e β -vetispireno) não variou significativamente comparando as diferentes origens. Nessa pesquisa de Champagnat et al. (2006), os constituintes característicos encontrados foram o β -vetispireno (1,6-4,5%), o Khusimol (3,4-13,7%), o vetiselinol (1,3-7,8%) e o α -vetivona (2,5-6,3%).

Muitos estudos comparativos dos contituintes do óleo essencial de *Vetiveria zizanioides* foram realizados levando em consideração variações de plantio. Pripdeevech et al. (2006) analisaram os constituintes do óleo essencial de *Vetiveria zizanioides* cultivados em solo sem tratamento, solo com adição de microorganismos e cultivo em semi-hidroponia e observaram que o óleo essencial da raiz da planta cultivada em solo com adição de microorganismos apresentou uma maior quantidade de componentes de baixa massa molecular como o 2-norzizaeno e seus derivados e o γ -vetivereno. O odor dos óleos essenciais obtidos do solo sem tratamento e do cultivo em semi-hidroponia apresentaram-se semelhantes, mas o óleo essencial obtido do solo com adição de microrganismos apresentou odor significativamente diferente. Estudo similar foi realizado por Adams et al. (2004), que extraiu o óleo essencial do vetiver cultivado em solo estéril e solo adicionado de bactérias e fungos. Nesse estudo os rendimentos dos óleos essenciais foram de 0,02% para o óleo essencial extraído da raiz da planta cultivada em solo estéril e 0,29-0,40% para a raiz da planta cultivada em solo com bactéria e fungos. Em relação aos constituintes químicos observaram um grande número de alcanos e alcanóis com particular

interesse os alcanos C₁₉-C₂₉ no óleo essencial extraído da planta cultivada em condições estéreis, sendo esses componentes quase inexistentes no óleo essencial da raiz da planta cultivada em solo com bactéria e fungos. Não foi encontrado no óleo essencial extraído da planta cultivada em solo estéril componentes como o β -funebreno, prezizaeno, α -amorfeno, ou β -vetispireno, encontrados no óleo essencial extraído da planta cultivada com solo acrescido de bactéria e fungos.

Um estudo realizado por Massardo et al. (2006) analisou a produção de óleo essencial da *Vetiveria zizanioides* em plantas jovens (20 cm de altura). Esse estudo verificou que nos seis primeiros meses de análise a quantidade de óleo essencial extraído se manteve constante com média de 0,30 g/100 g de raiz da planta, sendo que durante os 2 meses seguintes houve um aumento na produção para uma média de 0,70 g/100 g da raiz da planta, verificando posteriormente um decréscimo de produção para 0,54 g/100 g da raiz durante os meses de inverno. Esse resultado sugere que a produção do óleo essencial do vetiver é notadamente relacionada com o metabolismo da raiz da planta, o qual é afetado por diferenças ambientais causadas pelas mudanças das estações.

Costa et al. (2006) realizaram um estudo comparativo extraindo óleo essencial da raiz da *Vetiveria zizanioides* por hidrodestilação, extração por solvente e extração com CO₂ supercrítico e observou que os óleos essenciais obtidos pelas três métodos apresentaram como compostos majoritários o Khusimol, bicicloventivenol, β -vetivona e α -vetivona, embora os extratos obtidos com fluido supercrítico não apresentem os compostos mais voláteis.

1.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Vetiveria zizanioides*

A atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* pelo óleo essencial da raiz de *Vetiveria zizanioides* foi demonstrada por Hammer et al. (1999). Eles observaram que a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial para *Staphylococcus aureus* foi de 0,008% (v/v), sendo a menor CIM observada para as 52 amostras de diferentes espécies vegetais analisadas.

Sridhar et al. (2003) analisaram treze amostras de óleos essenciais da raiz de diferentes espécies aromáticas visando comparar os constituintes majoritários e as propriedades antifúngicas. Neste trabalho o constituinte majoritário de *Vetiveria zizanioides* foi a vetiverona (60%) e sua propriedade antifúngica foi menor se comparada com a atividade observada para *Cymbopogon martini* que apresentou acentuada ação antifúngica contra *Colletotrichum lindemuthianum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.* e *Rhizopus sp.*.

Em um estudo de Putiyanan et al. (2005) sobre a determinação da atividade antimicrobiana do vetiver, foi observado que os extratos metanólicos da raiz de seis variedades de Vetiver mostraram atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e algumas destas variedades mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Luqman et al. (2005) demonstraram que o extrato hexânico das raízes de vetiver apresentou potente atividade inibitória do crescimento de bactérias como *Mycobacterium smegmatis* e *Escherichia coli*, resistentes a outros antibacterianos.

Em uma pesquisa sobre avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial da raiz de vetiver verificou-se elevada atividade seqüestradora de

radicais livres, se comparado com padrões antioxidantes como o BHT e α -tocopherol, contudo sua capacidade quelante com metais como Fe^{2+} foi considerada fraca (KIM et al. 2005).

A atividade protetora hepática do extrato metanólico de *Vetiveria zizanioides* foi estudada por Parmar et al. (2008). Neste estudo foi administrado etanol 20% por 18 dias para induzir danos ao fígado de ratos e observaram-se alterações funcionais (indução do tempo de sono por administração de tiopentano), alterações físicas (alterações no volume e peso do fígado), e parâmetros bioquímicos como dosagens de transaminases, fosfatases, bilirrubina direta e indireta, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e alterações histológicas no fígado. Os resultados mostraram que o extrato metanólico de *Vetiveria zizanioides* preveniu danos funcionais, físicos, bioquímicos e histológicos, indicando o efeito protetor nas células hepáticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo investigar fitoquimicamente a raiz da espécie *Vetiveria zizanioides*, realizar testes de toxicidade aguda, investigar a atividade diurética e avaliar seu potencial antimicrobiano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar os metabólitos secundários existentes na raiz de *Vetiveria zizanioides* cultivada no HMA/SES-GO
- 2) Identificar os compostos químicos do óleo essencial extraído da raiz
- 3) Realizar testes de toxicidade aguda em ratos, por via oral, com extratos obtidos da raiz de *Vetiveria zizanioides*
- 4) Avaliar a ação diurética do extrato aquoso liofilizado das raízes da espécie *Vetiveria zizanioides*
- 5) Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial, do extrato etanólico bruto e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol/água da raiz de *Vetiveria zizanioides*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

A raiz da planta foi coletada na manhã do dia 02 de julho de 2007, em um período de clima seco, no Horto do Hospital de Medicina Alternativa localizado na BR-153, km 08, bairro Santo Antônio em Goiânia, Goiás, Brasil (16° 43' 50,3" S e 49° 14' 32,9" O a 863 m de altitude). Esse espécime foi plantado no dia 15 de julho de 2005, mantida em área irrigada e com adubação orgânica, sendo considerada, no momento de sua colheita, uma planta adulta com desenvolvimento total.

O processamento da raiz: seleção, lavagem, secagem e trituração, foram realizadas na área de produção da Divisão de Farmácia deste Hospital conforme o procedimento operacional padrão para processamento de plantas medicinais utilizado pelo Hospital de Medicina Alternativa e de acordo com o Manual de Boas Práticas Agrícolas apresentados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006c).

3.2 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO SOLO DO HORTO DO HOSPITAL DE MEDICINA ALTERNATIVA

Uma análise da composição química do solo do Horto do Hospital de Medicina Alternativa foi realizada em um laboratório terceirizado para caracterização do tipo de solo em que o material vegetal foi coletado. Essa análise constituiu na verificação do pH, pesquisa de macronutrientes e análise da textura do solo.

3.3 ESTUDO QUÍMICO DE *Vetiveria zizanioides*

Os procedimentos de isolamento e identificação dos constituintes químicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais - UFG.

3.3.1 Obtenção do extrato direcionado para digitalico

Uma quantidade de 50 g da planta seca em pó foi extraída sob agitação (60rpm) por um período de 1 hora e 30 minutos com 300 ml de etanol 50% (v/v) e 50 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A solução obtida, foi filtrada e extraída em funil de separação com 75 mL de diclorometano/isopropanol (3:2) por 3x. As fases orgânicas foram reunidas, sendo sua água retirada com sulfato de magnésio desidratado (WAGNER & BLADT, 2001). O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporedor a 40°C.

3.3.2 Obtenção do extrato aquoso liofilizado

Um decocto preparado a 5% (p/v) a partir da droga vegetal, permaneceu em fervura até redução do volume para um quarto do volume original, sendo posteriormente filtrado e liofilizado.

3.3.3 Obtenção do extrato etanólico bruto

Uma quantidade de 200 g da raiz dessecada e previamente pulverizada foi submetido ao processo de maceração à frio, por três dias, com agitação ocasional, utilizando como líquido extrator o etanol 95°GL. A proporção utilizada foi de uma parte do material pulverizado para cinco partes do etanol. Após a maceração foi feito a filtração em papel de filtro e o extrato obtido foi

concentrado em evaporador rotativo a 40°C. O resíduo vegetal obtido foi extraído por mais duas vezes de maneira análoga à primeira, obtendo-se assim o extrato etanólico bruto da raiz de Vetiver (FERRI, 1996).

3.3.4 Fracionamento do extrato etanólico

O fracionamento do extrato etanólico bruto foi feito segundo metodologia descrita por Ferri (1996), a qual constitui na dissolução do mesmo em mistura metanol/água na proporção de 7:3, que foi submetida a partições líquido-líquido sucessivas em hexano, diclorometano e acetato de etila. Desta forma, foram obtidas quatro frações: fração hexano (FH), fração diclorometano (FD), fração acetato de etila (FAc) e fração metanol:água (Faq).

Nesta pesquisa, uma quantidade de 50 g do extrato etanólico bruto foi diluído em 200 mL de mistura metanol:água 7:3 e colocado em um funil de separação. Ao funil foram acrescentados 200 mL de hexano procedendo a separação das fases e reserva da fração hexano, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. À fase aquosa foram acrescentados 200 mL de diclorometano com separação das fases, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes e então a fração diclorometano foi reservada. À fase aquosa que sobrou foram acrescentados 200 mL de acetato de etila com separação das fases, reserva da fração acetato de etila e repetição deste procedimento por mais duas vezes. A fração que sobrou das separações com acetato de etila foi considerada a fração aquosa. Todas as frações foram concentradas do mesmo modo apresentado para concentração do extrato etanólico bruto.

3.3.5 Obtenção do óleo essencial

A obtenção do óleo essencial foi realizada por destilação em sistema de Clevenger, onde 200 g da raiz dessecada e triturada de *Vetiveria zizanioides* foram extraídos por hidrodestilação por período de 2 horas. A temperatura de refrigeração do condensador foi mantida a 20°C (COSTA, 2001).

3.3.6 Pesquisa de heterosídeos digitálicos

Para a caracterização laboratorial destes princípios ativos, empregaram-se reações que evidenciam, isoladamente, partes das moléculas dos heterosídeos, como reações de caracterização do núcleo esteróide (Liebermann-Burchard); reações relacionadas com o anel lactônico pentacíclico (Kedde) e reações relacionadas com os desoxiaçúcares (Keller-Kiliani, Pesez) (COSTA, 2001).

3.3.7 Fracionamento direcionado para heterosídeos digitálicos

Uma quantidade de 1,00 g do extrato obtido segundo o item 3.3.1, foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (40,00g), empacotada com hexano e eluída com os sistemas de eluentes conforme Quadro 1. Foram obtidas 5 frações de cada eluente, cada uma contendo um volume de 20 mL, totalizando uma quantidade de 65 frações.

Fração (%)	Volume (mL)	Código
Hexano 100	100	FH
Hex/Diclorometano 70:30	100	FHD(7:3)
Hex./Diclorometano 50	100	FHD(5:5)
Hex/Diclorometano 30:70	100	FHD(3:7)
Diclorometano 100	100	FD
Diclo./Acetato de etila 70:30	100	FDA(7:3)
Diclo./Acetato de etila 50	100	FDA(5:5)
Diclo./Acetato de etila 30:70	100	FDA(3:7)
Acetato de etila 100	100	FA
Acet./Metanol 70:30	100	FAM(7:3)
Acet./Metanol 50	100	FAM(5:5)
Acet./Metanol 30:70	100	FAM(3:7)
Metanol 100	100	FM

Quadro 1: Sistema de eluentes para cromatografia em coluna realizada com o extrato da raiz de *Vetiveria zizanioides*

Das frações com solvente puro e com proporção 1:1 foram retiradas amostras para serem submetidas à reação de Kedde conforme Costa (2001).

Para as frações hexano foram testadas as fases móveis: hexano/acetato (8.5:1.5) e hexano/ acetato (7:3). Nas frações diclorometanos foram testados as fases móveis: acetato/metanol/água (8.1:1.1:0.8), acetato/metanol/água (7.6:1.1:1.3), hexano/acetato (8.5:1.5) e diclorometano/acetato (8:2). Para as frações acetato foram testadas as fases móveis: acetato/metanol/água (8.1:1.1:0.8), acetato/metanol/água (7.6:1.1:1.3), hexano/acetato (8.5:1.5), hexano/acetato (3:7) e acetato/metanol (8:2). Para as frações metanol foi testada somente uma fase móvel: acetato/metanol (8:2).

Além dos heterosídeos digitálicos, foram investigadas outras classes de metabólitos, sendo que as cromatografias de camada delgada (CCD) foram

submetidas à revelações em AS (Anisaldeído Sulfúrico) para verificação da presença de compostos terpênicos e saponinas, NP (Natural Product – Diphenylboryethylamine) para identificação de flavonóides e/ou compostos com grupo fenol, Dragendorff para caracterização de alcalóides, FeCl_3 para identificação de fenóis, KOH para caracterização de antraquinonas e cumarinas, e Kedde para caracterização de heterosídeos digitálicos (WAGNER & BLADT, 2001).

No processo de isolamento do heterosídeo digitálico 2,0 g do extrato obtido no item 3.3.1 foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (80,00 g) empacotada com hexano e eluída com sistema de eluentes conforme Quadro 1. Nesta cromatografia foram coletadas 130 frações com o volume de 10 mL de cada fração.

As frações de 42 a 48 foram reunidas e submetidas a um procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), com fase móvel para composta por hexano/diclorometano/metanol na proporção de 10:10:1. A banda isolada na CCDP foi raspada da cromatoplaça e extraída da sílica com diclorometano. A amostra obtida foi enviada à Universidade de Brasília para a obtenção dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

As cromatografias em coluna foram feitas utilizando sílica gel 60 (0,05 – 0,200 mm) da marca Vetec® e o monitoramento das frações foi realizado através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (10 x 5cm) da marca ALUGRAM® de 0,2 mm de espessura, sílica gel 60 e com indicador de fluorescência UV 254. A CCDP foi realizada em cromatoplaça apresentando as mesmas especificações da cromatoplaça para CCDA, mas com dimensões 20 x 20 cm.

Os solventes utilizados nas CC, CCDA e extração de CCDPs foram de grau analítico.

3.3.8 Análise fitoquímica do extrato aquoso liofilizado

Uma quantidade de 0,5 mg do extrato aquoso liofilizado, obtido no item 3.3.2, foi diluído em água destilada e filtrado, sendo a solução obtida submetida à CCDs em diferentes fases móveis capazes de eluir substâncias polares. A primeira fase móvel testada foi a fase contendo acetato de etila/ácido fórmico/água na proporção de 9,5:0,5:0,5 (Farm. Bras. IV Ed, 2004), a segunda foi com acetato de etila:tolueno/ácido fórmico/água na proporção de 8:1:0,5:0,5 (Farm. Bras. IV Ed, 2002), a terceira foi a fase móvel contendo acetato de etila/ácido fórmico/água na proporção de 8:1:1 (Farm. Bras. IV Ed, 1996) e a última a fase móvel contendo acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água na proporção de 10:1,1:1,1:2,7 (WAGNER & BLADT, 2001). As CCDs foram observadas sob luz UV 254 e 365 nm e reveladas em vanilina sulfúrica, FeCl_3 e NP.

Na tentativa de isolamento de compostos do extrato aquoso liofilizado da raiz de *V. zizanioides*, foi realizada uma coluna cromatográfica com sephadex lipofílico LH 20 da marca SIGMA-ALDRICH, com dimensões de poros de 25 a 100 μm . Nesta coluna foram utilizados 15 g de sephadex empacotado com 70 mL de metanol. Uma quantidade de 0,5 g do liofilizado diluído em 1,5 mL de metanol foi aplicada na coluna e eluída em sistema isocrático com metanol. Desta coluna foram coletadas 115 frações com volume de 1 mL cada fração.

As frações de 102 a 114 foram reunidas e submetidas a CCDP tendo como fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água na proporção de 10:1,1:1,1:2,7 (WAGNER & BLADT, 2001). A banda isolada na

CCDP foi extraída da cromatoplaça e eluída da sílica com acetato de etila. A amostra obtida foi enviada à Universidade de Brasília para obtenção dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

3.3.9 Quantificação de flavonóides no extrato aquoso liofilizado (adaptado de Rolin et al. 2006)

O doseamento de flavonóides foi realizado utilizando-se o decocto liofilizado. Neste procedimento 0,5 g do liofilizado foi transferido para um balão de 250 mL. Ao balão foram adicionados 100 mL de uma mistura de metanol/ácido acético 0,02 M (99:1), e balão levado ao banho-Maria sob refluxo a 90-100°C por 40 minutos, sendo depois a solução foi filtrada. Após resfriamento a absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro a 361nm. A análise foi realizada em triplicata. O branco foi preparado com a mistura de metanol:ácido acético 0,02 M

Para construção de curva padrão 1,25 mg de rutina (Sigma) com 95% de pureza foi pesada e transferida para um balão de 25 mL, completando-se o volume com metanol/ácido acético 0,02 M. Alíquotas de 200, 400, 600, 800 e 1000 μL foram transferidas para tubos de ensaio, completando-se o volume para 1 mL, homogeneizando e então lidas a 361 nm. A regressão linear da reta foi realizada utilizando o programa ORIGIN 5.0.

O cálculo do teor de flavonóides foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ flavonóides} = C (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) \cdot 100 \cdot 10^2 / m (\text{mg})$$

Onde:

100 é o fator de diluição

C = concentração de flavonóides em mg

m = massa da amostra (mg)

Os resultados apresentados para o doseamento dos flavonóides correspondem à média de três repetições ($n=3$) $\pm$ desvio padrão da média

3.3.10 Estudo da composição química do óleo essencial da raiz de *Vetiveria zizanioides*

O óleo essencial obtido em 3.3.5 foi submetido à análise cromatográfica, em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho SHIMADZU QP5050A. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida (CBP-5 com 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m), com fluxo de 1 mL . min⁻¹ de Hélio, como gás de arraste, aquecimento com temperatura programada (60 °C/2 min; 3°C min⁻¹/240°C; 10°C min⁻¹/280°C; 280°C/10 min) e energia de ionização de 70 eV, sendo o volume de injeção de 1 μ L da amostra diluída em CH₂Cl₂ na proporção de 1:5. A análise foi conduzida no modo de varredura, com intervalo de massas de 40-400 m/z e uma razão de split de 1:20.

Os componentes químicos do óleo essencial foram identificados por comparação (automática e manual) dos espectros de massas e índice de retenção com os descritos na literatura para os componentes mais comuns de óleos essenciais (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados através da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos C9 – C22, e utilização da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

3.4 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA DE *Vetiveria zizanioides* SEGUNDO AS DIRETRIZES DA OECD 423 (2001)

O projeto de pesquisa para avaliar a toxicidade aguda de *Vetiveria zizanioides* segundo as diretrizes da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) 423 (2001), foi submetido à Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás, sendo aprovado segundo protocolo de número 062/08 (Anexo A).

3.4.1 Extratos utilizados no teste de toxicidade aguda

Para uma análise mais detalhada da toxicidade aguda de *Vetiveria zizanioides* foram escolhidos dois extratos distintos: o extrato direcionado para digitálicos proposto por Wagner & Bladt (2001) e apresentado no item 3.3.1 e o extrato preparado a partir do decocto liofilizado, proposto por Melo (2005) e apresentado no item 3.3.2..

3.4.2 Descrição dos animais

Foram usados no experimento ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) de ambos os sexos oriundos do biotério da UNICEUB-Centro Universitário de Brasília. Os animais eram adultos jovens com 8 a 12 semanas de idade e o peso de cada um não excedeu a 20% da média do grupo.

3.4.3 Alojamento e manejo dos animais

Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) da Faculdade de Farmácia da

Universidade Federal de Goiás. Foram alimentados com ração balanceada Labina (Purina), além de água filtrada. O ambiente foi climatizado com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar variando de 50 a 70% com monitoramento do ciclo claro e escuro de 12 horas cada. Cada grupo de três animais foi acondicionado em uma caixa de polipropileno forrada por maravalha, sendo trocada em dias alternados.

Os animais passaram por um período de aclimação de uma semana antes do início dos experimentos e neste dia os animais foram pesados e identificados.

3.4.4 Descrição do protocolo experimental

Para a realização do experimento, seis grupos foram formados randomicamente, sendo que três grupos eram de ratos machos e três grupos de fêmeas. O número de animais usados para cada grupo foi de três animais, conforme recomendado pelas diretrizes da OECD 423.

A dose inicial para o teste de toxicidade foi escolhida entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Por se tratar de extratos vegetais originários de uma planta já utilizada pelas populações, e devido a inexistência de informações de casos de intoxicação por esta planta, decidiu-se iniciar a triagem com a dose de 2000 mg/kg.

Para solubilização do extrato foi utilizado DMSO 3% (p/v) e o volume foi completado com salina tendo-se o cuidado de não exceder o volume de 1 mL/100 g de peso corporal do animal.

O extrato direcionado para heterosídeos digitálicos foi administrado em um grupo de machos e em um grupo de fêmeas e o mesmo foi feito com o

extrato liofilizado, sendo que os dois grupos restantes foram destinados à administração do controle (salina/DMSO a 3%). As administrações foram feitas em dose única por gavagem com cânula apropriada.

Antes da administração dos extratos, os ratos foram privados de alimentação por 12 horas tendo o suprimento de água mantido à vontade. Depois que o extrato foi administrado, a alimentação ainda continuou suspensa por mais 2 horas. Os animais foram observados em intervalos variados (10min, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h) após a administração dos extratos de vetiver e, a partir de então, diariamente até o décimo quarto dia.

Durante os períodos de observação foram feitas observações comportamentais (*screening* hipocrático: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de calda, contorção, posição trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, hipnose, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte). As intensidades dos eventos foram tabuladas de zero a 4, correspondendo respectivamente a: ausente, pouco, moderado, intenso. As alterações encontradas na observação comportamental dos animais foram registradas em protocolo impresso com lista de sinais a serem investigados (MALONE & ROBICHAUD, 1962).

No décimo quarto dia os animais foram novamente pesados, anestesiados com solução de xilasina-cetamina por via intraperitoneal, eutanasiados e então necropsiados. Durante a necropsia foi retirado o coração, pulmão, bexiga, rins, fígado e baço para análise macroscópica. A eutanásia dos animais seguiu os princípios éticos de experimentação animal proposta

pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL, 2008).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

O projeto de pesquisa, para avaliação da atividade diurética de *Vetiveria zizanioides*, foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás, sendo aprovado segundo protocolo de número 062/08 (Anexo A).

3.5.1 Extrato aquoso liofilizado

Para a avaliação da atividade diurética foi utilizado o decocto liofilizado descrito no item 3.3.2, nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg, estipuladas tendo como base a posologia para humanos indicada por Melo (2005).

3.5.2 Descrição dos animais

Foram usados no experimento ratas Wistar (*Ratus norvegicus*) fêmeas oriundas do biotério da UNICEUB-Centro Universitário de Brasília. Os animais eram adultos jovens com 8 a 12 semanas de idade e o peso de cada uma não excedeu a 20% da média do grupo.

3.5.3 Alojamento e manejo dos animais

Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Foram alimentados com ração balanceada Labina (Purina)

além de água filtrada. O ambiente foi climatizado com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar variando de 50 a 70% com monitoramento do ciclo claro e escuro de 12 horas cada.

Os animais passaram por um período de aclimação de cinco dias antes do início dos experimentos. Cada grupo de cinco animais foi acomodados em uma caixa de polipropileno forrada por maravalha.

Após o período de cinco dias nas caixas de polipropileno os animais foram transferidos para gaiolas semi-metabólicas (Figura 2) individualizadas, onde passaram por um período de aclimação de mais cinco dias.



Figura 2: Gaiola semi-metabólica utilizada para acondicionamento de animais no experimento de diurese com o extrato aquoso liofilizado de *Vetiveria zizanioides*

3.5.4 Descrição do protocolo experimental

Para a realização do experimento de diurese foram formados cinco grupos com distribuição randomica entre grupos. O primeiro grupo foi destinado ao controle-negativo e recebeu solução de salina. O segundo grupo, destinado ao controle-positivo, foi administrado furosemida na dose de 20 mg/kg. Os outros três grupos foram tratados com o extrato liofilizado obtido do decocto de *Vetiveria zizanioides* solubilizado em solução salina, sendo que o primeiro

grupo recebeu o extrato na dose de 20 mg/kg, o segundo na dose de 40 mg/kg e o terceiro na dose de 80 mg/kg. A escolha das doses a serem administradas foi feita tendo como parâmetros a dose indicada para um humano adulto.

A administração foi feita por via oral através do método de gavagem não excedendo o volume de 1 mL/100 g de peso do animal. No dia destinado a administração dos extratos, os animais foram pesados e para as administrações foi observada a proporção do mesmo volume de líquido por kg de peso a todos os animais.

A contaminação da urina, pelas fezes eliminadas, foi evitada submetendo os animais a jejum de 12 horas iniciando-se no dia anterior e durante as administrações. Foi pré-administrada solução salina (4% do peso corpóreo) a todos os animais, meia hora antes da administração dos controles e do extrato, objetivando-se um pequeno aumento de retenção urinária. A água foi fornecida a vontade durante todo o experimento.

Com a utilização de uma proveta graduada foi medido o volume de urina excretada nos intervalos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após administração. O volume de cada coleta foi reunido em um único recipiente que foi acondicionado sob refrigeração. No final das 24 horas, com o auxílio de uma fita de uroanálise produzida por Macherey-Nagel/Alemanha com número de lote 678031, a urina foi homogeneizada e verificada o seu pH bem como avaliações de densidade, reatividade a nitritos, proteínas, glicose, cetonas, urobilinogênio, bilirrubina, hemoglobina, presença de hemácias e leucócitos. Após estas avaliações as amostras foram enviadas ao Laboratório da rede privada de Goiânia, onde foram dosadas as concentrações de sódio, potássio, cloreto, creatinina e uréia.

No final do experimento, 24 horas após a administração dos extratos e dos controles, os animais foram anestesiados com solução de xilasina-cetamina e o sangue coletado por punção cardíaca (2-3 ml). Após a punção cardíaca os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. As amostras de sangue foram enviadas ao Laboratório contratado para serem realizadas as dosagens de sódio, potássio, cloreto, creatinina e uréia. As dosagens de uréia, creatinina e cloretos foram feitas por colorimetria e as dosagens de potássio e sódio foram realizadas por fotometria de chama.

Após a eutanásia os animais foram submetidos à necropsia com avaliação à vista desarmada, seguida de extirpação do rim, fígado, baço e coração, com posterior pesagem destes órgãos.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Vetiveria zizanioides*

3.6.1 Obtenção do óleo essencial e dos extratos

A obtenção do óleo essencial foi realizada em aparelho Clevenger, conforme apresentado no item 3.3.5. A extração do extrato etanólico bruto foi realizada conforme item 3.3.3. e o fracionamento do extrato etanólico conforme item 3.3.4.

3.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

3.6.2.1 Microrganismos utilizados

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método da diluição em ágar conforme recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS, 2003) atualmente designado de *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Para tanto

foram utilizados isolados microbianos e cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG, descritas no Quadro 2.

Bactérias Gram-positivas
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)
<i>Micrococcus roseus</i> (ATTC 1740)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)
<i>Staphylococcus epidermides</i> (ATCC 12229)
Bactérias Gram-positivas esporuladas
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC14576)
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)
Bactéria Gram-negativas
<i>Enterobacter cloacae</i> (HMA/FT 502)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)
<i>Escherichia coli</i> (8739)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27483)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 14756)
Levedura Gram-positiva
<i>Candida albicans</i> (NTC 2010)

Quadro 2: Microrganismos usados na avaliação da Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico bruto, das frações e óleo essencial de *Vetiveria zizanioides*

3.6.2.2 Preparo do inóculo

Os microrganismos descritos no quadro 1 foram repicados em caldo tioglicolato e incubados a 37°C por 24 horas para reativação. Após crescimento, foi feito o repique em ágar simples inclinado (ASI), os quais foram

incubados à 37°C por mais 24 horas. Com o desenvolvimento dos microrganismos, os inóculos de cada cepa, foram suspensos em 2 mL de solução salina esterilizada 0,85% (p/v) até obtenção de turvação correspondente a escala 0,5 de MacFarland.

3.6.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial foram pesados 385 mg do mesmo e para a análise do extrato etanólico bruto e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol/água, foram pesados 500 mg de cada. As alíquotas do óleo, do extrato e das frações, foram completados para 2 mL com DMSO (tubo 1) para então serem feitas diluições seriadas ao dobro. Nos dez tubos de ensaio seguintes foram adicionados 1 mL de DMSO (tubos 2 a 11). Uma alíquota de 1 mL foi retirada do tubo 1 e então adicionada ao tubo 2, uma alíquota de 1 mL do tubo 2 foi retirada e adicionada ao tubo 3 e, assim, sucessivamente, até o tubo 11 o qual foi desprezado 1 mL do seu conteúdo final.

A cada um dos tubos foram adicionados 19 mL de ágar Müller Hinton liquefeito (aproximadamente 50°C), foi feita a homogeneização e então verteu rapidamente a mistura em placas de Petri estéreis. Desta forma foram obtidas placas contendo o óleo essencial em concentrações que variavam de 9,625 mg/mL até 0,0093 mg/mL e o extrato etanólico bruto e as frações em concentrações que variavam de 12,5 mg/mL até 0,0122 mg/mL. Foram preparadas placas-controle contendo o solvente utilizado nas diluições (DMSO) e placas contendo apenas ágar Müller Hinton.

Transferiu-se 100 μL (10^8 células/mL) de cada uma das suspensões (item 3.6.2.2) de bactérias para o inoculador de Steers (STEERS et al. 1959) e aplicou-se na superfície das placas de Petri contendo as diluições do óleo essencial e dos extratos em ágar Müller Hinton e nas placas-controles. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foi considerada CIM a menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento microbiano (NCCLS, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO SOLO DO HORTO DO HOSPITAL DE MEDICINA ALTERNATIVA

Na análise da composição do solo do Hospital de Medicina Alternativa foi possível verificar que este solo apresentava pH 5,8 e as seguintes quantidades de macronutrientes: cálcio $4,0 \text{ mEq}/100\text{cm}^3$, magnésio $1,2 \text{ mEq}/100\text{cm}^3$, cálcio conjugado com magnésio $5,2 \text{ mEq}/100\text{cm}^3$, alumínio ausente, hidrogênio conjugado com alumínio $1,5 \text{ mEq}/100\text{cm}^3$, fósforo $47 \text{ mg}/\text{dm}^3$, potássio de $52 \text{ mg}/\text{dm}^3$ e capacidade de troca catiônica de $6,8 \text{ mEq}/100\text{cm}^3$. Neste solo ainda foi possível determinar um teor de 2,7% de matéria orgânica, 29% de argila, 65% de silte e 6% de areia.

4.2 ESTUDO QUÍMICO DE *Vetiveria zizanioides*

4.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Digitálicos

Nas reações qualitativas realizadas na raiz de vetiver foi possível detectar indícios da presença de digitálicos. Na análise dos resultados colorimétricos a reação de Liebermann-Buchard, devido à desidratação ou desidrogenação do núcleo esteróide, apresentou coloração verde escura característica de positividade para o núcleo esteroidal. Na reação de Keller-Kiliani, específica para desoxiaçúcares presente na extremidade da parte glicídica, foi possível observar a presença de um anel de coloração acastanhada na fase de contato entre as duas soluções sendo que a camada acética adquiriu coloração esverdeada. A reação de Pesez que também caracteriza os desoxiaçúcares apresentou forte coloração verde-amarelada

quando observado na luz UV. Na reação de Kedde, específica para agliconas (anel lactônico), a solução desenvolveu gradativamente coloração vermelho acastanhada o que pode ser indicativo da presença do anel lactônico.

4.2.2 Fracionamento direcionado para heterosídeos digitálicos

Do extrato obtido pelo método de Wagner & Bladt (2001), direcionado para digitálicos, obteve-se 2,01 g de amostra com rendimento de 4,02%. A fração eluída com diclorometano apresentou resultado fortemente positivo para heterosídeo digitálico (Quadro 3). Este resultado pode ser visualizado na Figura 3.

Fração (%)	Volume (mL)	Kedde	Código
Hexano 100	100	Negativo	FH
Hexano/Diclorometano 70:30	100	-	FHD (7:3)
Hexano/Diclorometano 50	100	Negativo	FHD (5:5)
Hexano/Diclorometano 30:70	100	-	FHD (3:7)
Diclorometano 100	100	Positivo	FD
Diclorometano/Acetato de etila 70:30	100	-	FDA (7:3)
Diclorometano/Acetato de etila 50	100	Traços	FDA (5:5)
Diclorometano/Acetato de etila 30:70	100	-	FDA (3:7)
Acetato de etila 100	100	Traços	FA
Acetato de etila/Metanol 70:30	100	-	FAM (7:3)
Acetato de etila/Metanol 50	100	Negativo	FAM (5:5)
Acetato de etila/Metanol 30:70	100	-	FAM (3:7)
Metanol 100	100	Negativo	FM

Quadro 3: Resultados dos testes de Kedde realizados nas diferentes frações coletadas na cromatografia em coluna eluída com o extrato direcionado para digitálicos extraído da raiz de *Vetiveria zizanioides*

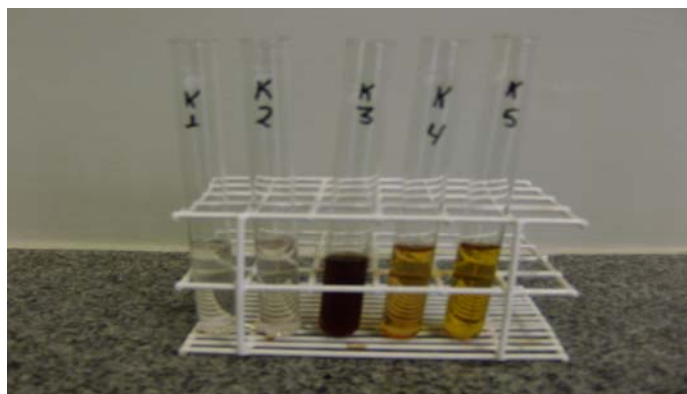


Figura 3: Tubos apresentando resultado dos testes de Kedde obtidas da cromatografia em coluna, com amostra direcionada para heterosídeos digitálicos, obtida da raiz de *Vetiveria zizanioides*

Para as frações hexano, a fase móvel que melhor separou as bandas foi a fase contendo hexano/acetato (7:3). Nas frações diclorometano, a fase móvel de escolha foi a diclorometano/acetato (8:2). Para as frações acetato, a fase móvel de escolha para CCD foi a fase contendo acetato/metanol (8:2), sendo a mesma fase de escolha para as frações metanol.

Nas frações hexano foram observadas duas bandas sob luz UV, sendo uma em UV 365 nm e a outra em UV 254 nm. A primeira banda, observada em UV 254 nm, apresentou Rf 0,93 e foi revelada com AS com coloração violácea, caracterizando a presença de compostos terpenóides e/ou saponinas. A segunda banda, observada em UV 365 nm, apresentou Rf 0,85 e foi revelada com NP, com coloração amarelada, caracterizando a presença de flavonóides.

Nas frações diclorometano observou-se várias bandas pouco definidas quando observadas em UV 254 nm. Utilizando a fase móvel contendo diclorometano/acetato (7:3), três bandas foram reveladas com o reagente Kedde, com coloração púrpura, o que caracteriza a presença de heterosídeos digitálicos nesta fração. Na Figura 4 pode-se visualizar a revelação dessas

bandas, sendo que primeira banda apresentou Rf 0,30, a segunda Rf 0,17 e a terceira Rf 0,10.

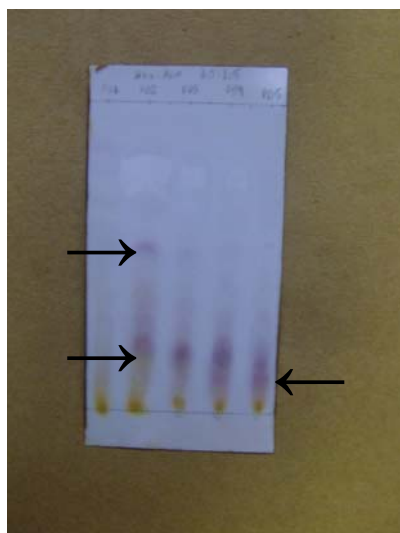


Figura 4: CCDA das frações eluidas com diclorometano e reveladas com Kedde

Para as frações acetato foram observadas três bandas sob luz UV, sendo a primeira e a segunda observadas em UV 254 nm e com Rfs 0,80 e 0,65, respectivamente, e a terceira observada em UV 365 nm e com Rf 0,59. As três bandas foram reveladas com NP, sendo que a primeira apresentou coloração amarelada e a segunda coloração amarelo-esverdeada, caracterizando a presença de flavonóides e a terceira banda, de coloração azul caracterizando a presença de ácido fenólico (WAGNER & BLADT, 2001).

Nas frações metanol, apesar de ter sido observado uma banda com Rf 0,65 em UV 365 nm, esta banda não foi revelada com nenhum dos reveladores testados.

A Quadro 4 relaciona as frações Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Metanol com seus respectivos reveladores e Rfs das substâncias separadas.

Frações	Rf	Revelação UV (nm)	Revelador químico	Coloração	Metabólito secundário
Hexano	0.93	365	AS	violeta	Terpenóide e/ou saponina
	0.85	254	NP	amarela	Flavonóide
Diclorometano	0.30	254	Kedde	púrpura	H. digitálico
	0.17	254	Kedde	púrpura	H. digitálico
	0.10	254	Kedde	púrpura	H. digitálico
Acetato de etila	0.80	254	NP	amarela	Flavonóide
	0.65	254	NP	amarela esverdeada	Flavonóide
	0.59	365	NP	azul	Ácido fenólico
Metanol	0.65	365	-	-	-

Quadro 4: Esquematização do perfil cromatográfico do extrato da raiz de *Vetiveria zizanioides* direcionado para digitálicos e revelação em diferentes reveladores

Rf: fator de retenção

UV: ultra violeta

AS: Anisaldeído sulfúrico

NP: natural product (diphenylboryethylamine)

A amostra resultante da CCDP apresentou massa de 3,9 mg e Rf de 0,77, mas apesar de em CCDA ter sido observado apenas uma banda, após análise de espectro de RMN de H^1 e C^{13} , verificou-se que a amostra se tratava de uma mistura complexa, não sendo possível sua identificação.

4.2.3 Pesquisa fitoquímica no extrato aquoso liofilizado

A CCD realizada com o liofilizado e eluída com a fase móvel contendo acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água na proporção de 10:1,1:1,1:2,7, indicada para observação de flavonóides, apresentou três

bandas visíveis no UV 365 nm, sendo que a primeira banda e a segunda, com Rfs 0,1 e 0,13, respectivamente, adquiriram coloração amarelada quando revelada com o revelador NP e a terceira com Rf 0,71 de fluorescência branco-azulada quando da revelação com o mesmo revelador.

A substância flavonóide resultante da cromatografia em Sephadex e eluição em CCDP, apresentou massa de 1,7 mg e Rf de 0,71, sendo insuficiente para realização do espectro de RMN de H^1 e C^{13} , impossibilitando assim identificação.

Com a utilização da curva padrão apresentada na Figura 5, foi possível realizar o doseamento de flavonóides do extrato liofilizado obtido do decocto de *Vetiveria zizanioides*, apresentando um teor de 0,51% de flavonóides.

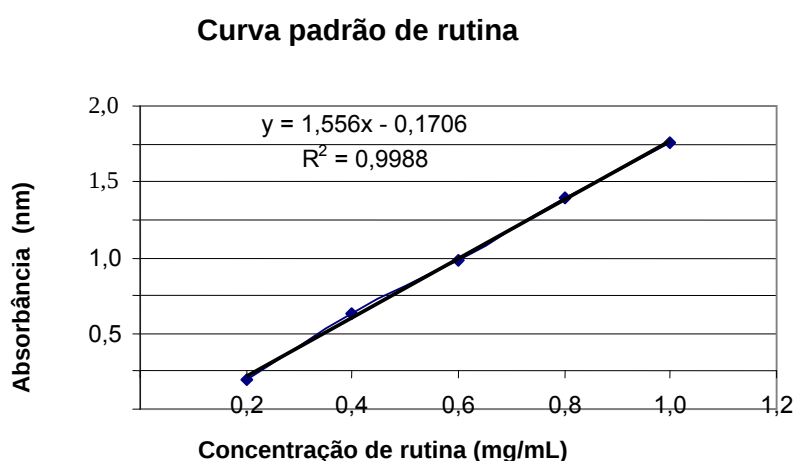


Figura 5: Curva padrão de rutina para doseamento de flavonóides do extrato liofilizado de *Vetiveria zizanioides*.

5.2.4 Estudo da composição química do óleo essencial

Os resultados da análise por CG/EM do óleo essencial extraído das raízes de *Vetiveria zizanioides* com os respectivos teores de cada componente expressos em porcentagem encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Teor e classificação dos componentes do óleo essencial das raízes de *V. zizanioides* cultivada no Hospital de Medicina Alternativa/SES-GO

IR	Componentes	Teor	Classificação
937	tetrahidro-citroneleno	0,20	Monoterpeno
965	6-metil-heptan-2-ol	0,21	Álcool alifático
1348	7-epi-silfiperfol-5-eno	1,75	Sesquiterpeno
1407	longifoleno	0,41	Sesquiterpeno
1441	aromadendreno	0,32	Sesquiterpeno
1446	vestitenono	1,41	Fenilpropanóide
1473	NI	0,55	NI
1466	9-epi-(E)-cariofileno	0,80	Sesquiterpeno
1473	4,5-di-epi-aristolocheno	1,26	Sesquiterpeno
1493	β -vetispireno	1,20	Sesquiterpeno
1533	NI	1,64	NI
1548	elemol	0,23	Sesquiterpeno
1568	palustrol	8,67	Sesquiterpeno
1578	spatulanol	0,37	Sesquiterpeno
1571	NI	0,35	NI
1577	NI	0,45	NI
1584	NI	0,77	NI
1588	NI	0,74	NI
1604	khusimono	7,86	Sesquiterpeno
1605	NI	0,81	NI
1608	β -atlantol	1,10	Sesquiterpeno
1619	junenol	4,12	Sesquiterpeno
1626	trans-isolongifolanono	0,98	Sesquiterpeno
1632	γ -eudesmol	0,62	Sesquiterpeno
1640	epi- α -cadinol	1,75	Sesquiterpeno
1641	1,7-diepi- α -cedrenal	3,20	Sesquiterpêno
1641	hinesol	2,64	Sesquiterpeno
1646	cubenol	2,63	Sesquiterpeno
1653	pogostol	2,62	Sesquiterpeno
1662	alohimachalol	2,46	Sesquiterpeno

IR	Componentes	Teor	Classificação
1670	epi-zizanona	5,03	Sesquiterpeno
1677	mustakona	2,70	Sesquiterpeno
1680	khusinol	1,90	Sesquiterpeno
1685	cedranol	3,69	Sesquiterpeno
1683	NI	0,64	NI
1697	zizanal	2,01	Sesquiterpeno
1700	eudesm-7(11)-en-4-ol	0,66	Sesquiterpeno
1726	acetato de guaiol	3,89	Sesquiterpeno
1731	vetiselinenol	0,66	Sesquiterpeno
1741	khusimol	12,86	Sesquiterpeno
1793	E-isolvalencenol	2,79	Sesquiterpeno
1806	nootkatona	1,45	Sesquiterpeno
1811	ácido vetivérico	2,32	Sesquiterpeno
1823	β -vetivona	0,58	Sesquiterpeno
1840	acetato de eudesm-7(11)-en-4-ol	1,48	Sesquiterpeno
1843	α -vetivona	4,81	Sesquiterpeno
1852	NI	0,38	NI

NI – composto não identificado

IR – Índice de retenção

Por meio da CG/EM, foi possível detectar 47 compostos do óleo essencial da raiz de *Vetiveria zizanoides* cultivado no Hospital de Medicina Alternativa, sendo que 38 (93,67%) foram passíveis de identificação. Dos 38 componentes identificados, um é álcool alifático, um é fenilpropanóide, um é monoterpeno hidrocarboneto, seis são sesquiterpenos hidrocarbonetos e vinte nove são sesquiterpenos oxigenados.

Os compostos majoritários são o palustrol (8,67%), khusimona (7,86%), epi-zizanona (5,03%), khusimol (12,86%) e o α -vetivona (4,81%).

4.3 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA DE *Vetiveria zizanioides* SEGUNDO AS DIRETRIZES DA OECD 423 (2001)

Com a administração da dose de 2000 mg/Kg dos extratos de *Vetiveria zizanioides*, durante a primeira avaliação comportamental dos animais, realizada após 10 minutos da administração, foi observado que todos os animais tratados com vetiver apresentavam piloereção, irritabilidade e defecação pastosa com maior intensidade nos animais que receberam o extrato direcionado para digitálicos. Nos períodos de observação seguintes, levando em consideração o *screening* hipocrático, atribuiu-se pontuação zero a todos os itens avaliados.

Durante todo o período de observação dos animais não ocorreu morte de nenhum deles.

Não foram observadas variações comportamentais ou de sensibilidade entre machos e fêmeas.

A necropsia não evidenciou nenhuma alteração macroscópica que justificasse o estudo histopatológico dos órgãos selecionados para análise (coração, pulmão, bexiga, rins, fígado e baço).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

O extrato liofilizado, obtido da decocção, foi utilizado para avaliação da atividade diurética de *Vetiveria zizanioides*. O volume urinário excretado nos intervalos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas e o volume total excretado em 24 horas são mostrados no Apêndice A.

A Figura 6 representa a média dos volumes urinários excretados, em 24 horas, pelos grupos controles (salina e furosemida) e grupos em que foram

administrados os extratos nas diferentes doses, sendo que os dados apresentados nessa figura mostram que apenas o controle positivo demonstrou média de volumes urinários excretados significativamente maior em relação à média dos volumes urinários excretados pelo controle negativo.

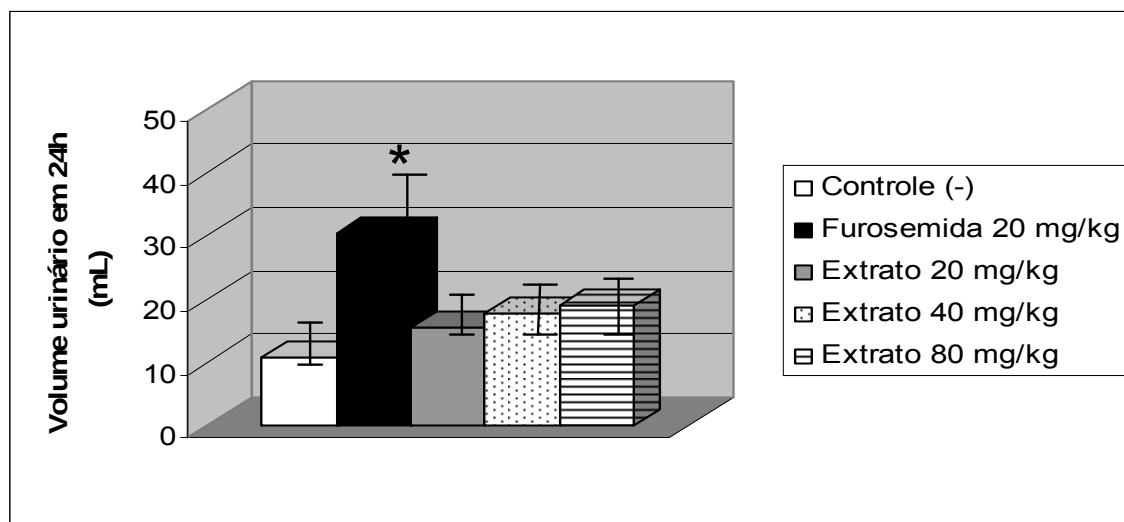


Figura 6: Média dos volumes urinários excretados em 24 horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (n=5, *p<0,05, análise de Dunnett comparando com controle negativo).

Na Figura 7 que apresenta a média dos volumes urinários excretados, nos intervalos de tempo determinados, nos grupos controles e nos grupos tratados com o extrato nas diferentes doses, pode-se observar um aumento do volume urinário excretado após administração da furosemida, nas primeiras duas horas, com diminuição desse volume excretado nas horas seguintes. O mesmo perfil de aumento de volume urinário excretado não é observado quando da administração dos extratos nas diferentes doses.

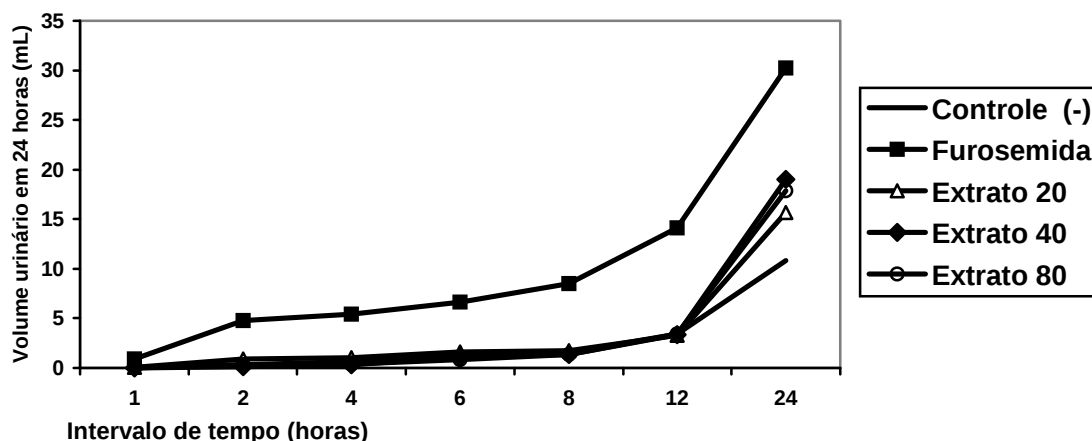


Figura 7: Média dos volumes urinários excretado, em cada intervalo de tempo, nos grupos controle negativos, positivos e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg

As Figuras 8 A, B e C representam, respectivamente, os resultados das dosagens de sódio, potássio e cloreto no plasma sanguíneo e as Figuras 9 A, B e C representam, respectivamente, os resultados das dosagens de sódio, potássio e cloreto na urina de 24 horas dos animais tratados como controles e nos animais tratados com as diferentes doses do extrato da planta. A Tabela 9 no apêndice B reúne os resultados das dosagens de uréia, creatinina, sódio, potássio e cloreto no soro e o resultados das mesmas dosagens bioquímicas e dos eletrólitos na urina de 24 horas.

A interpretação das Figuras 8A, B e C, permitem relatar que não houve diferenças significativas nas dosagens bioquímicas e de eletrólitos realizadas no plasma dos animais em que foram administrados a furosemida ou extratos nas diferentes doses.

Pela análise das Figuras 9A, B e C, pode-se inferir que somente houve diferença sigificativa em relação às dosagens bioquímicas e de eletrólitos realizadas na urina dos animais em que foram administrados a furosemida.

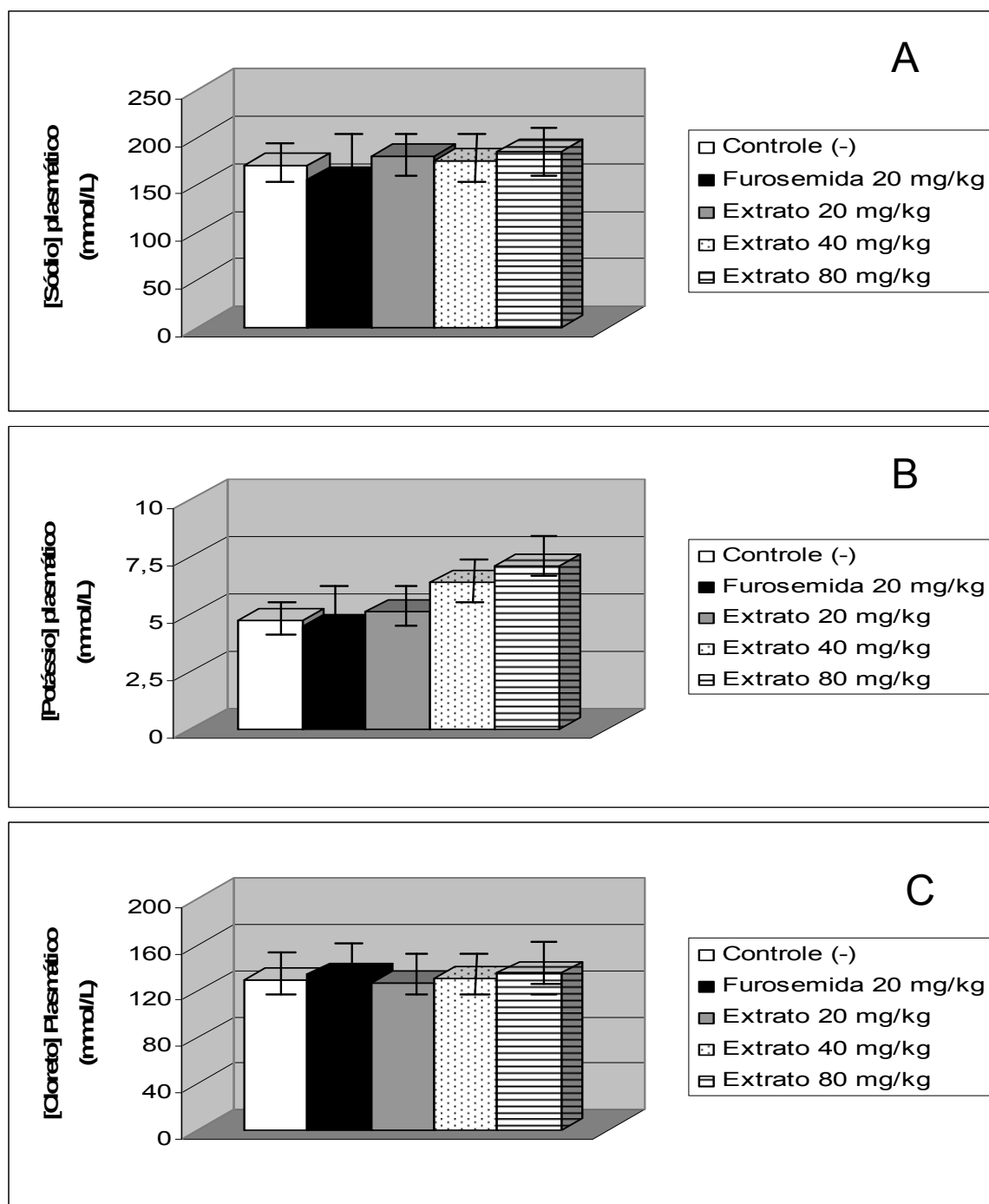


Figura 8: A concentração plasmática de sódio (A), potássio (B) e cloreto (C) em mmol/L nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg. Resultados em média $\pm$ DP; n=5, análise de Dunnett comparando com controle negativo.

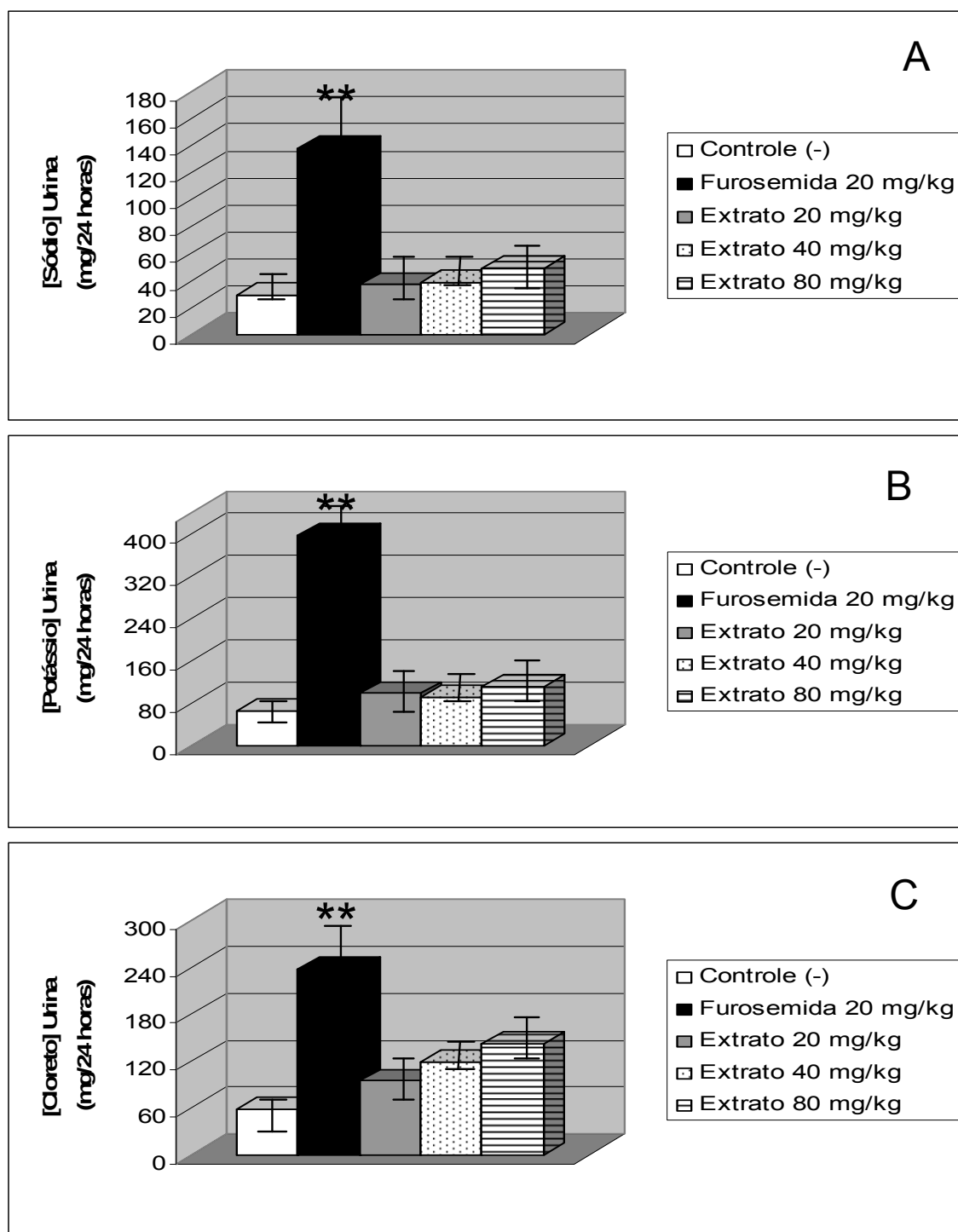


Figura 9: A concentração de sódio (A), potássio (B) e cloreto (C) na urina em mg/24horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg. Resultados em média $\pm$ DP; n=5, **p<0,01, análise de Dunnett comparando com controle negativo.

Os resultados das dosagens de uréia e creatinina no plasma dos animais tratados com salina, furosemida e extratos de *Vetiveria zizanioides* nas diferentes doses são mostrados na Figura 10A e B, sendo que nesses resultados não foram verificadas diferenças significativas nas dosagens de uréia e creatinina nos animais em que foram administrados furosemida e extratos nas diferentes doses em relação ao controle negativo.

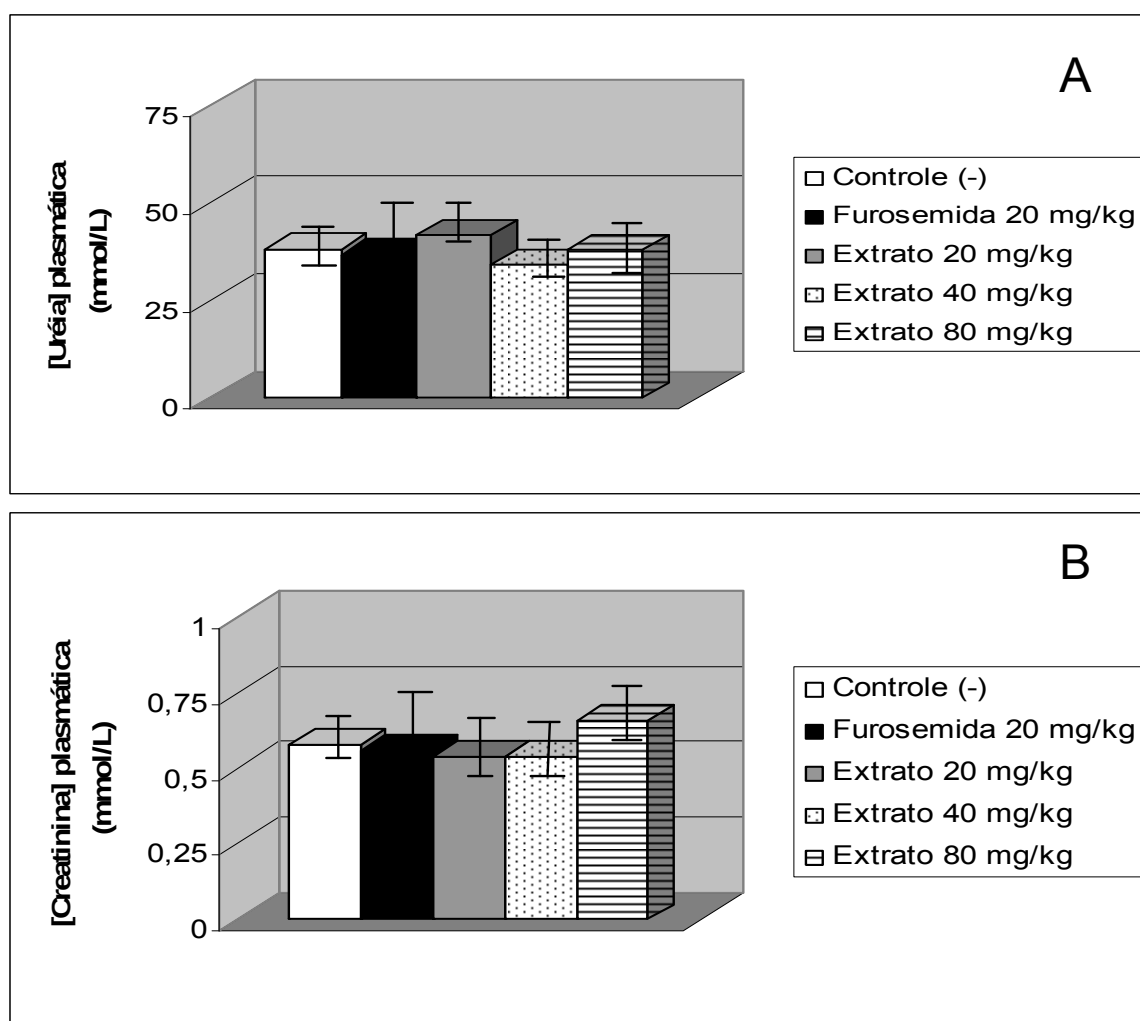


Figura 10: A concentração plasmática de uréia (A) e creatinina (B) em mmol/L nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg. Resultados em média $\pm$ DP; n=5, análise de Dunnett comparando com controle negativo.

Os resultados das dosagens de uréia e creatinina na urina de 24 horas dos animais tratados com salina, furosemida e extratos de *Vetiveria zizanioides* nas diferentes doses são mostrados na Figura 11 A e B, sendo que a interpretação desses resultados mostra aumento significativo de excreção de uréia e creatinina na urina de 24 horas somente com a administração da furosemida.

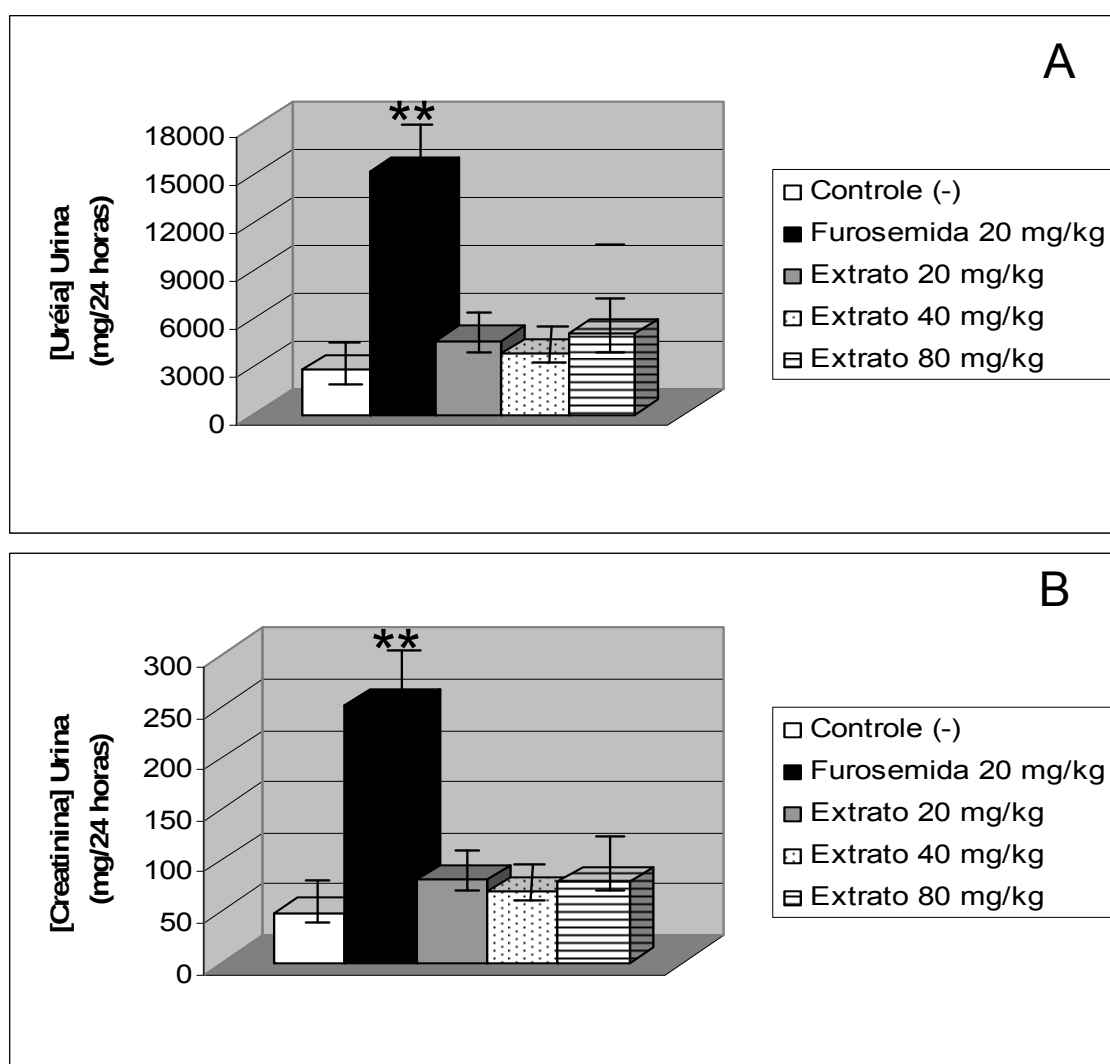


Figura 11: A concentração de uréia (A) e creatinina (B) na urina em mg/24horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg. Resultados em média $\pm$ DP; n=5, **p<0,01, análise de Dunnett comparando com controle negativo.

A verificação do pH urinário, bem como avaliações de sua densidade, reatividade a nitritos, proteínas, glicose, cetonas, urobilinogênio, bilirrubina, hemoglobina, presença de hemácias e leucócitos são mostrados na Quadro 5, sendo que esses resultados, provenientes do teste com tiras reativas, não demonstraram alterações relevantes.

Grupos	Hemoglob.	Eritrócitos	Urobilinog.	Bilirrubina	Cetônas	Glicose	pH	Densidade	Leucócitos
Controle (-)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,005	-
Controle (-)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
Controle (-)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,000	-
Controle (-)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
Controle (-)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
Controle (+)	-	-	N	-	-	-	7,5	1,010	+
Controle (+)	-	-	N	-	-	-	8,0	1,005	-
Controle (+)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,010	+
Controle (+)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,010	-
Controle (+)	-	-	N	-	-	-	7,0	1,005	-
20 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
20 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,020	-
20 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
20 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,020	-
20 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,005	-
40 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,005	-
40 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,005	-
40 mg/kg	-	-	N	-	-	-	8,0	1,015	-
40 mg/kg	-	-	N	-	-	-	8,0	1,025	-
40 mg/kg	-	-	N	-	-	+	7,0	1,015	-
80 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,025	-
80 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
80 mg/kg	-	-	N	+	-	-	7,0	1,015	-
80 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,015	-
80 mg/kg	-	-	N	-	-	-	7,0	1,020	-

Quadro 5: Verificações bioquímicas e de pH na urina dos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg.

-: ausência do item pesquisado

N: item em quantidade normal

A relação do peso corporal de cada animal pelo peso de seus órgãos (rim, fígado, baço e coração), foi apresentada na Tabela 2, sendo que não foram verificadas diferenças significativas nessa relação para nenhum órgão analisado.

Tabela 2: Relação peso dos órgãos/peso dos animais nos grupos controle negativo, positivo e grupos em que foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg.

Grupos	Rim	Fígado	Baço	Coração
Cont. -	0,0081±3,11	0,0355±0,0012	0,0024±3,5637	0,0040±8,2945
Cont. +	0,0080±6,65	0,0382±0,0049	0,0028±1,6431	0,0038±3,1205
20mg/kg	0,0079±5,06	0,0383±0,0011	0,0029±4,6583	0,0042±6,8920
40mg/kg	0,0077±9,03	0,0341±0,0033	0,0027±3,2863	0,0038±2,7748
80mg/kg	0,0080±2,34	0,0365±0,0018	0,0026±2,4899	0,0036±2,5884

Resultados em média ± DP, com ANOVA

4.5 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE *Vetiveria zizanioides*

O rendimento do óleo essencial foi de 0,2% e o rendimento do extrato etanólico bruto foi de 11,0%, sendo que as frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto tiveram rendimento de: 52,8% (fração hexano) 40,1% (fração diclorometano) 3,2% (fração acetato de etila) 3,8% (fração metanol/água 7:3).

Os resultados da CIM do óleo essencial, do extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol/água da raiz de *Vetiveria zizanioides*, testados contra os microrganismos descritos anteriormente no Quadro 1, encontram-se apresentados na Quadro 6.

Microrganismos	CIM/ OE	CIM/ EEB	CIM / H	CIM / D	CIM / Ac	CIM / M
Bactérias Gram-positivas						
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	0,30	0,39	0,78	12,5	25	>25
<i>Micrococcus roseus</i> (ATTC 1740)	0,07	0,19	0,39	3,12	12,5	>25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,15	0,39	0,39	6,25	12,5	>25
<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	0,15	0,39	0,39	6,25	12,5	>25
<i>Staphylococcus epidermides</i> (ATCC 12229)	0,30	1,56	3,12	25	>25	>25
Bactérias Gram-positivas esporuladas						
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC14576)	0,15	0,19	0,39	3,12	12,5	>25
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	0,15	0,39	6,25	6,25	12,5	>25
Bactérias Gram-negativas						
<i>Enterobacter cloacae</i> (HMA/FT 502)	9,62	>12,5	>25	>25	>25	>25
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	9,62	>12,5	>25	>25	>25	>25
<i>Escherichia coli</i> (8739)	9,62	>12,5	>25	>25	>25	>25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	9,62	>12,5	>25	>25	>25	>25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27483)	9,62	12,5	>25	>25	>25	>25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	9,62	12,5	>25	>25	>25	>25
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 14756)	9,62	>12,5	>25	>25	>25	>25
Levedura Gram-positiva						
<i>Candida albicans</i> (NTC 2010)	0,30	1,56	3,12	25	>25	>25

Quadro 6: Concentração inibitória mínima (CIM) (mg/mL) do óleo essencial (OE), extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (Ac) e metanol/água (M) da raiz de *Vetiveria zizanioides*

O óleo essencial da raiz de *Vetiveria zizanioides* analisado neste trabalho apresentou atividade antimicrobiana principalmente contra as bactérias Gram-positivas e *Candida albicans*. Com CIM de 0,07 mg/mL, o óleo essencial inibiu o crescimento de *Micrococcus roseus* ATTC 1740 e na CIM de 0,15 mg/mL inibiu o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC14576 e *Bacillus subtilis* 6633. CIM de 0,30 mg/mL foi obtida para inibir crescimento de *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermides* ATCC 12229 e

Candida albicans NTC 201. Em relação às bactérias Gram-negativas, houve inibição de crescimento na CIM de 9,62 mg/mL.

Para as bactérias Gram-positivas testadas, a CIM variou de 1,56 mg/mL até 0,19 mg/mL. Para bactérias Gram-negativas como *Enterobacter cloacae* HMA/FT 502, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* 8739, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Serratia marcescens* ATCC 14756, o extrato etanólico bruto na concentração de 12,5 mg/mL não mostrou atividade antibactimicrobiana. Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27483 e ATCC 9027 a CIM foi de 12,5 mg/mL.

CIM de 0,39 mg/mL foi observada para a fração hexano contra *Micrococcus roseus* (ATCC 1740), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC14576). Para os outros microrganismos Gram-positivos testados a CIM variou de 0,78 mg/mL a 6,25 mg/mL. Para as bactérias Gram-negativas não foi observado inibição de crescimento, nem mesmo na maior concentração testada.

Para a fração diclorometano a CIM de 3,12 mg/mL a 25 mg/mL foi obtida contra bactérias Gram-positivas. A fração diclorometano também não inibiu o crescimento dos microrganismos Gram-negativos.

A fração acetato de etila inibiu o crescimento de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Micrococcus roseus* (ATCC 1740), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (ATCC14576) e *Bacillus subtilis* (6633) em concentrações que variaram entre 12,5 mg/mL e 25 mg/mL. Esta fração também não inibiu o crescimento da *Candida albicans* e nem das bactérias Gram-negativas.

A fração metanol/água nas concentrações analisadas não inibiu o crescimento de nenhum microrganismo.

5. DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Vetiveria zizanioides*

Os heterosídeos digitálicos ou cardiotônicos possuem na sua estrutura química o núcleo fundamental do ciclopentano-per-hidrofenantreno, apresentando na posição C17 β uma lactona com quatro carbonos (cardenólidos) ou com cinco carbonos (bufadienólidos) (SIMÕES et al.2004).

Com a utilização de processos colorimétricos identificando partes da molécula do heterosídeo digitálico, fracionamento em coluna cromatográfica e revelação, foi possível confirmar indícios da presença deste heterosídeo na espécie *Vetiveria zizanioides*, apesar desse composto provavelmente estar presente nessa espécie em quantidade pequena, não sendo possível o isolamento e a identificação de qual digitálico estaria presente.

O doseamento de flavonóides mostrou um teor de 0,51% de flavonóides no extrato liofilizado e denota a concordância deste trabalho com a pesquisa de Champagnat et al. (2007), que estudando o gênero *Vetiveria*, isolou quatro flavonóides (carlinosídeo, neocarlinosídeo, 6,8-di-C-arabinopirasilluteolina e tricin-5-o-glucosídeo) tanto na espécie *Vetiveria zizanioides*, quanto de *Vetiveria nigrítana* e ainda o flavonóide isoorientina encontrado somente na espécie *Vetiveria zizanioides*. Os componentes carlinosídeo, neocarlinosídeo, 6,8-di-C-arabinopirasilluteolina e isoorientina foram isolados do extrato metanol/água das partes aéreas das espécies do gênero *Vetiveria*. O componente tricin-5-O-glucosídeo foi extraído do extrato etanólico das raízes das duas espécies do gênero *Vetiveria*.

O óleo essencial de *Vetiveria zizanoides* apresentou um rendimento de 0,2%, o que condiz com os resultados apresentados por Adams et al. (2004) que obtiveram rendimento de 0,35% para o óleo extraído da raiz cultivada em solo normal e rendimento de 0,02% para o óleo essencial extraído da raiz da planta cultivada em solo estéril. Pripdeevech et al. (2006) obtiveram rendimento de 0,27% de óleo essencial extraído da raiz de *Vetiveria zizanoides* cultivado em solo normal, 0,18% para o óleo da raiz do Vetiver cultivado com a adição de microorganismos e 0,06% de óleo essencial extraído da planta cultivada em semi-hidroponia.

Nessa pesquisa, o solo onde foi cultivado o vetiver foi considerado normal, sendo caracterizado como franco argiloso siltoso. A análise do pH mostrou que esse solo apresenta pH adequado, favorecendo o desenvolvimento da maioria das culturas. Quanto aos macronutrientes verificou-se uma baixa quantidade de alumínio, uma quantidade mediana de cálcio e maior quantidade de magnésio. A capacidade de troca catiônica foi entre 1-10, característica de um solo com alto teor de areia ou silte, sendo uma característica que mostra um solo com maior predisposição para lixiviação de nitrogênio e potássio e com baixa capacidade de retenção de água. A quantidade de matéria orgânica foi considerada normal o que é produtivo para a adequada circulação de água e ar no solo. A quantidade de argila foi considerada suficiente para reter a umidade de reserva no solo (LOPES, 1989).

O rendimento de 0,2% de óleo essencial da raiz de vetiver, coletado no mês de julho, apresentado neste trabalho, também vai de acordo com a pesquisa de sazonalidade realizada por Massardo et al. (2006), em que para o mês de julho foi encontrado um rendimento de 0,3% de óleo essencial.

Gobbo-Neto & Lopes (2007) relataram que variações na concentração dos metabólitos secundários podem ser influenciadas por mudanças nas condições ambientais. Estas mudanças poderiam se devido à sazonalidade, mudança no índice pluviométrico, diferenças no ritmo circadiano, diferenças de intensidades de radiações UV, mudanças na composição atmosférica, diferenças na altitude, temperatura, água e micronutrientes da planta, idade e também devido a diferentes ataques de patógenos.

Neste trabalho o componente majoritário foi o khusimol responsável por 12,86% da composição do óleo analisado. Resultado semelhante foi observado por Adams et al. (2004), que encontraram uma porcentagem de 24,6% de khusimol no óleo essencial da raiz de *V. zizanioides* cultivada em solo com bactérias e fungos e uma porcentagem de 11,5% de khusimol encontrado de óleo essencial extraído da raiz da planta cultivada em solo estéril. Massardo et al. (2006), fazendo um estudo de sazonalidade, observaram que o componente Khusimol foi produzido pela planta durante todos os meses do ano, apresentando uma variação em sua produção de 11,1 a 15,1%. Pripdeevech et al. (2006) cultivaram *V. zizanioides* em solo normal, solo com microrganismos (azospirillum, azetobacter fixadora de nitrogênio e outras bactérias) e em semi-hidroponia, observou o percentual de composição do componente khusimol de 11,11%; 3,55% e 12,21%, para os óleos essenciais de cada cultivo, respectivamente. Em um estudo realizado por Kim et al. (2005), observaram um percentual de 16,2% do componente khusimol em uma amostra de óleo essencial. Os resultados apresentados nesse trabalho, juntamente com os resultados apresentados pelos demais pesquisadores citados, mostram o componente khusimol como sendo um dos componentes majoritário e sempre

presente, independente do período da colheita e tempo de desenvolvimento da planta (MASSARDO et al. 2006) ou diferenças de cultivo (ADAMS et al. 2004, PRIPDEEVECH, et al. 2006). Esse dado permite considerar esse componente como um possível marcador de controle de qualidade do óleo essencial desta planta.

O segundo composto majoritariamente encontrado no óleo essencial da raiz da planta estudada nesse trabalho foi o palustrol, com 8,67%. Viljoen et al. (2002) realizaram um estudo de composição e atividade antimicrobiana com o óleo essencial de *Myronthamnus flabellifolius* e observou que o palustrol se apresentava nessa planta como um dos componentes minoritários, sendo que o óleo essencial dessa planta, na concentração de 0,0625% a 2%, exibia potente atividade fungicida contra *Candida albicans* e ação bacteriostática contra *Staphylococcus aureus*, sendo bactericida com relação dose-dependente. Massarany et al. (2008) estudando a composição química e atividade antimicrobiana de *Commiphora opobalsamum* L. observaram também nesta espécie a presença do composto palustrol dentre os compostos minoritários, sendo que o óleo essencial desta planta apresentou atividade contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida glabrata*, *C. crusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium intracellulare*.

Nesse trabalho, o composto químico khusimona, presente no óleo essencial da raiz de vetiver cultivado em solo sem tratamento adicional, representou 7,86% do total do óleo analisado, sendo um dos compostos encontrados majoritariamente. Essa maior proporção desse composto condiz com a pesquisa de Pripdeevech et al. (2006) em que, cultivando *V. zizanioides* em solo normal, solo com micróbios e em semi-hidroponia, observaram o

percentual de composição do componente khusimona de 20,57%, 6,13% e 20,91%, para os óleos essenciais de cada cultivo, respectivamente.

Um outro composto presente em quantidade significativa no óleo do vetiver foi o α -vetivona. Nessa pesquisa o composto vetivona está presente no óleo essencial com 4,81%. Esse resultado é condizente com os dados apresentados por Kim et al. (2005) em que o α -vetivona é um dos compostos majoritários do óleo essencial do *V. zizanioides*. Uma pesquisa realizada por Zhu et al. (2004) mostra que o óleo essencial de *V. zizanioides* apresentou ação contra a larva do cupim *Coptotermes formosannus* Shiraki e que o constituinte majoritário foi o α -vetivona.

5.2 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA DE *Vetiveria zizanioides*

A toxicidade das plantas pode parecer pequena se comparada a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, mas ao contrário, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública (CALIXTO, 2000; CUNHA, 2003; VEIGA JR et al., 2005).

O pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas pelo seu uso prolongado na própria espécie humana e que estas plantas seriam remédios eficazes e seguros, naturalmente balanceados, sem os efeitos colaterais comuns aos produtos sintéticos, não necessitando, portanto, da avaliação exigida para esse tipo de medicamento é um equívoco. Devemos ressaltar que as plantas medicinais são xenobióticos, isto é, produtos estranhos ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas e como todo corpo estranho, os produtos de sua

biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até prova em contrário (LAPA et al., 2004).

A OECD 423 informa que a toxicidade aguda manifesta-se imediatamente ou com até 14 dias após a exposição de uma dose única de um xenobiótico por injeção oral. Valadades (2006) relata que testes que avaliam a toxicidade aguda seriam utilizados para classificar substâncias de acordo com seu potencial de letalidade, verificar a toxicocinética, identificar os órgãos alvos da substância em estudo, bem como gerar um banco de dados para seleção de doses em testes subseqüentes de toxicidade.

O indício da presença de heterosídeos digitálicos no vetiver cultivado e utilizado no Hospital de Medicina Alternativa, apontada por ALENCAR et al. 2005, foi de relevante preocupação, visto que a toxicidade e as reações adversas dos digitálicos, administrados por via oral, seriam causadas por uma concentração apenas duas vezes a concentração terapêutica, sendo sempre uma relação dose-dependente (RATES e BRIDI, 2004).

Além do efeito próprio do digitálico outro efeito preocupante é a ingestão de plantas que contenham heterosídeos digitálicos juntamente com outros medicamentos, potencializando o efeito, podendo ocasionar toxicidade. Ervas com propriedades cardiotônicas ou anti-hipertensivas podem agir sinergicamente com fármacos vasodilatadores das coronárias à base de nitratos (como o dinitrato de isosorbida) e com bloqueadores de canais de cálcio (como a nifedipina) (VEIGA JR et al, 2005).

Nesse estudo foi observado que a dose de 2000 mg/kg utilizada no teste, não causou morte em nenhum dos animais. As alterações comportamentais observadas durante os primeiros 10 minutos foram devidas

provavelmente ao estresse da administração dos extratos e dos controles. Nos demais períodos de observação não foram verificadas alterações comportamentais sendo que foram atribuída pontuação zero para todos os itens avaliados durante a realização do *screening* hipocrático.

Na avaliação da toxicidade aguda dose única, por via oral, em ratos, o extrato direcionados para digitálico e o extrato aquoso liofilizado de *Vetiveria zizanioides*, foram classificados na classe 5, ou seja, substância de muito baixa toxicidade, segundo diretrizes da OEDC-423.

Apesar de a investigação fitoquímica ter relatado indícios da presença do heterosídeos digitálicos, nem mesmo o extrato direcionado para digitálicos foi suficiente para causar alterações tóxicas significativas próprias dos digitálicos, sendo que esses compostos poderiam estar presentes em pequena quantidade. As alterações causadas pela intoxicação por digitálicos poderiam ser de origem nervosa, ocorrendo depressão do sistema nervoso central, observando letargia; gastroenterites como anorexia, vômito, diarreia; e cardíacas, levando a arritmia cardíaca (SPINOSA, 1999).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DIURÉTICA

Os diuréticos são lembrados como agentes que aumentam o volume da urina eliminada. É importante, entretanto, compreender que tais drogas fazem mais do que, simplesmente, aumentar a quantidade de água excretada. Na verdade, a ação terapêutica mais importante dos diuréticos, em termos clínicos, está intimamente relacionada com uma alteração na capacidade de secreção e ou de reabsorção de eletrólitos pelo rim (FRIEDMAN e BERNDT, 2004).

De forma geral, 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 de água e sal. Os grupos que atuam diretamente nos túbulos são os diuréticos de alça, ou seja, age na alça de Henle, porção ascendente; os tiazídicos que atuam no túbulo distal; os diuréticos poupadores de potássio que atuam nos receptores da aldosterona nos túbulos distais e os inibidores da anidrase carbônica, que inibem esta enzima nas células dos túbulos proximais. Os grupos que modificam o filtrado são os diuréticos osmóticos que são compostos de substâncias hidrofílicas que retêm água por pressão osmótica (FRIEDMAN e BERNDT,2004).

A furosemida, utilizada nesse experimento como controle positivo, é um composto conhecido como diurético de alça ou de alta potência, sendo um dos agentes mais eficazes na indução de excreção de água e eletrólitos. O principal sítio de ação dos diuréticos de alça é o ramo ascendente espesso da alça de Henle, e a diurese é causada pela inibição do transporte de sódio, potássio e cloreto (FRIEDMAN e BERNDT,2004).

Tendo em vista que Melo (2005) sugere uma dose de 40 mL do decocto para administração em humano, considerando um humano adulto de 70 kg e mantendo as devidas proporções de peso médio de 200 g para os animais, foi estipulado uma dose de 2 mg/kg para cada rato, o que foi extrapolado a uma proporção de 10 vezes o valor dessa dose, sendo então administrados as doses de 20 mg/kg, 40mg/kg e 80 mg/kg.

Nas doses testadas, o volume urinário excretado pelos animais tratados com o extrato liofilizado da raiz de *Vetiveria zizanioides* não sofreu alteração significativa em seu volume.

O volume urinário excretado pelos animais tratados com a furosemida, nos diferentes intervalos de tempos, apresentou um pico de volume nas primeiras duas horas após a administração, com diminuição do volume desse nas horas seguintes. Os resultados observados com a administração da furosemida condizem com o perfil de ação desta droga (FRIEDMAN e BERNDT, 2004).

Na avaliação de excreção dos eletrólitos, com a administração nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg do extrato liofilizado de *Vetiveria zizanioides*, não foi possível observar aumento significativo de excreção de sódio, potássio ou cloreto na urina dos animais.

Em relação ao controle-positivo, nas dosagens bioquímicas de sódio, potássio e cloretos na urina de 24 horas, foram observados aumentos significativos em suas concentrações. Este perfil bioquímico condiz com o perfil de excreção de eletrólitos causado pela administração da furosemida. A perda de potássio na urina constitui um efeito não desejável para o diurético, sendo que uma grande depleção de potássio constitui um dos mais perigosos efeitos adversos dos diuréticos (IBRAHIM et al., 2007; BOSE et al., 2007).

Nas dosagens bioquímicas dos eletrólitos no plasma não foi observado aumento na concentração de sódio, potássio ou cloreto quando da administração dos extratos ou da furosemida. O resultado da não alteração dos níveis de eletrólitos no sangue é um resultado favorável visto que os diuréticos deveriam promover sua ação sem alterar o equilíbrio eletrolítico do sangue.

Em relação à uréia e creatinina na urina de 24 horas, foi observado um aumento significativo de excreção de uréia e creatinina quando da administração da furosemida. Este aumento possivelmente decorre do aumento do volume urinário excretado em 24 horas quando da administração desse diurético de alça de alte potência.

No plasma sangüíneo não foi observado aumento da concentração de uréia ou creatinina quando da administração da furosemida ou dos extratos nas diferentes concentrações. Esse dado é importante, pois é um resultado que sugere uma adequada atividade renal.

Nos testes bioquímicos realizados com as tiras reativas, não foi observado a presença de hemoglobina ou de eritrócitos, a quantidade de urobilinogênio foi considerada normal, não foi detectada a presença de bilirrubina, cetonas, glicose e leucócitos, sendo que o pH e a densidade estavam com valores dentro da normalidade.

Estatisticamente não houve diferenças significativas entre os pesos dos órgãos dos animais (rim, fígado, coração e baço), relativo ao peso corpóreo dos mesmos.

Os resultados apresentados por este trabalho são importantes para o direcionamento de novas pesquisas, pois apesar de o efeito diurético não ter sido confirmado com as doses administradas neste experimento, não se pode descartar a possibilidade de atividade diurética de *Vetiveria zizanioides*, sendo que outros testes poderão ser realizados para avaliar a atividade desta planta ou mesmo realizar o mesmo experimento sendo administrado doses mais elevadas de extrato.

A presença de flavonóides no extrato liofilizado de *Vetiveria zizanioides* levanta mais uma argumentação em prol da necessidade da realização de novos experimentos para investigar o efeito diurético desta planta, visto que muitos pesquisadores comprovaram a ação diurética de outras plantas que apresentavam flavonóides em sua constituição.

Jouad et al. (2001) observaram que a administração diária de uma mistura de flavonóides de *Spergularia purpurea* Pers. em ratos causou aumento do volume urinário excretado, aumento na concentração de sódio, potássio e cloretos na urina excretada, além de comprovado efeito na diminuição da pressão arterial destes ratos.

Um estudo realizado por Mamun et al. (2003) revelou atividade diurética causado pela administração do extrato metanólico de *Ipomoea aquatica* (Kalmisak) em ratos, sendo que esta planta apresenta o flavonóide quercetina em sua constituição. Xiao et al. (2005) investigando atividades biológicas de *Marchantia convoluta* observou grande potencial diurético nesta planta, sendo a mesma rica em flavonóides como a quercetina, luteolina, apigenina e seus O- e C- glicosídeos. A espécie *Coriandrum sativum* L., também rica em flavonóides como a quercetina e isoquercetina também mostrou potencial diurético e salurético quando da administração intravenosa do extrato aquoso desta planta (AISSAOUI et al., 2008).

Na espécie *Osthosiphon stamineus* Benth. foram encontrados flavonóides (sinesetina e eupatorina) e derivados do ácido caféico (ácido rosmarínico e ácido chicórico) (ARAFAT et al. 2008). Efeitos de atividade diurética e diminuição do quantitativo de ácido úrico eliminado na urina de ratos, quando da administração de extrato hidroalcoólico de *Osthosiphon*

stamineus Benth., foram observados por Olah et al. (2003). Em outro estudo com *Osthosiphon stamineus* Benth., extratos obtidos por extração com metanol puro e metanol:água (1:1), foram administrados em diferentes doses por um período de sete dias em ratos, sendo que o extrato obtido pela extração por metanol:água (1:1) e administrado na dose de 2 g/kg, apresentou maior potencial diurético e melhores resultados na diminuição do ácido úrico eliminado na urina de ratos (ARAFAT et al., 2008).

Por fracionamento e processos de cromatografia, Ibrahim et al. (2007) conseguiram isolar oito componentes da espécie *Chenopodium album* L. e mais oito componentes da espécie *Chenopodium murale* L. Todos os componentes isolados foram flavonóides sendo que o extrato alcoólico destas plantas, testados quanto às suas propriedades diuréticas, mostraram importante potencial diurético com aumento significativo de excreção de sódio e potássio na urina excretada.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Vetiveria zizanioides*

O teste de diluição em ágar tem caráter quantitativo, sendo possível determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações, frente a um conjunto de microrganismos, conforme recomendado pelo NCCLS (2003).

Apesar de pesquisas admitirem determinados valores para CIM como representativos, devido às variações na determinação CIM, muitos autores divergem quanto ao nível de inibição aceitável para produtos naturais. Dentre estas variações podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da colheita, se os extratos foram

preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada (FENNEL et al. 2004)

Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para produtos vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição – CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição – CIM acima de 1600 µg/mL. Holetz et al. (2002) consideram que se um extrato apresenta CIM menor que 100 µg/mL, a atividade antimicrobiana é considerada boa, CIM de 100 a 500 µg/mL seria uma atividade antibacteriana moderada; de 500 a 1000 µg/mL uma atividade antibacteriana pobre, sendo que acima de 1000 µg/mL a atividade antibacteriana não seria considerada.

O óleo essencial da raiz de *Vetiveria zizanioides* cultivado no Hospital de Medicina Alternativa, apresentou atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas. A CIM do óleo essencial frente a duas cepas de *S. aureus* foi de 0,15 mg/mL. Esse dado foi similar aos apresentados por Hammer et al. (1999) e Putiyanan et al. (2005).

O óleo essencial na concentração de 0,07 mg/mL inibiu o crescimento de *Micrococcus roseus*, na concentração de 0,15 mg/mL inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* e na concentração de 0,30 mg/mL inibiu o crescimento de *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

Mesmo considerando a sugestão de Fennel et al. (2004) em que expõe a dificuldade de se estabelecer um critério para padronização para produtos naturais devido às variações, esse trabalho demonstrou que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Vetiveria zizanioides* apresentou, dentro da classificação de Aligianis et al. (2001), forte atividade para inibir o crescimento

de cepas de *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*, e atividade moderada para inibir o crescimento das mesmas bactérias segundo a classificação de Holetz et al. (2002). O extrato etanólico bruto, dentro da classificação de Aligianis et al. (2001), se mostrou com forte atividade para inibir o crescimento de cepas de *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, sendo que pela classificação de Holetz et al. (2002) a atividade para inibir o crescimento das mesmas bactérias foi considerada moderada.

A descoberta de compostos com atividade antibacteriana é de grande importância visto a gravidade de doenças infecciosas causadas por esses agentes. *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* são bactérias formadoras de esporos, podendo sobreviver no ambiente sob condições hostis. O *Bacillus subtilis* é normalmente um microrganismo não patogênico, mas o *Bacillus cereus* é responsável por duas formas distintas de intoxicação alimentar com sintomas como vômito e diarreia. Este mesmo patógeno também está associado com infecções oculares tais como ceratites, endoftalmite e panoftalmite. Essa bactéria ainda tem sido associada a infecções localizadas e infecções sistêmicas, incluindo endocardite, meningite, osteomielite e pneumonia (JAWETZ et al. 1995).

Em relação ao *Staphylococcus aureus*, quase todos os indivíduos apresentam algum tipo de infecção por *S. aureus* durante sua vida, cuja gravidade vai desde uma infecção alimentar ou infecção cutânea de pouca importância até infecções graves potencialmente fatais. Um exemplo é a osteomielite, em que o foco principal de crescimento de *S. aureus* consiste

tipicamente num vaso sanguíneo terminal da metáfase de um osso longo, resultando em necrose do osso e supuração crônica. *S. aureus* pode causar pneumonia, meningite, empiema, endocardite ou sepse com supuração em qualquer órgão. A infecção de feridas cirúrgicas por *S. aureus* é um problema comum em hospitais e sua habilidade em desenvolver resistência a antibióticos contribui para aumentar o risco de pacientes em ambientes hospitalares (JAWETZ et al. 1995).

A ausência de atividade inibidora, do extrato etanólico bruto da raiz de *Vetiveria zizanioides* sobre bactérias Gram-negativas, pode estar relacionada com a membrana externa dessas bactérias, pois essa membrana poderia agir como uma barreira contra as substâncias ativas presentes no extrato (URZUA et al. 1998).

O resultado do teste de atividade antimicrobiana para o extrato etanólico bruto mostrou maior sensibilidade se comparado com os resultados dos testes antimicrobianos realizado nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol/água. Este resultado se deve provavelmente pelo fato de os compostos do extrato etanólico bruto estarem agindo sinergicamente, apresentando melhor ação do que quando do teste com as frações.

A fração hexano apresentou maior ação antimicrobiana, seguida pela fração diclorometano, acetato de etila e posteriormente fração metanol/água que não apresentou ação. A avaliação antimicrobiana com a fração hexano mostra que os componentes mais bioativos seriam compostos com menor polaridade, sendo que estes resultados estão de acordo com a pesquisa realizada por Luqman et al. (2005), que apresentaram CIM para a fração hexano das raízes de *Vetiveria zizanioides* variando de 0,5 a 60 mg/mL.

6. CONCLUSÕES

Na raiz de *Vetiveria zizanioides* cultivada no HMA/SES-GO foi confirmada indícios da presença de heterosídeos digitálicos, provavelmente em quantidade pequena, o que impossibilitou a identificação. Também foram revelados compostos terpenóides e/ou saponinas, flavonóides e ácido fenólico. No extrato liofilizado foi encontrado flavonóides no teor de 0,51%.

Na análise dos compostos químicos do óleo essencial extraído da raiz de *Vetiveria zizanioides* foi possível verificar que os compostos majoritários foram o khusimol, o palustrol, o khusimona, o epi-zizanona e o α -vetivona.

Os testes de toxicidade aguda, para avaliar a segurança da utilização de fitoterápicos a base de *Vetiveria zizanioides* por via oral, mostraram que os extratos desta planta apresentam toxicidade muito baixa, classe 5, de acordo com a classificação de OECD 423. Estes estudos constituem resultados importantes para o direcionamento de novos estudos de toxicidade em que outras espécies de animais poderão ser testadas e também a realização de estudos para avaliação de toxicidade em tratamento crônico.

O extrato aquoso liofilizado das raízes da espécie *Vetiveria zizanioides* não apresentou ação diurética nas doses avaliadas neste experimento.

O potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Vetiveria zizanioides* foi considerado relevante, principalmente devido à ação contra *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao extrato etanólico bruto, este se mostrou mais eficiente se comparado com a ação das frações hexano, diclorometano, acetato e metanol/água isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illions: Alured Publishing Corporation, 2007

ADAMS, R. P.; HABTE, M.; PARK, S.; DAFFORN, M. R. Preliminary comparison of root essential oils from cleansed (bacteria-and fungus-free) versus non-cleansed (normal) Vetiver plants. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 32, p. 1137-1144, 2004

AISSAOUI, A.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute diuretic effects of continuous intravenous infusion of an aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. in anesthetized rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 89-95, 2008

ALENCAR, R. G.; PRADO, C. C.; OLIVEIRA, L. M. G.; FREITAS, M. R. F.; SILVA, L. N. M.; NOGUEIRA, J. C. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; Estudo farmacobotânico e fitoquímico da raiz de *Vetiveria zizanioides* L. Nash (vetiver). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 1-4, 2005

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOUE, I. B.; Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, p. 4168-4170, 2001

AMOROSO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasileira** v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002

ARAFAT, O. M.; THAM, S. Y.; SADIKUM, A.; ZHARI, P. J.; ASMAWI, M. Z. Studies on diuretic and hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 354-360, 2008

BARBOSA, M.A. **A fitoterapia como prática de saúde - O caso do Hospital de Terapia Ayurvedica de Goiânia**. 1990. 130 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem Anna Nery, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

BOSE, A.; GUPTA, J. K.; DASH, G. K.; GHOSH, S. S.; PANDA, D. S. Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma* D.C. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2007

BRASIL, 2006a. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006- Dispõe sobre política nacional de práticas integrativas e complementares no sistema único de saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.

BRASIL, 2006b. Decreto nº 5.813, de 22 de julho de 2006- Dispõe sobre política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.

BRASIL, 2006c. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Plantas Medicinais: orientações gerais para o cultivo. Brasília, 47 p.

BRITO, A.R.M.S. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, p. 131-138, 1996

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p.179-189, 2000

CARNEIRO, D. M. **Ayurveda: saúde e longevidade**. Ed. UFG: Goiânia, 2007. 281p

CECHINEL FILHO, V., Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, p.680-685, 2000

CHAMPAGNAT, P; FIGUEREDO, G.; CHALCHAT, J.C.; CARNAT, A. P.; BESSIERE, J. M. A study on the composition of commercial *Vetiveria zizanioides* oils from different geographical origins. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 4, p.416-422, 2006

CHAMPAGNAT, P.; HEITZ, A.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; CARNAT, A. P.; LAMAISON, J. L. Flavonoides from *Vetiveria zizanioides* and *Vetiveria nigritana* (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 68-70, 2007

CHOPRA, C. S. R. N.; CHOPRA, I. C.; HANDA, K. L.; KAPUR, L. D. **Indigenous Drugs of Índia**. Calcutta: Academic Publishers. 3 ed., 1982

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, 1984

COSTA, A. F. **Farmacognosia** 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3, 2001

COSTA, T. S.; PELAIS, A. C. A.; CORRÊA, N. C. F.; FRANÇA, L. F.; MARQUES, M. O. M. Avaliação da extração de óleos essenciais de vetiver (*Vetiveria zizanioides*) com CO₂ supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais de Botucatu**, v.8, n.4, p.100-103, 2006

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R.; **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 2003

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias bioativas , In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. p. 108-122

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Editora Atheneu, IV ed, 1 fascículo, parte 2, p.30, 1996

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Editora Atheneu, IV ed, 4 fascículo, parte 2, p.176, 2002

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Editora Atheneu, IV ed, 6 fascículo, parte 2, p.194, 2004

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MC GAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; VAN STANDEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacol.** v. 94, p.205-217, 2004

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

FRIEDMAN, P. A.; BERNDT, W. O. Fármacos Diuréticos. In; CRAIG, R. C.; STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna.** Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 2004, p.223-237

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002

HUANG, J.; LI, H.; YANG, J.; LIU, Y.; LI, N.; NIE, C. Chemical components of *Vetiveria zizanioides* volatiles. **The Journal of Applied Ecology**, v. 15, n. 1, p. 170-172, 2004

IBRAHIM, L. F.; KAWASHTY, S. A.; BAIUOMY, A. R.; SHABANA, M. M.; EL-ERAKY, W. I.; EL-NEGOUMY, S. I. A comparative study of the flavonóides and some biological activities of two *Chenopodium* species. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 1, p. 24-28, 2007

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995. p. 146-150

JOUAD, H.; LACAILLE-DUBOIS, M. A.; LYOUSSE, B.; EDDOUKS, M. Effects of the extracted from *Spergularia purpurea* Pers. On arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 159-163, 2001

KIM, H. J.; CHEM, F.; WANG, X.; CHUNG, H. Y.; JIN, Z. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7691-7695, 2005

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethinomedicine**, v. 45, n. 2, p. 1-11, 2006

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 13, n. 3, p. 1-12, 2007

LAPA, E. J. SOUCCAR, C. LIMA-LANDMAN, M. T. R. GODINHO, R. O. THEREZA, C. M. L. N. Farmacologia e toxicologia de Produtos Naturais, In:

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. p. 247-262

LOPES, A. S. **Manual de fertilidade do solo**. São Paulo: Editora ANDA/POTAFOS, 1989. p. 17-19 e 142-145

LUQMAN, S.; SRIVASTAVA, S.; DAROKAR, M. P.; KHANUJA, S. P. S. Detection of antibacterial activity in spent root of two genotypes of aromatic grass *Vetiveria zizanioides*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n.8, p.732-736, 2005

MACIEL, M. A. M.; PINTO A. C.; VEIGA JUNIOR, F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. **A hipocratic screen for pure or crude drug materials**. *Lloydia*, p. 320-332, 1962

MAMUN, M. M.; BILLAH, M. M.; ASHEK, M. A.; AHASAN, M. M.; HOSSAIN, M. L.; SULTANA, T. Evaluation of diuretic activity of *Ipomoea aquatica* (Kalmisak) in mice model study. **Journal of Medicine Science**. v. 3, p.395-400, 2003

MARTINEZ, L.; ROSA, P. T. V.; MENUT, C.; LEYDET, A.; BRAT, P.; PALLET. D.; MEIRELES, M. A. A.; Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6578-6584, 2004

MASSARDO, D. R.; SENATORE, F.; ALIFANO, P.; GIUDICE, L. D.; PONTIERI, P. Vetiver oil production correlates with early root growth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 376-382, 2006

MASSARANY, S. M.; ABBAS, F. A.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C.; KHAN, S. I.; AI-REHAILY, A. J.; MOSSA, J. S.; ABOURASED, E. A. Chemical composition and biological evaluation of the essential oil of *Commiphora*

opobalsamum L. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 13, n. 4, p. 107-117, 2008

MELO, D. M. **Curso de fitoterapia ayurvédica**. Goiânia, v. 1, 2005

METHACANON, P.; CHAIKUMPOLLERT. O.; THAVORNITI. P.; SUCHIVA. K. Hemicellulosic polymer from Vetiver grass and its physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 335-342, 2003

MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais, **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001

MORAIS, R. G.; GUARIM NETO, G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato grosso: um estudo bibliográfico, **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 4, p.561-584, 2003

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline 423: Acute Oral Toxicity: Modified Up-and-Down Procedure, 2001

OLAH, N. K.; RADU, L. MOGOÇAN, C. HANGANU, D. GOCAN. S.; Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) hydroalcoholic extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 117-123, 2003

PARMAR, M. Y.; SHAH, P. A.; THAKKAR, V. T. GANGHI, T. R. Hepatoprotective activity of *Vetiveria zizanioides* Linn. Against ethanol-induced liver damage in rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 16 (supl.), p. 216-221, 2008

PINTO, C. A. ; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. v.25, supl. 1, p. 45-61, 2002

PRIPDEEVECH, P.; WONGPORNCHAI, S.; PROMSIRI, A. Highly volatile constituents of *Vetiveria zizanioides* root grown under different cultivations. **Molecules**. V. 11, p. 817-826, 2006

PUTIYANAN, S.; NANTACHIT, K.; BUNCHOO. M.; KHANTAVA, B.; KHAMWAN, C.; Pharmacognostic indentification and antimicrobial activity of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash root. **Chiang Mai Med Bull**, v. 44, n. 3, p. 85-90, 2005

RATES, S. M. K. & BRIDI, R. Heterosídeos Cardíacos, In: SIMÕES, C. M. O. etAL. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. p. 685-710

REIS M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais, In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. p. 45-74

ROLIN, A.; OISHI, T.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, U. R. Total flavonóides quantification from O/W Brazilian plants. **Journal of Pharmaceutic**, v. 208, p. 107-114, 2006

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2004

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de Laboratório. Disponível em: <www.cobea.org.br>. Acesso em 09 de junho de 2008

SPINOSA, S. H. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª ed, 1999, p. 251-265

SRIDHAR, S. R.; RAJAGOPAL, R.R.; MASILAMANI, S.; NARASIMHAN, S. Antifungal activity of some essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 51, p. 7596-7599, 2003

STEERS, E. FOLTZ, E. L. GRAAVES, V. S. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiotic Chemoterapy**, v. 9, p. 37- 311, 1959

STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9. Disponível em:<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>>. Acesso em 09 de setembro de 2008

SUDS, 1988. Coordenação de Práticas de Saúde Não Alopáticas. Divisão de Fitoterapia. Curso de Fitoterapia Através da Metodologia Ayurvrdica. Goiânia.

URZUA, A.; CAROLI, M.; NASQUEZ, L.; MENDONZA, L.; WIKENS, M.; TOJO, E. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacol**, v. 62, p. 251-254, 1998

VALADARES, C. M.; Avaliação da toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed Gas-Liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963

VEIGA JUNIOR, F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VILJOEN, A. M.; KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; KEELE, D.; ROLING, E.; VUUREN, S.; DEMIRCE, B.; BASER, K. H. C.; WYK, B. E. The composition and antimicrobial activity of the oil of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. **South African Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 100-105, 2002

XIAO, J.; JIANG, X.; CHEN, X. Antibacterial, anti-inflammatory and diuretic effect of flavonóides from *Marchantia convoluta*. **African Journal of Tradicional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 2, n. 3, p. 244-252, 2005

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

WEBERLING, F.; SCHWANTES, H. O.; **Taxonomia Vegetal**. Tradução da 4^a ed Alemã. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, p. 121-125,1986.

WAGNER, H.; BLADT, S. PLANT DRUG ANALYSIS: **A thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Germany: Springer, 2001

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; SPLITTGERBER, U.; WOLF, D. 1,7-Cyclogermacra-1 (10), 4-dien-15-al, a sesquiterpeno with a novel skeleton, and other sesquiterpenos from Haitian Vetiver oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 2, p. 61-83, 2000

ZHU, B. C. R.; HENDERSON, G.; CHEN, F. FEI, H. LAINE, R. A. Evaluation of vetiver oil and severan insect-active essencial oils against the Formosan subterranean termite. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 8, p. 1617-1625, 2004

APÊNDICE A – Tabela 3

Tabela 3: Volume urinário excretado nos intervalos determinados e volume total excretado em 24 horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas concentrações de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg.

Grupo	1h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	Total
Cont. -	-	1.5	0.5	1.2	0.8	1.0	6.0	11.0
Cont. -	-	-	0.2	0.2	-	0.3	5.0	5.7
Cont. -	-	-	-	1.5	-	1.0	5.0	7.5
Cont. -	-	-	1.0	-	-	1.0	8.0	10.0
Cont. -	-	-	-	0.8	-	6.2	13.0	20.0
Cont. +	0.2	0.9	0.2	3.0	1.7	6.0	13.3	25.3
Cont. +	3.0	9.7	1.3	2.0	1.0	8.0	35.0	60.0
Cont. +	0.2	4.6	0.5	-	0.7	4.0	6.0	16.0
Cont. +	1.0	3.0	1.0	-	4.7	5.8	17.0	32.5
Cont. +	-	1.1	0.4	1.0	1.3	4.2	10.0	18.0
20mg/kg	0.2	-	0.2	0.2	-	0.9	13.0	14.5
20mg/kg	-	2.0	-	0.6	0.5	1.2	11.0	15.3
20mg/kg	-	-	0.5	0.2	-	2.2	10.0	12.9
20mg/kg	-	2.0	-	1.7	-	2.5	20.0	26.2
20mg/kg	0.2	-	-	0.2	0.2	0.9	8.0	9.5
40mg/kg	-	-	0.2	0.2	1.3	1.9	12.0	15.6
40mg/kg	-	-	-	0.6	0.6	2.9	17.0	21.1
40mg/kg	-	-	-	0.2	0.7	3.7	17.0	21.6
40mg/kg	-	1.5	-	0.9	-	1.4	10.0	13.8
40mg/kg	0.2	-	-	0.5	-	0.4	16.0	17.1
80mg/kg	-	-	0.7	0.9	-	1.9	9.0	12.5
80mg/kg	-	-	-	1.3	0.2	1.5	12.0	15.0
80mg/kg	-	0.5	0.5	1.5	-	3.0	17.0	22.5
80mg/kg	-	-	-	-	1.1	0.7	23.2	25.0
80mg/kg	-	-	-	-	-	3.0	17.0	20.0

APÊNDICE B – Tabela 4

Tabela 4: Dosagens bioquímicas de uréia, creatinina e eletrólitos no soro e urina em mg/24 horas nos grupos controle negativo, positivo e grupos onde foram administrados os extratos de *Vetiveria zizanioides* nas concentrações de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg.

Grupo	Soro (mmol/L)				
	Uréia	Creat.	Na	K	Cl
Contr. -	38,2 ±7,46	0,58 ±0,083	170,5 ±14,27	4,77 ±0,71	130 ±5,78
Contr. +	36,8 ±7,32	0,56 ±0,089	156 ±16,80	4,48 ±0,47	134,4 ±3,36
20mg/kg	41,8 ±3,11	0,54 ±0,054	180 ±14,21	5,10 ±1,00	127,6 ±10,21
40mg/kg	34,4 ±4,82	0,54 ±0,054	176,4 ±11,92	6,40 ±0,81	131,0 ±7,31
80mg/kg	37,8 ±7,19	0,66 ±1,014	185 ±33,56	7,10 ±5,35	135,8 ±19,22
Grupo	Urina (mg/24horas)				
	Uréia	Creat.	Na	K	Cl
Contr. -	2815,02 ±1471,11	48,76 ±25,12	28,98 ±17,28	64,68 ±33,66	58,88 ±30,78
Contr. +	15198,63 ±11201,57**	251,06 ±198,03**	137,74 ±102,27**	398,00 ±330,07**	238,46 ±111,00**
20mg/kg	4642,20 ±687,90	80,71 ±9,27	36,73 ±13,37	98,35 ±29,24	94,37 ±32,80
40mg/kg	3854,25 ±437,51	68,87 ±16,52	38,18 ±8,81	92,23 ±23,00	119,24 ±31,82
80mg/kg	5085,35 ±1103,92	78,89 ±9,26	48,63 ±7,51	111,91 ±32,61	141,44 ±34,83

Resultados em média ± DP; n=5, *p<0,05 e p**<0,01, análise de Dunnett comparando com controle negativo.



ANEXO: A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

PROTOCOLO Nº
062/08

PARECER CONSUBSTANCIADO

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino)

PROJETO DE PESQUISA

II - Identificação:

☐ **Título do projeto:**

- **Avaliação da Atividade Diurética e Estudo de Toxicidade Aguda Método de Classe da Raiz de *Vetiveria zizanioides* L. Nash (Poaceae)**

☐ **Pesquisador (es) Responsável(veis):**

- Gilvana Cristina de Barros – Mestranda - FF/UFG

☐ **Pesquisadores Participantes:**

- Profª. Drª. Maria Tereza Freitas Bara - Orientadora
- Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
- Liuba Laxos Pucci (Mestranda)
- Marcelo de S. Vieira (Mestrando)

☐ **Instituição onde será realizado:**

- LPPN – LABORATÓRIO DE PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS DA FACULDADE DE FARMÁCIA - UFG
- NEPET- NUCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS TÓXICO-FARMACOLÓGICAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA-UFG

☐ **Data de apresentação ao CEP: 05/05/2008**

III - Objetivos e justificativa do projeto:

O presente projeto objetiva avaliar a atividade diurética e a toxicidade aguda oral de *Vetiveria zizanioides* L. Nash (Poaceae) e determinar o perfil de toxicidade aguda do extrato aquoso e do extrato diclorometano/isopropanol (3:2) da raiz de *Vetiveria zizanioides* L. Nash em ratos visando obter informações confiáveis e extrapoláveis para humanos.

IV - Sumário do projeto:

☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:**

- Não há discussão sobre métodos alternativos, entretanto os pesquisadores afirmam que, por ser um estudo em fase pré-clínica, a alternativa mais viável para a sua execução é utilizar animais de laboratório uma vez que a literatura científica admite equivalência farmacológica entre as doses em animais e no homem.

☐ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):**

- Ratos Wistar - oriundos do biotério da UNICEUB (Brasília-DF)
 - 25 animais, normotensos, pesando, em média 200g, não isogênicos (teste de diurese)



PARECER CONSUBSTANCIADO

 PROTOCOLO Nº
062/08

- 24 animais, machos (**teste de toxicidade aguda**)
 - Os animais serão distribuídos em cinco grupos contendo cinco animais cada (teste diurese);
 - Seis animais por dose teste, sendo três para o extrato aquoso e três para o extrato dicloro/isopropanol (3:2) (**toxicidade aguda**).
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do Ambiente (ar, temperatura, umidade), Alimentação/hidratação:**
- Os animais serão permanecerão no biotério do NEPET
 - Serão alimentados com ração Labina (Purina) e receberão água filtrada à vontade
 - O ambiente possui temperatura controlada $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 50 – 70% além de monitoramento do ciclo claro-escuro de 12h cada.
 - Para o estudo da ação diurética os animais serão mantidos, isoladamente, em gaiolas semi-metabólicas suspensas (25×15×17cm), de aço inoxidável e fundo de grade, nas quais será possível monitorar o consumo de água, a variação de peso e a produção de urina.
 - Para o estudo da toxidade aguda, os ratos ficarão acondicionados em gaiolas de polipropileno (42×34×17cm), três por gaiola. A maravalha utilizada para forrar as gaiolas será autoclavada.
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada:**
- Não utilizado.
- ❑ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:**
- A metodologia foi apresentada de forma criteriosa e adequada corpo do projeto (item 8) e no item 09 do protocolo. Entretanto cabe ressaltar alguns aspectos:
 - É interessante indicar as doses dos fármacos utilizados para anestesia dos animais.
- ❑ **Método de eutanásia:**
- Todos os ratos serão submetidos à eutanásia por deslocamento cervical sob anestesia com solução de xilazina-cetamina, por via intraperitoneal.
 - **Não foram apresentadas as doses destes fármacos utilizados.**
 - Se sinais de toxicidade forem aparentes, o período de observação poderá ser estendido, entretanto os pesquisadores comprometem-se a não prolongar desnecessariamente o sofrimento dos animais
- ❑ **Destino do animal:**
- Ao final do experimento os animais serão descartados em recipientes adequados localizados nas dependências do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTESP da UFG e serão posteriormente coletados por empresa especializada contratada pela Universidade, que se comprometerá a incinerar os animais mortos.

IV – Comentários do relator frente às orientações do COBEA

O protocolo está bem alicerçado e apresenta todos os itens pertinentes à avaliação ética.

- As considerações feitas no corpo deste parecer devem ser consideradas como sugestões a serem acatadas quando da confecção de novos protocolos para submissão a este Comitê.

P/UFMG

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO Nº
062/08

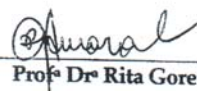
- ☐ Estrutura do protocolo:
 - o Estrutura apresentada de forma adequada.
- ☐ Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:
 - o O sofrimento imposto aos animais foi considerado bem como as atitudes a serem tomadas para minimizá-lo.
- ☐ Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:
 - o Os riscos (físicos, biológicos, químicos, psicológicos e sociais) inerentes à metodologia estão previstos no protocolo bem como os métodos utilizados para que sejam evitados.
- ☐ Necessidade do número de animais:
 - o O número de animais é justificado no protocolo/projeto, considerando a OECD 423 (TESTE DE CLASSE) e a protocolo estabelecido pela Sociedade Brasileira de Medicina Experimental.

V - Parecer do CEP:

De acordo com a documentação apresentada a este comitê consideramos o projeto **APROVADO**.

Advertimos aos pesquisadores a observância dos itens que constam nas "Orientações ao Pesquisador", que será anexada a este parecer consubstanciado.

VI - Data da reunião: 02/06/2008



Prof.ª Dr.ª Rita Goreti Amaral

Coordenador do COEP/PRPPG/UFMG