

Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr.

LIMA, C.M.P.¹; SOARES, R.P.F.¹; BASTOS, I.V.G.A.¹; GRANGEIRO, A.R.S.¹; GURGEL, A.P.A.D.¹; SILVA, A.C.P.¹; SILVA, J.G.¹; OLIVEIRA, R.A.G.²; SOUZA, I.A.³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521, Recife – PE, Brasil. ² Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa-PB, Brasil. ³ Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521, Recife – PE, Brasil.

RESUMO: O uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Para melhor entendimento, é necessário avaliar a relação risco/benefício de seu uso, por meio de estudos toxicológicos. O objetivo desta pesquisa foi estimar a toxicidade aguda do extrato etanólico das cascas secas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr através da obtenção da dose letal (DL₅₀) em roedores, e da Concentração letal (CL₅₀) frente à *Artemia salina* Leach. Foram realizados experimentos por via oral e intraperitoneal utilizando camundongos fêmeas albinos Swiss (*Mus musculus*) (n=6). Por via oral foram administradas 3 doses (1.000, 3.000 e 5.000 mg Kg⁻¹) e por via intraperitoneal, 5 doses (155, 160, 176, 345,6 e 414,72 Kg⁻¹). Os sinais comportamentais foram avaliados durante uma hora após a administração do extrato, ficando em observação até 48 horas. O número de óbitos foi quantificado para posterior cálculo da DL₅₀. A administração por via intraperitoneal foi realizada em intervalo de 5 minutos para cada animal. Nos ensaios de toxicidade por via oral a solução foi introduzida por via intragástrica através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem) no mesmo intervalo de tempo utilizado pela via intraperitoneal. Os animais do grupo de administração oral apresentaram algumas reações, porém não letais até a dose de 5.000 mg Kg⁻¹. A DL₅₀ para a via intraperitoneal foi 257, 49 mg Kg⁻¹ (*muito tóxico*, grau 4) (Schuartsman, 1980). A CL₅₀ (543,5 µg Kg⁻¹) demonstrou ser tóxica frente à *A. salina*. Conclui-se que sob condições agudas de exposição, o extrato do *Pithecellobium cochliocarpum* é um agente tóxico, devendo ser considerado como tal, dependendo da dose administrada ou absorvida, do tempo e frequência de exposição e das vias de administração.

Palavras-chave: fitoterapia, toxicologia, *Abarema cocliocarpa*.

ABSTRACT: Evaluation of acute toxicity of the *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr bark extract. The popular use, and even the traditional one, is not enough to validate medicinal plants as effective and safe medicines. For a better understanding, it is necessary to assess the risk / benefit ratio of their use through toxicological studies. The aim of this work was to evaluate the acute toxicity of *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr dried bark ethanolic extract through its lethal dose (LD₅₀), in mice, and lethal concentration (LC₅₀) in relation to *Artemia salina* Leach. Experiments were performed by oral and intraperitoneal route using female Swiss albino mice (*Mus musculus*) (n = 6). The first three doses were given orally (1,000, 3,000 and 5,000 mg kg⁻¹) and the last five doses were given intraperitoneally (155, 160, 176, 345.6 and 414.72 Kg⁻¹). The behavioral signs were evaluated one hour after administration of the extract, being observed up to 48 hours. The number of deaths was quantified for subsequent calculation of LD50. The intraperitoneal administration was carried out at an interval of 5 minutes for each animal. For the oral toxicity test, the solution was introduced in the digestive system of the animals through a metal cannula coupled to a syringe (gavage) at the same time interval used for the intraperitoneal route. The animals from the oral group presented some reactions, but they were not lethal up to the dose of 5.000 mg kg⁻¹. The LD50 for the intraperitoneal group was 257.49 mg kg⁻¹ (very toxic, grade 4) (Schuartsman, 1980). The LC50 (543.5 mg

kg⁻¹) was toxic to *A. salina*. We can conclude that, under acute conditions of exposure, the *Pithecellobium cochliocarpum* extract is a poisonous agent and should be considered as such depending on the administered or absorbed dose, the time and frequency of exposure, and the administration routes.

Keywords: herbal medicine, toxicology, *Abarema cochliocarpa*.

INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos as plantas são usadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. A toxicologia e a farmacologia dessas plantas têm recebido a atenção dos cientistas para a verificação de suas propriedades farmacológicas e/ou terapêuticas, no isolamento dos constituintes ativos, e na investigação de possíveis toxicidades (Rebecca, 2002; Brandão et al., 2008).

Para Rates (2001), esse aumento do interesse pelas plantas tem sido significativo para a origem de novos fármacos. Toledo (2003) acredita que o estímulo ao uso dos fitoterápicos tem, como objetivo, a prevenção, a cura ou a minimização dos sintomas das doenças, com custo mais acessível à população em relação aos produtos obtidos por síntese química que, em geral, são mais caros devido às patentes tecnológicas envolvidas. No entanto, a utilização de formulações fitoterápicas como alternativa terapêutica tem sido limitada pela questão da segurança da utilização (Mello et al., 2008).

Pithecellobium cochliocarpum (Gomez) Macbr é uma árvore de grande porte pertencente à família Leguminosae-Mimosaceae. Tem como sinonímia científica *Mimosa cochliocarpos* (Gomes) e *Abarema cochliocarpos* (Gomes). Essa espécie pode ser encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro (Grin, 2005). Popularmente é conhecida por babatenon, babatimão ou barbatimão e amplamente utilizada devido a sua atividade cicatrizante, antiinflamatória e antiulcerogênica (Sarmiento, 1999).

O *screening* fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos das cascas secas demonstrou a presença de saponinas, flavonoides, e taninos (Sarmiento, 1999). A casca do caule é utilizada como medicinal em aplicações tópicas para o tratamento de feridas na forma de decocto. Para uso interno utiliza-se a casca preparada na forma de infuso, decocto, tintura, vinhos e garrafadas como antiinflamatório (Oliveira & Silva, 1994).

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e a citotoxicidade do extrato etanólico das cascas do caule de *P. cochliocarpum* (Gomez) Macbr por meio da determinação da DL₅₀ por via oral e intraperitoneal em camundongos e da Concentração letal (CL₅₀) frente à *Artemia salina*.

MATERIAL E MÉTODO

Material botânico e obtenção da matéria-prima

Amostras das cascas do caule de 12 exemplares (planta adulta, em estado vegetativo e livre do ataque de pragas) de *P. cochliocarpum* foram coletadas no NUPA (Núcleo de Pesquisa e Processamento de Alimentos) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil em janeiro de 2009. Em seguida, foram identificadas pela Dr^a Rita de Cássia Araújo Pereira, Curadora do Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Uma excicata foi depositada no herbário "Prof. Lauro Pires Xavier", da UFPB, sob o número 61.336. O material coletado (835 g, peso fresco), foi pesado em balança eletrônica semi-analítica (modelo BG 400, Gehaka®), e posteriormente lavados em água corrente, e desidratadas em estufa com ar circulante a 33°C por 7 dias.

Obtenção do extrato alcoólico

As cascas do caule após secagem foram trituradas em moinho tipo Harley. O pó obtido (560 g) foi extraído em álcool etílico 95% (p/p). Foram preparados 4 litros de solução extrativa etanólica. Após 7 dias de maceração e refrigeração a 23 °C, a mistura foi filtrada com filtro de celulose adaptado a funil montado em suporte específico. Esse processo extrativo foi realizado em triplicata.

Concentração do extrato etanólico

A vaporização do extrato etanólico foi realizado utilizando um evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil) acoplado a bomba a vácuo sob temperatura constante de 45°C. Obteve-se, assim, 289g de um extrato pilular (52% em relação ao material vegetal seco), com consistência resinosa, cor escura, bem dispersível em soro fisiológico nas dosagens utilizadas.

Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL₅₀

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética (protocolo número 041544/2006-47). O trabalho experimental foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade

Federal de Pernambuco (UFPE) entre os meses de fevereiro a março de 2009. Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com pesos e idade aproximados, divididos em grupos de seis animais cada, previamente marcados e pesados. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22 ± 2 °C, com alimentação suspensa 12 horas antes do ensaio e liberação de água *ad libitum*. O extrato etanólico foi pesado em balança analítica (Scaltec®, modelo SBA 31) e solubilizado em solução fisiológica 0,9% de NaCl (p/v). O ensaio foi realizado pela via de administração intraperitoneal e oral. A avaliação da toxicidade aguda e a determinação da DL_{50} foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada por Karber & Behrens (1964) efetuada em duas fases: uma preliminar e outra definitiva. Na fase preliminar, foram administradas doses crescentes do extrato etanólico de *P. cochiliocarpum* para definir a D_1 (maior dose de sobrevivência) e a D_2 (menor dose capaz de determinar 100% de letalidade dos animais). Os dados obtidos na fase preliminar delinearão uma fase definitiva. Os animais receberam doses compreendidas entre D_1 e D_2 seguindo uma progressão geométrica de razão 1,2 para determinação da DL_{50} (Dose letal para 50% dos roedores); todos permaneceram em observação durante 48 horas. As variáveis observadas pelas vias de administração foram às diversas reações comportamentais, tais como: ambulação, alterações da frequência respiratória, diurese, óbitos, entre outros. O cálculo da DL_{50} foi obtida com emprego da seguinte fórmula:

$$DL_{50} = \frac{DF - \sum (A.B)}{n}$$

Onde:

DF = dose mínima capaz de matar todos os animais

A = diferença entre duas doses consecutivas

B = animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número total de animais por lote

A classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL_{50} seguiu a proposta de Schuartsman (1980): grau 6 ($DL_{50} < 5$ mg Kg^{-1}) = supertóxico; grau 5 ($DL_{50} = 5-50$ mg Kg^{-1}) = extremamente tóxico; grau 4 ($DL_{50} = 50-500$ mg Kg^{-1}) = muito tóxico; grau 3 ($DL_{50} = 0,5-5$ g Kg^{-1}) = moderadamente tóxico; grau 2 ($DL_{50} = 5-15$ g Kg^{-1}) = pouco tóxico; grau 1 ($DL_{50} > 15$ g Kg^{-1}) = praticamente atóxico.

Determinação da CL_{50} com *Artemia salina* L.

Os cistos de *A. salina* L. foram mantidos sob-resfriamento a 5 °C até a execução do experimento. Este experimento foi realizado no Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, entre os meses de março a abril de 2008. Foram utilizadas as larvas na forma de metanúplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL_{50}) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (Lopes et al., 2002). Para a obtenção dos metanúplios, cistos de *A. salina* foram incubados em solução salina (pH 8,5 e 29 °C) sob iluminação artificial por 48 h. Após eclosão, os metanúplios migravam através de uma placa perfurada para outro compartimento com livre incidência de luz. Uma solução foi preparada utilizando 10 mg do extrato etanólico de *P. cochiliocarpum* e 10 mL de solução salina, a partir desta foram efetuadas diluições com concentrações inferiores (40, 120, 240, 360, 480 e 600 $\mu g mL^{-1}$). Das diluições obtidas com as respectivas concentrações, 5 mL foram colocados em tubos de ensaio e adicionados 10 metanúplios. O teste foi realizado em triplicata. Um grupo controle foi preparado contendo apenas os metanúplios. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de metanúplios vivos e mortos para determinação da CL_{50} de acordo com o método estatístico de Probitos, utilizando o programa Microcal Origin 4.1.9.

RESULTADO

Na fase preliminar do teste de toxicidade aguda por via intraperitoneal foram administradas doses variadas que possibilitou a determinação de D_1 (dose máxima isenta de mortalidade) de 160 mg Kg^{-1} e D_2 (dose mínima capaz de levar a óbito 100% dos animais) de 414,72 mg Kg^{-1} . Os sinais de toxicidade da fase definitiva foram observados inicialmente após administração do extrato etanólico de *P. cochiliocarpum* e apresentou efeitos estimulantes como taquicardia, taquipnéia, tremores finos e grosseiros, movimentos circulares, exoftalmia e movimentos estereotipados. Após 30 minutos da administração verificou-se a presença de sinais depressivos em todas as doses, tais como: abaixamento dos membros posteriores, apnéia e alteração da marcha. Todos os efeitos observados sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) foram reativos e proporcionais às doses administradas.

Na dose de 155 mg Kg^{-1} foram observados efeitos sobre o trato gastrointestinal, tais como: distensão abdominal, contorções e diminuição da excreção fecal. Piloereção, edema de focinho, palidez, fotofobia e cianose foram verificados em 25 % dos animais de cada grupo, sendo que esses

efeitos periféricos acentuaram-se nas doses mais elevadas do extrato vegetal.

Em 176 e 345,6 mg Kg⁻¹ foram observados taquipnéia e taquicardia, agitação motora, reação de fuga, espasmos, diurese e excreção fecal, com mortalidade de 18% e 85% dos animais, respectivamente.

A taxa de mortalidade do extrato etanólico de *P. cochliocarpum* variou com o aumento das doses, como demonstrado na curva dose-resposta (Figura 1). As doses acima de 414,72 mg Kg⁻¹ foram capazes de matar 100% dos animais tratados com o extrato etanólico de *P. cochliocarpum*. A DL₅₀ determinada foi de 257,49 mg Kg⁻¹.

O ensaio de toxicidade aguda por via oral foi realizado nas doses de 1.000, 3.000 e 5.000 mg Kg⁻¹. A dose de 1.000 mg Kg⁻¹ apresentou baixa diurese, excreção fecal variável, aumento da frequência respiratória, palidez, agressividade, agitação e edema de focinho. Para a dose de 5.000 mg Kg⁻¹ além dos efeitos estimulantes, foram observados também sinais depressores sobre o SNC. Apesar desses efeitos comportamentais, não foi verificado óbitos dos animais até a dose limite de 5.000 mg Kg⁻¹, indicando que quando administrado por esta via o extrato bruto apresenta baixa toxicidade. Isso impossibilitou o cálculo da DL₅₀ pela metodologia proposta (Zaupá et al., 2002).

Com base no ensaio para verificação da toxicidade do extrato etanólico de *P. cochliocarpum* frente a *A. salina* Leach observou-se que nas concentrações de 40 a 600 µg mL⁻¹ essas larvas apresentaram diminuição na movimentação em relação as do grupo controle, mostrando que a exposição às maiores taxas de concentração do

extrato de *P. cochliocarpum* tem influência sobre a movimentação do organismo estudado. Após 24 horas de exposição ao extrato houve um moderado índice de mortalidade de *A. salina* na maior parte das concentrações utilizadas de acordo com o método proposto por Meyer et al (1982). Desta forma, foi possível calcular experimentalmente o valor de CL₅₀ (543,5 µg mL⁻¹) para o extrato etanólico do vegetal estudado.

DISCUSSÃO

Os produtos fitoterápicos são, algumas vezes, erroneamente considerados como seguros porque são de origem natural (Gesler, 1992). Segundo Bent & Ko (2004), esses produtos contêm princípios bioativos capazes de causar efeitos adversos.

De acordo com Talalay (2001), todo produto natural usado em terapêutica deveria ser submetido a testes de eficácia e segurança por métodos iguais aos usados por novas drogas sintéticas. Por motivos éticos, morais e legais, a obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada. Com isso, as informações toxicológicas sobre compostos químicos são obtidas basicamente a partir de testes toxicológicos pré-clínicos, ou seja, com animais de laboratórios em condições previamente padronizadas (Morton, 1998; Boelsterli, 2003).

Sugere-se que as reações comportamentais observadas após a administração intraperitoneal do extrato etanólico de *P. cochliocarpum* decorre de alterações do equilíbrio dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Inicialmente as doses

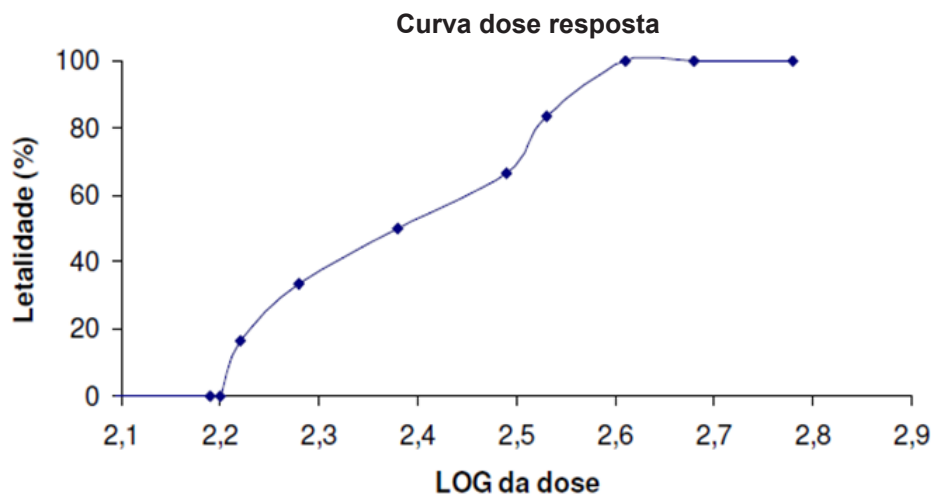


FIGURA 1. Curva dose-resposta da toxicidade aguda por via intraperitoneal do extrato etanólico das cascas secas de *Pithecellobium cochliocarpum* em camundongos albinos *Mus musculus*, Biotério de Antibióticos da UFPE, ano 2009.

demonstraram ser estimulantes devido à liberação de neurotransmissores excitatórios e/ou inibição da recaptação desses. A inibição da recaptação aumenta a concentração dos neurotransmissores em contato com os receptores, incrementando, assim, a atividade do circuito neuronal (Silva, 2002). No entanto, os efeitos depressores estiveram presentes e não foram tão pronunciados, possivelmente pelo esgotamento parcial das vesículas sinápticas dos neurotransmissores excitatórios, ou estimulação prolongada direta de neurotransmissores inibitórios (Goodman e Gilman, 2012).

As cascas secas do caule de *P. cochliocarpum* contêm constituintes químicos dentre os quais taninos, saponinas, flavonóides (Sarmiento, 1999) e são utilizadas pela população no tratamento de feridas. Melo et al. (2007) afirmaram que as saponinas, por serem capazes de formar complexos com esteróides e fosfolípídeos das membranas das células da mucosa intestinal, causam irritação na mesma. Essa propriedade irritante sobre a mucosa possivelmente justifica o aumento das contorções abdominais à medida que aumentou a dose na administração intraperitoneal (Malone, 1977; Malone, Robichaud, 1962).

Os taninos são compostos responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas em geral, e, devido à sua complexação com proteínas, é a base de algumas de suas propriedades biológicas, tais como o controle de insetos, fungos e bactérias (Aerts et al., 1999). A diminuição da excreção fecal foi observada com o aumento das doses do extrato etanólico de *P. cochliocarpum*, provavelmente pela presença de taninos. Devido ao alto peso molecular, essas moléculas estão relacionadas com a inibição da digestibilidade (Monteiro et al., 2005).

A presença de intensa taquicardia durante todo o período do ensaio, mesmo na fase final, na qual se verificou depressão do sistema nervoso, deve-se provavelmente à presença de taninos no extrato etanólico de *P. cochliocarpum*. Para Alice (1995), o uso excessivo de produtos de plantas medicinais ricas em taninos por via oral pode ser perigoso ao músculo cardíaco, o que justifica a taquicardia observada na administração das doses intraperitoneais do extrato.

De acordo com Pinto et al. (2001), o efeito tóxico dos taninos, causado pela absorção intestinal dos produtos finais da hidrólise, ocasiona hemorragias, gastroenterites, necrose hepática e nefrites, entre outros. A administração do extrato nos animais provocou, na maioria das doses utilizadas, a ausência de micção.

Embora o extrato etanólico de *P. cochliocarpum* tenha se apresentado muito tóxico por via intraperitoneal, o mesmo por via oral foi pouco tóxico não verificando letalidade dos animais.

Esta ausência de letalidade pode estar relacionada aos mecanismos farmacocinéticos de absorção e/ou biotransformação, que possivelmente diminuíram os níveis séricos necessários para provocar efeito letal nos animais (Silva, 2006), no entanto, sinais clínicos de toxicidade foram observados no referido extrato vegetal.

Meyer et al. (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, estes, são considerados atóxicos. Sendo assim, *P. cochliocarpum* pode ser considerado tóxico. Não foram verificados na literatura, dados que relatem a CL_{50} de extratos de barbatimão sobre *A. salina* que possam servir como parâmetro de comparação.

O teste de citotoxicidade com *A. salina* é um ensaio biológico amplamente utilizado por ser rápido, confiável, de baixo custo e por ter demonstrado boa correlação com várias atividades biológicas (Meyer et al., 1982), tais como: atividade antitumoral (Mclaughlin, 1991; Mclaughlin et al., 1991, 1993), atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (Dolabela, 1997), atividade antibacteriana (Brasileiro et al., 2006; Niño et al., 2006; Magalhães et al., 2007) e antifúngica (Niño et al., 2006; Magalhães et al., 2007). Em geral, extratos com alta toxicidade para *A. salina* ($CL_{50} < 200 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentam alto potencial para estas atividades. O extrato de *P. cochliocarpum* apresentou toxicidade moderada frente a *A. salina*, sugerindo que o mesmo possua propriedades biológicas como antitumoral, tripanossomicida, antibacteriana e antifúngica (Santos et al., 2002; Holec et al., 2005, Oliveira, 2006; Sarmiento, 1999;).

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr foi tóxico nos ensaios *in vitro* frente à *Artemia salina* Leach como também em testes pré-clínicos (agudos) por via intraperitoneal. Porém, o extrato etanólico da casca de *P. cochliocarpum* apresentou baixa toxicidade quando administrado por via oral. No entanto, vale ressaltar que as condições como exposição, dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração, a que o extrato foi avaliado devem ser consideradas.

A utilização desse vegetal com fins terapêuticos pela população deixa sugestivas opções para trabalhos futuros que visem o encontro de nova atividade farmacológica.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Doutorado.

REFERÊNCIAS

- AERTS, T.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanodins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environments*, v.75, p.1-12, 1999.
- ALICE, C.B. et al. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacológico. 1.ed. Canoas: ULBRA, 1995. 208p.
- BARBOUR, E.K. et al. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.93, p.1-7, 2004.
- BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *The American Journal of Medicine*, v.116, p.478-85, 2004.
- BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. *Journal Toxicological Sciences*, v.28, n.3, p.109-21, 2003.
- BRANDÃO, M.G.L et al. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.127-34, 2008.
- BRASILEIRO, B.G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, p.195-202, 2006.
- DOLABELA, M.F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 1997. 128p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GESLER, W.M. Therapeutic landscapes: medical issue in light of the new cultural geography. *Social Science and medicine*, v.34, p.735-46, 1992.
- GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 12 Ed. Editora McGrawHill, 2012; 757-69.
- GRIN, National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Germplasm Resources Information Network, Disponível em: <http://www.arsgrin.gov/>. Acesso em: 03 fev. 2010.
- HOLETZ, F.B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DIAZ, J.A.; TOLEDO, C.E.M.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.397-401, 2005.
- KARBER, G.; BEHRENS, B. *Statistical methods in biological assay*. 2.ed. London: Charles Griffin, 1964. 219p.
- LOPES, W.B. et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Revista Eletrônica Horizonte Científico*, v.1, p.1-11, 2002.
- MAGALHÃES, A.F. et al. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.713-8, 2007.
- MCLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. *Methods in plant biochemistry*. New York: Academic Press, 1991, p.1-32.
- MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. *Studies in Natural Product Chemistry 9*. Amsterdam: Elsevier, 1991, p.383-409.
- MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants. Nova York: Kinghorn & Balandrini, 1993, p.112-37.
- MELO, D.S. et al. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.2, p.420-8, 2007.
- MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera* em coelhos Nova Zelândia. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, n.5, p.752-6, 2008.
- MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Medica*, v.45, p.31-4, 1982.
- c, J.M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química nova*, v.28, n.5, p.892-6. 2005.
- MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: Wagner H. & Wolf P. (Eds), *Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, Springer-Verlag, Berlin, 1977. p.23-53.
- MALONE, M. H.; ROBICHAUD. R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia*, v.25, p.23-53, 1962.
- MORTON, D.M. Importance of species selection in drugtoxicity testing. *Toxicology Letters*, v.102, p.545-50, 1998.
- NIÑO, J. et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Brazilian Journal Microbiology*, v.37, p.566-70, 2006.
- OLIVEIRA, R.A.G.; SILVA, M.S.H. *Plantas medicinais na atenção primária a saúde*. 1.ed. João Pessoa: Universitária, 1994, 100p.
- OLIVEIRA, R.A.G. *Plantas medicinais usadas tradicionalmente na dermatologia: avaliação da atividade biológica de seus extratos, óleos essenciais e suas associações*. 2006. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- PINTO, L.G.Q. et al. Desempenho do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado em dietas contendo diferentes teores de tanino. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.30, n.4, p.1164-71, 2001.
- RATES, S.M.K. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, p.101-4, 2001.
- REBECCA, M.A. et al. Toxicological studies

- on *Stryphnodendron adstringens*. Journal of Ethnopharmacology, v.83, p.101-4, 2002.
- SANTOS, S.C. et al. Tannin composition of barbatimao species. Fitoterapia, v. 73, p. 292-299, 2002.
- SARMENTO, D.M.A. Isolamento e identificação de substâncias bioativas de *Pithecellobium cochliocarpum* Mart. 1999. 86p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Exatas da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- SCHUARTSMAN, S. Produtos químicos de uso domiciliar – segurança e riscos toxicológicos. 1.ed. São Paulo: Almed, 1980. 92p.
- SILVA, P. Farmacologia. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 334p.
- SILVA, E.C.B. Avaliação biológica da *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae- Caesalpinoidea. usos e riscos. 2006. 137p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- TALALAY, P. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. Academic Medicine, v.76, p.238-47, 2001.
- TOLEDO, A.C.O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacocinética. Revista Lecta, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.
- ZAUPA, C. et al. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus® em roedores. Acta Farmaceutica Bonaerense, v.21, p.265-72, 2002.