

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Cissus gongylodes: **CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS PRELIMINARES DA SEGURIDADE DA UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS E CAULES**

FERNANDA FLORES NAVARRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

N322c Navarro, Fernanda Flores
Cissus gongylodes: caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas de caules. / Fernanda Flores Navarro. – Araraquara, 2009.
70 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento

1. Cissus gongylodes, 2. Vitaceae. 3. Perfil toxicológico. 4. Atividade antimicrobiana. I. Sacramento, Luis Vitor Silva do, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

FERNANDA FLORES NAVARRO

Cissus gongylodes: **CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E
INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS PRELIMINARES DA SEGURIDADE DA
UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DAS FOLHAS E CAULES**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. LUÍS VITOR SILVA DO SACRAMENTO

Prof. Dr. MARCELO APARECIDO DA SILVA

Profa. Dra. MARIA STELLA GONCALVES RADDI

Araraquara, 17 de dezembro de 2009.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

Dedicatória

*Aos meus pais, meu querido irmão,
minha filha adorada e meu marido,
por me ensinar cada qual ao seu
modo, a nunca deixar de sonhar.*

Amo vocês!!!

Agradecimentos

Aos meus pais, que são à base da minha vida. Obrigada por me ensinar a voar, e estarem sempre ao meu lado. Obrigada pela paciência, ajuda, pois sem vocês eu não conseguiria

Ao meu querido irmão Roberto (*in memoriam*) pelo exemplo de perseverança. Obrigada por me ensinar a “lutar sempre, desistir nunca”.

Ao meu amor Wagner, pelo amor, carinho, compreensão pela paciência e imprescindível auxílio na formatação deste trabalho.

À minha filha Isabela que chegou há tão pouco tempo e me ensinou que gestos pequenos são as melhores coisas da vida.

Às minhas amigas Cristina, Daniele, Maira e Paula, pela ajuda incondicional, apoio e risadas divididas.

Aos meus amigos Priscila, Plinio e Eduardo. A distância apenas fortalece o elo da amizade.

Aos colegas do Laboratório de Botânica da FCF/UNESP, especialmente à Angélica, pela ajuda essencial na realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pela orientação, pelos ensinamentos e paciência.

Aos professores do Programa, à secretaria da Pós Graduação, à Biblioteca.

Ao Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS.

Ao prof. Dr. Ismar Rodrigues pelo apoio e ensinamentos.

**A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização de
mais este sonho, o meu sincero reconhecimento.**

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Plantas Medicinais.....	4
2.2 A família Vitaceae.....	6
2.3 O gênero <i>Cissus</i>	8
2.4 A espécie <i>Cissus gongylodes</i>	9
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Material vegetal.....	14
4.2 Análise Anatômica.....	14
4.3 Análise Histoquímica.....	15
4.4 Obtenção das drogas vegetais.....	16
4.5 Análise Farmacognóstica.....	17
4.5.1 Caracterização Fitoquímica preliminar.....	17
4.6 Controle de Qualidade Físico Químico da droga vegetal.....	17
4.6.1 Densidade aparente da droga pulverizada.....	18
4.6.2 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho.....	18
4.6.3 Determinação de valor de pH.....	19
4.6.4 Determinação do teor de cinzas.....	19
4.6.5 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido.....	20
4.6.6 Determinação do teor de extrativos.....	20
4.7 Controle de Qualidade Microbiológico.....	21
4.7.1 Contagem de microrganismos viáveis.....	21
4.7.2 Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> e <i>Escherichia coli</i>	22

4.7.3 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
4.8 Atividade Antimicrobiana.....	23
4.8.1 Microrganismos.....	23
4.8.2 Soluções.....	24
4.8.3 Difusão em Agar.....	24
4.9 Estudo toxicológico pré-clínico de extratos aquosos de <i>C. gongylodes</i>	25
4.9.1 Animais.....	25
4.9.2 Ensaio <i>in vivo</i>	26
4.9.3 Determinação das transaminases séricas.....	27
4.9.4 Determinação da creatinina sérica.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Caracterização <i>Cissus gongylodes</i>	28
5.1.1 Características macroscópicas.....	29
5.1.2 Características microscópicas.....	30
5.2 Ensaio Histoquímicos.....	33
5.3 Processamento da droga vegetal.....	40
5.3.1 Secagem.....	40
5.3.2 Moagem.....	41
5.4 Ensaio farmacognósticos.....	43
5.5 Determinação de polifenóis totais.....	44
5.6 Controle Físico-Químico de qualidade das drogas vegetais de <i>Cissus gongylodes</i>	45
5.7 Controle de Qualidade Microbiológico.....	47
5.8 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	51
5.9 Estudo toxicológico pré-clínico de extratos aquosos de <i>Cissus gongylodes</i>	52
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. ANEXO.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Cissus gongylodes</i> a: hábito, notando-se a folha do ramo vegetativo na parte inferior; b: botão; c: aspecto superior do disco nectarífero; d: pétalas, vista dorsal e ventral; e: estames, vista ventral, lateral e dorsal; f: escama da gavinha; g: brácteas; h: estípula. Escala 1 cm (a), 1 mm (b-h)..	12
Figura 2	Aspectos anatômicos do caule de <i>C. gongylodes</i> . Barras: 110µm.....	31
Figura 3	Aspectos anatômicos das folhas de <i>C. gongylodes</i> : A: Barra: 10 µm; B,D e E: Barra: 40 µm; C,F: Barra: 10 µm.....	31
Figura 4	Aspectos anatômicos da nervura central de <i>C. gongylodes</i> : A, B, C, D e E: Barra: 110 µm; F e H: Barra: 40 µm; G e I: Barra: 10 µm.....	32
Figura 5	A: Cortes transversais da folha de <i>C. gongylodes</i> corados com reagente de Dragendorff, B: controle (Barra 40 µm); C: Cortes transversais do caule de <i>C. gongylodes</i> corados com reagente de Dragendorff, D: controle(Barra 40 µm); E: Cortes transversais da folha de <i>C. gongylodes</i> corados com cloreto férrico; F: controle (Barra 40 µm).....	36
Figura 6	G: Cortes transversais do caule de <i>C. gongylodes</i> corados com cloreto férrico, H: controle (barra 110 µm); I: Cortes transversais do caule de <i>C. gongylodes</i> corados com vanilina clorídrica (barra 10 µm); J – controle (barra 110 µm); K: Cortes transversais da folha de <i>C. gongylodes</i> corados com azul de comassiê, L: controle, (barra 40 µm).....	37
Figura 7	M -Cortes transversais da folha de <i>C. gongylodes</i> . N: 2,4-DNF, controle (Barra 40 µm); O: Cortes transversais do caule de <i>C. gongylodes</i> corados com Lugol. P: controle (Barra 110 µm); Q: Cortes transversais da folha de <i>C. gongylodes</i> corados com Sulfato de Azul do Nilo; R: controle (Barra 40 µm).....	38
Figura 8	S: Cortes transversais da folha de <i>C. gongylodes</i> corados Vermelho de Sudan (barra 40 µm); T: Cortes transversais do caule de <i>C. gongylodes</i> corados Vermelho de Sudan (barra 110 µm).....	39
Figura 9	Pó das folhas e do caule de <i>C. gongylodes</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio histoquímico realizado nas folhas e caule de <i>C. gongyloides</i> por meio de corantes ou reagentes identificadores de substâncias lipofílicas.....	34
Tabela 2	Ensaio histoquímico realizado nas folhas e caule de <i>C. gongyloides</i> por meio de reagentes identificadores de substâncias hidrofílicas.....	35
Tabela 3	Nível de redução de partícula segundo o tipo de droga vegetal.....	42
Tabela 4	Análise fitoquímica preliminar.....	44
Tabela 5	Determinação de polifenóis totais.....	44
Tabela 6	Controle de qualidade físico-químico das drogas vegetais.....	45
Tabela 7	Controle de qualidade microbiológico do pó.....	49
Tabela 8	Análise microbiológica e os limites tolerados de microrganismos para drogas vegetais.....	50
Tabela 9	Atividade antimicrobiana do pó das folhas e pó do caule de <i>C. gongyloides</i>	51
Tabela 10	Porcentagem relativa do peso dos órgãos dos animais após tratamento.....	53
Tabela 11	Dosagem de AST, ALT e Creatinina.....	54

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CET	Cetoconazol
CIPRO	Ciprofloxacino
CONT	Controle negativo
DC	Decocto do caule de <i>Cissus gongylodes</i>
FD	Fator de diluição
IF	Infusão das folhas de <i>Cissus gongylodes</i>
m/v	Massa por volume
p/v	Peso por volume
PC	Pó obtido do caule de <i>Cissus gongylodes</i>
PF	Pó obtido das folhas de <i>Cissus gongylodes</i>
TE	Teor extrativo
UFC	Unidade formadora de colônias
XLD	Ágar xilose-lisina-desoxicolato

RESUMO

Cissus gongylodes Planchon (Vitaceae) é popularmente utilizada no tratamento de processos inflamatórios e de cálculos renais e biliares, onde o infuso tem sido utilizado por períodos prolongados, até que supostamente os cálculos sejam expelidos. Embora no Brasil a legislação procure garantir a segurança e qualidade de fitoterápicos, ainda são insuficientes os registros e estudos relacionados com estes produtos utilizados pela população. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos: realizar uma análise farmacobotânica de exemplares de *C. gongylodes* ocorrentes no “Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP”, Campus de Araraquara; obter drogas vegetais distintas; realizar ensaios fitoquímicos preliminares para conhecer as características farmacognósticas de amostras das drogas eleitas de *C. gongylodes*; realizar o controle de qualidade físico-químico e microbiológico utilizando metodologias baseadas em compêndios oficiais e literatura, determinar a atividade antimicrobiana das drogas e avaliar alguns aspectos da toxicidade pré-clínica de extratos aquosos de *C. gongylodes*. A análise farmacobotânica permitiu identificar e caracterizar a espécie. Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de compostos, os quais foram confirmados através dos ensaios farmacognósticos evidenciando a presença de taninos, flavonóides e alcalóides. O controle de qualidade físico-químico e microbiológico mostrou que as drogas vegetais obtidas do caule e das folhas de *C. gongylodes* encontram-se dentro dos valores de referência microbiológicos. Não foi identificada atividade antimicrobiana das amostras nas condições do experimento. Do ponto de vista toxicológico nenhum dos parâmetros avaliados apresentaram variação estatística significativa quando

defrontado com os animais do grupo controle. São necessários, entretanto mais estudos para traçar o perfil toxicológico e farmacológico desta espécie vegetal.

PALAVRAS-CHAVES: *Cissus gongylodes*, Vitaceae, perfil toxicológico, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Cissus gongylodes Planchon (Vitaceae) is popularly used for the treatment of inflammations and the renal biliary microcrystals in which the infusion has been used for prolonged periods, supposedly to expel the calculus. There are still insufficient registers and studies connected with these products used by the population, although the legislation in Brazil tries to guarantee the security and quality of phytotherapies. For that reason, the objective of the present thesis is to carry out a pharmacobotany analysis of samples of *C. gongylodes* which has been happening to the “Horto de Plantas Mediciniais e Tóxicas da FCF/UNESP”- Campus of Araraquara; to obtain different vegetable drugs for the continuance of the study; to carry out preliminary phytochemistry tests to know the characteristics pharmacognostic of samples of the elected drugs of *C. gongylodes*; to carry the chemical-physical and microbiological quality control using methodologies based on official compendia and literature; and also, to assess the antimicrobial activity of the drugs and some features of the toxicity of aqueous extracts of *C. gongylodes* pre-clinically. The pharmacobotany analysis has allowed to identify and to characterize the sort. The histochemistry tests have showed up the presence of compounds which were confirmed through the pharmacognostic tests that showed the presence of tannins, flavonoid and alkaloids. Furthermore, the chemical-physical and microbiological quality control are inside the microbiological values of reference and the antimicrobial activity of the samples was not identified in these conditions of the experiment. From the toxicological point of view, none of the parameters assessed showed significant statistical variation when faced with the animals of control group.

However, it is necessary further studies to delineate the pharmacological and toxicological profile of this plant species.

KEY WORDS: *Cissus gongylodes*, Vitaceae, profile toxicological, antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (CECHINEL, YUNES, 1998).

A importância das plantas medicinais deve-se por sua contribuição como fonte natural de princípios ativos e por proporcionar grandes chances de obter-se um protótipo molecular devido à diversidade de constituintes presentes. No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CAPASSO et al, 2000; CALIXTO 2005).

Planta medicinal é considerada todo vegetal que contém, em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos ou precursores de substâncias utilizadas para tais fins, sendo amplamente utilizadas pela medicina alternativa (AMOROZO, 2002; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2002).

Observa-se um crescimento na utilização de plantas medicinais pela população brasileira. Alguns fatores podem explicar o aumento do uso desses medicamentos, tais como, os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, como também uma forte tendência de busca, pela

população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001).

O conhecimento popular constitui um importante recurso para descoberta de fármacos usados na terapêutica sendo que muitos antibióticos, tranqüilizantes, sedativos, anestésicos, analgésicos e laxantes tiveram sua origem neste estudos (BUSSMANN, 2004).

Os fatores que favorecem a área de produtos naturais, no Brasil, são o conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico da população brasileira, sendo a miscigenação um fator primordial. Negros e europeus trouxeram cada qual para o Brasil o seu conhecimento sobre o uso de plantas, aos quais somou-se ao dos índios. A difusão desse conhecimento no seio da população facilita a aceitação popular de plantas medicinais e a aderência terapêutica. Entretanto, existe um elevado grau de internacionalização da indústria farmacêutica: algo como 70% das vendas pertence a empresas estrangeiras (FERREIRA, 2002).

De acordo com ALBURQUERQUE (2002) um dos objetivos da etnofarmacologia, um ramo da etnobotânica, é investigar e estudar o uso de plantas com finalidades medicinais com o firme propósito de oferecer elementos práticos para outros investigadores nas áreas de fitoquímica e farmacologia, favorecendo a descoberta de novos fármacos.

Na abordagem etnofarmacológica são selecionadas plantas de acordo com o uso terapêutico por determinado grupo étnico. Sendo assim, há oportunidade de descoberta de novas estruturas com princípios ativos (BRITO, 1996).

A família Vitaceae compreende 12 gêneros e cerca de 800 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (SOUZA & LORENZI, 2005). No Brasil, esta família é representada apenas pelo gênero *Cissus* com 42 espécies descritas (LOMBARDI, 2000). Os representantes de Vitaceae apresentam portes arbustivos ou são lianas com gavinhas, de crescimento simpodial, folhas compostas pinadas ou palmadas, com ou sem estípulas (BERG,1993).

O gênero *Cissus* é representado por arbustos sarmentosos, nodosos, com râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (BERG,1993).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

A necessidade foi, é e continuará sendo a grande força motriz que impulsiona a humanidade. A dor fez com que o homem buscasse o analgésico, estabelecendo o binômio doença/remédio. Portanto, é fácil inferir que o uso de partes de plantas e animais no combate às doenças seja tão antigo quanto a Humanidade (OLIVEIRA & AKISUE,2003).

Aproximadamente 25% dos fármacos empregados atualmente, nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores.

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; e a farmacologia que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (MACIEL et al., 2002; MENDONÇA-FILHO; VENDRUSCOLO et al., 2005).

Há nesse sentido, vários caminhos para o estudo de plantas medicinais, destacando-se quatro tipos básicos de abordagens: randômicas, etológica, quimiotaxonômica, etnodirigida (ALBURQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular. Já é do conhecimento que é muito mais provável encontrar atividade

biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (HOUGHTON; RAMAN, 1998). Cerca de 75% dos compostos puros de origem natural empregados na indústria farmacêutica, foram isolados, tornando válida as recomendações da medicina popular. Outros aspectos importantes que devem ser levados em consideração são as informações botânico-taxonômicas e químicos-taxônomicas (CECHINEL; YUNES, 1998).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos.

Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.

De maneira indireta, este tipo de conhecimento popular desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al, 2002).

A importância das plantas medicinais deve-se também por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas (HOSTETTMANN, 2003). No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas

destas podem apresentar substâncias tóxicas ou variação na composição química (CAPASSO et al, 2000; CALIXTO 2005).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e aproximadamente 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapêutica moderna. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (HOSTETTMANN et al., 2003).

2.2 A família Vitaceae

A família Vitaceae compreende 12 gêneros cerca de 800 espécies, possui distribuição tropical e subtropical. No Brasil ocorre apenas o gênero *Cissus*, com cerca de 42 espécies. Pertence a esta família a videira ou parreira, que produz a uva, utilizada *in natura* ou na produção de vinhos. Algumas Vitaceae são cultivadas como ornamentais, com destaque para a hera-japonesa (*Parthenocissus tricuspidata*), muito utilizada na forração de fachadas e muros, com gavinhas dotadas de discos adesivos. Entre as espécies nativas destacam-se o anil trepador, *Cissus verticulata* (= *Cissus sicyoides*), comum principalmente na região sudeste e a mãe-boia (*Cissus gongylodes*) que são freqüentemente utilizadas como medicinais (SOUZA, LORENZI, 2008).

As plantas da família Vitaceae são lianas ou raramente ervas não escandentes ou arvoretas, geralmente com gavinhas opostas às folhas (representando inflorescências modificadas); as folhas em filotaxia alterna, são

simples ou compostas, freqüentemente palminérveas, geralmente com estípulas. As inflorescências são cimosas ou paniculadas, terminais, axiliares ou opostas às folhas; as flores são ou unissexuadas, actinomorfas, diclamídeas contendo disco nectarífero ou glândulas nectaríferas isoladas presentes; o cálice geralmente é muito reduzido, tetra ou pentâmero, gamossépalo, com prefloração valvar ou aberta; a corola é tetra ou pentâmera, diali ou gamopétala, com prefloração valvar; os estames são isostêmones com anteras rimosas; o ovário é súpero, bilocular, com placentação axial sendo encontrados dois óvulos por lóculo. O fruto é do tipo baga. (BERG, 1993; SOUZA; LORENZI, 2008)

As lianas são membros característicos das florestas tropicais, abundantes e de grande importância ecológica, tendo papel ativo na dinâmica das comunidades florestais. Representam, em média, 21% das espécies de plantas utilizadas como alimento por ampla variedade de primatas tropicais (EMMONS & GENTRY, 1983; PEÑALOSA, 1984; MORELLATO & LEITÃO FILHO, 1996). Floristicamente são importantes, contribuindo com cerca de 25% da diversidade taxonômica das florestas tropicais (GENTRY, 1991).

Planchon em 1887, havia reconhecido a dificuldade em separar as espécies da família Vitaceae em gêneros e subgêneros naturais, contrastando com a grande facilidade de se separar a família Vitaceae das demais famílias dicotiledôneas. Esta dificuldade deve-se à uniformidade dos caracteres gerais dentro do grupo que, no entanto é extremamente diverso nos detalhes (LOMBARDI, 1994).

2.3 O gênero *Cissus*

O gênero *Cissus* (L.) é o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies. Na América do Sul esse é o único gênero de ocorrência natural, com exceção de uma única espécie do gênero *Vitis* que ocorre naturalmente no noroeste do continente sul-americano. As espécies ocorrem em matas primárias, secundárias, cerrados, caatingas, campos, vegetações de altitude e litorânea (CORREA, 1926; LOMBARDI, 1994).

É representado por arbustos sarmentosos, nodosos, com râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (BERG, 1993)

O gênero *Cissus* é um gênero neotropical, distribuído pela África, América Central, Sul da América do Norte, América do Sul, Sul da Ásia, Austrália, Caribe e Papúasia.

Várias espécies de *Cissus* são estudadas e possuem diversas atividades, como por exemplo: atividade antimicrobiana e antiinflamatória (GARCIA et al., 2000), atividade antidiabética de *Cissus sicyoides* (BELTRAME, 2001), efeitos neurofarmacológicos de *Cissus quadrangularis* (VISWANATHA SWAMY, 2006). Outras atividades farmacológicas pertencentes ao gênero *Cissus*: antioxidante e antimicrobiana (MURTHY et al., 2003; SILVA et al., 2007), inibidor da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO et al., 2006), hipoglicemiante (BARBOSA et al., 2002), na prevenção da osteoporose (SHIRWAIKAR et al., 2003).

2.4 A espécie *Cissus gongylodes*

De acordo com LOMBARDI (2000), a classificação taxonômica de *Cissus gongylodes* é:

- Reino: Plantae;
- Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);
- Superdivisão: Spermatophyta (plantas com sementes);
- Divisão: Magnoliophyta (plantas com flor);
- Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas);
- Subclasse: Rosidae;
- Ordem: Rhamnales. Incluem-se nesta ordem apenas 3 famílias: Rhamnaceae, Vitaceae e Leaceae.
- Família: Vitaceae.

Cissus gongylodes Planchon (Figura 1), é uma liana de ramos suculentos, angulados, vegetativos com lenticelas esparsas, pubérculos, às vezes avermelhados. Há tricomas alvescentes unicelulares, bicelulares, multicelulares unisseriados e tricomas glandulares com pendúnculo unicelular e cabeça de secreção de cor clara quando *in natura*, mas escura nas exsicatas. Gavinhas dicotômicamente ramificadas várias vezes, discos adesivos nas extremidades, às vezes avermelhadas, pubérulas. Estípulas de 0,55-1,9 cm comprimento x 0,9-1,7 cm largura, deltóideas, carnosas, às vezes com bordas avermelhados, pubérulas, margem ciliada, caducas ou persistentes. Folhas compostas trifolioladas, raro anômalas simples e irregularmente lobadas; nos ramos reprodutivos são ausentes ou muito menores, irregularmente lobadas ou simples; pubérulas em ambas as faces as glabras na face ventral e pubérulas

na dorsal, principalmente ao longo das nervuras principais; margem denticulada; folhas novas com margem ondulada; papiráceas e levemente carnosas; folíolos centrais de 6,85-14,1 cm comprimento x 4,25-12,5 cm largura, rômnicos, lateralmente lobados nos ramos vegetativos, ápice agudo, base atenuada; folíolos laterais de 3,5-10,0 cm comprimento x 1,8-7,5 cm largura, sublongos a elípticos, cada um com um lobo deltóide lateral nos ramos vegetativos; nos ramos reprodutivos são dissimilares; ápices agudos e base atenuada. Peciólulos centrais de 0,-0,9 cm comprimento, laterais de 0,15-0,3 cm comprimento, pubérulos. Peciolos de 6,0-10,7cm comprimento, canaliculados a alados, pubérulos. Inflorescência de 3,0-4,5 cm comprimento x 4,2-5,3 cm largura, aplanada; brácteas de 0,4-0,7 cm comprimento x 0,25-0,3 cm largura, triangulares, às vezes de bordos avermelhados; base abaulada e secretora; pubérulas; margens ciliadas com eixos de 0,9-1,4 cm comprimento, esverdeados, pubérulos. Cálice de 0,1-0,2 cm altura x 0,4 cm diâmetro, truncado esverdeado, papiloso, fechado em botão, carnosos, lateralmente alargado. Corola de 0,2-0,3 cm altura x 0,2-0,3 cm diâmetro, esverdeada, papilosa; quatro pétalas coerentes, bordos elevados na junção, caducas. Disco amarelo, no centro de depressão no cálice, nitidamente cruciforme em material fresco, parte apical côncava com depressão central, estilete cilíndrico de base abaulada, estigma levemente capitado. Estames, 4, filetes delgados; conectivo deltóide, granuloso, esverdeado; nas exsiccatas apresentam cor escura; teças extrorsas. Baga de cerca. 0,8 cm diâmetro, esférica, lisa ou com lenticelas pontuais esparsas, na maturidade púrpura; sementes com cerca de 1,3 cm comprimento x 0,74 cm largura, 1-turbinada, hilo acuminado, rafe levemente

marcada com estrias transversais, laterais levemente rugosas (LOMBARDI, 1994).

Sua distribuição ocorre Colômbia, Venezuela, Peru, Brasil e Bolívia, em altitudes de 140 a 750-900m, em matas e principalmente nas margens e savana; florescendo de janeiro a maio e frutificando de fevereiro e agosto (LOMBARDI, 1994).

Conhecida popularmente como cipó de uvas, batata de cobra, chupão, cipó d'água, cipó mãe boa, condurango, mãe boa, parreira brava, uva do mato, videira brava (LOMBARDI,1994). Segundo Herter (1936) esta espécie é cultivada no Uruguai (citada como *Vitis pterophora*) onde recebe o nome de cortina japonesa. As folhas cozidas são empregadas contra edemas, reumatismo e béri-béri segundo CÔRREA (1926). Segundo PHILIPS (*in* PUTZ & MOONEY, 1991) *Cissus gongylodes* é uma importante planta domesticada pelos índios Kayapós no Brasil, onde plantas vivendo por mais de 40 anos são fontes de folhas e frutos comestíveis.

A extensa distribuição geográfica de *Cissus gongylodes* desde a região amazônica até o sudeste do Brasil não é acompanhada por diferenças morfológicas notáveis entre as populações vigentes. Nota-se que o material proveniente da região amazônica apresentam flores e inflorescências iguais àquelas coletadas no sudeste. Observa-se apenas que no primeiro os folíolos apresentam peciólulos mais longos (LOMBARDI, 1994).

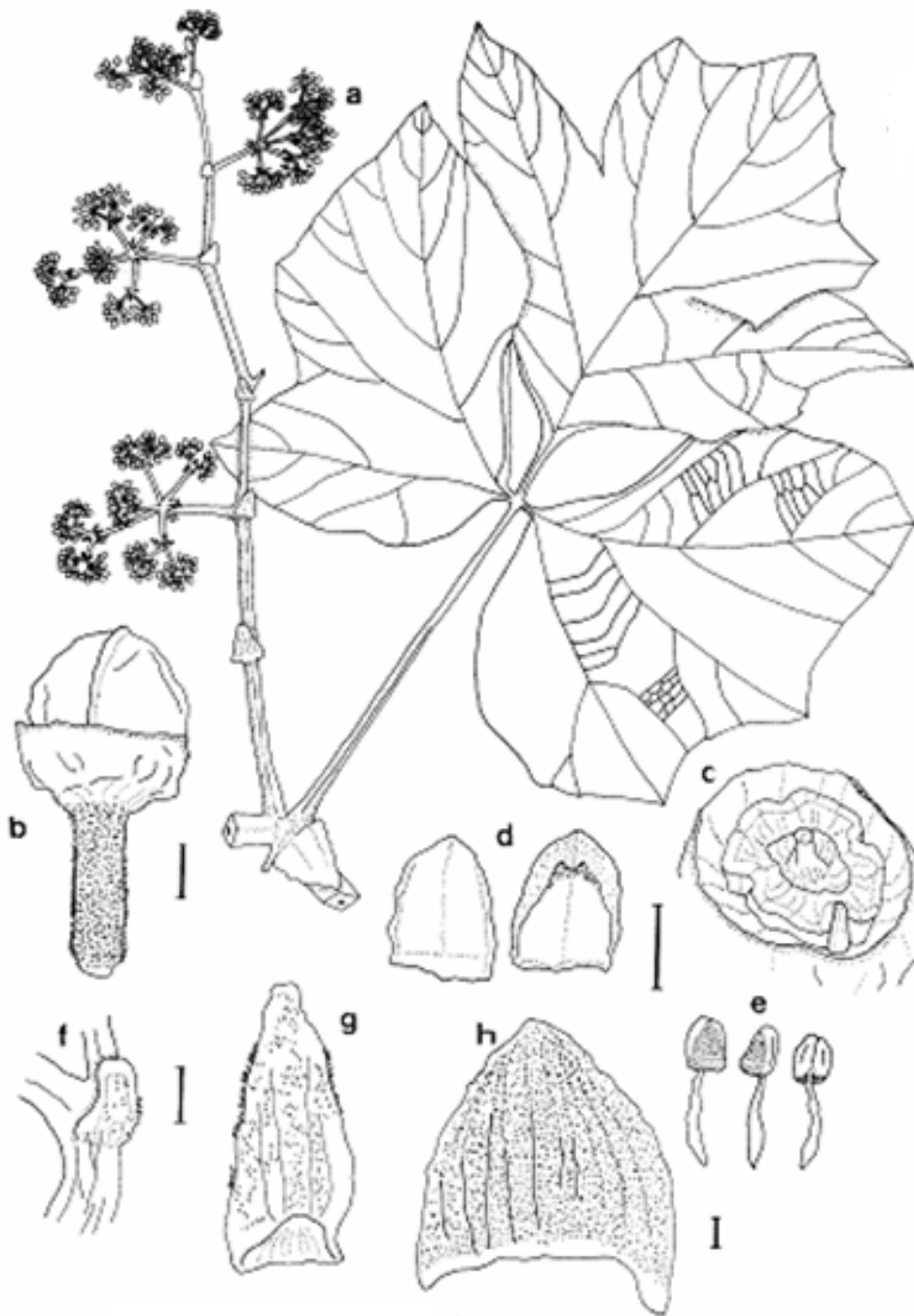


Figura 1: *Cissus gongylodes* a: hábito, notando-se a folha do ramo vegetativo na parte inferior; b: botão; c: aspecto superior do disco nectarífero; d: pétalas, vista dorsal e ventral; e: estames, vista ventral, lateral e dorsal; f: escama da gavinha; g: brácteas; h: estípula. Escala 1 cm (a), 1 mm (b-h) (LOMBARDI,1994).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Realizar uma análise farmacobotânica de exemplares ocorrentes no “Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF/UNESP, Campus de Araraquara”;
- Estudo da seguridade dos extratos aquosos obtidos do caule e das folhas de *Cissus gongylodes*, avaliando alguns parâmetros da toxicidade pré-clínica.

Objetivos específicos:

- Obter drogas vegetais distintas;
- Realizar ensaios fitoquímicos preliminares das drogas eleitas comparando com os testes histoquímicos;
- Realizar o controle de qualidade físico-químico e microbiológico das drogas eleitas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das drogas vegetais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As partes aéreas de *C. gongylodes* foram coletadas no “Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara, Araraquara-SP (altitude 661m; latitude Sul: 21° 48’ 51,4’’; longitude Oeste: 48° 12’ 5,1’’).

4.2 Análise anatômica

Os fragmentos de órgãos ou estruturas vegetais de 0,5cm² ou 0,5cm³, conforme a dimensão (região nervural da parte mediana do folíolo central; pecíolo; caule herbáceo da porção terminal (não menos que a 40cm do ápice) de ramos jovens) foram fixados em solução de Karnovsky durante 24 horas sob condições de vácuo. Após este período foram submetidos à desidratação em série etanólica (30-100%) e posteriormente foram submetidos à inclusão em historresina glicol metacrilato—segundo as recomendações de KRAUS e ARDUIN (1997) e as instruções do fabricante (Leica®). Os cortes foram obtidos em micrótomo de rotação e aderidos em lâminas de vidro para microscopia de luz. A coloração constou da aplicação de solução aquosa de azul de toluidina a pH 6,8 durante 3 minutos. Após lavagem em água corrente por igual tempo, as lâminas com os cortes corados foram postas a secar em estufa a 40 °C durante 24 horas. As lamínulas foram afixadas com resina Permount®.

Os cortes foram analisados em microscópio Olympus® e as melhores imagens foram registradas em microscópio Leica® associado a sistema de captura de imagens (software DC Viewer) do Laboratório de Parasitologia da FCF/UNESP.

4.3 Análise histoquímica

Para realização dos ensaios histoquímicos foram obtidos cortes transversais a mão de amostras da região mediana do folíolo central das folhas e do caule de *C. gongylodes*.

O controle negativo para os testes histoquímicos constou de cortes tratados com hipoclorito de sódio 2% até descoloração completa e posterior lavagem sucessiva em água destilada (3 vezes).

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações propostas por ASCENSÃO (2003), tanto para identificação de substâncias apolares como para as polares. Os reagentes empregados para evidenciar as substâncias apolares foram: Sudan III (JOHANSEN, 1940) para lipídios totais; sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947) para diferenciação de lipídios ácidos e neutros; tetróxido de ósmio (GANTER E JOLLÉS, 1969 e 1970) para a identificação de lipídios insaturados; reagente de NADI (DAVID E CARDE, 1964) para identificação de óleos essenciais e oleoresinas; tricloreto de antimônio (HARDMAN E SOFOWORA, 1972; MACE et al., 1974) para identificação de esteróides; ácido sulfúrico (GEISSMAN e GRIFFIN, 1971) para identificação de lactonas sesquiterpênicas, e 2,4–dinitrofenilhidrazina (GANTER e JOLLÉS, 1969-1970)

para identificação de terpenóides com grupo carbonila. Para substâncias polares foram empregados: cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para a identificação de compostos fenólicos totais; vanilina clorídrica (MACE e HOWELL, 1974) para a identificação de taninos, reagente de Dragendorff (SVENDSEN e VERPOORTE, 1983) para identificação de alcalóides; PAS (MCMANUS, 1948) para identificação de polissacarídeos totais; lugol (JENSEN, 1962) para a identificação de amido; e azul brilhante de Comassie (FISCHER, 1968) para identificar proteínas totais.

De acordo com KRAUS E ARDUIN (1997), os testes usados nos estudos anatômicos para o reconhecimento de metabólitos celulares, em geral, reagem a mais de uma substância, gerando a necessidade de testes complementares, com controle, para garantir correta interpretação. Em razão dessa recomendação, foram realizadas de uma a três repetições para cada substância, sendo considerados passíveis de testes complementares aqueles compostos determinados por apenas uma reação de coloração.

4.4 Obtenção das drogas vegetais

As folhas e o caule de *C. gongylodes* foram segregados e higienizados com água potável e submetidas à desinfecção por imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 0,1% durante 20 minutos, seguidas por lavagem em água corrente e secagem prévia em papel absorvente. Após este procedimento as partes da planta foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 72 horas. Após este período procedeu-

se à moagem do material em moinho de facas e armazenamento do triturado em frascos plásticos pretos com tampas herméticas.

4.5 Análise Farmacognóstica

4.5.1 Caracterização fitoquímica preliminar

Para a caracterização fitoquímica da planta foram realizados testes clássicos de identificação para os principais grupos de princípios ativos (MELLO et al., 2000; HARBONE; 1998 e FALKENBERG et al., 2003): flavonóides (reação de Shinoda, reação com cloreto férrico e reação com cloreto de alumínio), saponinas, cardiotônicos (reação de Liebermann-Burchard, reação de Balje, reação de Keller-Kiliani e reação de Kedde), antraquinonas, polifenóis totais (Reagente de Folin-Ciocalteu), taninos (reação com gelatina, cloreto férrico e acetato de chumbo) e alcalóides (solúveis em meio ácido e meio básico: reações de Dragendorff, Bertrand, Valser-Mayer e Bouchardat). Para as saponinas determinou-se também o índice de espuma.

4.6 Controle de Qualidade Físico-Químico da droga vegetal

Os métodos de avaliação da droga vegetal foram desenvolvidos segundo normas farmacopeicas e outras técnicas não farmacopéicas.

4.6.1 Densidade aparente da droga pulverizada.

A determinação da densidade aparente da droga vegetal pulverizada foi realizada segundo MARTINS e SACRAMENTO (2004), foram amostradas triplicatas distintas de quantidades aleatórias suficientes para o preenchimento de 25 cápsulas gelatinosas de tamanho 00, volume médio de 0,95mL e de massa conhecida, dispostas em encapsulador. Em seguida, a massa das cápsulas preenchidas foi determinada e a densidade aparente calculada pela relação massa/volume.

4.6.2 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho.

Amostras de 4,0 g de droga vegetal moída, exatamente pesadas, foram submetidas ao aquecimento (110 °C) por raios infravermelhos pelo período de aproximadamente 1 h. Após este período foi realizada a leitura do peso. Este procedimento foi realizado de hora em hora até que o peso não variasse mais do que 0,25%. A porcentagem da perda por dessecação foi calculada pela equação segundo Farmacopeia Brasileira (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.9.) e expresso pela média de três determinações.

4.6.3 Determinação de valor pH

Pelo processo extrativo de infusão preparou-se uma solução a 1% (m/v) das folhas e do caule de *C. gongylodes*, após 15 minutos realizou-se a filtração utilizando algodão. Aguardou o arrefecimento da solução extrativa obtida para a verificação do pH da solução-problema em peagômetro (Analion® pH-metro), previamente calibrado. Para uma melhor reprodutibilidade deste teste o valor do pH da água também foi verificado (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.2.19.). O resultado foi expresso pela média de três determinações.

4.6.4 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas totais foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira (DETERMINAÇÃO, 1988, p.V.4.2.4.), onde calcinou-se previamente o cadinho de porcelana em mufla a 450 °C por 30 minutos. O mesmo foi resfriado em dessecador (15 minutos) e seu peso determinado em balança analítica. Pesou-se exatamente 3,0 g da droga vegetal, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas, deixando em dessecador para arrefecimento durante 15 minutos e pesagem posterior. Foi repetida a técnica até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga (% p/p) e representando a média de três determinações.

4.6.5 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

Os resíduos obtidos na determinação de cinzas totais foram aquecidos à ebulição durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico 7% (p/V) em cadinhos cobertos com vidro de relógio. Em seguida, o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente e essa água transferida para o cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido em papel de filtro isento de cinzas, e lavado com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, o mesmo foi seco em chapa quente e incinerado a 500 °C até peso constante. (DETERMINAÇÃO, 1988, p. V.4.2.5.). Os resultados calculados foram expressos em porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca e representados pela média de três determinações.

4.6.6 Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesado, foi submetido à decocção com 100 mL de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado a 100 mL. A solução restante foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20 mL desprezados. Do restante do filtrado, pesou-se uma alíquota equivalente a 20 g, em pesa-filtro previamente tarado e evaporando até secura em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 3 h. Em seguida, resfriado em dessecador e pesado (MELLO e PETROVICK, 2000). O teor de extrativos foi

calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g \times FD \times 100}{m}$$

Onde:

TE = teor de extrativos (%m/m)

g = massa de resíduo seco (g)

m = massa da amostra (g)

FD = fator de diluição (5)

4.7 Controle de Qualidade Microbiológico.

O controle de qualidade microbiológico foi realizado segundo USP, 23 (2006), de acordo com a metodologia para análise de produtos não estéreis. Utilizou-se caldos de enriquecimento e meios seletivos para a pesquisa de identificação de *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4.7.1 Contagem de microrganismos viáveis

Transferiu-se, assepticamente, 10,0 g da amostra para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 min. Após a homogeneização, foi

pipetado 1,0 mL da amostra 1:10 e adicionados 20,0 mL ágar tioglicolato para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras, a 47° C em placa de Petri, que foram colocadas em estufa a 35° C por 24h e 25° C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

4.7.2 Pesquisa de *Salmonella sp* e *Escherichia coli*

Transferiu-se assepticamente, 1,0 g da amostra para 9,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, incubados a 35 °C durante 24 a 48 h. Após este período, foi transferido 1 mL do caldo lactosado para 2 tubos contendo caldo tetrionato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, foi semeado a amostra do caldo tetrionato para 1 tubo contendo agar verde brilhante e duas placas de Petri contendo agar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e agar bismuto sulfito. Foi realizada da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferido para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 h. Foram observadas as características das colônias.

Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado, foi transferido para placa contendo agar Mac Conkey e incubado a 35 °C por 24 h.

4.7.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Transferiu-se assepticamente, 1,0 g da amostra para 9,0 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, foi semeado uma alçada em placas de agar Vogel Johnson e agar cetrimida, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Foram observados as características das colônias a confirmação é realizada através de método de coloração de Gram.

4.8 Atividade Antimicrobiana

4.8.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC10231).

4.8.2 Soluções

Os extratos das folhas e do caule de *C. gongylodes* foram obtidos separadamente através do decocto para o caule e infusão para as folhas empregando-se a proporção de droga/água de 1:10 (m/m). O tempo de extração utilizado foi de 10 minutos para a infusão e 15 minutos para a decocção. Os extratos aquosos foram preparados da mesma maneira que a população prepara, utilizando água como solvente.

O decocto do caule (DC) e o infuso das folhas (IF) de *Cissus gongylodes* foram concentrados pó por aquecimento controlado a 40 °C até *secura*, prepararam-se soluções das seguintes concentrações em mg/mL: 10, 25, 50, 100, 200 e 300 acrescida de aproximadamente 0,015mL de polisorbato 80.

4.8.3 Difusão em ágar

O ensaio foi realizado de acordo com BAUER et al (1966), onde culturas desenvolvidas em caldo BHI por 24 horas foram diluídas convenientemente (cerca de 10⁸ bactérias/mL) e semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com 20 µL dos extratos a serem testados, foram colocados sobre a superfície do ágar inoculado. Após incubação por 48 horas a 37 °C, observou-se os halos de inibição das amostras. Foram utilizados como controle negativo água e polissorbato 80 e como controle positivo foram usados cetoconazol (40 µg/disco) e de

ciprofloxacino (5 µg/disco) (SAIRAM et al., 2000; MURAT et al., 2003; GULÇIN et al., 2004).

4.9 Estudo toxicológico pré – clínico de extratos aquosos de *C. gongylodes*.

4.9.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio em torno de 200g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas às 07:00h) e tiveram alimento e água a vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

Foram utilizados um total de 10 animais distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo I: animais tratados com infusão das folhas de *Cissus gongylodes* (IF) por gavagem (05 machos e 05 fêmeas).
- Grupo II: animais tratados com decocto do caule de *Cissus gongylodes* (DC) por gavagem (05 machos e 05 fêmeas).
- Grupo III: animais tratados com uma mistura de partes iguais do decocto do caule e das folhas de *Cissus gongylodes* (F+C) por gavagem (05 machos e 05 fêmeas).

- Grupo IV: grupo controle receberam solução salina (05 machos e 05 fêmeas).

Os extratos das folhas e do caule de *C. gongylodes* foram obtidos separadamente através do decocto para o caule e infusão para as folhas empregando-se a proporção de droga/água de 1:10 (m/m). O tempo de extração utilizado foi de 10 minutos para a infusão e 15 minutos para a decocção. Os extratos aquosos foram preparados da mesma maneira que a população prepara, utilizando água como solvente.

Os extratos aquosos foram administrados por gavagem e a dosagem estabelecida foi a de 5000 mg/Kg, considerada dosagem máxima de acordo com a resolução RDC 17/2000 (ANVISA).

4.9.2 Ensaio *in vivo*

O ensaio foi realizado segundo VASCONCELOS (2007), onde os animais receberam o decocto, diariamente por 07 dias, após jejum diário de 12 horas; uma hora após a administração do decocto os animais receberam água e alimentação. Ao final dos 07 dias de tratamento os animais foram decaptados e determinaram-se a massa dos órgãos: coração, pulmão, fígado, rins e baço para determinação do peso relativo dos órgãos.

Coletou-se o sangue dos animais para a determinação de parâmetros bioquímicos. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1800 rpm e os plasmas mantidos a -20° C até a realização das análises laboratoriais.

A determinação do peso relativo dos órgãos foi obtida pela fórmula:

$$\text{Peso relativo dos \u00f3rg\u00e3os(\%)} = \frac{\text{Peso do \u00f3rg\u00e3o}}{\text{Peso do animal}} \times 100$$

As compara\u00e7\u00f5es estat\u00edsticas foram realizadas utilizando-se o software Graphpad-Instat\u2122 com aplica\u00e7\u00e3o de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Valor de probabilidade de 5% ou menos foram considerados significantes (ARANGO, 2001).

Este experimento foi aprovado pelo comit\u00ea de \u00c9tica em Pesquisa desta faculdade atrav\u00e9s do parecer n\u00b039/2008 (Anexo 01).

4.9.3 Determina\u00e7\u00e3o das transaminases s\u00e9ricas.

Aspartato aminotransferase (AST) foi determinada de acordo com m\u00e9todo de monitoramento cont\u00ednuo descrito por BERGMAYER et al (1977), utilizando kit reagente LABTEST\u2122.

Alanina aminotransferase (ALT) foi determinada por m\u00e9todo cin\u00e9tico descrito por WR\u00d3BLENSKI & LADUE (1956) e RECOMMENDATION (1972), utilizando kit reagente LABTEST\u2122.

4.9.4 Determina\u00e7\u00e3o da creatinina s\u00e9rica.

A creatinina foi determinada por m\u00e9todo cin\u00e9tico descrito RECOMMENDATION (1972), utilizando o kit reagente LABTEST\u2122.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de plantas medicinais crescem exponencialmente, e o conhecimento popular, muitas vezes baseado apenas em evidências, abrange ampla diversidade de espécies vegetais que ainda não possuem estudos científicos. Torna-se imprescindível no meio acadêmico realizar estudos de caracterização, controle de qualidade e avaliação da segurança no uso popular destas espécies, podendo assim, difundir uma informação idônea e concreta sobre as atividades terapêuticas e segurança no uso de plantas medicinais à população.

No entanto, é necessário conscientizar a população sobre o tipo de planta empregada, evitando-se assim, possíveis equívocos na identificação das espécies, pois como já se sabe, uma mesma espécie possui diversos nomes populares, e estes podem ser atribuídos muitas vezes a mais de uma espécie vegetal. *Cissus gongylodes*, por exemplo, pode ser popularmente conhecido como mãe-boá, cipó de uvas e uva ursa, deve-se ter atenção, porém que o nome popular uva ursi, refere-se à outra espécie vegetal.

5.1 Caracterização de *Cissus gongylodes*

A etapa inicial do estudo de plantas medicinais consiste na confirmação da identidade das mesmas, com base em descrições macro e microscópicas constantes em monografias. Quando essas descrições são complementadas

com ilustrações do material em análise, o reconhecimento das estruturas vegetais é facilitado.

5.1.1 Características macroscópicas

Esses ensaios foram realizados com auxílio de lupa com aumento máximo de quatro vezes. A análise macroscópica de *Cissus gongylodes* Planchon revelou ramos suculentos, angulados, vegetativos com lenticelas esparsas. Gavinhas dicotômicamente ramificadas várias vezes, discos adesivos nas extremidades. Folhas compostas trifolioladas, pubérulas em ambas as faces; margem denticulada, folhas novas com margem ondulada, papiráceas e levemente carnosas. Inflorescência aplanada; brácteas triangulares, cálice truncado esverdeado, papiloso, fechado em botão, carnosos, lateralmente alargado. Corola esverdeada, papilosa; quatro pétalas coerentes. Baga esférica, lisa ou com lenticelas pontuais esparsas, na maturidade púrpura, que segundo LOMBARDI (1994) caracteriza um exemplar de *Cissus gongylodes* Planchon.

Tais informações são importantes no controle de qualidade farmacobotânico de matérias-primas vegetais, proporcionando condições para a identificação de lotes adulterados (SANCHES, 2007).

5.1.2 Características microscópicas

Nas Figuras 2, 3 e 4 estão apresentados os cortes anatômicos preparados a partir das folhas e do caule de *C. gongyloides*. Observam-se as diferentes tonalidades adquiridas pela ação metacromática do azul de toluidina pH 6,8 elementos traqueais e esclerênquima (verde ou verde azulado); colênquima, parênquima e elementos de tubo crivado e células companheiras (azul cobalto ou púrpura).

A Figura 2 exhibe as secções referentes ao caule de *C. gongyloides* que apresenta epiderme uniestratificada, subjacentes à epiderme encontram-se diversas camadas de parênquima clorofiliano, sendo o xilema primário preservado e a formação de elementos de vaso do xilema secundário.

A medula é bem desenvolvida com grandes células parenquimáticas com os vacúolos ocupando quase todo o estelo.

O mesofilo do tipo heterogeneo (Figura 3) é constituído por uma camada de parênquima paliçádico seguido de parênquima lacunoso. A epiderme da lamina foliar é unisseriada, formada por células justapostas. Há tricomas tectores longos distribuídos por toda estrutura foliar. HALLAHAN e GRAY (2000) sugerem que os tricomas podem atuar na proteção da planta a vários fatores externos, tais como, herbivoria e patógeno, excessiva incidência de luz, altas temperaturas, perda excessiva de água.

Os cortes da Figura 4 revelam o aspecto geral da nervura central, observa-se com maior ênfase o feixe vascular na Figura 4-F e 4-G. Os feixes vasculares são colaterais e organizados em número de cinco.

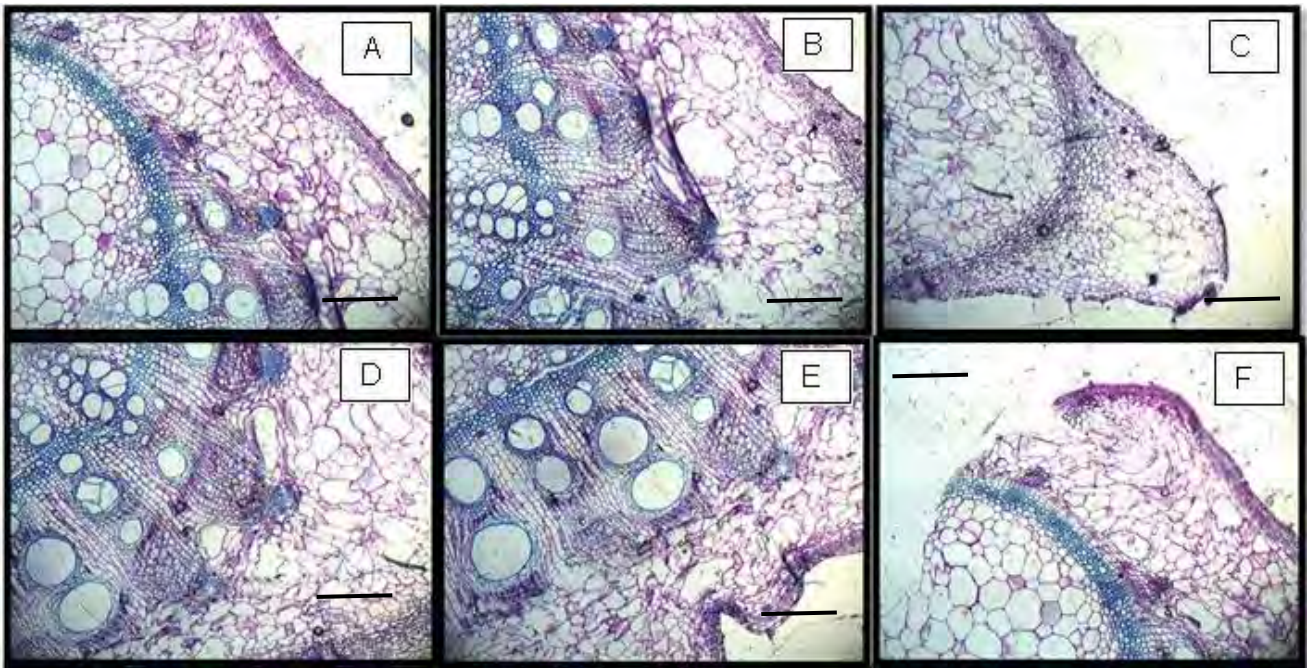


Figura 2. Aspectos anatômicos do caule de *C. gongylodes*. Barras: 110 μ m.

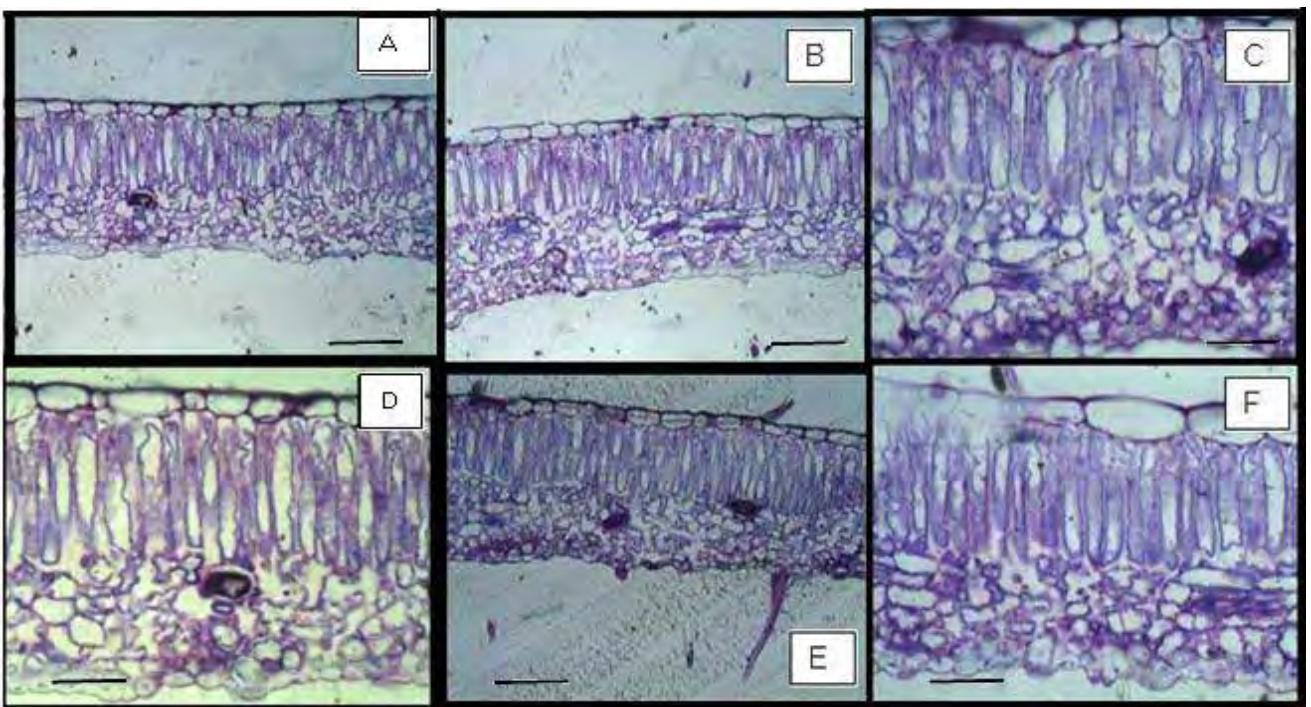


Figura 3. Aspectos anatômicos das folhas de *C. gongylodes*: A: Barra: 10 μ m; B,D e E: Barra: 40 μ m; C,F: Barra: 10 μ m

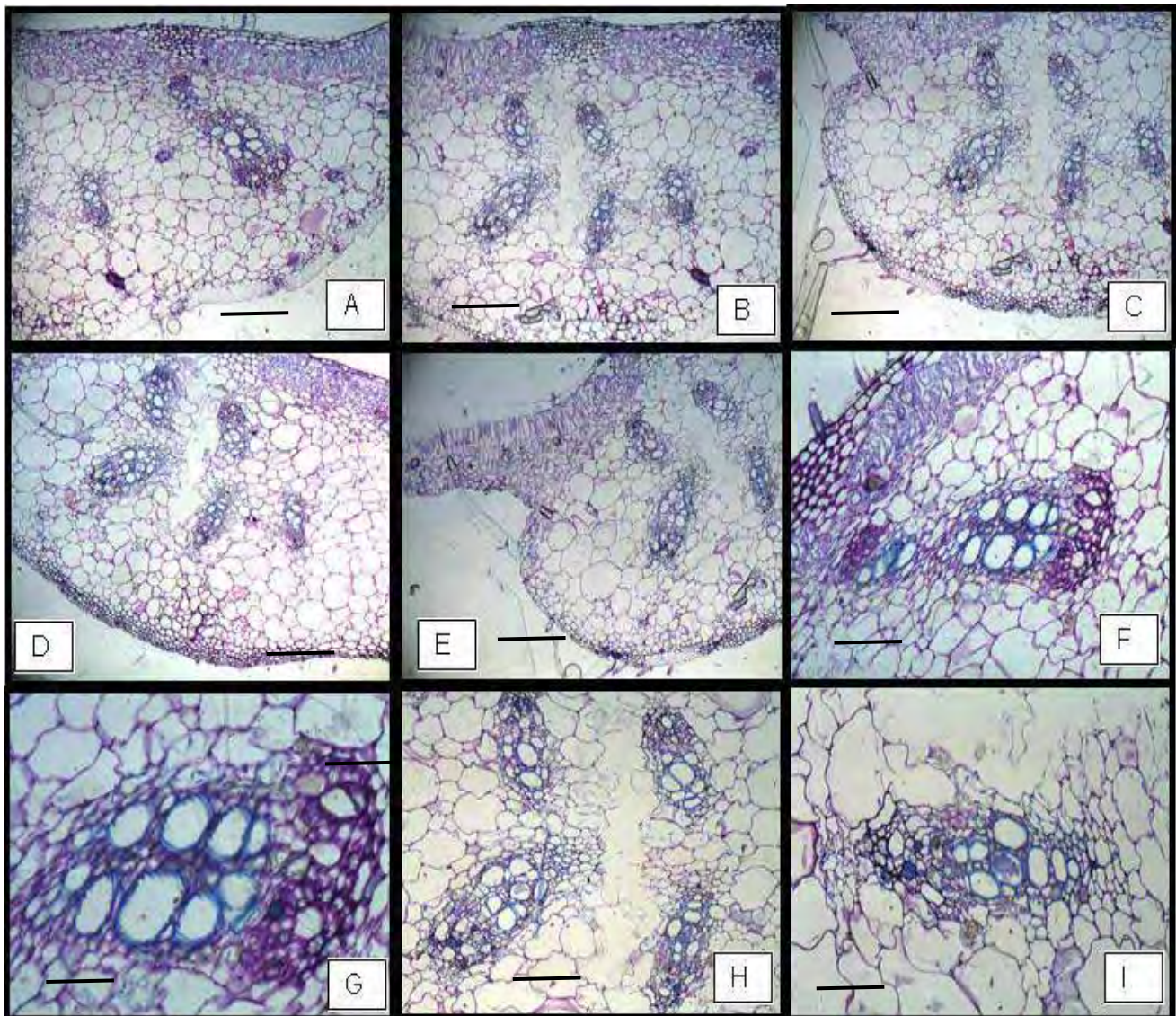


Figura 4: Aspectos anatômicos da nervura central de *C. gongyloides*: A, B, C, D e E: Barra: 110 µm; F e H: Barra: 40 µm; G e I: Barra: 10 µm.

5.2 Ensaio Histoquímico

Após a caracterização macro e microscópica realizou-se a determinação qualitativa de marcadores químicos e/ou princípios ativos, complementado a caracterização do vegetal. Os resultados dos ensaios histoquímicos podem ser indícios de determinadas atividades terapêuticas, pois a presença de determinados compostos derivados do metabolismo secundário pode ser indicativa de atividades terapêuticas que devem ser constatadas posteriormente.

As seções da folha de *C. gongylodes* foram realizadas, a partir da nervura central da lâmina foliar. Os caules foram cortados em transversal e todos os ensaios foram confrontados com seus respectivos cortes clarificados.

A Tabela 1 mostra os principais compostos com características lipofílicas por meio de corantes ou reagentes identificadores no caule e na folha de *C. gongylodes*. A Tabela 2 indica os principais compostos hidrofílicos identificados no caule e na folha da espécie estudada. As Figuras 5, 6, 7 e 8 indicam as fotomicrografias do caule e da folha de *C. gongylodes*, mediante as reações químicas ocorridas.

Tabela 1: Ensaio histoquímico realizado nas folhas e caule de *C. gongylodes* por meio de corantes ou reagentes identificadores de substâncias lipofílicas.

Reagente/Corante	Identificação	Cor (Resultado positivo)	Caule	Folha
Sudan III	Lipídios totais	Vermelho	+	+
Sulfato azul do Nilo	Lipídios ácidos e neutros	Rosa (ácido) /Azul (neutro)	-	+
Tetróxido de ósmio	Lipídios insaturados	Preto	-	-
Reagente de NADI	óleos essenciais e oleoresinas	Azul (óleos)/Vermelho (resinas)	-	-
Tricloreto de antimônio	Esteróides	Vermelho-alaranjado	-	-
Ácido sulfúrico	Lactonas sesquiterpênicas	Vermelho-acastanhado	-	-
2,4-dinitrofenilhidrazina	Terpenóides com grupo carbonila	Vermelho-alaranjado	-	+

(-) Reação negativa, (+) Reação positiva

Tabela 2: Ensaio histoquímico realizado nas folhas e caule de *C. gongylodes* por meio de reagentes identificadores de substâncias hidrofílicas.

Reagente/Corante	Identificação	Cor (Resultado positivo)	Caule	Folha
Cloreto Férrico	Compostos Fenólicos Totais	Preto	+	+
Vanilina clorídrica	Taninos	Vermelho	+	-
Tetróxido de ósmio	Lipídios insaturados	Preto	-	-
Reagente de Dragendorff	Alcalóides	Castanho-avermelhado	+	+
PAS	Polissacarídeos totais	Rosa intenso	-	-
Lugol	Amido	Roxo	+	-
Azul brilhante de Comassiê	Proteínas	Azul	-	+

(-) Reação negativa, (+) Reação positiva

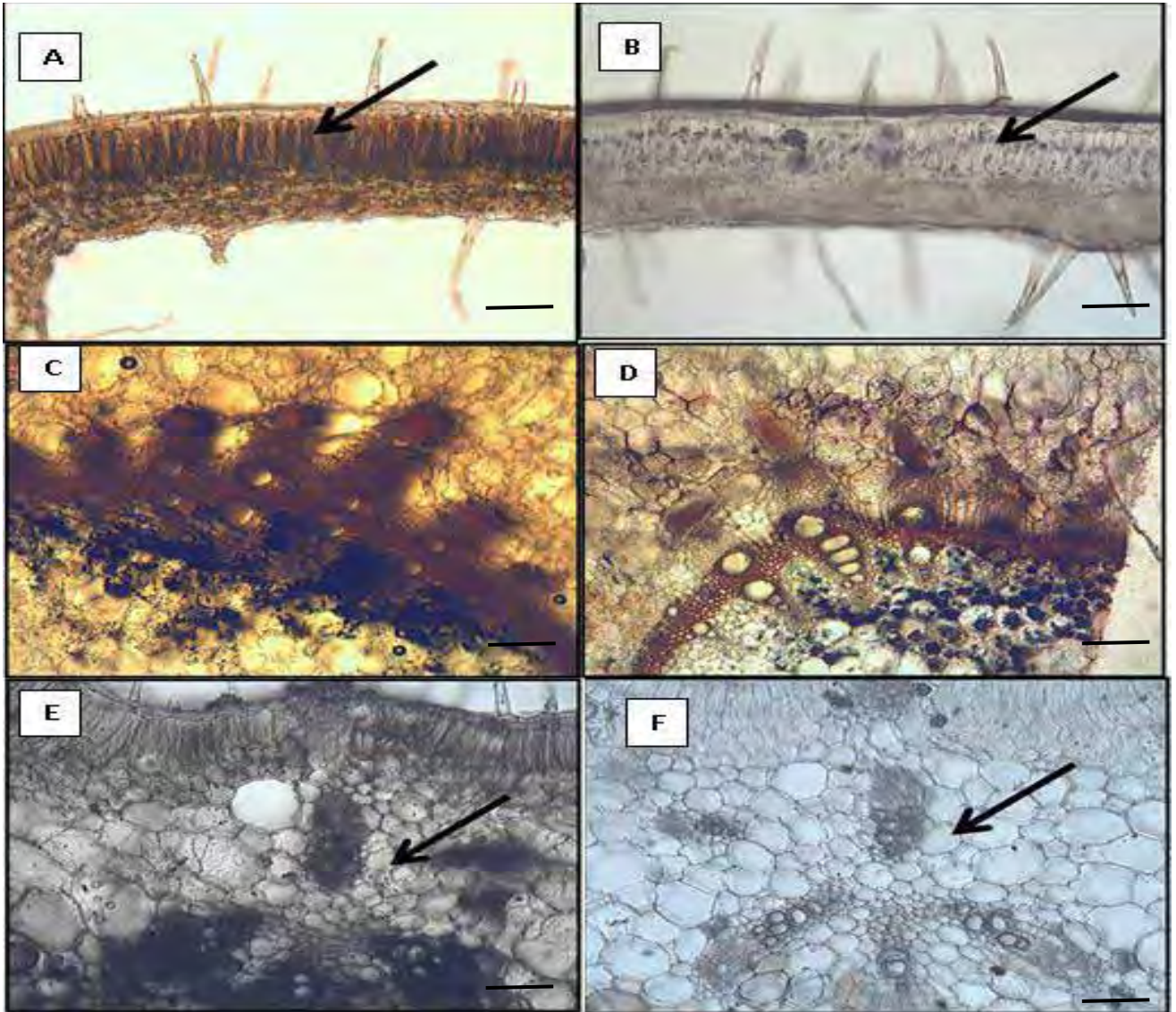


Figura 5. A: Cortes transversais da folha de *C. gongylodes* corados com reagente de Dragendorff, B: controle (Barra 40 μ m); C: Cortes transversais do caule de *C. gongylodes* corados com reagente de Dragendorff, D: controle (Barra 40 μ m); E: Cortes transversais da folha de *C. gongylodes* corados com cloreto férrico; F: controle (Barra 40 μ m).

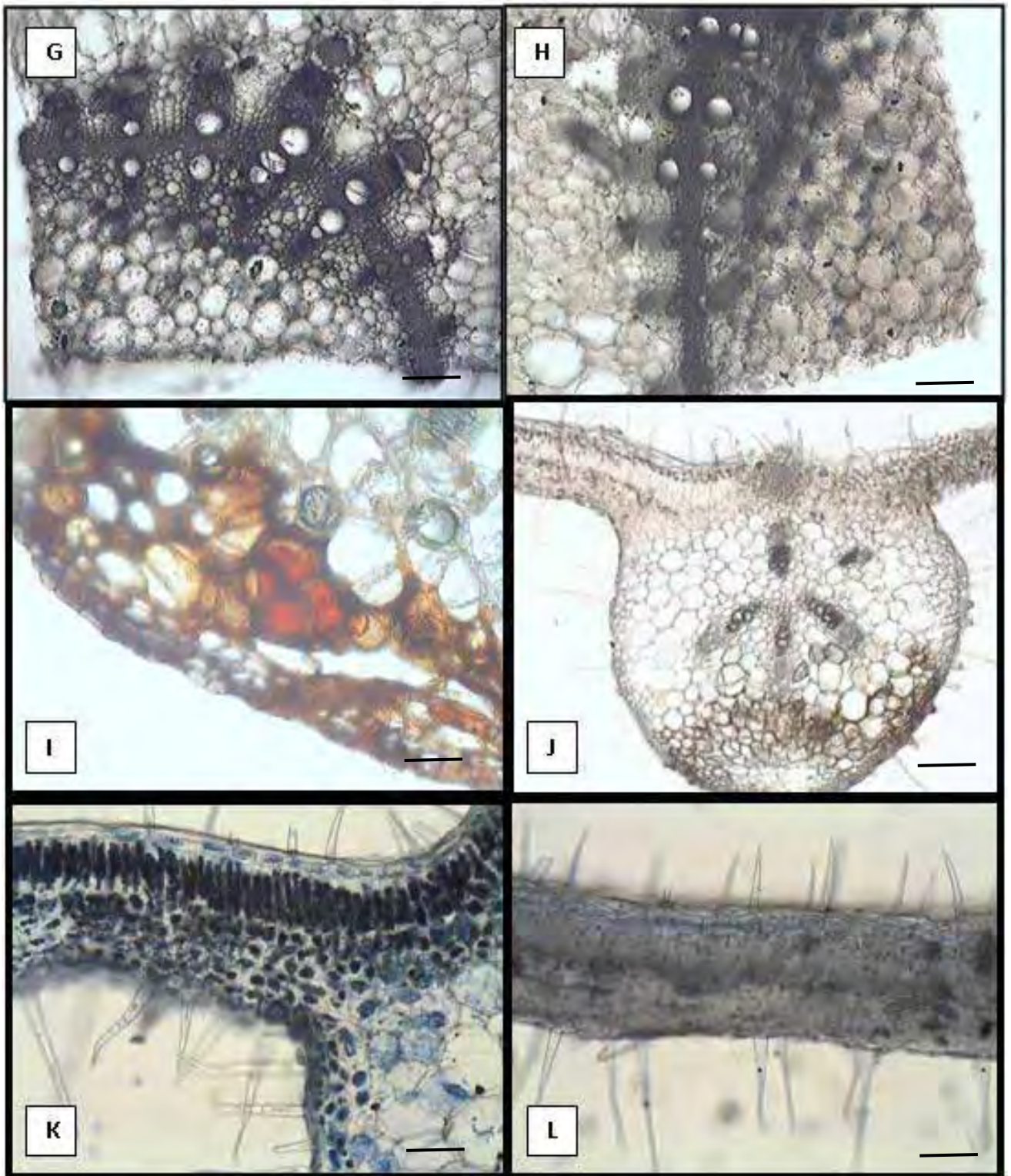


Figura 6. G: Cortes transversais do caule de *C. gongylodes* corados com cloreto férrico, H: controle (barra 110 μm); I: Cortes transversais do caule de *C. gongylodes* corados com vanilina clorídrica (barra 10 μm); J – controle (barra 110 μm); K: Cortes transversais da folha de *C. gongylodes* corados com azul de comassiê, L: controle, (barra 40 μm).

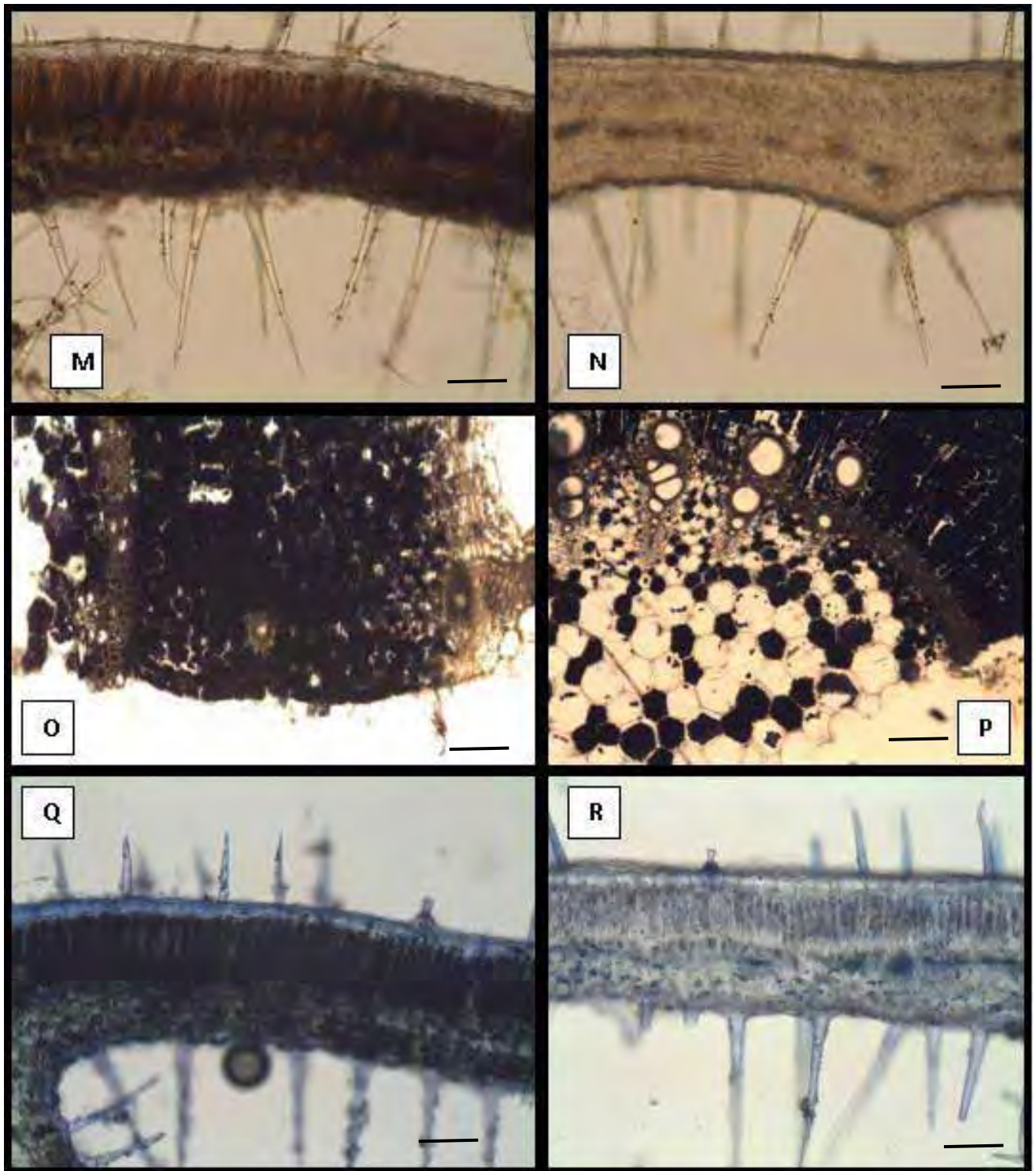


Figura 7. M -Cortes transversais da folha de *C. gongyloides*. N: 2,4-DNF, controle (Barra 40 μm); O: Cortes transversais do caule de *C. gongyloides* corados com Lugol. P: controle (Barra 110 μm); Q: Cortes transversais da folha de *C. gongyloides* corados com Sulfato de Azul do Nilo; R: controle (Barra 40 μm).

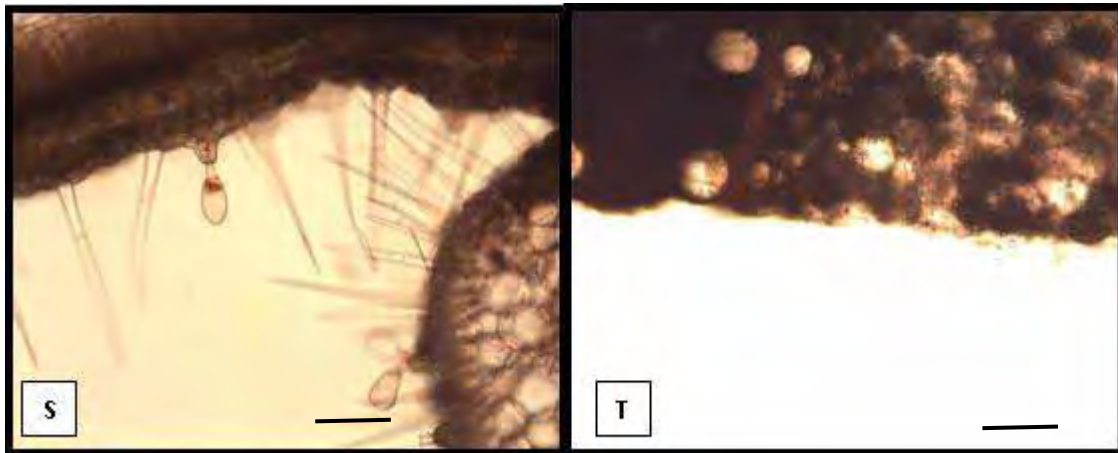


Figura 8. S: Cortes transversais da folha de *C. gongyloides* corados Vermelho de Sudan (barra 40 μm); T: Cortes transversais do caule de *C. gongyloides* corados Vermelho de Sudan (barra 110 μm).

Os cortes transversais à mão da folha de *C. gongyloides* evidenciam a presença de alcalóides no mesofilo (Figura 5-A) e no parênquima (Figura 5-C). A Figura 5-E indica cortes transversais da folha de *C. gongyloides* evidenciando a presença de compostos fenólicos na nervura central e no parênquima (Figura 6-G).

Cortes transversais do caule de *C. gongyloides* evidenciam a presença de taninos na nervura central (Figura 6-I), e nos cortes da folha de *C. gongyloides* (Figura 6 -K) verificou-se a presença de proteínas totais no mesofilo.

A ocorrência de terpenóides com grupo carboxila foi evidenciada no mesofilo (Figura 7-M), bem como a de amido foi constatada no parênquima (Figura 7-O). Lipídeos ácidos e neutros foram verificados no mesofilo (Figura 7-Q), e também foram evidenciados lipídeos gerais em tricomas (Figura 8 - S) e no parênquima (Figura 8 - T).

5.3 Processamento da droga vegetal

5.2.1 Secagem

A secagem é uma etapa imprescindível no estudo das plantas medicinais, ela pode ser realizada ao sol, à sombra ou em estufa, sempre com circulação de ar. Com o material seco, previnem-se reações de oxidação, hidrólise, ataque de microrganismos, entre outros (MACIEL, 2002). A secagem tem por finalidade a retirada de água e com isso, impedir as reações de hidrólise e de crescimento microbiano. A umidade residual dependerá do tipo de órgão que constitui o material vegetal (BACCHI, 1996) e da eficiência do processo de secagem.

As partes aéreas de *C. gongylodes* foram segregadas em folhas e caules, sendo desprezadas as gavinhas e flores. Removeu-se todo material estranho. Procedeu-se a higienização utilizando como agente desinfetante o hipoclorito de sódio e a secagem separadamente das folhas e caule, ambos utilizando estufa com circulação forçada de ar a 40^o C por 72 horas. Após este período as folhas de *C. gongylodes* encontravam-se totalmente secas, porém observou-se que na secagem do caule de *C. gongylodes*, a esta temperatura ocorreu crescimento de fungos.

Para solucionar o problema na secagem do caule realizou-se a fragmentação do caule e ao cortar o caule fresco, verifica-se a liberação instantânea de um exsudado de consistência viscosa e pegajosa indicando, possivelmente, a presença de mucilagem. A presença deste exsudado pode

ser o motivo do surgimento de colônias de fungos. Os fragmentos de menor tamanho foram submetidos à secagem a 40^o C por 72 horas, onde ocorreu a completa secagem do material.

5.2.2 Moagem

Após a secagem os fragmentos de folhas e caule de *C. gongylodes*, foram separadamente submetidos ao moinho de facas, obtendo-se o pó, para aumentar a área de contato entre material sólido em pó e o líquido extrator tornando mais eficiente a operação. A escolha das dimensões mais apropriadas depende também da textura do órgão vegetal. Quanto mais rígidos forem os tecidos, maior será o grau de divisão necessário (FALKENBERG, SANTOS, SIMÕES; 2007).

De acordo com a natureza da droga vegetal, são recomendados diferentes níveis de redução de tamanho de partículas para o processo de extração e mistura (Tabela 3).

Tabela 3: Nível de redução de partícula segundo o tipo de droga vegetal.

Classificação	Diâmetro médio das partículas
Corte Grosso	5-10 mm
Corte Semifino	0,5-5 mm
Corte fino	500-50 μm
Pó	1-50 μm

Fonte: SONAGLIO et al, 2003

A droga vegetal foi submetida a moagem por moinho de facas e posteriormente moinho de bolas, onde se obteve, após análise de granulométrica, grânulos com diâmetro médio de 0,200mm para o pó do caule de *C. gongylodes* e 0,160mm para o pó das folhas de *C. gongylodes*.

Observam-se na Figura 9 características do pó obtido a partir da folhas de *C. gongylodes* (PF) e pó obtido do caule de *C. gongylodes* (PC). A coloração do pó das folhas de *C. gongylodes*, é mais escura quando comparada com o pó do caule de *C. gongylodes*. Não foi possível comparar as características destas drogas vegetais, pois a planta estudada não possui monografia em compêndios oficiais e não foram encontrados periódicos que possibilitassem a comparação.

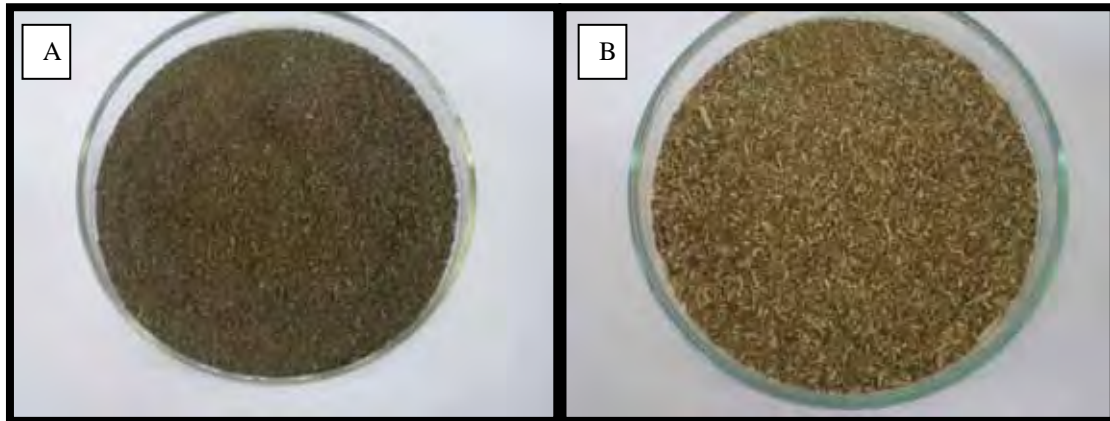


Figura 9: Pó das folhas (A) e do caule (B) de *C. gongylodes*

5.4 Ensaio farmacognósticos

O ensaio farmacognóstico foi realizado utilizando o pó das folhas de *C. gongylodes* (PF) e o pó do caule de *C. gongylodes* (PC). Os resultados da análise química do material são apresentados na Tabela 4 e demonstraram a presença de flavonóides, taninos e alcalóides.

Tais resultados demonstram o potencial terapêutico desta espécie, já que é conhecido que estes compostos são responsáveis por diversas atividades farmacológicas. Contudo são necessários estudos específicos para identificar as atividades terapêuticas.

Tabela 4: Análise fitoquímica preliminar

Grupos metabólitos	P.F	P.C
Flavonóides	+	+
Saponinas	-	-
Cardiotônicos	-	-
Antraquinonas	-	-
Glicosídeos Antraquinônicos	-	-
Taninos	+	+
Alcalóides	+	+

(+) positivo (-) negativo

5.5 Teor de polifenóis totais

Os resultados do teor de polifenóis totais são apresentados na Tabela 5, onde PF pó das folhas de *Cissus gongylodes* e PC pó do caule de *Cissus gongylodes*. A presença de polifenóis totais pode ser um indício de que a espécie vegetal possui atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade antiinflamatória e atividade antimicrobiana, já que os polifenóis conferem estas atividades.

Tabela 05: Determinação de polifenóis totais.

Ensaio	P.F	P.C
Determinação de polifenóis totais	3,10%±0,0023	3,31%±0,0015

5.6 Controle físico-químico de qualidade das drogas vegetais de *Cissus gongylodes*.

Vários ensaios foram realizados com o objetivo de controlar a qualidade da droga vegetal. As análises físico-químicas envolveram a determinação da perda por dessecação, determinação da densidade, determinação de cinzas totais, determinação de cinzas insolúveis em ácido, determinação de pH e determinação do teor de extrativos.

Os resultados do controle de qualidade físico-químico da droga vegetal são apresentados na Tabela 6.

Os resultados expressam os valores médios e desvio padrão de três determinações. Foram expressos na tabela os resultados da droga vegetal originada do pó das folhas de *Cissus gongylodes* (PF), e droga vegetal originada do pó do caule de *Cissus gongylodes* (PC).

Tabela 6: Controle de qualidade físico-químico das drogas vegetais.

Ensaio	P.F	P.C
Perda por dessecação	8,5% ± 0,114	9,1% ± 0,113
Densidade	0,86g/mL ± 0,197	0,92 g/mL ± 0,099
Cinzas totais	11,71% ± 0,207	12,61% ± 0,215
Cinzas insolúveis em ácido	1,3% ± 0,012	1,15% ± 0,053
pH	4,75 ± 0,007	3,87 ± 0,028
Teor de Extrativo	9,57% ± 0,293	9,09% ± 0,225

A determinação de perda por dessecação do P.F e do P.C apresentou respectivamente um valor de 8,5% e 9,1%, quando ocorreu o processo de estabilização. Esse resultado está de acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira que preconiza um valor da faixa de 8-14% para drogas vegetais.

Estas análises oferecem informações importantes para o armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal seca está diretamente relacionada com o seu armazenamento correto, que pode proporcionar contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos.

A densidade aparente para as partículas constitui-se numa exigência estabelecida pela RDC n. 48/2004 ANVISA. Uma vez que permite a manipulação correta de medicamentos fitoterápicos como, por exemplo, na produção de cápsulas. A densidade aparente obtida para PF foi de 0,86 g/mL e para PC 0,91 g/mL.

A cinza resultante da incineração do material vegetal pode ser fisiológica (componentes minerais da própria planta) e não fisiológicas (material estranho) (LEITE, 2009). A presença de altos teores de cinzas pode indicar a presença de cinzas não fisiológicas, o que pode ser indício de contaminação por areia e terra, proveniente de tratamento inadequado na colheita, higienização e processamento do material vegetal.

Observa-se que os valores obtidos de cinzas totais PF 11,71% e PC 12,61% também estão de acordo com o limite determinado pela Farmacopéia Brasileira (2000), o qual é de 14%.

Os resultados obtidos no ensaio de cinzas insolúveis em ácido foram de 1,3% P.F e 1,15% P.C, ambos apresentam-se dentro da faixa preconizada pela Farmacopéia (2000), máximo de 3%, o que indica que as amostras não foram contaminadas por material estranho, o que resultaria em altos valores de cinzas.

O valor de pH do extrato das drogas vegetais foram 4,75 para P.F. e 3,87 para P.C, o que sugere a presença de substâncias ácidas no farmacógeno estudado.

Com o objetivo de avaliar a quantidade de substâncias extraíveis, denominado de teor de extrativo, e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998), empregou-se a decocção em água, mesmo procedimento popularmente utilizado pela comunidade no consumo destas drogas vegetais. O rendimento encontrado foi PF 9,57% e PC 9,09%.

5.7 Controle de qualidade microbiológico

Considerando os diversos aspectos impostos para a garantia da qualidade do material botânico, que englobam não somente os aspectos físico-químicos, mas também o microbiológico, e considerando ainda, o fato dos materiais vegetais conterem um grande número de fungos e bactérias, pertencentes à sua microflora natural ou mesmo introduzidas durante a manipulação, contaminação esta que pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário realizou-

se o controle microbiológico do pó das folhas de *C. gongylodes* e pó do caule de *C. gongylodes* (SIMÕES et al, 2007).

Os resultados do controle microbiológico são expressos na tabela 07, os limites aceitos de acordo com a Farmacopéia Européia, Organização Mundial da Saúde e Farmacopéia Brasileira são apresentados na tabela 08, e permitem observar que não houve crescimento dos microrganismos patogênicos: *Enterobactérias*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus*. Observa-se na contagem do número total de bactérias que houve um crescimento de 460 UFC/g para PF e 350 UFC/g para PC, e para fungos e leveduras viáveis ocorreram crescimento de 220 UFC/g PF e 270 UFC/g PC.

O controle microbiológico tem como função determinar o número total de microrganismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, além de visar à identificação dos microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*, que não devem estar presentes (Farmacopéia Brasileira, 1988; SIMÕES et al., 2007). Esta análise visa assegurar o consumo de produtos de boa qualidade; ou seja, isentos de microrganismos patogênicos ou potencialmente prejudiciais, permitindo um número limite de microrganismos aceitáveis, assegurando qualidade microbiológica da droga vegetal.

Tais resultados permitem concluir que as drogas vegetais estudadas estão de acordo com as especificações encontradas na literatura e, portanto, encontram-se aprovadas para a preparação dos extratos.

Tabela 7: Controle de qualidade microbiológico do pó

Ensaio	PF	PC
Bactérias Totais	4,6 x 10 ² UFC/g	3,5 x 10 ² UFC/g
Fungos e Leveduras Totais	2,2 x 10 ² UFC/g	2,7 x 10 ² UFC/g
<i>Enterobactérias</i>	ausente	ausente
<i>Escherichia coli</i>	ausente	ausente
<i>Salmonella sp</i>	ausente	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausente	ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ausente	ausente

Tabela 08: Análise microbiológica e os limites tolerados de microrganismos para drogas vegetais.

Parâmetros	Eur. Ph (2002) ¹ UFC/g	Eur. Ph (2002) ² UFC/g	WHO ³ UFC/g	F. Bras ⁴ UFC/g
Microrganismos				
aeróbios	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁷
mesófilos totais				
Enterobactéria	10 ⁶	10 ³	10 ⁴	10 ³
<i>Salmonella sp.</i>	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	10 ²	0	10 ²	10 ²
<i>Staphylococcus</i>	Sem		Sem	
<i>aureus</i>	especificação	0	especificação	0
Bolores e leveduras	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

Fontes: 1. European Pharmacopoeia (categoria 4A – preparações incluindo tratamento da droga vegetal com água quente, como infuso, decocto) (European Pharmacopoeia, 2002). 2. European Pharmacopoeia (categoria 4B – preparações que não inclui tratamento com água quente (maceração) (European Pharmacopoeia, 2002). 3. World Health Organization (drogas vegetais que sofrem pré-tratamento com água quente ou que são usadas em formas tópicas) (WHO, 1998), 4. Farmacopeia Brasileira (2000).

5.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

Devido à escassez de informações sobre a espécie *C. gongylodes*, foram realizadas a atividade antimicrobiana do pó das folhas (PF) e do caule (PC). Foram testadas concentrações em mg/mL: 10, 25, 50, 100, 200 e 300.

A tabela 9 expõe os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana de *C. gongylodes*. Todas as concentrações testadas não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Tabela 9: Atividade antimicrobiana do pó das folhas e pó do caule de *C. gongylodes*

Microrganismos	P.F	P.C	CONT	CET	CIPRO
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	NT	23
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	+	+	+	NT	22
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	NT	20
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	NT	25
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+	NT

(-) inibição (+) crescimento; diâmetro do halo de inibição (mm); CONT: controle negativo; CET: cetoconazol (40µg/disco); CIPRO: ciprofloxacino (5 µg/disco)

Não há estudos sobre atividade antimicrobiana realizados com esta espécie vegetal, porém outras espécies do gênero *Cissus* apresentam atividade antimicrobiana como, por exemplo: *Cissus sicyoides* (BELTRAME et al, 2002), *Cissus verticillata* (L.) (SILVA, 2007), *Cissus quadrangularis* (MURTHY, 2003).

A ausência de atividade antimicrobiana destas amostras não significa que esta espécie não possui atividade antimicrobiana. Mudanças climáticas, alterações no índice pluviométrico e composição do solo podem interferir na concentração de metabólitos secundários produzidos pela espécie vegetal.

Estudos futuros poderão ser realizados utilizando concentrações diferentes e um possível fracionamento dos extratos empregados neste ensaio.

5.9 Estudo toxicológico pré – clínico de extratos aquosos de *C. gongylodes*.

Os animais submetidos ao ensaio toxicológico pré-clínico não apresentaram sinais de toxicidade de acordo com os parâmetros observados durante os 07 dias de experimento.

Os resultados foram expressos pela média seguida de \pm desvio padrão.

A pesagem dos órgãos animais está representada na tabela 10, 11 e 12. Os resultados mostram que todos os grupos: Infusão folha (IF) macho, Decocto caule (DC) macho, Decocto das folhas e caule (F+C) macho, IF fêmea, DC fêmea, F+C fêmea não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

Tabela 10: Porcentagem relativa do peso dos órgãos dos animais após tratamento.

Tratamento	Peso relativo dos órgãos (%) \pm desvio padrão				
	Coração	Baço	Pulmão	Fígado	Rins
Controle (macho)	0,37 \pm 0,03	0,21 \pm 0,01	0,47 \pm 0,05	3,29 \pm 0,23	0,71 \pm 0,06
IF (macho)	0,34 \pm 0,02	0,23 \pm 0,04	0,45 \pm 0,09	3,32 \pm 0,29	0,71 \pm 0,08
DC (macho)	0,33 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	0,53 \pm 0,09	3,09 \pm 0,21	0,66 \pm 0,02
F+C (macho)	0,34 \pm 0,02	0,20 \pm 0,04	0,48 \pm 0,12	3,12 \pm 0,22	0,66 \pm 0,04
Controle (fêmea)	0,41 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03	0,71 \pm 0,20	3,24 \pm 0,23	0,70 \pm 0,05
IF (fêmea)	0,35 \pm 0,01*	0,24 \pm 0,06	0,60 \pm 0,05	3,29 \pm 0,26	0,74 \pm 0,03
DC (fêmea)	0,37 \pm 0,03	0,25 \pm 0,03	0,71 \pm 0,12	3,16 \pm 0,07	0,73 \pm 0,03
F+C (fêmea)	0,36 \pm 0,02	0,27 \pm 0,04	0,69 \pm 0,13	3,31 \pm 0,18	0,78 \pm 0,05*

n=5, * p<0,05.

A dosagem das transaminase ALT e AST e a dosagem da creatinina sérica foram realizadas com o intuito de verificar possíveis alterações hepáticas – avaliada pelas transaminases e renais – avaliada pela creatinina sérica. Frente aos resultados apresentados na tabela 11, pode observar que não houve aumento da AST e ALT após a administração da infusão e o decocto das drogas vegetais estudadas sugerindo a ausência de danos hepáticos. As fêmeas submetidas a administração do infuso das folhas de *C. gongyloides* apresentaram o valor de creatinina sérico inferior ao grupo controle, entretanto, segundo VASCONCELOS et al (2007) valores de creatinina sérica entre 0,5 e 1,1 mg/dL são considerados valores de referência para ratos *Wistar*.

Tabela 11: Dosagem de AST, ALT e Creatinina.

Tratamento	AST (U/L) ± desvio padrão	ALT (U/L) ± desvio padrão	Creatinina (mg/dL) ± desvio padrão
Controle (macho)	38,73±32,48	35,08±28,21	1,02±0,05
IF (macho)	31,12±19,12	28,46±8,74	1,03±0,13
DC (macho)	37,09±34,37	32,42±29,50	1,00±0,21
F+C (macho)	33,72±9,30	30,75±8,02	0,97±0,13
Controle (fêmea)	59,63±31,50	39,33±24,60	0,91±0,34
IF (fêmea)	43,26±37,72	34,31±13,12	0,57±0,05*
DC (fêmea)	36,99±17,85	31,15±14,38	0,92±0,12
F+C (fêmea)	38,45±30,18	37,51±3,75	1,05±0,09

n=5 * p<0,05.

O uso de plantas medicinais é uma prática amplamente difundida na população brasileira, muitas espécies carecem de estudos toxicológicos que assegurem seu uso. Espécies do gênero *Cissus* têm sido estudadas para a verificação de suas atividades terapêuticas e efeitos toxicológicos de seus extratos. Pepato et al (2000) realizou um estudo com o objetivo de investigar em ratos o efeito tóxico do decocto de folhas de *Cissus sicyoides* a nível hepático, muscular e de vasos sanguíneos, o qual demonstrou que o decocto apresentou toxicidade a nível hepático detectado por aumento de aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), mas apenas quando associado ao diabetes. Os demais órgãos avaliados não sofreram efeito tóxico do decocto. Não há na literatura estudos toxicológicos dos extratos obtidos a partir de *C. gongylodes*.

O estudo toxicológico realizado foi caracterizado como um estudo preliminar, para avaliar possíveis danos hepáticos e renais, contudo são necessários a avaliação de outros parâmetros bioquímicos e estudos histológicos.

6. Conclusão

A análise anatômica possibilitou uma sondagem segura de caracteres microscópicos à espécie, caracterizando as drogas eleitas. Não há literatura para comparar as características microscópicas.

Na análise histoquímica verificou-se a presença de compostos fenólicos, taninos, alcalóides, amido, proteínas, lipídeos e terpenóides com grupo carbonila. Os ensaios farmacognósticos confirmaram a presença de taninos, flavonóides e alcalóides.

Após a obtenção das drogas vegetais originadas a partir do caule e das folhas de *Cissus gongylodes* realizou-se o controle de qualidade físico-químico e microbiológico com o objetivo de verificar e identificar possíveis contaminações.

Diversos compostos fenólicos apresentam atividade antimicrobiana, ambas as drogas vegetais obtidas apresentaram compostos fenólicos, confirmado através do ensaio de polifenóis totais, entretanto as amostras de *Cissus gongylodes* não apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações de concentrações de 10, 25, 50, 100, 200 e 300 mg/mL frente aos microrganismos testados (*E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 9372, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 10231).

Do ponto de vista toxicológico, a administração do infuso de folhas e decocto de caule de *C. gongylodes* Planchon em ratos durante sete dias consecutivos não levou a alterações de peso de órgãos, alterações de função renal – avaliada pela creatinina sérica – ou alterações de função hepática –

avaliada pelas transaminases; portanto, não há evidências de toxicidade nestas condições experimentais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U.P. **Introdução a etnobotânica**. Recife: Bagaço. 2002.87p.

ALBURQUERQUE, U.P; HANAZAKI,N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacogn**. 2006.16 (Supl): 678-689.

AMOROZO,M.C.M, Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 16(2): 2002. 189-1203.

ASCENSÃO, L. **Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado**. Botucatu: IB-UNESP, 2003. 20 p. (mimeogr).

BACCHI,E.M. **Controle de Qualidade de fitoterápicos**. In: DI STASI,L.C. (org). Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Universidade Estadual Paulista.1996. p.169-197.

BARBOSA WLR, SANTOS WRA, PINTO LN, TAVARES ICC. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Rev Bras Farmacogn** 12(Supl.): 13-15. 2002.

BARBOSA-FILHO JM, MEDEIROS KCP, DINIZ MFFM, BATISTA LM,
ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, CUNHA EVL, ALMEIDA JRGS, QUINTANS-
JÚNIOR LJ. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase.

Rev Bras Farmacogn 16: 258-285. 2006.

BAUER, A.W.; KIRBY, E.; SHERRIS, E. M.; TURK, M. Antibiotic by standarized
single disk method. **Am. J. Clin. Path.**, v.45, p.493 - 496, 1966.

BELTRAME, F. L., SARTORETTO, J. L., BAZOTTE, R. B., CUMAN, R. N.,
CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético de
Cissus sicyoides L. (Vitaceae). **Química Nova**. v.24, n. 6. p. 783-783. 2001.

BELTRAME, F.L., PESSINI, G. L., DORO, D. L, DIAS FILHO, B. P, BAZOTTE,
R. B, CORTEZ, D. A. G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity
of *Cissus sicyoides*. **Braz Arch Biol Techn** 45: 21-25. 2002.

BERG, M. E. V. D. **Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu
conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2 ed.
1993. 207 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 24 de fevereiro de 2000.
**Aprova o regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos
fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária**. Diário oficial da
União, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 18 de março de 2004.

Dispões sobre o registro dos medicamentos fitoterápicos. Diário oficial da
União, 2004.

BRITO, A.R.M.S. Farmacologia de plantas medicinais. **In: Plantas medicinais:
arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** (DI STASI, L.C.) São
Paulo. UNESP. 1996. 230p.

BUSSMANN, R. W. (2004) Ethnobotany and Biodiversity and Conservation.

Disponível em:

<http://www.natureandculture.org/GermanResearchGroups/papers/AG%20Bussmann/Etnoconservation.pdf>. Acessado em março de 2008.

CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Q. J. Microsc.
Sci.**, v.88, p.383-392, 1947.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.;
MASCOLO, M.; **Fitoterapia.** 71, S58. 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin
America: a personal review. **J. Ethnofarmacol.** 100: 131-134, 2005.

CECHINEL, V.F.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21. 1998.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. IV, 1926. p 130.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris. Série D**, v. 258, p.1338-1340, 1964.

DETERMINAÇÃO da perda por dessecação. Métodos físicos e físico-químicos. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed., parte I. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988. p. V.2.9.

DETERMINAÇÃO de cinzas insolúveis em ácido. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed., parte I. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988. p. V.4.2.5.

DETERMINAÇÃO de cinzas totais. Métodos de farmacognosia. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed., parte I. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988. p. V.4.2.4.

DETERMINAÇÃO do pH. Métodos físicos e físico-químicos. In:

FARMACOPEIA brasileira. 4. ed., parte I. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988. p. V.2.19.

DINIZ, M. F. M. Ensaio toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2000.

EMMONS, L.H. & GENTRY, A.H. Tropical forest structure and distribution of gliding and prehensile-tailed vertebrates. **The American Naturalist** 121(4): 513-524. 1983.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4th edition. Strasbourg: Council of Europe, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. **Introdução à análise fitoquímica.** In: SIMÕES et al (org). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 6ed., Editora da UFSC, UFRGS Editora, 2007.

FERREIRA, S.H. (2002) **Academia Brasileira de Ciências**: medicamentos a base de plantas medicinais. Disponível em:
<http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf>>. Acessado em março 2008.

FISCHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

GAEDCKE, F.; STEINHOFF, B.; BLASIUS, H. **Herbal medicinal products: scientific and regulatory basis for development, quality, assurance and marketing authorization**. Boca Raton: Medpharm/CRC Press, 2003.

GARCIA, A. M., QUÍLEZ, M.T., SAENZ, M. E., MARTINEZ-DOMINGUEZ, R. P. Anti-inflammatory active of *Agave intermixta* Trel. *Cissus sicyoides* L., species used in Caribbean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. V.71. p. 395-400. 2000.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Gauthier – Paris, Villars. 1969-1970. 2v.

GENTRY, A.H. The distribution and evolution of climbing plants. Pp. 3-49. In: F.E. Putz & H.A. Mooney (eds.). **The biology of vines**, Cambridge, Cambridge University Press. 1991.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p.2475-2485, 1971.

GULÇIN, I.; KUFREVIOGLU, O.I.; OKTAY, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). **J. Ethnopharmacol.**, v.90, p.205-215, 2004.

HALLAHAN, D. L.; GRAY, J.C. **Plant trichomes**. San Diego: Academic press, 2000. 311 p.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E.A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technol**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. p. 09, 60 - 61.

HOUGHTON, P.J; RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**, Chapman & Hall, London, 1998.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco:WH Freeman, 1962. 408p.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, v.1,1997, p.198.

LEITE. J.P.V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**.São Paulo: Atheneu,2009.

LOMBARDI, J. A. **O gênero Cissus L. emend descoings (Vitaceae) na América do Sul**. Campinas, SP: USP, 1994, 355p. (tese).

LOMBARDI, J. A. Vitaceae-Generos Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. Flora Neotropica, Monograph 80, **The New York Botanical Garden**, 2000.

MACE, M.E.; BELL, A.A.;STIPANOVIC, R.D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64,p.1297-1302, 1974.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.;
Plantas medicinais a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**.
2002, 25: 429-438

MARTINS. A. B.; SACRAMENTO, L. V. S. **Análise microscópica e física para controle de qualidade primária de matéria prima vegetal pulverizada**. 16º Congresso de Iniciação Científica UNESP. Ilha Solteira, Brasil. 2004.

MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technol.**, v. 23, p. 99-108, 1948.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bonaerense**,v. 19, n. 3, p. 211 - 215, 2000

MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população de Ilha Grande-RJ. **Rev Bras Farmacogn**. 2003, 13 (Supl): 55-58

MORELLATO, L.P. & LEITÃO FILHO, H.F. Levantamento florístico da comunidade de trepadeiras de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro - série botânica** 103: 1-15. 1998.

MURAT, K.; SULHIYE, Y.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **J.**

Ethnopharmacol., v.86, p.69-73, 2003.

MURTHY, K. N. C., VANITHA, A., SWAMY, M. M., RAVISHANKAR, G. A..

Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. **J Med Food**

6: 99-105. 2003.

OLIVEIRA, F; AKISUE,G. **Fundamentos de farmacobotânica.** 2 ed. Atheneu:

São Paulo, 2003.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS**

sobre medicina tradicional 2002 – 2005. Ginebra, 2002. 66 p.

PEÑALOSA, J. Basal branching and vegetative spread in two tropical rain forest lianas. **Biotropica** 16(1): 1-9. 1984.

PEPATO, M. T.; KELLER, E.; BAVIERA, A. M.; LORENZONI, A.; BRUNETTI, I.

Avaliação do efeito tóxico de *Cissus sicyoides* em ratos normais e diabéticos.

Anais do XXXV Congresso Brasileiro de Fisiologia. FESBE. 2000.

PUTZ, F.E. & MOONEY, H.A. (eds). **The biology of vines.** Cambridge

University Press, Cambridge, 1991.

SAIRAM, M.; ILAVAZHZGAN, G.; SHARMA, S.K.; DHANRAJ, S.A.; SURESH, B.; PARIDA, M.M.; JANA, A.M.; DEVENDRA, K.; SELVAMURTHY, W. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). **J. Ethnopharmacology**, v.71, p.377-382, 2000.

SANCHES, A. C. C., LOPES, G. C., TOLEDO, C. E. M., SACRAMENTO, L. V. S., SAKURAGUI, C. M., MELLO, J. C. P. Estudo Morfológico Comparativo das Cascas e Folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*- Leguminosae. **Lat. Am. J. Pharm.** 26 (3): 362-8. 2007.

SHIRWAIKAR, A., KHAN, S. S. MALINI, S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **J Ethnopharmacol** 89: 245-250. 2003.

SILVA, L., ONIKI, G. H., AGRIPINO, D. G., MORENO, P. R. H., YOUNG, M. C. M., MAYWORM, M. A. S., LADEIRA, A. M. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Rev Bras Farmacogn** 17: 361-367. 2007.

SIMÕES et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6ed., Editora da UFSC, UFRGS Editora, 2007.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.

Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES et al(org). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 5 ed., Editora da UFSC, UFRGS Editora, 2003.

SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática.** Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2008.

SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids.** New York: Elsevier Scientific Publishing, 1983. p. 276.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convection, 26, 2003.

VASCONCELOS, T.H; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev Bras Farmacogn.**17(4): 583-591, Out./Dez. 2007.

VENDRUSCULO,G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas medicinais utilizadas como medicinais pela comunidade do Bairro de Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn.** 2005, 15:361-372.

VISWANATHA SWAMY, A. H. M., THIPPESWAMY, A. H. M, MANJULA, D.V. AND MAHENDRA KUMAR, C.B. Some Neuropharmacological Effects of the Methanolic Root Extract of *Cissus quadrangularis* in Mice. **African Journal of Biomedical Research**, Vol. 9; 69 – 75. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials.** Geneva: WHO,1998.

YUNES, R.A. CECHINEL, V.F. **Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental.** In: YUNES,R.A; CALIXTO, J.B (org.). *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.* Argos: Chapecó.2001.