



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS- DIAGNÓSTICO**

MARIA SILVANA PINTO LOPES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS,
HISTOPATOLÓGICOS E ELETROCORTICOGRÁFICOS RELACIONADOS À
UTILIZAÇÃO DO DECOCTO DA CASCA DE *Himatanthus sucuuba*.**

BELÉM, PA

2018

MARIA SILVANA PINTO LOPES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS,
HISTOPATOLÓGICOS E ELETROCORTICOGRÁFICOS RELACIONADOS À
UTILIZAÇÃO DO DECOCTO DA CASCA DE *Himatanthus sucuba*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial ao Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Área de concentração: Diagnóstico

Orientadora: Prof. Dr.^a Vanessa Jóia de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Moises Hamoy

BELÉM, PA

2018

Lopes, Maria Silvana Pinto

Avaliação de parâmetros toxicológicos, bioquímicos, histopatológicos e eletrocorticográficos relacionados à utilização do decocto da casca de *Himatanthus sucuuba*. / Maria Silvana Pinto Lopes. –Belém, Pará, 2018.

66 f

Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)

Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Prof. Dr.^a Vanessa Jóia de Mello

Himatanthus sucuuba, Toxicidade, Eletrocorticograma, Decocto

MARIA SILVANA PINTO LOPES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS,
HISTOPATOLÓGICOS E ELETROCORTICOGRÁFICOS RELACIONADOS À
UTILIZAÇÃO DO DECOCTO DA CASCA DE *Himatanthus sucuba*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial ao Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Área de concentração: Diagnóstico

Belém (PA), ____ / de _____ de 2018.

Orientadora: Prof. Dr.^aVanessa Jóia de Mello

Banca Examinadora:

Prof.Dr.^o Moisés Hamoy – ICB- UFPA (Avaliador Interno)

Prof. Dr. ^oJosé Ricardo dos Santos Vieira – ICB – UFPA (Avaliador Interno)

Prof. Dr.^a Márcia Cristina da Silva Freitas (Avaliadora externa)

Eduardo José Melo dos Santos (Avaliador Interno)

BELÉM, PA

2018

*Dedico este trabalho a minha querida avó Maria Rosa Coelho e
a meu amado Pai Francisco Pereira Lopes que sonharam
comigo esse momento, saudades eternas meus queridos.*

(In memoriam)

Agradecimentos

A Deus, primeiramente pela vida, por se mostrar sempre tão presente nos momentos em que mais precisei e por nunca ter me abandonado.

Aos meus pais que são os meus alicerces, agradeço sinceramente por todos os ensinamentos e pela educação que vocês me deram.

Aos meus irmãos por todo o incentivo e apoio.

Ao meu amado esposo, Pedro Costa Pereira, pelo carinho e companhia em ocasiões de distração ou nos tempos de dificuldade. A minha filha Rebeca, que está a caminho, pela companhia nestes meses.

À minha orientadora, Vanessa Jóia de Mello, pela paciência, força e apoio dados nesses anos e, principalmente, pelo carinho e amizade que me proporcionou nos momentos mais difíceis.

Ao meu co-orientador, Moises Hamoy, por ter sido o primeiro professor a me incluir no ambiente da pesquisa científica e por sempre me auxiliar no desenvolvimento dos trabalhos, muito obrigado por ser esse amigo admirável.

A todos os professores pela contribuição em minha formação. Especialmente, agradeço as professoras, Márcia Cristina Freitas, Andréia do Socorro Campos e Maria Helena Maia. Obrigada pelas horas de conversa, pelo apoio e estímulo.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais/UFPA pela amizade e pela ajuda nos experimentos. Agradeço em especial a Laiane Nascimento, Vaneza Rodrigues, Jéssica Lígia, Sâmia e Billy Lima.

Aos colaboradores do Laboratório de Ciências Aplicadas - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e Laboratório de Espectrometria Analítica Aplicada - Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN-UFPA), pelo importante auxílio na execução dos protocolos experimentais.

A todos os amigos que fiz nesses dois anos de mestrado, em especial Paula, Artur, Rafaela, Lidia, Keuri e Allane, por terem me proporcionado bons momentos ao longo desses anos de convivência.

Aos funcionários do biotério pelo seu serviço prestado, fornecendo os animais com presteza durante o andamento do projeto.

E a todos aqueles que passaram pela minha vida com sorrisos e palavras que me deram coragem e determinação para que essa etapa fosse concluída.

RESUMO

A utilização das plantas medicinais com finalidades terapêuticas e profiláticas para várias doenças é uma das práticas médicas mais antigas existentes, sendo desta forma propagada de geração em geração. Elas produzem uma grande variedade de substâncias químicas que constitui recurso terapêutico relevante para uma parcela significativa da população mundial que, não tem acesso aos medicamentos industrializados. Apesar de sua vasta utilização, seu perfil tóxico e possíveis alterações nos exames laboratoriais como hemograma e testes de bioquímica de rotina, muitas vezes não são bem conhecidos, gerando desta forma a necessidade de estudos visando à minimização de efeitos colaterais e toxicológicos. Faz parte deste grupo a *Himatanthus sucuuba* (Sucuuba, Ucuuba e Sucuba) que na Amazônia Brasileira, que tem as cascas empregadas no tratamento de úlceras gástricas. No entanto, a literatura revela grande escassez de estudos de caráter toxicológico relacionado à *Sucuuba*, tornando promissora a descrição da toxicidade subcrônica e sua relação direta à alguns parâmetros laboratoriais, possíveis alterações anatopatológicas (de órgãos como fígado, rins e parte duodenal intestino), bem como, de possíveis alterações do perfil eletrofisiológico relacionada ao uso desta planta medicinal. Objetivos: Avaliar parâmetros toxicológicos: frente o *Bioensaio de toxicidade para* larvas de *Artemia salina*, avaliação subcrônica com análise de parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos e eletrocorticograma relacionados ao uso do decocto da casca de *Himatanthus sucuuba* em ratos wistar via registro de frequências até 50 Htz. Materiais e métodos: Após a obtenção do material biológico, foi obtido o decocto das cascas, que posteriormente foi liofilizado - LHS. Bioensaio de toxicidade para as larvas de *Artemia salina* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm foram avaliadas. Avaliação do perfil toxicológico subcrônica: O grupo I (n=15) foi utilizado como controle dos testes bioquímicos e hematológicos e foi comparado ao grupo II (n=15) que recebeu o LHS na dose de 3mg/Kg -30 dias. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e a coleta de sangue e órgãos foi imediatamente efetuada para a avaliação de parâmetros hematológicos bioquímicos e histopatológicos (por coloração HE), respectivamente. Na avaliação dos parâmetros eletrocorticográficos, foi realizada a cirurgia de implante de eletrodo em dois grupos: Grupo I controle(n=10) e II Grupo tratado (n=10) com LHS (3mg/Kg) de forma repetida: 30 minutos, 24, 48, 72 horas. Posteriormente um segundo designer experimental avaliou o efeito das doses 30, 300 e 600mg/kg frente ao quadro excitatório convulsivo induzido por pentilenotetrazol 60 mg/Kg, sendo incluído no protocolo experimental o controle positivo com benzodiazepínico Diazepam na dose 5 mg/kg para efeitos comparativos. As leituras eletroencefalográficas foram efetuadas no mesmo período supracitado. Os dados foram posteriormente analisados uma ferramenta foi construída usando a linguagem de programação Python versão 2.7. As análises estatísticas foram efetuadas com utilização do software GraphPad Prism 5.0 ®. Resultados e Discussão: Não foram observadas alterações toxicológicas nos ensaios de viabilidade de artemias salinas e nem nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados no estudo subcrônico de exposição a doses repetidas de LHS 3mg/kg. A ausência de alterações morfológicas observada pela análise histológica de cortes de fígado, rim e porção do duodeno corrobora com os resultados obtidos nas análises clínicas e com poucos estudos descritos com extratos desta planta. Quanto aos estudos eletrocorticográfico, esta dose não apresentou resultados diferentes do controle, no entanto numa análise ampliada de doses as 300 e 600mg/kg foram capazes de promover uma ação anticonvulsivante frente à indução de convulsões por PTZ 60mg/kg e comparada a expressa por Diazepam 5mg/kg nas mesmas condições. Esta ação deve estar relacionada a presença do conjunto de metabólitos secundários presentes que possuam potencial anticonvulsivante bem como a grande capacidade antioxidante da mesma, uma vez que é presente a formação de EROS neste modelo com PTZ.

Conclusão: Estes resultados sugerem uma segurança associada a dose etnofarmacológica utilizada para desordens digestivas para os parâmetros avaliados e apresenta a *Himanthus sulu* como uma planta promissora para o desenvolvimento de fitofármacos que possam ser desenvolvidos visando ação anticonvulsivante principal ou complementar em protocolos de tratamento.

SUMÁRIO

RESUMO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1.1. Plantas medicianais	11
1.2. Toxicidade de Plantasmedicinais.....	14
1. 3. Revisão da literatura.	16
1.3.1 Família Apocenaceae	16
1.3.2. Genero <i>Himatanthus</i>	17
1.3.3. Especie <i>Himatanthus sucuíba</i>	17
1.4. JUSTIFICATIVA.....	21
1.5. OBJETIVO.....	26
1.5.1. Objetivo Geral.....	26
1.5.2. Objetivos Específicos.....	26
6. Referencias Bibliográficas.....	30

Artigo

ANEXO

1. Referencial Teórico

A biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza e fonte de um imenso potencial, detentor de ricas áreas vegetais, o Brasil é considerado um dos países mais importantes do planeta por conter diversas espécies vegetais. Com 15% a 20% do número total de espécies e com a mais diversa flora do mundo, o país conta também com alguns dos biomas mais ricos do planeta em número de espécies vegetais, como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado (CORADIM et al., 2011).

Na lista da flora do Brasil atualmente, são reconhecidas 46.505 espécies sendo 4.754 de Algas, 33.105 de Angiospermas, 1.568 de Briófitas, 5.718 de Fungos, 30 de Gimnospermas e 1.330 de Samambaias e Licófitas, (FLORA DO Brasil 2018). Acredita-se que muitas descobertas tenham sido feitas durante a procura de novas fontes de alimento, mas provavelmente um número significativo foi devido à curiosidade e ao desejo natural de investigação de todo ser humano (NIERO et al., 2003). A flora de modo geral possui grande aplicabilidade terapêutica onde o conhecimento a respeito de seus usos vem sendo transmitido desde o início da civilização até os dias de hoje (VEIGA Jr et al., 2008).

Todas as partes da planta como: sementes, frutos, raízes, rizomas, folhas, cascas e flores, podem ser utilizadas. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais. A OMS têm expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em vista que 65% e 80% das pessoas no mundo já fizeram pelo menos uma vez uso de plantas medicinais como adjuvante ou até mesmo como principal forma de tratamento (CALIXTO et. al., 2001, BRASIL, 2013A, EHRLICH, 2012, FARNSWORTH et al, 1985; EISENBERG et al, 1998, SANTOS, 2016).

Segundo Schenkel (1995) a utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos, muitas vezes está associada ao desconhecimento de possível existência de efeitos tóxicos, bem como, qual a forma mais correta de cultivo; preparo e indicação e principalmente em quais casos são contraindicadas. Estes materiais processados apresentam uma série de desafios em termos de identificação botânica e, de acordo com a Organização Mundial de

Saúde (OMS), a utilização incorreta desses compostos representa uma ameaça à segurança do consumidor (PALHARES et al., 2015, SANTOS 2016).

1.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais sempre desempenharam um papel fundamental no apoio à saúde das populações humanas. Sendo empregadas em comunidades tradicionais, como remédios caseiros, e consideradas matéria-prima para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (SANTOS 2016; LEÃO; FERREIRA; JARDIM, 2007).

Elas produzem uma grande variedade de substâncias químicas que podem apresentar diversas atividades biológicas e constituem ainda hoje um recurso terapêutico relevante para uma parcela significativa da população mundial que, não tem acesso aos medicamentos industrializados (TÔRRES et al., 2005, CAMPOS, 2016).

Segundo Gurib-Fakim (2006) grande parte da população mundial tem confiança nos métodos tradicionais relativos aos cuidados diários com a saúde e cerca de 80% dessa população, principalmente dos países em desenvolvimento, confiam nos derivados de plantas medicinais para seus cuidados com a saúde na utilização de plantas medicinais.

Tendo sua utilização na atenção básica no Brasil desde 1986 na 8ª Conferência Nacional de Saúde, sendo recomendada a introdução das práticas tradicionais de cura popular no atendimento público de saúde. Foi a partir da institucionalização do Sistema Único de Saúde (SUS) pela Constituição de 1988, mediante a Resolução WHA 31.33 (1978) e 40.33 (1987), que foram iniciadas as transformações que possibilitaram a implementação de práticas inovadoras na gestão em saúde, pensando a identificação, validação, preparação, cultivo e conservação das plantas, passando a incluir algumas plantas medicinais nos serviços assistenciais médicos prestados à população (ROSA et al. 2013; MIGUEL, 1999; IBIAPINA et al., 2014)

Com objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 aprovou a Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos dando outras providências.

Desde 2007, o SUS oferece fitoterápicos derivados de plantas, de modo que, atualmente, disponibiliza 12 medicamentos fitoterápicos para a população, (BRASIL, 2013,(RENAME) Relação Nacional de Medicamentos Essenciais disponíveis no SUS. O RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS) desde 2008 possui o objetivo de subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva relacionadas à regulamentação, cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos.

Criada em 9 de dezembro de 2008, a Portaria Interministerial nº 2960, aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com objetivo de inserir, com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. A criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, grupo técnico interministerial formado por representantes do governo e dos diferentes setores da sociedade civil envolvidos com o tema, que teve a missão de monitoramento e avaliação da implantação desta política. Esse comitê criou instrumentos adequados à mensuração de resultados para as diversas vertentes desta política, além de incentivar parcerias técnicas dos setores do governo envolvidos com sua implantação. O programa busca também promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros.

Atualmente o Ministério da Saúde possui uma lista com 71 nomes de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS): *Achillea millefolium*, *Allium sativum*, *Aloe spp* (*Aloe vera* ou *Aloe barbadensis*), *Alpinia* (*Alpinia zerumbet* ou *Alpinia speciosa*), *Anacardium occidentale*, *Ananas comosus*, *Apuleia ferrea* = *Caesalpinia ferrea*, *Arrabidaea chica*, *Artemisia absinthium*, *Baccharis trimera*, *Bauhinia spp* (*Bauhinia affinis*, *Bauhinia forficata* ou *Bauhinia variegata*, *Bidens pilosa*, *Calendula officinalis*, *Carapaguianensis*, *Cassia sylvestris*, *Chamomilla recutita* = *Matricaria chamomilla*, *Chenopodium ambrosioides*, *Copaifera spp*, *Cordia spp* (*Cordia curatavica* ou *Cordia verbenacea*), *Costus spp* (*Costus caber* ou *Costus spicatus*), *Croton spp* (*Croton cajucara* ou *Croton zehneri*), *Curcuma longa*, *Cynara scolymus*, *Dalbergia subcymosa*, *Eleutheria plicata*, *Equisetum arvense*, *Erythrina mulungu*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* ou *Myrtus brasiliensis*, *Foeniculum vulgare* etc. (Medicina natural, 2018). Das 71 espécies da lista do SUS, oito já foram aprovadas e estão

sendo distribuídas na rede pública de saúde: alcachofra, aroeira, cáscara sagrada, garra do diabo, guaco, isoflavona da soja e unha de gato. E plantas usadas na Amazônia mais que ainda não estão na lista do SUS pomadas (*Symphytumofficinale* L. confrei), *Ptychopetalum Olacoides* Anselmino- marapuama, *Vismiacayenensis*Pers lacre), *Caesalpiniaferrea* Mart - jucá) e Arrabidaea chica pariri;xaropes (*Cocos nucifera*L. coco, *Theobromacacao* L. cacau, *Averrhoa carambola* L. - carambola, *Genipaamericana* L. - jenipapo), “terramicina”, pariri, *Cereussp.* Mandacarue plantas diversas comação antihelmíntica) e comprimidos (“terramicina”, *Portulaca pilosa* L. amorcrescido, *Kalanchoepinnata* Pers. - pirarucu, *Copaiferasp.* copaíba, *Pedilanthus tithymaloides* Poit. - coramina e “melhoral”).), Glycinemax (Isoflavona de Soja), Schinustherebenthifolius (Aroeira), Aloe vera (Babosa), Menthapiperita (Menta hortelã).

Em maio de 2014, a Diretoria Colegiada da ANVISA revisou a RDC para registro dos medicamentos fitoterápicos e criou o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos, revogando a RDC 14/2010 por meio da RDC 26/2014. Publicou também a Instrução Normativa 2/2014 (IN 2/14) que traz a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado (ANVISA, 2014); (ANVISA 2014 apud Matos, 2016).

Do ponto de vista sanitário é importante aprimorar o controle de qualidade dos fitomedicamentos, desde a qualidade da matéria-prima até a obtenção do registro do produto. Deve-se harmonizá-los para que haja rastreabilidade de sua obtenção e sempre mantendo a homogeneidade dos insumos e produtos, conforme as normas de vigilância sanitária. Pois, em muitos casos ocorre negligência por parte das instituições em comprovar a eficácia dos fitoterápicos, que levam em consideração apenas a antiguidade do uso popular como evidência concreta e renunciando a obrigatoriedade de avaliações toxicológicas completas para fins de comercialização popular (MIGUEL, 1999; ANVISA, RDC nº14/2010, MOREIRA et al., 2014 pag. 26 apud SANTOS 2016).

É interessante notar que 25% das substâncias derivam de plantas, e outra boa parte são análogos sintéticos de compostos protótipos isolados de plantas (TAMILSELVAN *et al.*, 2014). Apesar de possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos popularmente pelas pessoas, podem apresentar toxicidade que vão de formas mais sutis à crônicas, como carcinogenicidade, mutagenicidade e hepatotoxicidade, podem muito bem ter passado

despercebida pelas gerações anteriores, e esses tipos de toxicidade são os que mais preocupam na avaliação da segurança dos fitofármacos (Martins et al., 2012; NEWALL et al., 2002).

1.2 Toxicidades de plantas medicinais

Espécies consideradas tóxicas produzem metabólitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas em homens e animais desde alergias na pele e mucosas, até distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e, em alguns casos, pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo ao óbito (VASCONCELOS et al., 2009; JESUS & SUCHARA, 2013).

O uso de produtos originados de plantas medicinais na medicina tradicional tem crescente destaque no cenário mundial. Seus compostos derivados são considerados xenobióticos, isto é, um produto estranho ao organismo humano nele introduzido, neste caso, com finalidades terapêuticas. Como toda substância estranha, os produtos de sua biotransformação podem ser potencialmente tóxicos e, assim, devem ser encarados até que se prove o contrário (SCHVARTSMAN, 1991; SIMÕES et al., 2003).

Sua ação toxicante, depende da dose, via de entrada e tempo de exposição (BROETTO, et al. 2016). São definidas como tóxicas aquelas plantas que possuem algum tipo de efeito lesivo ou substância nociva, causando distúrbios ao organismo do homem ou de animais, pelo contato ou ingestão (ANDRADE FILHO et al., 2001).

A intoxicação é uma manifestação clínica dos efeitos nocivos resultantes da interação entre uma substância química e um sistema biológico, podem ocorrer de modo agudo ou crônico. A forma aguda geralmente ocorre após contato único, pode ser acidental, principalmente em crianças, ou intencional como nas tentativas de aborto e suicídio, sendo estes os casos que geralmente aparecem nas estatísticas (ZAMBOLIM, 2008). Já a subcrônica é aquela em que os efeitos tóxicos em animais produzidos por exposições diárias repetidas a uma substância, por qualquer via, aparecem em um período de aproximadamente 10% do tempo de vida de exposição do animal no período menor ou igual a 30 dias. Com relação à forma crônica os efeitos tóxicos ocorrem após repetidas exposições, por um período longo de tempo a partir de 1 a 3 meses, geralmente durante toda a vida do animal, (OGA, 2008; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Existe uma percepção na população que o uso de plantas no tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz, sendo essas, muitas vezes, usadas no tratamento de doenças crônicas associadas com medicamentos convencionais (TOVAR & PETZEL, 2009). No entanto, a utilização deve ser restrita a plantas conhecidas e/ou corretamente identificadas, pois podem ocorrer intoxicações com o uso de espécies vegetais, provocando graves acidentes, (COLOMBO et al., 2010)

Mesmo com o desenvolvimento de grandes laboratórios farmacêuticos e dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo, sendo de grande destaque nossa região Amazônica, baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança

Com o objetivo de controlar e documentar a ocorrência de intoxicações por plantas foi criado em 1998 o Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas, inserido no Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas (SINITOX) tem como principal atribuição coordenar a coleta, a reunir, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no país. Os registros são realizados pela Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (RENACIAT), composta por diversas unidades presentes em todas as regiões do Brasil, sendo divulgados os resultados do trabalho anualmente.

As plantas ocupam o 13º lugar, em número de casos de intoxicação com 1185 casos registrados (SINITOX, 2012). No ano de 2014 foram relatados 836 casos de intoxicação humana por plantas, três destes casos estavam associados ao uso terapêutico e sete deles ligados a automedicação. Na região Norte do país, oito casos de intoxicação por plantas foram registrados, com uma morte associada (SINITOX, 2014).

No Brasil, a pesquisa com plantas nativas sofre da carência de recursos e também com as dificuldades legais e burocráticas para o acesso, coleta de plantas e o desenvolvimento de estudos (CARLINI et al., 2007). Muitas plantas medicinais amplamente utilizadas na cultura popular não possuem seu perfil tóxico bem conhecido, o grande uso de medicamentos à base de plantas medicinais e o próprio conhecimento popular trazem consigo a necessidade de

pesquisas para o esclarecimento e confirmação de informações sobre as ações das plantas, visando à minimização de efeitos colaterais e toxicológicos, haja vista esse uso deve ser confiável e seguro.

Dentre as espécies destaca-se a *Himatanthus sucuuba*, usada popularmente na forma de chá como medicamento terapêutico mais carece de análises toxicológicas, de possíveis aspectos tóxicos que possam determinar um perfil de segurança associada à utilização desta planta, podendo limitar variáveis relacionadas ao tratamento como esquemas posológicos, doses e efeitos colaterais indesejáveis, e em algumas situações até mesmo a não recomendação de utilização. Estes dados também poderão ser alicerce para uma futura inclusão da *Himatanthus sucuuba* no cadastro do RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS).

Diante de o exposto o presente projeto tem em vista avaliar parâmetros toxicológicos: bioquímicos, histopatológicos e eletroencefalográficos relacionados ao uso do decocto de cascas da *Himatanthus Sucuuba* e correlacioná-los a possível perfil tóxico de envenenamento relacionado ao seu uso como planta medicinal.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 A família *Apocynaceae*

A família *Apocynaceae* está dividido em duas subfamílias (*Apocynoideae* e *Plumerioideae*) compreende cerca de 400 gêneros e 3700 espécies, no Brasil ocorrem 95 gêneros e 850 espécies. Inclui espécies arbustivas, herbáceas, arbóreas, muitas das quais trepadeiras e suculentas, a família é muito estudada por possuir substâncias isoladas a partir de espécies do táxon. Muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas de fármacos e fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica. (CAMPOS; FARINACCIO, 2011; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

1.3.2 O gênero *Himatanthus*

Dentre os gêneros que compõem a família *Apocynaceae*, está o *Himatanthus*, constituído por espécies restritas à região neotropical, distribuídas do Panamá até os países da

América do Sul, (VICENTINI & OLIVEIRA, 2002 e SPINA, 2004). O nome do gênero *Himatanthus* deriva de uma expressão grega que significa manto-de-flor, referindo-se as brácteas que envolvem os botões das espécies (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). O gênero *Himatanthus* foi classificado como *Plumeria*. Somente em 1938, Woodson observou que alguns espécimes de *Plumeria* apresentavam características morfológicas que as diferiam das demais espécies deste gênero. A partir deste estudo, surgiu o gênero *Himatanthus* (WOODSON, 1938). Uma revisão foi feita por Plumel em 1991 subdividiu o gênero em dois subgêneros: o subgênero *Obovatae* e o subgênero *Lanceolatae*. Sendo o gênero revisado em 2003 por Spina, na qual, algumas espécies da classificação de Plumel foram considerados sinônimos, dentre eles a *H. sucuuba*, sinônimo *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, observando que alguns espécimes de *Plumeria* apresentavam características morfológicas que as diferiam das demais espécies deste gênero. Destacando-se por incluir espécies popularmente utilizadas como plantas medicinais e que possuem grande diversidade de compostos farmacologicamente ativos em sua composição química, rica em tri terpenos e iridóides, precursores de alcalóides, que pode fornecer substâncias com diversas atividades (BARRETO et al., 1998; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

1.3.3 Espécies *Himatanthus sucuuba*

Botanicamente, *H. sucuuba* e *H. articulatus* foram tratados como espécies diferentes, no entanto, em revisão do gênero, estes passaram ser considerados como sinonímia. Atualmente, o nome aceito é *H. articulatus* (Vahl). A espécie é conhecida na região amazônica como Sucuuba, Ucuuba, Sucuba, Janaguba e Sucuuba-verdadeira. É uma árvore latescente de grande porte, atingindo até 20 m de altura, com copa estreita e tronca ereto, com casca rugosa; folhas simples, alternas, pecioladas, glabras em ambas as faces, ovaladas, coriáceas, margens inteiras; inflorescências dispostas em cimeiras terminais com poucas flores grandes e brancas; frutos geminados em forma de chifres, contendo sementes aladas.



Figura 1. Aspectos morfológicos de *H. sucuuba*; árvore florida aspecto do ramo florido. **Fonte:** ALAN MESSIAS e LORENZI MATOS (2013).

Figura 2. **Fonte:** ALAN MESSIAS e LORENZI MATOS (2013).



Figura 3. Árvore latescente de grande porte. **Fonte:** <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/agoniada/index.htm>.

1.3.4 Fitoquímica

Os metabólitos mais isolados de *Himatanthus* sp. são os iridóides (SOUSA et al, 2010). São produtos do metabolismo secundário de alguns grupos vegetais e desempenham um papel de proteção contra predadores, principalmente herbívoros, por serem venenosos ou amargos. Nas plantas, os iridóides apresentam uma pronunciada distribuição em angiospermas, sendo muitas vezes, utilizados como marcadores taxonômicos em nível de gênero e subgênero (GOMES; NOGUEIRA; MORAIS, 2011).

Dentre os iridóides já conhecidos têm-se o plumierídeo, isoplumierídeo, protoplumericina A, cafeoilplumierídeo e o iridóide ácido-3-metoxi-3;4- diidroplumierídeo isolados da casca de *Himatanthus sucuuba* (MORAGAS, 2006), no caule e no látex os compostos químicos mais isolados foram também os iridóides, como fulvoplumierina, plumericina que apresentou atividade contra o carcinoma nasofaringe epidermóide humano e a isoplumericina (SOUSA, 2009), e atividade antifúngica, antibiótica e citotóxica), além de isoplumierídeo, desmetilplumierídeo, plumierídeo (REBOUÇAS et al., 2012; SILVA, et al., 2003; SILVA, 2000; VILEGAS et al., 1992; HAMBURGER, et al., 1991). Os triterpenoscinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina e acetato de lupeol também são encontrados nas cascas e no látex de *H. sucuuba* (possuem atividades antiinflamatória e analgésica) (MIRANDA et al., 2000), e também foram encontradas substâncias fenólicas, como o ácido gálico, catecol, quercitrina e miricetrina (REBOUÇAS et al, 2012; SILVA, 2000).

Os flavonoides foram detectados em todos os extratos, com maior intensidade nas folhas de *H. sucuuba*. Taninos foram detectados em ambas as cascas de *H. sucuuba* e *C. comosa*, com maior intensidade em *sucuuba*. Os iridóides e triterpenóides foram detectados em ambas as partes de *H. sucuuba*, sendo que o primeiro foi detectado com maior intensidade nas cascas.

A espécie tem ocorrência principal na Amazônia, sendo uma planta perenifólia, heliófita e secundária, ocorrendo preferencialmente no interior da mata. Em geral, o uso popular desta espécie está relacionado ao látex e ao decocto das cascas.

A *Himatanthus sucuuba* tem recebido muita atenção da literatura referenciando a sua utilização no tratamento de diversas condições patológicas. A relevância histórica das

propriedades do gênero *Himatanthus* foi inicialmente descrita na primeira farmacopeia Brasileira (SILVA, 1929), já a aplicabilidade terapêutica, tem sido descrita em diferentes comunidades localizadas na região Amazônica Brasileira, Peruana e Colombiana. Como exemplo, no Peru, a infusão de cascas tem sido vastamente utilizada na cicatrização de feridas, no tratamento de tumores, artrite, como vermífugo e laxativo (LUNA, 1984 (b), VILLEGAS *et.al.*, 1997, SANZ-BISET *et. al.*, 2009). Já na Amazônia Brasileira, as cascas têm sido empregadas no tratamento de úlceras gástricas, como propriedade afrodisíaca e como agente antitumoral (PERDUE & BLOMSTER 1978, VANDER BERG, 1984).

Fato que tornou o quanto mais relevante a verificação das propriedades toxicológicas desta planta, pois componentes da biodiversidade podem fornecer ampla gama de produtos de importância econômica, dentre eles destacam-se fitoterápicos e fito fármacos.

No entanto, a literatura revela grande escassez de estudos de caráter toxicológico relacionado à *Himatanthus Sucuuba*, que possibilite a descrição da toxicidade de possíveis alterações hematológicas, bioquímicas e anatohistopatológicas bem como, de possíveis alterações do perfil eletroencefalográfico relacionada ao uso desta planta.

1.4 JUSTIFICATIVA

Muitas plantas medicinais amplamente utilizadas na cultura popular não possuem seu perfil tóxico bem conhecido, o grande uso de medicamentos à base de plantas medicinais e o próprio conhecimento popular trazem consigo a necessidade de pesquisas para o esclarecimento e confirmação de informações sobre as ações das plantas, visando à minimização de efeitos colaterais e toxicológicos, haja vista esse uso deve ser confiável e seguro. Pois, todas as plantas podem ser potencialmente tóxicas, produzem substâncias que podem agir como um toxicante, dependendo da dose, via de entrada e tempo de exposição.

No entanto, a maioria dessas plantas é utilizada com base no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico de suas propriedades farmacológicas, pois, substâncias em princípio consideradas terapêuticas também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos, sendo imprescindível à realização de estudos toxicológicos desses compostos.

Dentro desta ótica é fundamental a avaliação de toxicidade de substâncias com propriedades biológicas, para que possamos identificar os possíveis efeitos que as plantas possam causar a saúde do ser humano. Atualmente existe um grande número de bioensaios desenvolvidos para determinar os níveis de toxicidade, como: a toxicidade baseada em resposta biológica, diferentes organismos de diferentes níveis taxonômicos que são utilizados a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados. A avaliação da toxicidade utilizando o micro crustáceo *Artemia salina* é realizada através de um método rápido, submetidos a teste agudo-letal, que consiste de uma análise após exposição (24h – 48h) do composto com o organismo bioindicador, não havendo a necessidade de um ambiente asséptico sendo de baixo custo, além de não requerer equipamentos sofisticados e utilizar amostras em pouca quantidade, esses fatores contribuem para viabilidade e eficácia (MEYER et al, 1982; DALL’STELLA, 2008).

Para avaliarmos os possíveis efeitos tóxicos subcrônico da planta, usaremos a análises clínicas como ferramenta (bioquímica e hematológica) para o estabelecimento e confirmação do diagnóstico do quadro clínico de intoxicação, e assim poder elucidar o verdadeiro “status” da gravidade que a planta possa causar (KANEKO, 2008; OLIVEIRA et al. 2002).

Também muitas intoxicações por plantas causam lesões que podem ser comprovadas em análises histológicas, segundo Barros et al.(2007) a análise histológica também fornece dados mais seguros em relação às alterações que acontecem nos tecidos, podendo ser complementar muito útil no estabelecimento ou na confirmação do diagnóstico de intoxicação por determinada planta, buscando uma correlação entre os parametros analíticos clínicos e possível estabelecimento de modificações fisiopatológicos do tecido analisado (fígado, rim e porção duodenal). A escolha destes tecidos fez diante a relevancia destes órgãos nos processos de absorção, metabolismo e excreção e sua interação direta com a via de administração utilizada, a via oral(COSTA, 2012).

Neste sentido, análises toxicológicas tornam-se indispensáveis, pois as investigações de possíveis aspectos tóxicos podem determinar um perfil de segurança associada à utilização desta planta podendo limitar variáveis relacionadas ao tratamento como esquemas posológicos, doses e efeitos colaterais indesejáveis, e em algumas situações até mesmo a não recomendação de utilização.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros toxicológicos: bioquímicos, histopatológicos e eletrocorticográficos relacionados ao uso do decocto da casca de *Himatanthus sucuuba* em ratos wistar.

1.5.2 Objetivos específicos

- Coleta e identificação do material botânico.
- Preparo e padronização do liofilizado.
- Bioensaio de toxicidade para larvas de *Artemia salina*.
- Avaliação subcrônica: Análise de peso, comportamento, ingesta de alimento e água.
- Determinação do perfil hematológico e bioquímico em ratos wistar tratados com decocto da casca de *Himatanthus sucuuba* após exposição, período de 30 dias.
- Avaliação anatohistopatológica de fígado, rim e porção duodenal em ratos wistar tratados com o decocto da casca de *Himatanthus sucuuba* após exposição, período de 30 dias.
- Avaliação do perfil eletrocorticográfico em ratos wistar tratados com decocto da casca de *Himatanthus sucuuba* após exposição repetida: 30 minutos, 24h, 48h, 72h; com sacrifício após 7 dias.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, 2001. 341 p.

ANVISA. Instrução Normativa-IN nº 2, de 13 de maio de 2014. Publica a "**Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado**" e a "**Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado**". Diário Oficial da União. Brasília, 14 maio 2014 (b). N. 90, Seção 1, p. 58. Disponível em: Acesso em: 07 de março 2018.

ANVISA. Resolução-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o **registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais 96 fitoterápicos**. Diário Oficial da União. Brasília, 14 maio 2014 (a). n. 90, Seção 1, p. 52. Disponível em. Acesso em: 06 de março. 2018.

BARROS CSL, CASTILHOS LML, RISSI DR, KOMMERS GD, RECH RR. **Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por Senecio brasiliensis (Asteraceae) em bovinos**. PesqVet Brás 2007 Jan; 27(1): 53-60.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas de Interesse ao SUS**. Brasília, 2013 a. Disponível em: [<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?Idtxt=30277>](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?Idtxt=30277). Acesso em: março de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. 2013. Disponível em: [<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html>](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html). Acesso em: março de 2017.

BROETT, C.V. S, Soares, A.A.M. **Intoxicação por Plantas no Estado do Espírito Santo**. do Espírito Santo, UNESC. Rua Fioravante Rossi, 2930, 29.705,900, 2016

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Portaria Interministerial nº 2960 em 9 de dezembro de 2008**. Publica Programa de Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico.Diário Oficial da União.

Disponível

em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/pri2960_09_12_2018.html>

CARLINI, E.A. et al. **Da planta medicinal ao medicamento**. Scientific American Brasil, v.63, p.70-7, 2007.

CALIXTO, J.B. **Estudo Farmacológico Pré-clínico de Plantas Medicinais**. In: YUNES, R. A, 2001

COLOMBO, M.L. et al. Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, n.7, p.417-25, 2010.

DALL STELLA, D.S.G. **Estudo fitoquímico aplicado da fração sol vel do extrato etanólico bruto da Dorstenia multiformis Miquel (Moraceae)**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DI STASI LC, Hiruma-Lima CA. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP, p.323-330, 2002.

FARNSWORTH, N. R.; J & COLABORADORES. *Ethnopharmacol.* 1985, 2, 173

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 06 Mar. 2018

FERRIGNI, V. N. R.; HASEGAWA, M.; *Rev. Latinoamer. Quím.* 1976, 7, 146.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday**. Molecular Aspect of Medicine, n. 27, p. 1-93, 2006.

HAMOY, M et al. **Cunaniol-elicited seizures: Behavior characterization and electroencephalographic analyses**. Elsevier Inc. Toxicology and Applied Pharmacology, (2018)

IBIAPINA, W. V. et. al. **Inserção da Fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS**. Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança –v. 2, n.1, p. 58-68, 2014.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. **Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil.** Revista Brasileira de Farmácia, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

MATOS, D. N. **Estudo do uso de fitoterápicos e plantas medicinais na população cirúrgica do Hospital de clínicas.** Dissertação de mestrado. Porto Alegre, 2016.

MARTINS, R. T. et al. **Receptores opioides até o contexto atual.** Revista Dor, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 75-9, jan/mar. 2012.

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS nº 886, 22/04/2010. **Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe, 1999.

MONTEIRO, J.R.S et al,..Anticonvulsant properties of Euterpe oleracea in mice. Elsevier Ltd. Allrights reserved Neurochemistry International 90 (2015) 20e27.

MOREIRA, D. L.; TEIXEIRA, S. S.; MONTEIRO, M. H. D.; OLIVEIRA, A. C. A. X.; NEWALL, C. A.; PHILLIPSON, J.D.; ANDERSON, L. A. (Editor). **Plantas medicinais: guia para profissional de Saúde.** São Paulo, Premier, 2002. 308 p. ISBN 8586067296.

OGA, S. et al. **Fundamentos de toxicologia.** 3º edição. São Paulo: Atheneu, 2008, 696p.

OLIVEIRA, P.; OLIVEIRA, J.; COLAÇO, A. Recolha e envio de amostras biológicas para o diagnóstico de intoxicações em carnívoros domésticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.** Lisboa, v. 97, n. 544, p 161- 169, 2013.

PALHARES, R. M.; DRUMMOND, M. G.; BRASIL, B. S. A. F.; COSENZA, G. P.; PLUMEL, M. M. **Legenre Himatanthus (Apocynaceae) révision taxonomique.** Bradea, Rio de Janeiro, v. 5, suplemento, p.1-118, 1991.

PERDUE, G. P., BLOMSTER, R., N. **South American plants III**. Isolationa of Fulvoplumerierin from Himatanthus sucuuba (M. Arg) Woodson (apocynaceae) J. Pharm. Sci, v67, p 1322-1323, 1978.

PINTO, BRUNO ARAÚJO SERRA. Estudo psicofarmacológico do extrato bruto das cascas de *Himathathus drasticus* mart. Dissertação Mestrado. UFM Pós-graduação em saúde e Ambiente, 2011.

REBOUÇAS, S.O. *et al.* **Antigenotóxico Himatanthus drasticus**. Apocynaceae, 2012.

RENISUS: lista de plantas medicinais do SUS | Medicina Natural. Disponível em:<https://www.medicina_natural.com.br/plantas-medicinais-do-sus/>. (acesso em 24/07/2018)

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) [online]. Registros de Intoxicações/ **dados nacionais/ 2012**.Disponível em:<<http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=411>>.(acesso em 30/10/2017).

SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. 1102 p. ISBN 8570256825.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas), Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento**. 2014 Disponível em: Acesso em: 12 novembros 2017

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas) acesso em 08/03/2018

SOUSA, E.L. *et al.* Antitumor **activity of leaves of Himatanthus drasticus (mart.)** Plumel-pocynaceae (janaguba) in the treatment of sarcoma 180 tumor. **Braz J Pharmac Sci**, v. 46, p. 199 – 203, 2010.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 3. Ed. São Paulo, Sarvier, 1991. 355 p.
SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. 1102 p. ISBN 8570256825.

SCHENKEL EP. Cuidado com os medicamentos. **As plantas medicinais, os chás e os fitoterápicos**. Porto Alegre: Saga, Deluzzata; 1995.

SPINA, A.P. **Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Wild. Ex. Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. 2004. 191 f. Tese de doutorado. 191 p. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

TAMILSELVAN, N. et al. **A review on some poisonous plants and their medicinal values**. J AcuteDis, p. 85-89, 2014.

TÔRRES, A.R. et al. **Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.15, n.4, p.373-80, 2005.

VAN DER BERG M. A. “**Ethnobotany in the Neotropics**. Advances in Economic Botany,” ed. by France G. T., Kallunki J. A., New York Botanical Gardens, NY, pp WOODSON, R. E. **Studies in the Apocynaceae – 7th.**, an evaluation of the genera Plumeria L. and Himatanthus Willd. Annalsofthe Missouri Botanical Garden, St.140—149, 1984.

WOODSON. Estudos químicos revelaram a presença de depsídeos, terpenos e iridoides em *Himatanthus suluuba* (Spruce)1938

ZAMBOLIM CM, OLIVEIRA TP, HOFFMANN AN, VILELA CEB, NEVES D, ANJOS FR, et al. **Perfil das intoxicações exógenas em um hospital universitário**. Ver Med Minas Gerais. 2008;18(1):5-10.

Segue em anexo o artigo dentro das normas da Revista Journal
Ethnopharmacology.

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS,
HISTOPATOLÓGICOS E ELETROCORTICOGRÁFICOS RELACIONADOS À
UTILIZAÇÃO DO DECOCTO DA CASCA DE *Himatanthus sucuuba*.**

¹MARIA SILVANA PINTO LOPES, ¹LAIANE DE NAZARÉ SILVA DO NASCIMENTO,
²MARCIA CRISTINA FREITAS DA SILVA, ³JOSE RICARDO VIEIRA, ⁴KELY DAS
GRAÇAS FERNANDES DANTAS, ⁵NILTON AKIO MUTO, ¹MOISES
HAMOY¹VANESSA JOIA DE MELLO.

1. Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Pará.
2. Laboratório de Ciências aplicadas- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
3. Laboratório de ensino de Hematologia- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
4. Grupo de espectrometria Analítica Aplicada–Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN), Universidade Federal do Pará.
5. Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA), Universidade Federal do Pará.

ABSTRACT:

The use of medicinal plants with therapeutic and prophylactic purposes for various diseases is one of the oldest existing medical practices, being propagated this way from generation to generation. They produce a wide variety of chemical substances that is relevant therapeutic resource for a significant portion of the population that has no access to manufactured drugs. Despite its wide use, its toxicity profile and possible changes in laboratory tests such as blood count and routine biochemical tests often are not well known, thus generating the need for studies to minimize side effects and toxicity. Part of this group *sucuuba Himatanthus* (*sucuuba*, and *Ucuuba Sucuba*) that the Brazilian Amazon, which has the shells used in the treatment of gastric ulcers. However, the literature reveals a great shortage of toxicological studies related to *Sucuuba*, its promising making the description of the subchronic toxicity and its direct relationship to some laboratory parameters, possible pathological changes (organs such as liver, kidney and part duodenal intestine) as well as possible changes in the

electrophysiological profile related to the use of this medicinal plant. Objectives: To evaluate toxicological parameters: forward the bioassay toxicity to larvae of *Artemia salina*, subchronic evaluation with analysis of hematological, biochemical, histopathological and electrocorticogram (ECoG) related to the use of *Himatanthus bark decoction sucuuba* in Wistar rats in frequency record 50 HTZ . Materials and methods: After obtaining the biological material was obtained decoction of barks, which was subsequently lyophilized - LHS. Bioassay toxicity to larvae of *Artemia salina* at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 ppm were evaluated. subchronic toxicological profile of evaluation: Group I (n = 15) was used as control of biochemical and hematological tests and compared to group II (n = 15) received the LHS 3mg/kg -30 days. After the experimental period, the animals were euthanized and blood and organs collected was immediately performed to evaluate hematological parameters biochemical and histopathological (HE), respectively. In the evaluation of electrocorticographic parameters, the electrode implant surgery was performed in two groups: Control Group I (n = 10) and Group II treated (n = 10) with LHS (3mg/kg) repeatedly: 30 minutes, 24, 48, 72 hours. Later also a second experimental designer evaluated the effect of doses 30, 300 and 600mg/kg against seizure excitatory above-induced pentylenetetrazol 60mg/kg, being included in the experimental protocol the positive control with benzodiazepine diazepam at a dose 5 mg/kg for comparative purposes. The electrocorticographic readings were taken during the same period mentioned above. The data were subsequently analyzed a tool was built using the Python programming language version 2.7. The statistical analysis was performed with use of GraphPad Prism 5.0 ® software. Results and discussion: The absence of morphological alterations observed by histological examination of sections of liver, kidney and part of the duodenum corroborates the results obtained in clinical analysis and with few studies with extracts of this plant. As for electrocorticographic studies, this dose did not provide different results than the control, however in the enlarged doses analyze 300 to 600 mg/kg were able to promote an action anticonvulsant against the induction of convulsions PTZ 60mg/kg and compared to that expressed by Diazepam 5mg / kg under the same conditions. This action is related to the presence of this set of secondary metabolites

present that have potential anticonvulsant and a great antioxidant capacity of the same, since this is the formation of ROS in this model with PTZ. Conclusion: These results suggest a safety associated with ethnopharmacological dose used for digestive disorders for the evaluated parameters and displays the *Himantanthus succuba* as a promising plan for the development of phytopharmaceuticals that can be developed to main anticonvulsant or complementary treatment protocols.

Key Words: *Himantanthus succuba*, Toxicity, Eletrcorticogram, decoct.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza e fonte de um imenso potencial, detentor de ricas áreas vegetais, o Brasil é considerado um dos países mais importantes do planeta por conter diversas espécies vegetais (CORADIM et al., 2011). A flora de modo geral possui grande aplicabilidade terapêutica onde o conhecimento a respeito de seus usos vem sendo transmitido desde o início da civilização até os dias de hoje (VEIGA Jr et al., 2008). Cerca de 65% e 80% das pessoas no mundo já fizeram pelo menos uma vez uso de plantas medicinais como adjuvante ou até mesmo como principal forma de tratamento (CALIXTO et. al., 2001, BRASIL, 2013A, EHRLICH, 2012, FARNSWORTH et al, 1985; EISENBERG et al., 1998, SANTOS, 2016). Em nosso país destaca-se a planta *Himantanthus succuba* que tem recebido muita atenção da literatura referenciando a sua utilização etnofarmacológica no tratamento de diversas condições patológicas. A relevância histórica das propriedades do gênero *Himantanthus* foi inicialmente descrita na primeira farmacopeia Brasileira (SILVA, 1929), já a aplicabilidade terapêutica, tem sido descrita em diferentes comunidades localizadas na região Amazônica Brasileira, Peruana e Colombiana. Como exemplo, no Peru, a infusão de cascas tem sido vastamente utilizada na cicatrização de

feridas, no tratamento de tumores, artrite, como vermífugo e laxativo (LUNA, 1984, VILLEGAS *et.al.*, 1997, SANZ-BISET *et. al.*, 2009). Já na Amazônia Brasileira, as cascas têm sido empregadas no tratamento de úlceras gástricas, como propriedade afrodisíaca e como agente antitumoral, (PERDUE & BLOMSTER 1978, VANDER BERG, 1984). No entanto, sua utilização tem como base no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico que muitas vezes acontece em âmbito de sua atividade farmacológica sendo os efeitos indesejados ou tóxicos, ainda pouco estudados. Desta forma é imprescindível à realização de estudos toxicológicos que visem possíveis efeitos colaterais/tóxicos seja via a influência do tratamento nos exames laboratoriais rotineiros, no perfil histopatológicos de órgãos intimamente relacionados a absorção, metabolismo e excreção destes fitoprodutos, bem como, da influência deste no SNC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material botânico e amostra teste

Inicialmente foi submetido a Embrapa Oriental o Termo de Transferência de Material – TTM para obtenção das amostras de casca de *Himatanthus sucuuba* Val/Woodson. A escolha da parte da planta e o tipo de extração a ser utilizada foi baseada nas informações etnofarmacológicas, pois todas as plantas são consumidas na forma de chá (decocto). O chá das cascas foi preparado da mesma maneira como foi descrito no uso etnofarmacológico (SOARES, 2015). O material biológico foi seco por 24 horas e depois triturado manualmente. Em seguida, o pó resultante foi submetido a uma extração por decocção em água a 100 °C durante 10 minutos (200 g cascas/2000 mL de água). Após o resfriamento do material, o decocto foi liofilizado e administrado diariamente aos animais por via oral.

2.2. Avaliação Toxicológica

2.2.1. Bioensaio de toxicidade para as larvas de *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982)

Foram transferidas larvas (n=10) para tubo, posteriormente completando o volume para 9 mL de solução salina, e imediatamente foi adicionado 1 mL das soluções testes nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm em cada tubo de ensaio, sendo utilizada triplicata para cada concentração em questão. A leitura foi comparada ao controle negativo onde estava presente apenas às lavras e a solução salina com ausência das soluções testes.

Contagem das Larvas: Após 24 horas em contato com a solução testes foi feita a contagem do número de larvas vivas e os dados foram tabulados.

2.2.2. Avaliação toxicológica subcrônica (Oliveira, *et. al.*, 2013)

Desenho Experimental: Os animais foram divididos em 2 grupos. O grupo I (n=15) utilizado como controle dos testes hematológicos e bioquímicos comparado ao grupo II (n=15) que recebeu o Liofilizado de decocto de *Himatanthus sucuuba* (LHS). A dose utilizada foi determinada utilizando o sistema alométrico para ajuste do cálculo da dosagem pela taxa metabólica do animal atingindo o valor de 3 mg/Kg. O peso dos animais, o consumo de líquido e de alimentos foi medido diariamente durante os 30 dias do experimento. Durante o período experimental, todos os animais foram observados para a verificação de algum sinal de toxicidade (como capacidade exploratória, letargia/excitação, incoordenação). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados (por decapitação com uso de guilhotina) e a coleta de sangue foi imediatamente efetuada para a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

2.2.3 Avaliação Anatohistopatológica

Após o sacrifício os animais foram examinados macroscopicamente sendo efetuada a ressecção de fígado, rins e porção duodenal do intestino. Imediatamente após a retirada, os órgãos foram pesados (expressando os resultados pela relação grama órgão/kg animal e inspecionados quanto aos parâmetros visuais de normalidade). As secções teciduais dos órgãos incisados foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada, e após 24 horas, foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (Bacha; Wood, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 – 5,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico para avaliações de possíveis alterações toxicológicas.

2.2.4 Avaliação toxicológica: Perfil eletrocorticográfico

2.2.4.1. Desenho Experimental

Desenho Experimental I: Inicialmente os animais foram divididos em 2 grupos.

O Grupo I controle (n=10) recebeu somente o veículo em questão e II Grupo tratado (n=10) recebeu LHS na dose 3mg/Kg, de forma repetida: 30 minutos, 24, 48, 72 horas. As leituras eletrocorticográficas foram efetuadas no mesmo período supracitado.

Design Experimental II: Posteriormente projetou-se um novo experimento a fim de avaliar um perfil diferente de doses no possível aumento do limiar basal e controle da excitabilidade e em animais inicialmente tratados com pentilenotetrazol (PTZ). Os animais foram divididos em 5 grupos (n=10). O grupo I controle (recebendo apenas veículo), grupo II que recebeu o LHS na dose de 30 mg/kg, grupo III que recebeu o LHS na dose de 300 mg/kg, grupo IV

que recebeu o LHS na dose de 600 mg/kg e grupo controle positivo que recebeu Diazepam na dose de 5mg/kg, sendo que todos grupos foram tratados inicialmente com PTZ (60 mg/kg) via i.p. Para caracterizar o comportamento excitatório no decorrer do tempo de contato com o PTZ, foram divididos os seguintes estágios com tempo de observação de 30 minutos conforme o Tabela 1:

Tabela 1.Estágios do comportamento excitatório resultante da exposição ao PTZ.

Estágio 0:	Sem alterações comportamentais após aplicação do PTZ.
Estágio 1:	Animal apresenta eriçamento de vibrissas, Imobilidade e tremores de pina.
Estágio 2:	Incoordenação e tremor, espasmos dos membros anteriores e embandeiramento da cauda.
Estágio 3:	O animal apresenta crises clônicas isoladas em um ou mais membros anteriores sem perda do reflexo de postura.
Estágio 4:	O animal apresenta crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura, salivação e vocalização.
Estágio 5:	Animal apresenta crises clônicas ou tônico –clônicas generalizada com perda do reflexo de postura, cianose e parada respiratória.

Para captação de sinal eletrocorticográficos foram implantados eletrodos conjugados na duramater, cada eletrodo apresenta 1 mm de diâmetro. As coordenadas estereotática utilizadas foram Bregma -0,96mm e 1 mm lateral, indicado como córtex motor (Paxinos, 2005).

O implante dos eletrodos utilizados na obtenção dos registros corticais foi realizado conforme a técnica utilizada por (Hamoyet al., 2018, Monteiro et al., 2015). Para os dois

delineamentos experimentais (I e II). No terceiro dia após a cirurgia, os eletrodos foram conectados a um sistema de aquisição de dados, composto por um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), monitorado por um osciloscópio (Protek, 6510), os dados foram continuamente digitalizados em uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX) os dados foram armazenados em disco rígido e, processado através de um software especializado (LabVIEWexpress). O eletrodo de registro estava localizado no lado direito do hemisfério, e do lado esquerdo o eletrodo de referência. Todo o experimento foi executado dentro da gaiola de Faraday.

No Desenho Experimental I: os animais (n=10) tratados com LHS(3mg/Kg), de forma repetida: 30 minutos, 24, 48, 72 horas controles (n=10). As leituras eletrocorticográficas foram efetuadas nos mesmos períodos supracitados. Já no Design Experimental II: LHS foi administrado os diferentes grupos nas doses 30, 300 e 600mg/kg (n=10 por grupo). Após 60 minutos foi feita a aplicação de 60 mg/kg de PTZ via IP, logo em seguida foi feita a avaliação comportamental seguida do imediato registro eletrocorticográfico (ECoG) que teve duração de 10 minutos para cada animal. Os dados foram comparados com o Diazepam na dose de 5 mg/kg obedecendo ao mesmo critério para registro.

2.2.4.2 Análise dos dados eletrocorticográfico

Para as análises dos sinais adquiridos uma ferramenta foi construída usando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib para os gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4.

Os gráficos de amplitude demonstram a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Nos sinais foram observadas 1000 amostras por segundo. Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada pelo método periodograma média de Welch. O histograma de frequência foi gerado pelo primeiro cálculo do PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição, com o PSD, resultando um histograma construído com caixas de 1 Hz. Para analisar a diferença entre os experimentos, um gráfico com a média e desvio padrão de PSD de vários experimentos foi construído, cada onda do gráfico foi gerada a partir de um conjunto de testes, onde o PSD foi gerado e calculado a média e o desvio padrão de cada grupo, para o cálculo da janela PSD Hamming foi usado 256 pontos sem sobreposição. Após o período de registro, os animais foram eutanasiados com altas doses de cloridrato de quetamina (200 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e Diazepam (10 mg/Kg) para evitar mais sofrimento, seguindo as exigências institucionais para a eutanásia destes animais.

2.3. Análises estatísticas dos resultados

As análises toxicológicas referentes à *Artemia salina*, bem como, as análises comparativas dos dados hematológicos e bioquímicos foram determinadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 ® Anova, Dunnet e $p < 0,05$. Já as comparações dos valores de potência revelados pela análise eletrofisiológica no primeiro grupo experimental foram efetuadas usando teste t paramétrico $p < 0,05$ e para o segundo experimento que visava o comparativo de doses Dunnet e Tukey com $p < 0,05$, com auxílio do mesmo software.

3.RESULTADOS

3.1 Bioensaio de toxicidade para as larvas de *Artemia salina*

Após o preparo do liofilizado foi realizado o Bioensaio com *Artemia salina*, após 24 horas a leitura foi comparada ao controle negativo onde estava presente apenas às lavras e a solução salina com ausênciadadas soluções testes, o bioensaio não demonstrou diferenças entre controle e tratado com LHS, nas diferentes concentrações de 1, 10, 100 e 1.000 ppm, como mostra o Gráfico 1.

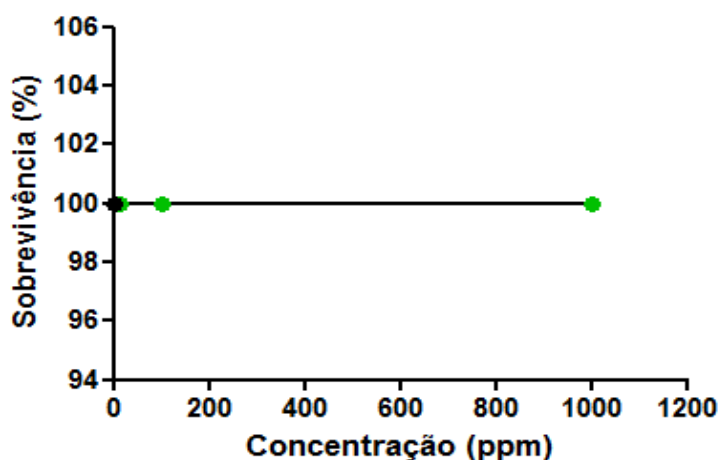


Gráfico 1: Taxa de sobrevivência de *Artemia salina* sob diferentes concentrações do liofilizado de cascas de *Himatanthus suluuba*-LHS (1, 10, 100 e 1.000 ppm) após 24 h exposição.

3.2. Avaliação toxicológica subcrônica

A Tabela 2 apresenta os resultados do perfil hematológico obtidos nos animais Controle e Tratados com LHS. Os dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si em todos os parâmetros estudados. Estes resultados demonstram a ausência de alterações destes parâmetros hematológicos nos animais submetidos ao tratamento com LHS por 30 dias.

Tabela 2: Parâmetros hematológicos pós-tratamento (3 mg/kg via oral, após 30 dias).

Parâmetros	Controle	Tratado	Valor de P
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$) RBC	$6,659 \pm 0,1851$	$6,388 \pm 0,3695$	0,8986
Hemoglobina (g/dL) HGB	$12,62 \pm 0,4192$	$12,78 \pm 0,3475$	0,5630
Hematócrito (%) HCT	$38,52 \pm 1,163$	$38,52 \pm 1,032$	0,7563
Volume corpuscular médio VCM (fL)	$57,85 \pm 0,9188$	$58,50 \pm 0,7966$	0,5366
Hemoglobina corpuscular médio HCM (pg)	$18,92 \pm 0,3873$	$19,41 \pm 0,2914$	0,2255
CHCM (g/L)	$32,70 \pm 0,3519$	$33,15 \pm 0,2119$	0,2556
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$) WBC	$7,977 \pm 0,4043$	$9,664 \pm 0,8398$	0,0766
Granulócitos (%)	$12,73 \pm 1,570$	$8,586 \pm 1,541$	0,0768
Linfócitos (%)	$67,14 \pm 4,413$	$63,91 \pm 7,426$	0,6688
Monócitos (%)	$15,98 \pm 0,8268$	$13,22 \pm 1,651$	0,1099
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) PLT	$565,6 \pm 24,37$	$586,4 \pm 31,84$	0,3896

Os valores estão expressos em média $\pm$ EP. Aplicado teste T pareado, com uso do software GraphPad Prism 5.0®. * A presença indica resultados diferentes estatisticamente quando comparados com os valores apresentados pelo grupo controle.

Os resultados obtidos via análise do perfil bioquímico sérico de ratos controles e tratados com LHS. Foram efetuadas as dosagens de glicose (mg/dL), transaminases (Gama;-GT, AST e ALT), creatinina (mg/dL), ureia (mg/dL), ácido úrico (mg/dL) e proteína total dos animais do desenho experimental. O tratamento efetuado com LHS não revelou resultados diferentes estatisticamente quando comparados aos obtidos no grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos nos animais tratamento por 30 dias com LHS.

Parâmetros	Controles	Tratados	Valor de P
Ureia (mg/dL)	36,21 ± 1,331	40,47 ± 1,564	0,1039
Creatinina (mg/dL)	0,3121 ± 0,03538	0,2680 ± 0,009817	0,3434
Ácido úrico (mg/dL)	1,129 ± 0,1584	0,9933 ± 0,1548	0,5146
AST (U/L)	116,5 ± 16,98	145,9 ± 13,34	0,3285
ALT (U/L)	61,07 ± 2,843	60,73 ± 1,871	0,9408
Gama GT	1,643 ± 0,1329	1,600 ± 0,3055	1,0000
Proteína total (g/dL)	3,493 ± 0,05078	3,447 ± 0,05422	0,6825
Glicose (mg/dL)	82,00 ± 5,597	86,80 ± 2,922	0,4682

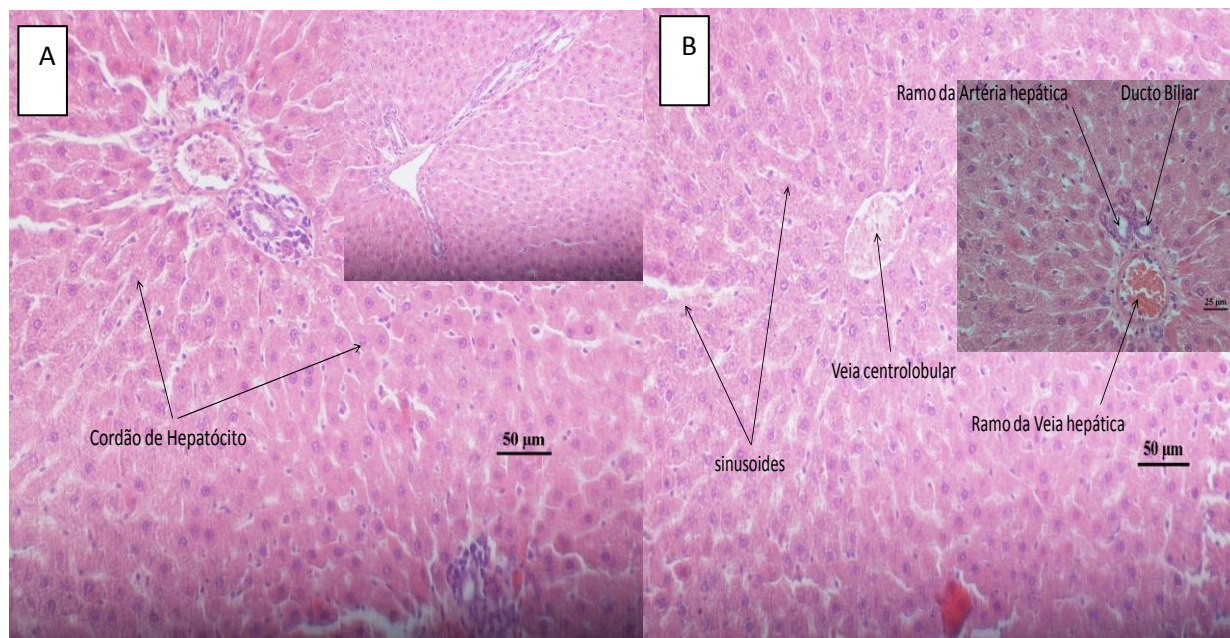
p
a

Parâmetros bioquímicos das transaminases (Gama;-GT, AST e ALT), creatinina (mg/dL), ureia ((mg/dL), ácido úrico (mg/dL), proteína total(g/dL) e glicose (mg/dL) obtidos do soro de Ratos wistar, tratados com 3 mg/kg vo de LHS, após 30 dias (toxicidade subcrônica). Os valores estão expressos em média ± EPM foi aplicado teste T pareado.

A inspeção macroscópica dos órgãos: fígado, rim e porção duodenal logo após o sacrifício foi efetuada. Após a secção dos mesmos estes foram pesados. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de pesos dos órgãos supracitados entre os grupos controle e tratado com LHS, (teste T, não pareado, $p < 0,05$) dados não expressos. Após

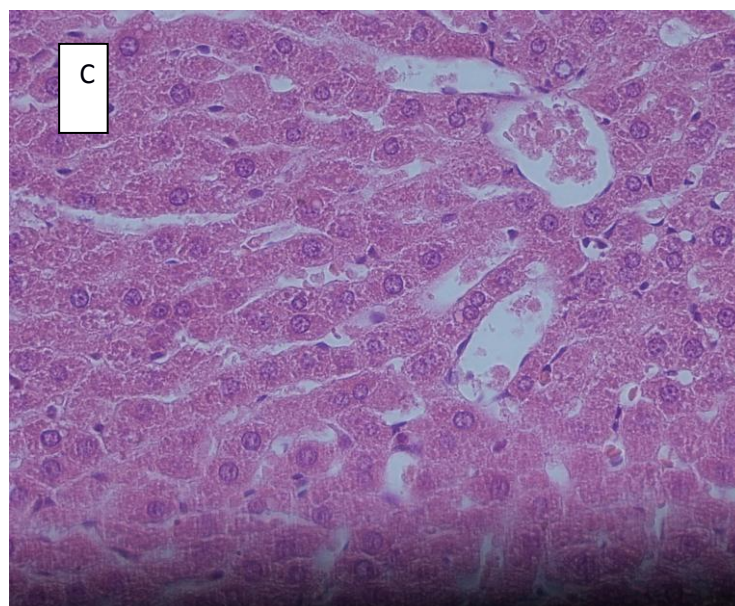
esta análise estes órgãos foram fixados e submetidos à coloração específica de hematoxilina e eosina para que fossem efetuadas as análises histológicas. As figuras 1, 2 e 3 corresponde as análises histológicas de fígado, rins e porção duodenal intestinal.

Quanto à leitura das lâminas considerou-se padrão de normalidade para o fígado parâmetros de conservação e homogeneidade do aspecto. Foi possível identificar lóbulos hepáticos íntegros, espaço porta íntegro e veias hepáticas bem definidas; cordões sinusóides presentes. Não foi observada necrose, hipertrofia da célula de Kupffer nem ocorrência de apoptose ou degenerações (hidrópica ou esteatose), figura 1, A, B e C apresentam lâminas de fígado de animais tratados com decocto de *Himatanthus sucuuba* e em D e E estão lâminas de animais controles.



268

269



270

271

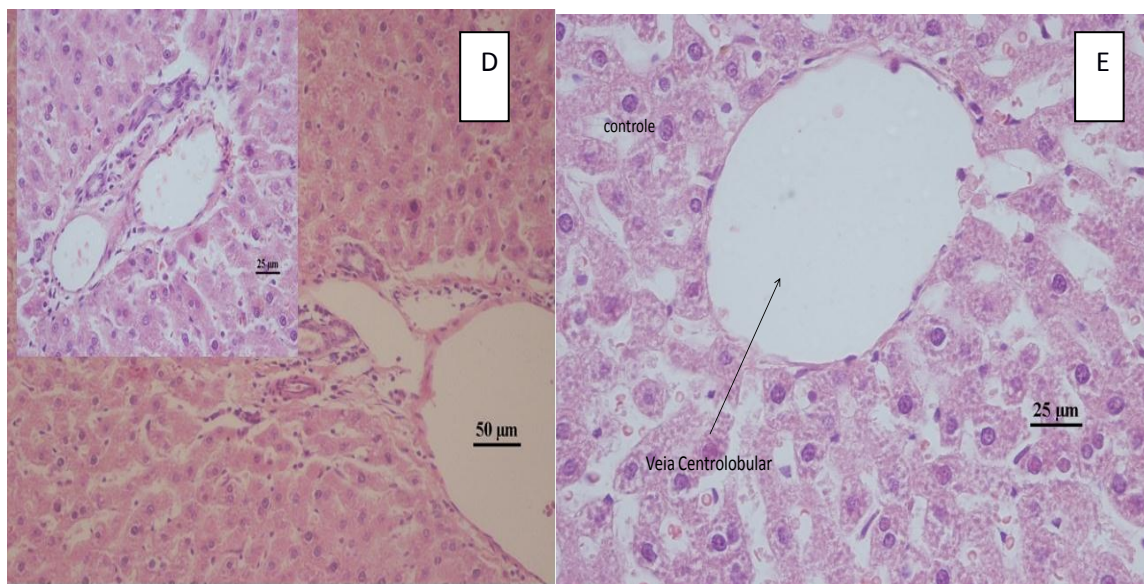


Figura 1. Cortes histológicos de fígado. A, B e C apresenta microscopia de fígado de animais tratados decocto de *Himatanthus sucuuba* e D e E lâminas de animais controles. O hepatócito e espaço porta apresentam os elementos de tecido conjuntivo compatíveis com a normalidade (Tecido conjuntivo frouxo, vasos). Coloração (H&E) microscópica obj 20 e 40X.

Nos rins, a normalidade se manteve bem conservada, apresentando corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros; os glomérulos formados por capilares, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas. Resultados expressos nas lâminas de rim dos animais tratados com decocto de *Himatanthus sucuuba*, houve pequenas ocorrências de degeneração hidrópica, mas como é reversível e de causas variadas não pode se afirmar que estar associado ao tratamento. Figura 2, 2F e 2G (tratados) apresentando características morfológicas semelhante à figura 2H (controle).

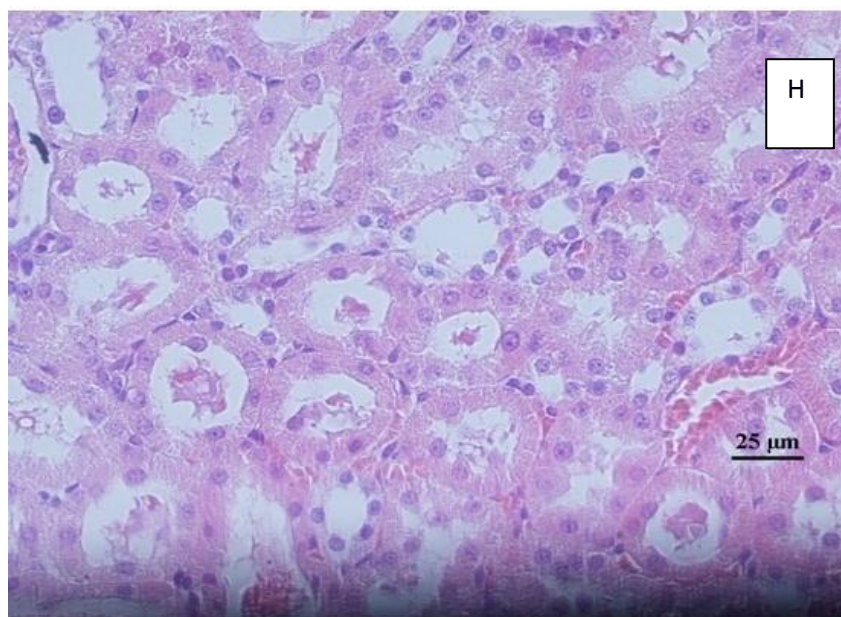
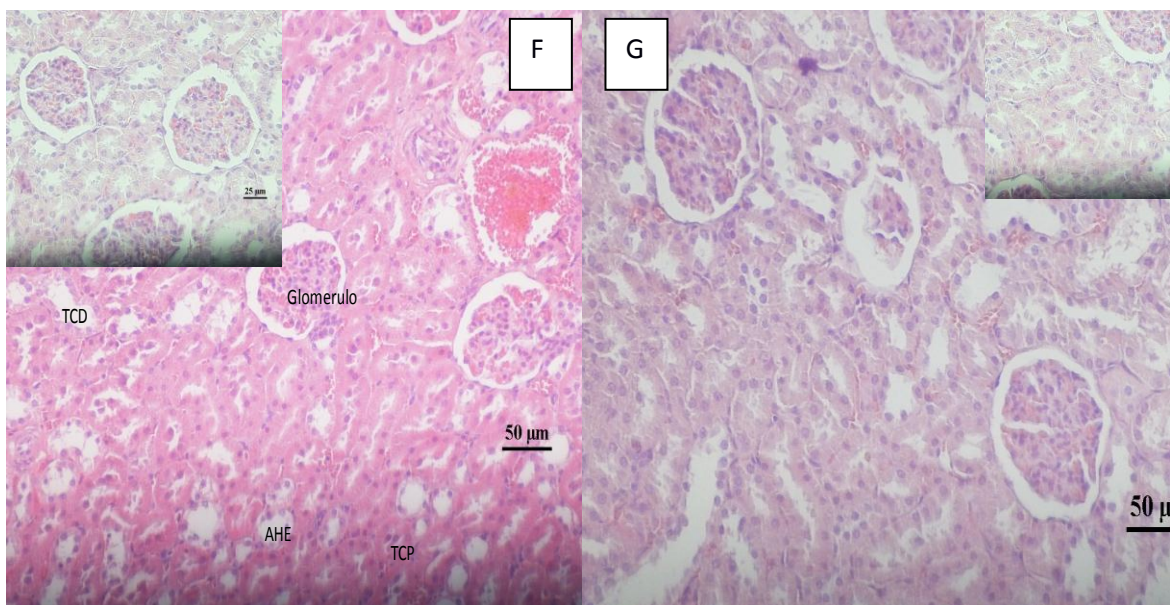


Figura 2. Cortes Histológicos de rins. As imagens 2F, 2G descreve lâminas de animais tratados com LHS onde destacam-se os túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD) glomérulo, região cortical com túbulos proximais retilínea, túbulos distais com macula densas e na região medular túbulos e ductos coletores com células cúbicas bem delimitadas. A análise descreve semelhante morfologia ao controle – imagem H. (Coloração H&E) microscópico obj.20 e 40X.

Os cortes histológicos referentes à porção duodenal apresentado na Figura 3. As imagens 3I, 3J, 3L são referentes a ratos tratados LHS por um período de 30 dias e a figura 3M corresponde ao controle. Também não foram observadas alterações nas amostras tratadas em relação as controle.

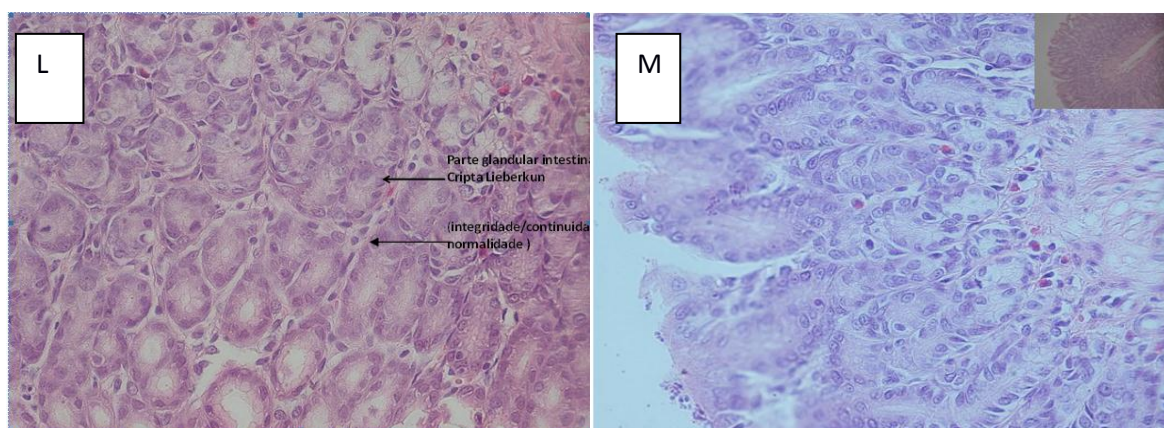
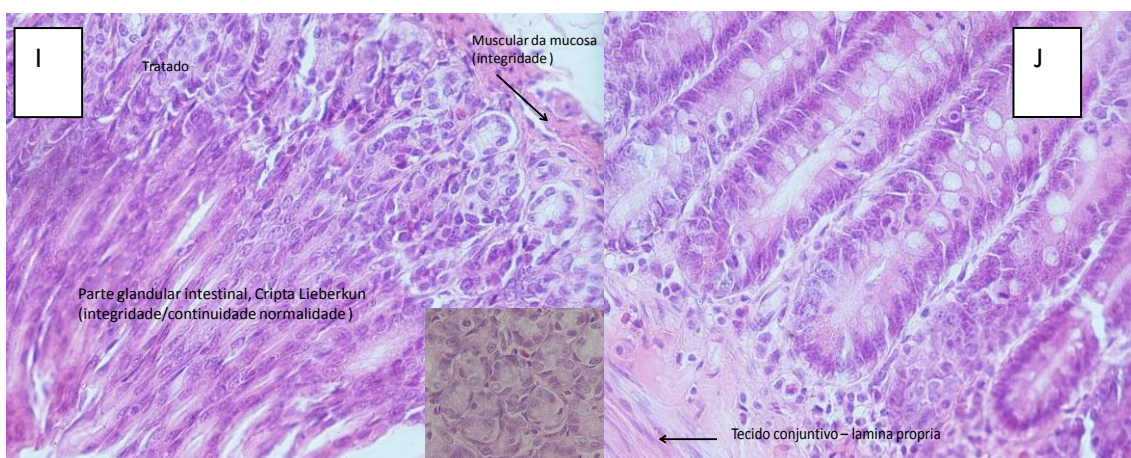


Figura3. Cortes Histológicos da porção duodenal. As imagens 3I, 3J e 3L mostram a porção duodenal de animais tratados com *LHS*, com criptas, muscular da mucosa, tecido conjuntivo, parte glandular intestinal, íntegro comparados ao Controle – imagem M Coloração (H & E) e visualizado em microscópico obj 20 e 40X.

3.3 Avaliação toxicológica: Perfil eletrocorticográfico

Para avaliação de possíveis alterações no perfil eletrocorticográfico os animais foram inicialmente submetidos a um implante de eletrodo para posterior realização do eletrocorticograma (ECoG). A Figura 4 apresenta o posicionamento do eletrodo implantados em todos os animais deste desenho experimental.



Figura 4:Implante do eletrodo para a realização do ECoG.

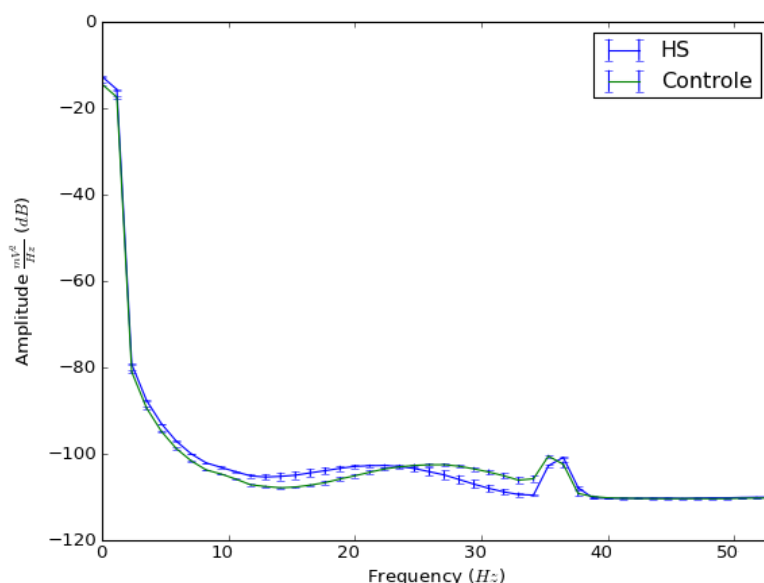
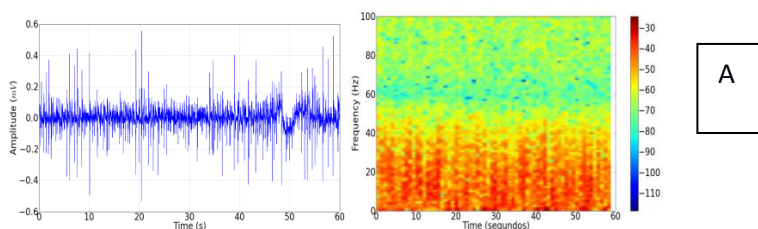
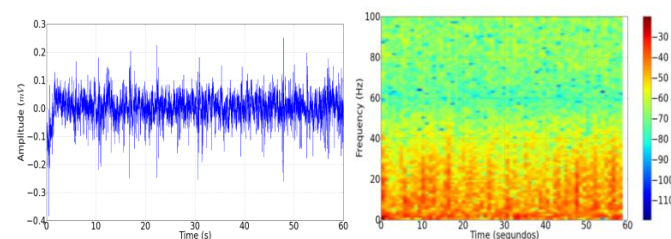


Gráfico 2: Distribuição espectral de frequência demonstrando media e desvio padrão nas frequências de 1-50Hz. O registro eletrocorticográfico de ratos tratados LHS (3mg/Kg) e controle, letras distintas entre as curvas denotam diferenças significativa após aplicado Teste T pareado.

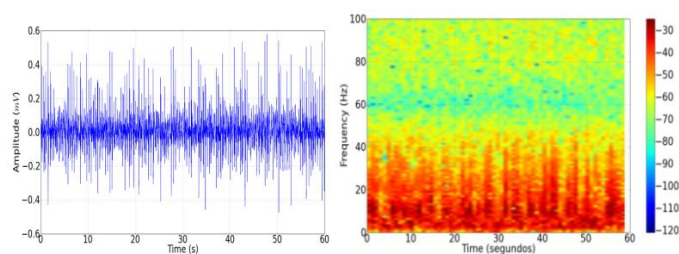
As análises referentes ao eletrocorticograma (ECoG) estão apresentadas no gráfico 2 pela distribuição espectral das frequências e no gráfico 3 que ilustra o sinal eletrocorticográfico após administração de LHS 3mg/Kg, doses repetidas nos tempos 30 min, 24, 48, 72 horas. Os resultados não apresentaram significância estatística, no entanto, a observação do Gráfico 2 é possível notar uma sugestiva baixa de linear no potencial, que apesar de nestas condições não apresentarem significância estatística podem expressar diferenças com o controle em outra faixa de dose de LHS. Tendo em vista a análise mais detalhada desta tendência observada efetuou-se o designer experimental II onde os resultados estão expressos na Tabela 3 e Gráficos 4 e 5.



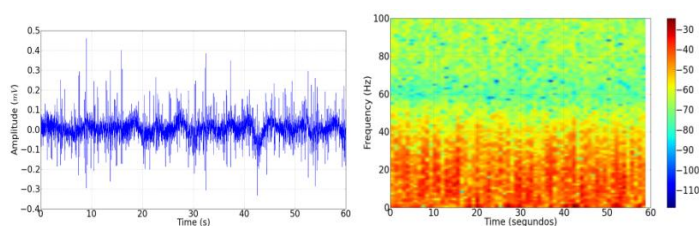
A



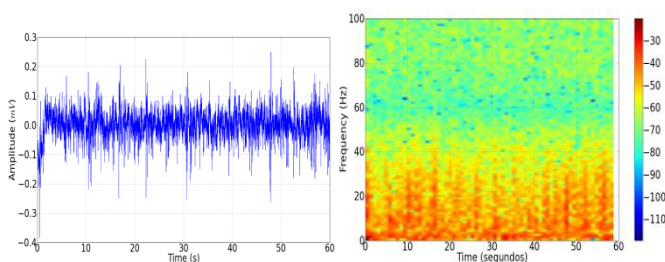
B



C



D



E

Gráfico 3: Sinal eletrocorticográfico após administração de LHS 3mg/Kg A= Basal, B= 30 minutos, C= 24 horas, D= 48 horas e E= 72 horas. Traçados eletrocorticográficos (ECoG) mostrando pontas e rajadas isoladas. Gráfico 3 A- Espectrograma de frequências basal. Gráficos 3 B, C, D, E correspondem aos espectrogramas de frequência de após tratamento com doses repetidas de 3mg/kg com leitura efetuada depois de 30 min, 24, 48, 72 horas respectivamente.

A Tabela 4 apresenta o tempo de latência (em segundos) da escala de aparecimento dos principais comportamentos observados nos estágios após a administração LHS nas doses de 30, 300 e 600 mg/kg como avaliação anticonvulsivante.

Tabela 4: Latência (s) de aparecimento sinais comportamentais observados nos estágios após a administração de LSH.

	E.V.	I.	EMA	C. S. P.R.	C.G.T.P.R.	C.C.T.P.R	Morte
PTZ 60mg/kg	27,57±4,353	55,57±11,94	65,57±12,39	79,29±21,48	161,3±66,94	420,6±87,37	726±96,72
LHS (+PTZ) 30 mg/kg	24,83±4,708	44,17±2,483	56± 6,573	71,17±10,83	178,3± 18,99	442,5±55,40	636±74,36
LHS(+PTZ) 300 mg/kg	30,83±7,985	56,17 ±11	82,67± 24,85*	103,7±32,19	183 ± 41,56		
LHS (+PTZ) 600 mg/kg	33±2,828	43,83± 3,71	57,33±8,042	71,17±10,68	192,8± 30,26		

E.V: Eriçamento de vibrissas (estágio I), I: incoordenação, e E.M.A: Espasmos dos membros anteriores (estágio II) , C.S. P.R.: Crises clônicas isoladas sem perda do reflexo de postura (estágio III), C.G.T.P.R.: Crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (estágio IV), C.C.T. P.R.: Crises clônicas ou tônico clônicas com perda do reflexo de postura e M: morte.

A avaliação comportamental foi efetuada de acordo com os estágios comportamentais descritos na Tabela 1. E os tempos de latência estão detalhadamente descritos na Tabela 4. Após administração de 30 mg/kg de LHS por via oral, os animais não apresentaram

diferenças de tempo de latência em comparação com os estágios excitatórios convulsivos provocados pela pentilenotetrazol (PTZ) atingindo o quinto estágio comportamental em $442,5 \pm 55,40$ segundos, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo PTZ que apresentou latência de $420,6 \pm 87,37$ segundos (Anova, Dunnet $p < 0,05$). No entanto, nas doses de 300 e 600mg/kg os animais apresentaram evolução característica ao quadro induzido pelo PTZ até o estágio 4, onde foi possível observar crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura, salivação e vocalização, porém não ocorreu a evolução do processo até o quinto estágio. Numa análise mais destacada exposta no gráfico 4 (4A e 4B) o aparecimento de crises clônicas isoladas sem perda de reflexo de postura (estágio 3 - Tabela 1) e crises generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (estágio 4 - Tabela 1), nas três doses avaliadas, 30, 300 e 600mg/kg não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo PTZ isolado (Anova, Dunnet $p < 0,05$).

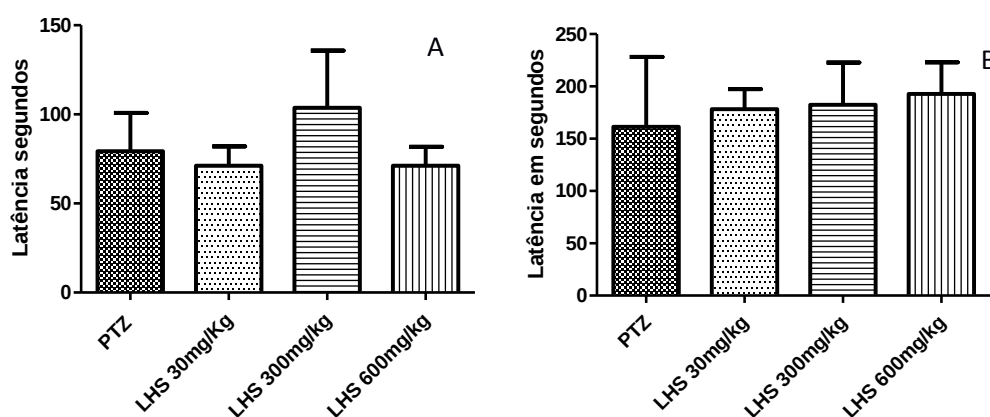
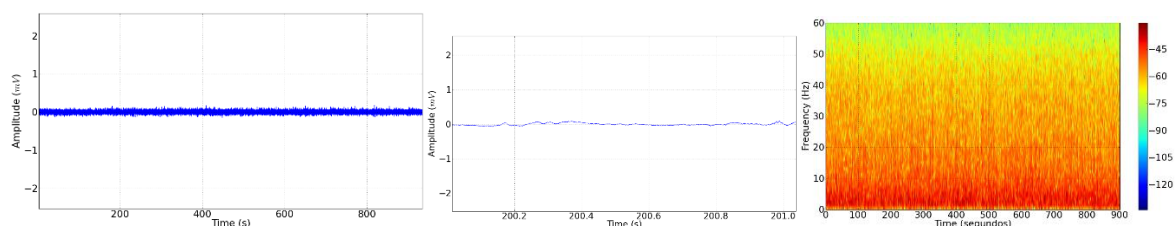
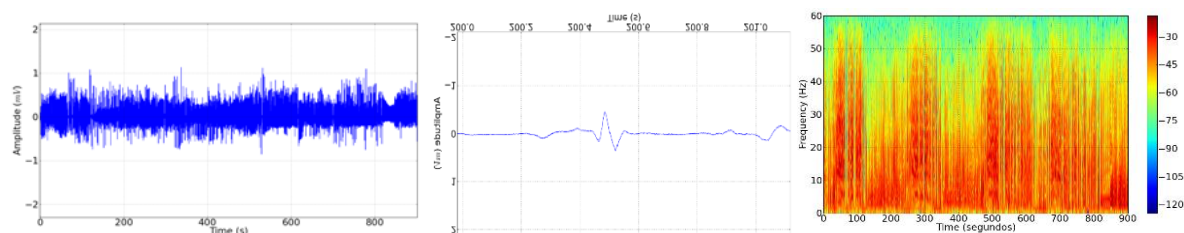


Gráfico 4: Tempo de latência para o aparecimento dos estágios 3 e 4. (A) apresenta a latência para o aparecimento de crises clônicas isoladas sem perda de reflexo de postura, e (B) para crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (B). * indica resultados diferentes estatisticamente em relação ao grupo PTZ isolado (Anova, Dunnet, $p < 0,05$).

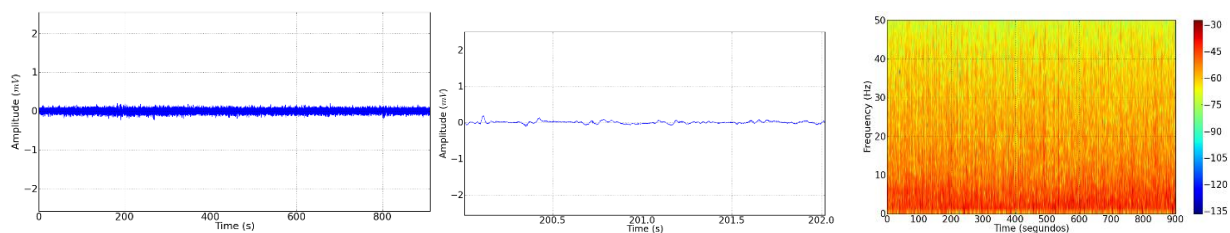
Os animais tratados com as doses 300 e 600 mg não evoluíram para o estágio 5 comportamental, onde o animal apresenta crises clônicas ou tônico-clônicas generalizada com perda do reflexo de postura, cianose e parada respiratória, e nenhum dos animais submetidos a este tratamento morreu, perfil evidenciado nos animais controles induzidos com PTZe nos tratados com 30 mg/kg. Estes resultados sugerem uma proteção ao animal, impedindo que haja evolução do quadro convulsivo a estágios mais graves que podem levá-lo à parada respiratória e morte.

A**Basal**

389

B**PTZ**

391

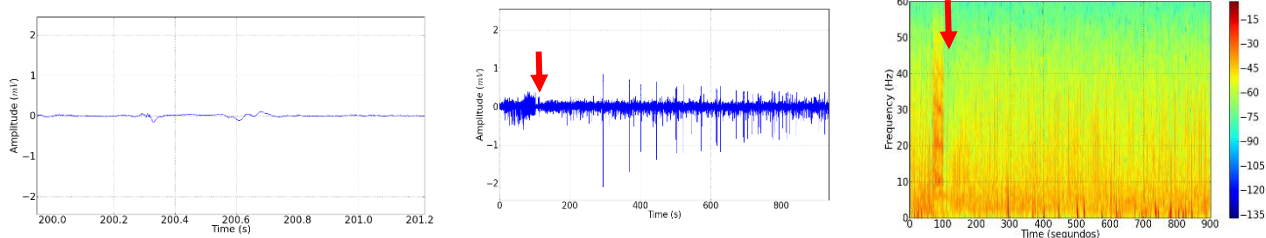
C**LHS 300mg/kg**

393

394

D

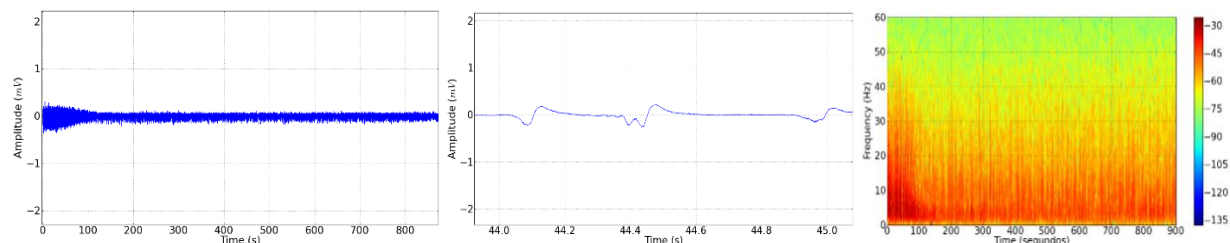
LHS 300mg/kg + PTZ 60 mg/kg



395

E

BDZ 5mg/kg



397

Gráfico 5. Registro eletrocorticográfico demonstra o traçado e o espectrograma A-Basal, B-PTZ, C-300 mg/Kg LHS e D-300 mg/Kg LHS +PTZ LHS. O gráfico 5 apresenta o demonstrativo do traçado eletrocorticográfico e espectrograma observado na leitura (A) Basal, (B) observado no animal que recebeu PTZ, (C) animal tratado com 300 mg/kg LHS, (D) animal que recebeu 300 mg/kg de LHS e posteriormente foi induzido a convulsão por PTZ e (E) do animal submetido a dose de 5 mg/kg de diazepam com posterior deflagração da convulsão por PTZ.

Tendo em vista a comparação do efeito inibitório do tratamento com LHS sob o quadro excitatório convulsivo induzido pelo PTZ, foi avaliada nas mesmas condições experimentais o tratamento com Diazepam 5 mg/kg, um benzodiazepínico clássico com ação anticonvulsivante (Gráfico 5 e 6).

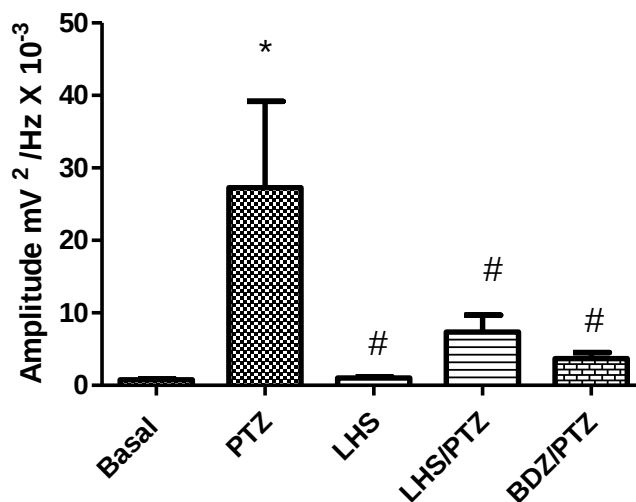


Gráfico 6: Amplitudes em escala linear das frequências até 50 Hz comparação entre o tratamento LHS e o tratamento com Diazepam (BDZ). O gráfico apresenta as diferenças de amplitude em escala linear das frequências até 50 Hz, onde pode se observar a leitura basal, indução PTZ (60mg/Kg), LHS (300 mg/kg) isolado, LHS (300 mg/kg) + PTZ (60 mg/kg), e Diazepam (BDZ 5 mg/Kg) + PTZ (60 mg/kg). O * apresenta resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo Basal (Anova, Dunnett, $p < 0,001$) e # apresenta resultados estatisticamente diferentes entre si (Anova, Tukey, $p < 0,001$).

Na análise da atividade do potencial de campo representada por traçado eletrocorticográfico do córtex cerebral do rato em estado basal, o espectrograma demonstrou distribuição de energia nas frequências até 50Hz, com maior concentração nas frequências localizadas abaixo dos 10 Hz (Gráfico 5- A). A atividade do potencial de campo do animal submetido a injeção de PTZ apresentou amplitudes maiores no traçado eletrocorticográfico, o que pode ser observado no espectrograma que demonstrou maior intensidade de energia distribuída até 50Hz (Gráfico 5- B). Para o grupo que foi tratado com LHS o traçado eletrocorticográfico revelou com amplitudes próximo ao do grupo controle (basal) de tal forma que o espectrograma apresenta concentração de energia nas frequências até 10Hz (Gráfico -5 C). Para o grupo que recebeu LHS e posteriormente foi submetido à convulsão provocada pelo

PTZ observa-se que no traçado ocorre uma interrupção na evolução da crise (Gráfico 5 D- Seta Vermelha) não permitindo a evolução para os estágios posteriores. O grupo que recebeu Diazepam (BDZ) 5 mg/Kg apresentou controle da convulsão induzida pelo PTZ, com mínima alteração de traçado (Gráfico 5 -E).

Dentro de uma análise quantitativa, as diferenças nas amplitudes são evidenciadas quando se compara a frequência linear no intervalo de 1 a 50Hz (Gráfico 6). O grupo Basal apresentou média de $0,7859 \pm 0,1190 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ enquanto o grupo que recebeu apenas PTZ, $27,26 \pm 11,91 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, demonstrando diferença estatística significativa em relação ao basal (Anova, Dunnett, $p < 0,001$). Na análise dos grupos que receberam LHS na dose de 300mg/Kg de forma isolada revelou média de amplitude de $1,026 \pm 0,1812 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ não apresentando diferença estatística ao grupo de leitura basal. Já o Grupo que recebeu LHS 300mg/Kg e posteriormente PTZ para indução à convulsão apresentou média de amplitude registrada de $7,337 \pm 2,343 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ demonstrando diminuição da intensidade da convulsão provocada pelo PTZ, com diferença estatística significativa ao PTZ isolado (Anova, Tukey, $p < 0,001$). Vale ressaltar que o Grupo LHS 300 mg/Kg e posterior indução com PTZ não revelou valores médios de amplitude diferentes estatisticamente do grupo tratado com Diazepam e posterior indução com PTZ (Gráfico 6, Anova, Tukey, $p < 0,001$).

4. DISCUSSÃO

A região norte possui grande expressão da medicina tradicional, fortemente representada pelo uso de plantas medicinais, utilização de *Himatanthus sucuuba*, a infusão casca desta planta pela população regional vem mostrando potencial terapêutico com grande aplicabilidade nas desordens digestivas. A análise de aspectos tóxicos desta planta é de

extrema importância para determinar um perfil de segurança associada à sua utilização na medicinal tradicional, podendo limitar variáveis relacionadas ao tratamento como esquemas posológicos, doses e efeitos colaterais indesejáveis, e em algumas situações até mesmo a não recomendação de utilização. E em especial, mesmo que comprovada sua segurança é extremamente útil determinar a possível influência de sua ingestão no perfil das análises clínicas como nos parâmetros de hemograma e de alguns analitos da bioquímica clínica de rotina.

Os resultados expressos pela avaliação do liofilizado do decocto das cascas da *Himatanthus sucuuba* (LHS) sob o bioensaio de *Artemia salina* apresenta um perfil satisfatório uma vez que não expressam resultados diferentes entre *Artemias* controles e expostas a solução teste como mostra o gráfico 1. Em geral a avaliação de toxicidade é considerada fundamental como bioensaio preliminar no estudo de substâncias com propriedades biológicas. O teste realizado com a *Artemia salina* é muito utilizado, justamente por fornecer dados relevantes em relação ao impacto de substâncias sobre a microbiota, sendo uma metodologia simples, que demanda um baixo custo e é flexível às estruturas físicas de laboratórios (LUHLLIER et al, 2006). Nossos dados corroboram com dados descritos na literatura que apresenta a descrição de ensaios toxicológicos com extrato etanólico de *Himatanthus sucuuba* realizada pelo grupo de pesquisa que demonstrou ausência de toxicidade expressiva no bioensaio da *artemia Salina* (LOPES, 2017).

Em relação às análises toxicológica subcrônica a administração de doses repetidas por um período de 30 dias não promoveu efeitos significativos nos resultados dos parâmetros do Hemograma (Tabela 2). Dentro dos parâmetros analisados não foram determinadas alterações em seu perfil que diferissem os animais tratados em relação aos controles. O sangue é

principal meio de transporte, as células presentes desempenham várias funções de defesa contra infecções tornando-se importante sua análise. Essas células reconhecem moléculas estranhas existentes em diferentes agentes infecciosos, combatendo-as por meio de resposta imunológica (CRUVINEL et al., 2010). Nenhum parâmetro avaliado apresentou diferenças que justificariam quaisquer alterações associadas a este tratamento repetido no perfil hematológico.

No que diz respeito à avaliação de parâmetros bioquímicos de rotina expressos na Tabela 3, as análises sob as mesmas condições também não apresentam toxicidade subcrônica da espécie *Himatanthus sucuuba* , constatando que na dose utilizada na medicina tradicional, e adaptada alometricamente ao modelo animal, não demonstrou nenhuma alteração nestes parâmetros bem como nenhuma alteração hipocrática ou morte durante o protocolo experimental.

A verificação do perfil hepático, a partir da análise das transaminases nos conferem informações importantes sobre a integridade/toxicidade de agentes sob hepatócitos. O fígado é o maior e o mais complexo dos órgãos internos, sendo o principal local do metabolismo de agentes xenobióticos como os fármacos, bem como outros compostos potencialmente tóxicos, (GOMES, 2014) ainda segundo o autor o exame laboratorial, identifica as causas das lesões hepáticas e o perfil das alterações laboratoriais encontradas em hepatopatia específica, e que se complementam a possíveis alterações apresentados na análise histológica. O hepatócito é o componente estrutural básico do fígado, e é considerado o primeiro alvo da toxicidade de uma substância (ZELIKOFF, 1998). Considerado a célula mais versátil do organismo, acumula e transporta inúmeras substâncias além de possuir funções endócrinas e exócrinas (GARTNER & HIATT, 1997). Como as células metabolicamente complexas, os hepatócitos

contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), a presença de elevações simultâneas desta enzima normalmente relata-se quadros de alguma patologia (ALVAREZ et al., 2002). Fato não relacionado ao tratamento avaliado. Já a enzima γ -glutamyl transferase (GGT) encontra-se ligada à membrana plasmática de células que exibem alta capacidade secretora ou absorviva, como hepatócitos (ductos biliares e fração microssomal) túbulos renais proximais. Emprega-se o doseamento desta enzima para diagnosticar comprometimento da função biliar (ALVAREZ et al., 2002), onde também o tratamento com LHS não apresentou diferenças em relação aos animais controle.

Para avaliação da função renal foi dosado creatinina (mg/dL), ureia (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), a análise não demonstrou alterações nos tecidos. O rim é o principal órgão do sistema urinário, sendo responsável pela regulação da concentração da maioria dos íons presentes nos líquidos orgânicos e pela filtração do sangue, equilíbrio ácido-base por meio da filtração do sangue, seguido da reabsorção seletiva ou da secreção para o fluido tubular e excreção de substâncias indesejáveis (SMELTZER, 2009). Sendo críticos para eliminação dos produtos de degradação, e a alteração na função renal é uma das causas mais comuns de toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos. A avaliação da função envolve alguns constituintes de ocorrência normal no sangue, entre eles, creatinina, ureia e ácido úrico. A creatinina é um produto normal do metabolismo, sendo sua depuração proporcional a massa corporal. Situações em que ocorre elevação de creatinina no plasma pode-se associar a uma deficiência no processo de filtração glomerular, geral, elevação das concentrações de creatinina e ureia no sangue podem ser usadas como índice de decréscimo da filtração glomerular (DUSSE et al., 2017, DAVIS e

BERNDT, 1994). O ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas individualmente, os níveis de ácido úrico dependem de fatores metabólicos determinados geneticamente, como atividade enzimática, fatores nutricionais e também da eficiência de sua excreção renal (MARION et al. 2011). Nas análises não foi determinada alterações significativas nestes parâmetros, bem como no aspecto estrutural exibidos pela análise histológica do tecido renal.

Vale ressaltar que a distribuição das estruturas funcionais, em perfil de normalidade, também expressadas pela verificação histológica de fígado e rim por coloração hematoxilina e eosina (HE) confirma a preservação destes tecidos após exposição destes animais ao tratamento figura 1 e 2. Outro órgão analisado durante o experimento foi à porção duodenal. A importância da análise do tecido deve-se sua grande participação na atividade absorptiva deste órgão. De forma semelhante ao fígado e rim, não foram determinadas modificações na avaliação histológica efetuada no tecido como mostra a figura 3.

A literatura corrobora com dados obtidos na pesquisa trazendo a descrição de ensaios relacionados ao látex da *Himatanthus articulatus* demonstrando baixa toxicidade, assim como não exerce nenhum efeito genotóxico em ratos (BAGATINI, 2004). O perfil semelhante também foi obtido a partir da avaliação de extrato metanólico de *H. articulatus* revelando baixa toxicidade por via oral em camundongos (SOUSA, et al., 2010), Estudos realizados com a decocção de casca de caule de *Himatanthus suluuba* sugerem que há uma baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica, revelando que seu consumo é seguro para a espécie humana (Guerra & Peters, 1991).

A literatura descreve um estudo que avaliou o efeito de extrato etanólico de cascas da *Himathantus drasticus* (EHA) sob convulsões induzidas por estricnina e pentilenotetrazol.

Nas análises com o primeiro indutor não foi observada atividade anticonvulsivante significativa, no entanto, sob o modelo do PTZ, EHA apresentou atividade anticonvulsivante e bioprotetora em todos os parâmetros avaliados, e de forma análoga ao nosso estudo seu tratamento não se apresentou diferente aos resultados expressos pelo anticonvulsivante Diazepam (PINTO, 2011). Neste mesmo estudo, a prospecção fitoquímica inicial verificou que a fração total de alcaloides obtidas do extrato, não foi capaz de promover a manutenção do efeito anticonvulsivante sugerindo desta forma que este efeito pode estar atribuída a outros metabolitos secundários ou que a mesma seja dependente do fitocomplexo. Diversos estudos têm evidenciado o envolvimento de EROS nas convulsões e efeitos induzidos por PTZ (OBAY et al, 2008), AKABARA et al, 2005), nas últimas décadas vários compostos de origem natural dotados com atividade anticonvulsivante apresentaram também atividade antioxidante associada (HSIEH et al, 1999, IHAN et al, 2005). O grupo em estudos relacionado verificou alta atividade antioxidante de LHS (dados não apresentados).

5. CONCLUSÃO

O experimento realizado com decocto da casca de *Himatanthus sucuuba* LHS- 3mg/Kg demonstrou ausência de toxicidade expressiva no bioensaio da *Artemia Salina*. Este perfil foi mantido na avaliação subcrônica com doses repetidas, onde não foram expressas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos estudados. A ausência de alterações morfológicas observada pela análise histológica de cortes de fígado, rim e porção do duodeno corrobora com os resultados bioquímicos obtidos, sugerindo segurança associada ao uso etnofarmacológico.

No que diz respeito a avaliação do perfil eletrocorticográfico na dose utilizada na medicina tradicional foi observada uma tendência no declive nas medias das amplitudes

nas leituras eletrocorticográficas, sem que fosse determinada significância estatística pós tratamento. Entretanto dentro de uma avaliação mais ampliada dos efeitos das doses nestes parâmetros, as doses de 300 mg/kg e 600 mg/kg expressaram significativo efeito anticonvulsivante frente as convulsões induzidas com PTZ, e já na dose de 300 mg/kg resultados não diferentes estatisticamente dos obtidos com o uso de Diazepam 5 mg/kg. Dentro da ótica de avaliação toxicológica, estes resultados expressaram um achado que contribui para uma nova atribuição farmacológica a esta planta, no entanto, são necessários estudos que possam averiguar em detalhe esta atividade revelada sendo objetivo de futuros estudos a serem desenvolvidos pelo grupo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGATINI, M.D; SILVA, A.C. F; TEDESCO, S.B. **Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais**, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2004, 4p.

CRUVINEL, W. M· Et al.,**Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**.Rev. Bras. Reumatol. vol.50 no.4 São PauloJuly/Aug.2010.

DUSSE LMS, Rios DRA, Sousa LPN, Moraes RMMS, Domingueti CP, Gomes KB.**Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente**. RBAC. 2017; 49(1):41-51.

- 580 ENDO, Y.; HAYASHI, H.; SATO, T.; MARUNO, M.; OHTA, T.; NOZOE, S.; *Chem.*
581 *Pharm. Bull.* **1994**, 42, 1198.
- 582 ELISABETSKY, E & CASTILHOS, Z. C. **Plants used as analgesic by Amazonian**
583 **CABOCLOS a basis for selecting plants for investigation.** International Journal of Crude
584 Drug Research, 28, 309-20, 1990.
- 585 FERRIGNI, V. N. R.; HASEGAWA, M.; *Rev. Latinoamer.Quím.* **1976**, 7, 146.
- 586 GUERRA, M. D. O., PETERS, V. M. *Journal of Ethnopharmacology*, v.34, n.2-3, p.195-200,
587 1991.
- 588 GOMES, D. L. F. **Biomarcadores para Avaliação da Lesão Hepática Induzida por**
589 **Fármacos.** Faculdade de Ciências e Tecnologia Departamento de Química, Bioquímica e
590 Farmácia Universidade do Algarve, 2014.
- 591 HAMOY, M et al. **Cunaniol-elicited seizures: Behavior characterization and**
592 **electroencephalographic analyses** .Elsevier Inc.Toxicology and Applied Pharmacology,
593 (2018).
- 594 LOPES, M.S. P, **avaliação do efeito gastroprotetor/ gastrocicatrizante e de parâmetros**
595 **toxicológicos do extrato etanólico de *himatanthus sucuuba*.** Universidade Federal do Pará,
596 2017.

- 597 MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant
598 constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.
- 599 MARION et al. **Uric acid as a risk factor for cardiovascular diseases and metabolic**
600 **syndrome** Rev. Bras. Farm. 92(1): 3-8, 2011.
- 601 PAUMGARTTEN, F. J. R. **Traditional use and safety of herbal medicines**. Revista
602 Brasileira de Farmacognosia, v. 24, p. 248-257, 2014.
- 603 PERSINOS, G. P.; BLOMSTER, R.N.; *J. Pharm. Sci.* **1978**, 67, 1322.
- 604 OLIVEIRA, P.; OLIVEIRA, J.; COLAÇO, A. Recolha e envio de amostras biológicas para o
605 diagnóstico de intoxicações em carnívoros domésticos. **Revista Portuguesa de Ciências**
606 **Veterinárias**. Lisboa, v. 97, n. 544, p 161- 169, 2013.
- 607 BRANDÃO, M. G. L.; OLIVEIRA, G. Medicinal plants recommended by the world health
608 organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their
609 quality. **PLOS One**, v. 10, n. 5, p. 1-29, 2015.
- 610 PINTO, BRUNO ARAÚJO SERRA. Estudo psicofarmacológico do extrato bruto das cascas
611 de *Himathathusdrasticus* Mart. Dissertação Mestrado UFM P's graduação em m saúde e
612 Ambiente, 2011.

- 613 PAUMGARTTEN, F. J. R. **Traditional use and safety of herbal medicines**. Revista
614 Brasileira de Farmacognosia, v. 24, p. 248-257, 2014.
- 615 RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, Genome sequence of the
616 Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v.428, p.493-521,
617 2004. Disponível em:
618 <<http://www.nature.com/nature/journal/v428/n6982/pdf/nature02426.pdf>>. Acesso em: 26
619 mar. 2018, 10.1038/nature 02426.
- 620 SILVA, S. L.; NASCIMENTO, A. A. do; RIBEIRO, E. F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C.
621 M.; SANTOS, A. M. dos; MIRA NETO, R. de. A. **Avaliação da toxicidade aguda pré-
622 clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae).**
623 *Acta Amazonica*, v.46, n.1, p. 73-80, 2016.
- 624 SOUSA, E.L. *et al.* Antitumor **activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-**
625 **pocynaceae (Janaguba) in the treatment of sarcoma 180 tumor.** **Braz J Pharmac Sci**, v. 46, p.
626 199 – 203, 2010.
- 627 SOARES, F.P. *et al.* Estudo etnofarmacológico e etnobotânico de *Himatanthus drasticus*
628 (Mart.) Plumel (Janaguba). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.4, supl. II, p.900-908, 2015
- 629 SCHENKEL EP. Cuidado com os medicamentos. **As plantas medicinais, os chás e os
630 fitoterápicos**. Porto Alegre: Saga, Deluzata; 1995.

631 SILVA JR, Amaral AC, Silveira CV, Rezende CM, Pinto AC. Quantitative determination by
632 HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuba*. *Acta Amazônica*.
633 2007;37(1):119-22.

634

ANEXO



JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0378-8741

DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their **biological and pharmacological effects** based on the principles established through international conventions. Early people confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful **therapeutic agents** in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these **medicinal substances** and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of **indigenous remedies**. Chemists continue to use **plant-derived drugs** (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of **indigenous medical knowledge**,
- scientific study of **indigenous medicines** in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - invited, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D.E., and Leonti, M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the headings **Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions.**

Click [here](#) to see an example.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with <http://www.theplantlist.org> mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.