

Procedimento Operacional Padrão como estratégia para avaliação toxicológica e registro de Plantas Medicinais**Standard Operating Procedure as a strategy for toxicological evaluation and registration of Medicinal Plants**

DOI:10.34117/bjdv6n8-598

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação:26/08/2020

Igor Birelo Sanches

Graduando em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Endereço: Rodovia BR - 369, s/n, Bandeirantes/PR, CEP 86360-000

E-mail: igorbirelo.sanches@gmail.com

João Paulo Ferreira Schoffen

Biólogo Doutor em Biologia Celular e Molecular Instituição: Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Endereço: Rodovia BR - 369, s/n, Bandeirantes/PR, CEP 86360-000

E-mail: jpschoffen@uenp.edu.br

Fábio Rodrigues Seiva

Biólogo Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica

Instituição: Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Endereço: Rodovia BR - 369, s/n, Bandeirantes/PR, CEP 86360-000

E-mail: fabio.seiva@uenp.edu.br

Cristiano Massao Tashima

Farmacêutico Doutor em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Endereço: Rodovia BR - 369, s/n, Bandeirantes/PR, CEP 86360-000

E-mail: cristianotashima@uenp.edu.br

Regildo Márcio Gonçalves Silva

Biólogo Doutor em Genética e Bioquímica

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/ Campus de Assis)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis/SP, CEP 19806-900

E-mail: regildo.silva@unesp.br

Carlos Vinícius Dalto da Rosa

Biólogo Doutor em Biologia Celular e Molecular

Instituição: Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Endereço: Av. Edelina Meneghel Rando, 151, Vila Macedo, Bandeirantes/PR, CEP 86360-000

E-mail: carlosvinicius_xz@hotmail.com

Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto

Médica Veterinária Pós-doutorado em Fitoterapia

Instituição: Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Endereço: Rodovia BR - 369, s/n, Bandeirantes/PR, CEP 86360-000

E-mail: emellopeixoto@uenp.edu.br

RESUMO

Considerando os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030, práticas relacionadas ao desenvolvimento de fitoterápicos, produtos tradicionais fitoterápicos e plantas medicinais representam importantes medidas estratégicas para minimizar a ocorrência de resistência farmacológica bem como o impacto de resíduos medicamentosos sintéticos no meio ambiente. No contexto agropecuário, resistência farmacológica de helmintos intestinais representa importante barreira ao controle sanitário em animais de produção. O estudo de plantas taníferas têm demonstrado significativos efeitos sobre helmintos intestinais, representando importante alternativa ao uso de anti-helmínticos sintéticos em sistemas de produção animal. No entanto, aplicação de produtos com potencial farmacológico requer avaliação da efetividade e segurança medicamentosa, possibilitando registro de plantas medicinais e fitoterápicos. Estabelecimento de Procedimento Operacional Padrão (POP) é de suma importância uma vez que proporciona controle sobre a execução dos ensaios e repetibilidade científica. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi estabelecer POP para execução e repetibilidade da avaliação de possíveis efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos do Extrato Hidroalcoólico de Brácteas de *Musa paradisiaca* a 10% (EHABB 10%) em ratos Wistar. Foram selecionados artigos científicos publicados entre os anos de 2010 e 2020 nas bases de dados Scielo, PubMed e Portal de Periódicos da CAPES, bem como documentos emitidos por órgãos regulamentares da pesquisa científica como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), National Institute of Health (NIH), National Research Council (NRC), Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). O documento produzido descreve detalhadamente delineamento experimental, incluindo dados comportamentais, análises bioquímicas e histológicas, assim como análise estatística empregada. A partir dos resultados obtidos pelo presente estudo foi possível estabelecer POP para avaliação toxicológica do EHABB 10%, favorecendo sua execução de forma mais precisa, padronizada e eficiente.

Palavras-chave: agroecologia, fitoterápicos, anti-helmínticos naturais, ensaios pré-clínicos.

ABSTRACT

Pharmacological resistance to synthetic anthelmintic drugs represent an important barrier to animal parasites control. Considering the global agenda of sustainable development, search and development of phytotherapeutic agents, traditional phytotherapeutic products, and medicinal plants represent important measures to minimize the occurrence of pharmacological resistance and impacts of synthetic drugs on environment. In this context, antiparasitic properties of tanniferous plants have been recorded, highlighting the genus *Musa* spp. Toxicological evaluation is necessary for the validation of substances with pharmacological properties and its use on animals. The objective of the present study was to establish a standard operating procedure for the toxicological evaluation of the hydroalcoholic extract of banana bracts at 10%. The experimental design included the search and analysis of scientific articles published between 2010 and 2020 on the Scielo, PubMed and Portal de Periódicos da CAPES databases, documents and laws delivered by regulatory bodies of scientific research. The standard operating procedure describes the scientific methodology,

including animal data and laboratorial analyses of serum, organs and tissues. The present study supports and enable future pre-clinical trials for the evaluation of toxic effects of banana bracts extract in rats.

Keywords: agroecology, phytotherapics, natural anthelmintics, preclinical essays.

1 INTRODUÇÃO

Considerando os atuais anseios e necessidades da sociedade atual, é de suma importância a busca por inovações eficientes no que se refere à saúde, preservação ambiental e desenvolvimento tecnológico. De acordo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 (WHO 2015), práticas relacionadas ao desenvolvimento de produtos tradicionais fitoterápicos (PTFs) e plantas medicinais (PMs) representam importantes medidas estratégicas para minimizar a ocorrência de resistência farmacológica bem como o impacto de resíduos medicamentosos sintéticos no meio ambiente.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem valorizado a utilização de plantas medicinais, em função de que 80% da população mundial é dependente desta terapêutica de baixo custo (WHO 2002). No Brasil, foram estabelecidas diretrizes para o uso de plantas medicinais na saúde pública, com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (BRASIL 2006). Entretanto, apesar da fitoterapia ter sido incorporada ao Sistema Único de Saúde (BRASIL 2011), sendo orientada pela Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL 2015), e fazer parte do Programa de Saúde da Família e Assistência de Atenção Básica (BRASIL 2012), a falta de informações claras e científicas tem promovido o desconhecimento profissional acerca de tais produtos (ANDRADE 2017). Na agropecuária, embora a utilização de plantas medicinais seja encorajada em suas diversas atividades, o acesso dos agricultores a medicamentos naturais tem sido um fator limitante (BRASIL 2016).

Para transformar esta realidade, é de extrema importância que se promova o desenvolvimento em pesquisas científicas. Conforme RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTFs) são obtidos pelo emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica (BRASIL 2014). PTFs são passíveis de registro ou notificação, enquanto os fitoterápicos são passíveis de registro. As principais dificuldades relacionam-se à baixa disponibilidade de recursos financeiros e de pessoal para a realização das diferentes atividades necessárias à regulamentação dos produtos (BRASIL 2016).

O processo de validação e aplicação de produtos com potencial efeito farmacológico abrange a elucidação dos processos de manipulação, farmacocinética e efeitos tóxicos no organismo, tornando-se necessária a realização prévia de ensaios pré-clínicos (LANUSSE 2014; SIQUEIRA et al. 2020). Complementarmente, ensaios *in vitro* exigem a complementação de estudos *in vivo*, uma vez que os níveis de biodisponibilidade do fármaco no organismo muitas vezes não refletem a concentração estudada *in vitro*, sendo essencial para o completo entendimento e validação de produtos naturais, incluindo aqueles com potencial anti-helmíntico (BENAVIDES et al. 2017).

Infecções parasitárias do trato gastrointestinal representam importante barreira à produção animal, provocando perdas econômicas expressivas, incluindo gastos com medicamentos, redução da produtividade e morte dos animais (LANUSSE et al. 2014). Neste contexto, resistência anti-helmíntica representa uma das maiores causas de dificuldades no controle parasitário, configurando-se como reflexo do tradicional, intenso e indiscriminado uso de fármacos sintéticos executado nas últimas décadas (AMARANTE; AMARANTE 2016; DOS SANTOS et al. 2019). O amplo espectro de ação, altos níveis de eficácia, bem como o baixo custo foram responsáveis por tal cenário, desde o surgimento do primeiro anti-helmíntico sintético ocorrido no século passado (HOSTE; ACOSTA 2011; LANUSSE 2014). Entretanto, a aplicação de moléculas sintéticas tem sido amplamente discutida devido aos seus efeitos no meio ambiente e ao progressivo entendimento da população acerca de resíduos medicamentosos em produtos oriundos de animais, especialmente no que diz respeito ao potencial risco à saúde pública que representam (EICHBERG et al. 2016; BABIC et al. 2018)

Em busca de métodos naturais de controle parasitário, diversos estudos têm demonstrado alta eficácia de plantas medicinais e extratos vegetais na inibição de helmintos intestinais, com destaque especial a plantas taníferas do gênero *Musa* spp. (OLIVEIRA et al. 2010; NOGUEIRA et al. 2012; MARIE-MAGDELEINE et al. 2010, 2014; GREGORY et al. 2015; KAKIMORI et al. 2019; LEME, et al. 2020). Extratos de diferentes partes de *Musa paradisiaca* demonstraram potenciais efeitos hepatoprotetores em ratos (ABBAS et al. 2016). Embora seja composto por diferentes metabólitos secundários, a atividade dos extratos de plantas do gênero *Musa* tem sido relacionada a compostos fenólicos, como taninos condensados, cuja ação antiparasitária se baseia na indução de danos morfológicos na cutícula de nematoides (MARIE-MAGDELEINE et al. 2010; KAKIMORI et al. 2019).

Assim, considerando a potencial utilização de plantas medicinais no desenvolvimento de novos produtos com ação farmacológica, o objetivo do presente estudo foi realizar a elaboração de POP para execução de ensaios pré-clínicos para avaliação toxicológica do EHABB 10%.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ABORDAGEM PARA COLETA DE DADOS

Revisão de literatura foi executada em duas etapas consecutivas: busca de artigos e análise textual. Trabalhos publicados entre os anos de 2010 e 2020 nas bases de pesquisa Scielo, PubMed e Base de Periódicos da CAPES foram selecionados. Na pesquisa textual, aplicaram-se os termos “extratos vegetais”, “anti-helmínticos naturais”, “*Musa paradisiaca*”, “toxicidade extrato vegetal”, “poluição ambiental” e “resistência anti-helmíntica”. Todos foram pesquisados em língua portuguesa e inglesa. Artigos em inglês e português foram selecionados. Revistas das áreas de ciências agrárias, farmácia, medicina veterinária e ciências ambientais foram incluídas. Trabalhos com escopos voltados a avaliações de extratos de plantas não pertencentes ao gênero *Musa* spp., bem como aqueles com delineamento voltado a ensaios clínicos de produtos naturais foram automaticamente excluídos.

A pesquisa de documentos regulamentares foi realizada em sites oficiais de órgãos reguladores da pesquisa científica, como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *National Institute of Health* (NIH), *National Research Council* (NRC), Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Foram selecionados arquivos relacionados à regulação da experimentação científica com animais no âmbito da validação de produtos com potencial farmacêutico, das avaliações toxicológicas e ensaios pré-clínicos.

De forma a garantir a inclusão de materiais pertinentes à manipulação e experimentação com animais, foram selecionadas obras e legislações relacionadas ao tema fora do escopo de pesquisa apresentado. Este procedimento se mostrou de fundamental importância como método auxiliar na busca de instrumentos necessários à estruturação da metodologia pretendida.

Após seleção, todos os arquivos foram analisados de forma a considerar informações textuais relacionadas aos seus respectivos objetivos, metodologias, soluções, resultados e recomendações. Tais informações foram triadas de acordo com sua relevância, aplicabilidade, adequabilidade e repetibilidade científica e então utilizadas como suporte para estabelecimento do POP para execução dos ensaios *in vivo* necessários à validação do uso do EHABB 10%.

2.2 ESTABELECIMENTO DO POP PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EHABB 10%

Entende-se por POP documento organizacional planejado do trabalho a ser executado de modo que haja favorecimento da qualidade das ações realizadas, à medida que o executor do processo constitui parte integrante da elaboração de cada procedimento (NEVES; MANCINI;

MENEZES 2013). Neste estudo, o POP estabelecido contém descrição detalhada de todas as medidas necessárias para execução de procedimentos experimentais relacionados à avaliação toxicológica do EHABB 10%. Este POP deverá ser utilizado como guia simples destinado a quem executará os ensaios. Sua implantação será realizada a fim de que se obtenha repetibilidade científica e supressão de desvios e inadequações na realização de cada atividade.

O delineamento experimental foi construído com base no documento de número 420 da OECD (2001), referente a ensaio de toxicidade aguda, a partir do qual adequações e adaptações foram realizadas a fim de atender aos critérios de repetibilidade científica, adequabilidade e aplicabilidade necessários à execução do experimento.

2.3 SUBMISSÃO À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

A metodologia estabelecida foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP) sob Projeto SECAPEE de nº 4935.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Serão utilizados 25 ratos Wistar, albinos, pesando entre 150 e 200 gramas e com 8 a 12 semanas de idade (OECD 2001). Provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Maringá, tais animais serão mantidos no Biotério da UENP, localizada em Bandeirantes, estado do Paraná, Brasil (23°06'36"S, 50°22'03"W). Durante o período de 7 dias os animais serão alocados individualmente em caixas de polipropileno, sob temperatura média de 25 °C, umidade relativa do ar média de 60% e ciclo de claro/ escuro de 12 horas (OECD 2001; NIH 2010; NEVES; MANCINI; MENEZES 2013).

Como alimento, os animais deverão receber ração peletizada e balanceada de acordo com suas necessidades fisiológicas (Tab. 1) (NRC 1995; OECD, 2001). É importante que esta possua em sua composição farelo de milho integral moído, farelo de trigo, farelo de soja, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, aminoácido e premix mineral e vitamínico. Ainda, o alimento deve apresentar-se íntegro e manter suas características organolépticas (odor, sabor, cor e consistência) (NEVES; MANCINI; MENEZES 2013). Segundo o NRC, a necessidade energética para ratos em crescimento é de 114 kcal multiplicado pelo seu peso elevado a 0,75. Para ratos adultos, os aminoácidos essenciais são histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, treonina, valina. Ainda, o órgão determina que a exigência proteica para crescimento e

reprodução é de 15% e, para manutenção, de 5% da dieta. A quantidade de lipídeos, por sua vez, é de 5% (NRC, 1995).

Aos animais também deverá ser oferecida água limpa e filtrada *ad libitum* (OECD 2001).

3.2 ESTUDO PILOTO

A execução de estudo piloto será necessária e terá a finalidade de realizar a exclusão de doses altamente nocivas aos animais e estabelecer intervalo de doses a serem testadas no estudo principal. Para tanto, recomenda-se a aplicação sequencial e crescente, a cada 24 a 48 horas, de doses crescentes do extrato a ser avaliado. As doses aplicadas serão de 50, 300, 1000 e 2000 mg/kg, iniciando-se em 50 mg/kg, sendo que será utilizado apenas um animal por dose testada (OECD, 2001). A cada aplicação, deverá ser verificada a existência de quaisquer sinais de toxicidade evidente ou de óbito (Quadro 2) durante 14 dias consecutivos (ANVISA 2013). Qualquer alteração de tal natureza será interpretada como sinal de toxicidade e a dose na qual os sinais foram observados será automaticamente excluída da fase seguinte do estudo e o produto será classificado de acordo com seu potencial de toxicidade, segundo categorias do *Globally Harmonized System* (GHS). Desta forma, serão incluídas no estudo principal apenas as doses que se mostrarem seguras (Figura 1). O estudo piloto será encerrado quando a dose teste inicial for estabelecida (OECD 2001).

Tabela 1 - Estimativa de requerimentos nutricionais de ratos em diferentes fases do ciclo de vida.

| <i>Nutriente</i> | Unidade | <i>Quantidade por kg de dieta</i> | |
|--|----------------|-----------------------------------|--------------------|
| | | Manutenção | Crescimento |
| Proteínas | g | 50.0 | 150.0 |
| Gordura | g | 50.0 | 50.0 |
| Minerais | - | - | - |
| Cálcio | g | 5.0* | 5.0 |
| Sódio | g | 0.5* | 0.5 |
| Fósforo | g | 3.0* | 3.0 |
| Ferro | mg | 35.0* | 35.0 |
| Iodo | mg | 150.0* | 150.0 |
| Vitaminas | - | - | - |
| A (retinol) | mg | 0.7* | 0.7 |
| D (colecalfiferol) | mg | 0.025* | 0.025 |
| B12 | mg | 50.0* | 50.0 |
| E (RRR-α-tocoferol) | mg | 18.0* | 18.0 |

Nota. Requerimentos nutricionais baseados em dietas contendo 10% de umidade e 3.8-4.1 kcal de energia metabolizável/ g e devem ser ajustados para dietas com diferentes teores de umidade e concentração energética. Fonte: Adaptado de NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995).

*Os requerimentos estimados de vitaminas e minerais para manutenção não foram determinados, sendo aplicadas as exigências de crescimento.

Quadro 1 - Alterações fisiológicas, físicas e comportamentais identificadas como potenciais sinais relacionados a dor ou desconforto em ratos.

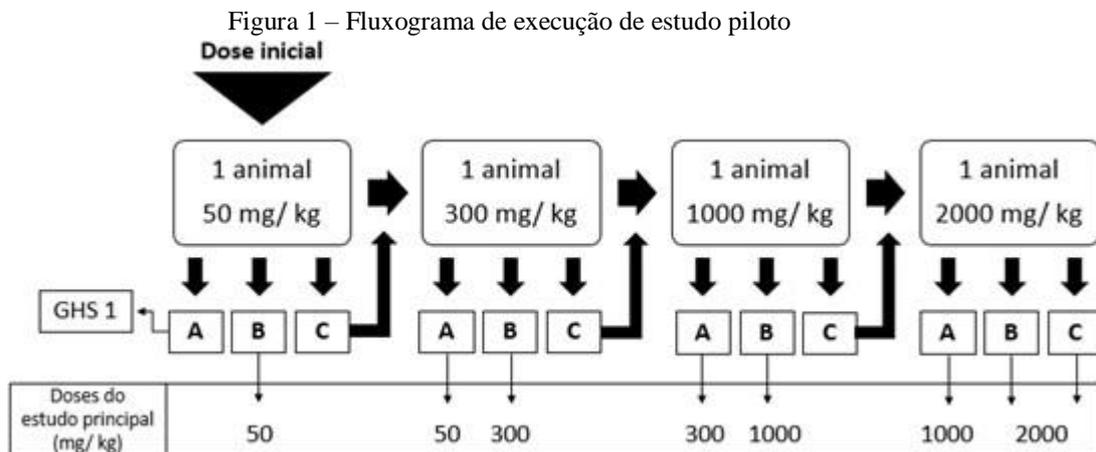
| Sinais | | | |
|---|--|-------------------------------|----------------------|
| Diminuição da ingestão de alimento e água | Respiração com a boca aberta | Postura anormal | Desidratação |
| Perda de peso | Ranger de dentes | Sono agitado | Espasmos ou tremores |
| Isolamento social | Agressividade | Ausência de reflexo palpebral | Vocalização |
| Automutilação | Hiper/hipoatividade | Dilatação pupilar | Salivação |
| Taquipnéia | Pelagem opaca, emaranhada e/ou eriçada | Hiper/hipotonicidade muscular | |

Nota. Fonte: Adaptado de National Institute of Health (2010).

3.3 ESTUDO PRINCIPAL – ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA (ETA)

De acordo com ANVISA (2013), ETA constitui método de estudo utilizado para avaliar a toxicidade induzida por substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração.

O presente ensaio será executado utilizando-se aplicação única do produto a ser avaliado, por meio de gavagem, respeitando doses fixas pré-estabelecidas (50, 300, 1000 e 2000 mg/kg), seguindo o mesmo fluxograma apresentado na Figura 1 (OECD, 2001; ANVISA 2013; NEVES; MANCINI; MENEZES 2013). O grupo controle receberá solução salina estéril a 0,9% em volume equivalente ao maior volume de extrato administrado aos grupos experimentais.



Nota. GHS: *Globally Harmonized System*. Fonte: Adaptado de OECD (2001).

Cada grupo de tratamento deverá ser constituído por igual número de indivíduos. De acordo com princípios éticos da utilização de animais em experimentação (RUSSEL; BURCH 1959), deverão ser utilizados o menor número possível de animais, capaz de sustentar análise estatística dos resultados. Neste contexto, o cálculo do número de animais por tratamento e o número de

repetições, deverá ser baseado nas normas de aplicação do modelo “resource equation” citado por Charan e Kantharia (2013), definido pela fórmula:

$$E^* = (\text{Número de animais por grupo} \times \text{Número de grupos}) - \text{Número de grupos}$$

*número total de animais por grupo de dosagem

O intervalo de aplicação do produto aos grupos experimentais será determinado pela intensidade e duração dos possíveis sinais de toxicidade apresentados pelos animais (OECD 2001). Cada grupo de dosagem do estudo principal deverá conter um animal utilizado no estudo piloto, correspondente à dose testada, e os demais animais disponíveis. Todos os procedimentos serão imediatamente precedidos por mensuração da massa corpórea de todos os animais em balança semi-analítica e coleta de sangue por meio de punção da veia caudal (NEVES; MANCINI; MENEZES 2013) para análise bioquímica, além de jejum alimentar prévio de seis horas e jejum alimentar pós-aplicação de três horas, válidos para todos os animais de todos os tratamentos (OECD, 2001).

Após administração, os animais deverão ser observados continuamente nas primeiras 4 horas e de forma periódica até 24 horas pós-aplicação. Em seguida, avaliação será executada duas vezes ao dia durante 13 dias consecutivos (OECD 2001; ANVISA 2013). Os parâmetros a serem observados encontram-se listados no Quadro 2 do presente estudo. Animais que apresentarem sinais de dor aguda ou distresse serão automaticamente submetidos a estratégias de intervenção, de acordo com avaliação clínica executada por profissional veterinário (NIH 2010).

De maneira semelhante ao descrito anteriormente, ao sétimo e décimo quarto dias de experimentação todos os animais serão novamente submetidos à mensuração da massa corpórea e coleta sanguínea (NEVES; MANCINI; MENEZES 2013) para análise bioquímica.

Ao décimo quarto dia será executada eutanásia por meio de aprofundamento anestésico, executando-se aplicação via intra-peritoneal de associação anestésica (Quetamina (20-50 mg/kg); Xilazina (2-10 mg/kg); Acepromazina (0.5-1.5 mg/kg)) seguida de injeção intra-cardíaca de cloreto de potássio (75-150 mg/kg), a qual será realizada após estabilização do animal em plano anestésico cirúrgico, considerando ausência de consciência, perda de reflexo muscular e de reflexo a estímulos nocivos (ANVISA 2013; BRASIL 2018; AVMA 2020).

Tais procedimentos serão seguidos de excisão e coleta de material hepático, renal e gástrico para preparação histológica. Amostras sanguíneas serão coletadas por punção cardíaca e submetidas a avaliação bioquímica. Considerando avaliações executadas em estudos anteriores (ABBAS et al. 2015) e abordagens laboratoriais descritas para animais domésticos (THRALL et al. 2012), os

parâmetros bioquímicos a serem mensurados serão: creatinina, uréia, ALT, AST, ALP, GGT, FA, bilirrubina total, bilirrubina indireta, albumina, colesterol.

Em relação ao exame histopatológico, o mesmo deverá ser realizado avaliando-se tecido renal, hepático e gástrico. Configuram-se como parâmetros de avaliação: presença de degeneração e dilatação tubular de tecido renal, celularidade de túbulos e glomérulos, vacuolização de células tubulares, presença de material hialino nos túbulos, arquitetura hepática e vacuolização citoplasmática, degeneração e organização de hepatócitos, assim como integridade de epitélio estomacal (MAXIE, M G 2007).

Os dados experimentais poderão ser expressos como média do desvio padrão dos valores obtidos nas análises realizadas e submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$) para verificação de variação dentro dos grupos e entre os grupos experimentais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é norteadada pelos princípios de melhoria da atenção à saúde, sustentabilidade e desenvolvimento socioeconômico. Objetiva garantir à população brasileira o acesso ao uso racional desses produtos, priorizando não somente sua efetividade, mas sobretudo a segurança do consumidor. Assim, a elaboração de protocolos operacionais padrão, específicos para avaliação dos efeitos orgânicos, comportamentais, hepatotóxicos e nefrotóxicos, não somente do EHABB 10%, mas como das PMs, PTFs e fitoterápicos, favorecem a validação desses medicamentos por possibilitarem a execução de ensaios experimentais essenciais à garantia de segurança medicamentosa na medicina humana e animal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos laboratórios parceiros e à Fundação Araucária e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de apoio financeiro ao projeto na forma de bolsa.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. et al. Pharmacognostic evaluation of *Musa paradisiaca* L. bract, flower, trachea and tracheal fluid. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. India, v. 4, n. 4, p. 1461-1475, 2015.
- _____. Evaluation of Hepatic activity of various morphological parts of *Musa paradisiaca* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Nigeria, v. 10, n. 10, p. 419 – 429, 2016.
- ANDRADE, L. Fitoterápicos da relação nacional de medicamentos essenciais no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 22, n. 1, 2017.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2ª ed. Brasília: ANVISA, 2013.
- AMARANTE, A F T; AMARANTE, M R V. Advances in the diagnosis of the gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Braz. J. Vet. Res. Anima. Sci.*. Brasil, v. 53, n. 2 p 127-137, 2016.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Schaumburg: AVMA, 2020.
- BABIC, S. Fate of febantel in the aquatic environment—the role of abiotic elimination processes. *Environmental Science and Pollution Research*. India, v. 25, p. 28917–28927, 2018.
- BENAVIDES, J C R et al. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. França, v. 129, p. 209-217, 2017.
- BRASIL. Câmara Interministerial de Agroecologia e Produção Orgânica. Brasil agroecológico: Plano Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (PLANAPO 2016-2019). Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2016. 89 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. *Diário Oficial da União*: seção I, Brasília, DF, p. 52, 14 maio 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 91 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014*. 9 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 205 p.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 7. 508, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, dispõe sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção I, Brasília, DF, p. 1, 28 jun. 2011.

BRASIL. Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Diário Oficial da União: seção I, Brasília, DF, p. 5, 22 fev. 2018.

CHARAN, J; KANTHARIA, N D. How to calculate sample size in animal studies?. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. India, v. 4, n. 4, p. 303-306, 2013.

DOS SANTOS, J M L et al. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*. Inglaterra, v. 199, n. 5, p. 160–164, 2014.

DOS SANTOS, J M L et al. Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus*. *Experimental parasitology*. EUA, v. 205, 2019.

EICHBERG, C et al. The anthelmintic ingredient moxidectin negatively affects seed germination of three temperate grassland species. *Plos one*. EUA, v. 11, n. 11, 1 – 13, 2016.

FORTES F S; MOLENTO, M B. Resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Brasil, v. 33, n. 7, p. 1391-1402, 2013.

GREGORY, L et al. Dried, ground banana plant leaves (*Musa* spp.) for the control of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infections in sheep. *Parasitology Research*. Reino Unido, v. 142, n. 4, p. 111:317–323, 2015.

HOSTE, H; TORRES-ACOSTA, J F J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*. Inglaterra, v. 180, n. 3, p. 144–154, 2011.

KAKIMORI, M T A et al. Anthelmintic and antioxidant potential of banana bracts (*Musa paradisiaca*) extract in ruminants. *Acta Veterinária Brasileira*, v.13, n.1, p. 18-23, 2019.

MAXIE, M G. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2. 5 ed. EUA: Saunders Ltd., 2007. 782 p.

LANUSSE, C; ALVAREZ, L; LIFSCHITZ, A. Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Veterinary Parasitology*. Inglaterra, v. 204, n. 1, p. 18-33, 2014.

LEME, M E, et al. Ação in vitro do extrato do botão floral da bananeira (*Musa* spp.) sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. *Research, Society and Development*. Brazil, v. 9, n. 8, 2020.

MARIE-MAGDELEINE, C et al. Effect of banana foliage (*Musa x paradisiaca*) on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Livestock Science*. Holanda, v.131, n. 6, p. 234–239, 2010.

MARIE-MAGDELEINE, C et al. In vitro effects of *Musa x paradisiaca* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. Reino Unido, v. 96, p. 127-132, 2014.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Guidelines for Pain and Distress in Laboratory Animals: Responsibilities, Recognition and Alleviation. [S.I.] 2010. 6 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. (Fourth Revised Edition, 1995). Washington, D.C.: National Academy Press, 1995, 173p.

NEVES, S M P; MANCINI FILHO, J; MENEZES, E W. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: 2013.

NOGUEIRA, F A et al. Anthelmintic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo tests. Parasitology Research. USA, v. 111, n. 4, p. 317–323, 2012.

OLIVEIRA, L N et al. Eficácia de resíduos da bananicultura sobre a inibição do desenvolvimento larval em *Haemonchus* spp. provenientes de ovinos. Ciência Rural. Brasil, v. 40, n. 2, p. 488-490, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, 2001. 14 p.

RUSSELL, W M S; BURCH, R L. The Sources Incidence and Removal of Inhumanity. In:_. (Eds.). The Principles of Humane Experimental Technique. Londres: Methuen and Co., Ltd., 1959. p. 37-43.

SIQUEIRA, J S et al. Prospecção fitoquímica e avaliação dos potenciais citotóxico e antioxidante do extrato das folhas de *Microgramma vaccinnifolia*. Brazilian Journal of Development. Brasil, v. 6, n. 4, p. 20318-20331, 2020.

THRALL, M A; WEISER, G; ALLISON, R W.; CAMPBELL, T W. Veterinary hematology and clinical chemistry. 2 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. 762p.

VERTEBRATE ANIMAL RESEARCH. Anesthesia (Guideline). Iowa: 2018. Disponível em: <<https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>>. Acesso em 22 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Sustainable Development Goals – Knowledge Platform. [S.I.] 2015. Disponível em: <<https://blog.fastformat.co/como-fazer-citacao-de-artigos-online-e-sites-da-internet/>>. Acesso em 25 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monographs on Selected Medicinal Plants. Geneva: WHO, 2002. 448 p. 4 v.