

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DO
Aspidosperma subincanum (APOCYNACEAE) EM
CAMUNDONGOS**

Thays Nascimento Costa

Orientador: Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

GOIÂNIA

2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Thays Nascimento Costa		
E-mail:	thaysnc@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Não		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DO <i>Aspidosperma subincanum</i> (APOCYNACEAE) EM CAMUNDONGOS		
Palavras-chave:	Aspidosperma subincanum, intoxicação subcrônica, intoxicação aguda.		
Título em outra língua:	ASSESSMENT OF ACUTE TOXICITY AND SUBCHRONIC <i>Aspidosperma subincanum</i> (APOCYNACEAE) OF MICE		
Palavras-chave em outra língua:	Aspidosperma subincanum, acute toxicity and subchronic toxicity.		
Área de concentração:	PCC		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	03/09/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal		
Orientador (a):	Adilson Donizeti Damasceno		
E-mail:	addamasceno@vet.ufg.br		
Co-orientador(a):*	Veridiana M. B. Dignani de Moura		
E-mail:	vdmoura@vet.ufg.br		
Co-orientador:	Fabiano José Ferreira de Sant'Ana		
E-mail:	santanafjf@yahoo.com		


*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 21 / 11 / 2013

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

THAYS NASCIMENTO COSTA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA DO
***Aspidosperma subincanum* (APOCYNACEAE) EM**
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

Comitê de orientação:

Prof^a. Dr^a. Veridiana M. B. Dignani de Moura – EVZ/UFG

Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant’Ana – FAV/UnB

GOIÂNIA

2013

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

Costa, Thays Nascimento.
C837a Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do
Aspidosperma subincanum (Apocynaceae) em camundongos
[manuscrito] / Thays Nascimento Costa. - 2013.
xv, 68 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno; Co-orientadores: Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, Profª. Drª. Veridiana M. B. Dignani de Moura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, quadros e tabelas.

1. *Aspidosperma subincanum* – Intoxicação subcrônica.
2. *Aspidosperma subincanum* – Intoxicação aguda. I. Título.

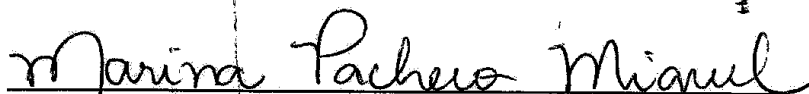
CDU: 615.9

Thays Nascimento Costa

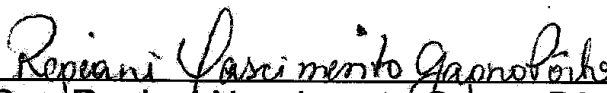
Dissertação defendida e aprovada em **03/09/2013**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel – CAJ/Nataí-GO



Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Pôrto - EVZ/UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus por me acalmar a cada dia e me mostrar que preciso ser paciente e confiar em suas promessas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno, agradeço por todo o apoio, disponibilidade, colaboração e comprometimento com o projeto.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UnB, por se disponibilizar a me orientar na confecção, leitura e fotografias das lâminas histológicas e na correção da dissertação.

Aos professores da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, pelos ensinamentos ao longo do mestrado.

Ao Helton Freires Oliveira, pelo profissionalismo e disponibilidade em auxiliar na realização dos exames laboratoriais.

A Profa. Dra. Renata Mazaro e Costa do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por ter cedido o biotério e o laboratório para a realização do projeto.

Ao colega Adryano Augustto Valladão de Carvalho do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás pela instrução durante o projeto.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold pela colaboração na análise estatística deste experimento.

À minha amiga e companheira das batalhas vividas durante o mestrado, Luciana Silva de Carvalho, agradeço pelo apoio.

Ao meu noivo Jossuel, pela compreensão com minha ausência, o apoio e o carinho que sempre me trata.

Aos meus pais, Cleuza e Zilmar, meu irmão Thiago e minha cunhada Juliana por me apoiarem sempre e fazerem o melhor por mim, minha gratidão.

As amigas e colegas de mestrado Thaís Meneses e Letícia Furtado por me proporcionarem momentos únicos neste tempo fora de casa.

A professora Marina Miguel Pacheco do Laboratório de Patologia Veterinária do Campus Jataí da UFG, pela ajuda nos momentos de dúvidas e pela amizade.

Aos colegas de serviço, Juliano Terra e Sidney Aniceto Rezende Junior pelo grande companheirismo e apoio diário.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida. Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente e que tiveram importância na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Introdução	1
1.2 Descrição da planta <i>Aspidosperma subincanum</i> (Guatambu).....	3
1.3 Toxicidade dos fitoterápicos	6
1.4 Objetivos	13
1.4.1 Geral.....	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
Obtenção do extrato bruto etanólico de <i>Aspidosperma subincanum</i>	14
Local de realização do experimento	14
Exposição dos animais.....	14
Teste de atividade farmacológica	15
Toxicidade aguda	16
Toxicidade subcrônica.....	17
Observação dos sinais de toxicidade (<i>screening hipocrático</i>).....	18
Avaliação ponderal	18
Colheita das amostras.....	19
Análises laboratoriais	19
Necropsia e histopatológico	20
Análise estatística.....	21
RESULTADOS	21
<i>Screening hipocrático</i>	21
Exames laboratoriais (hemograma e provas bioquímicas séricas.....	25

Exame necroscópico e histopatológico	31
Peso dos animais e órgãos	32
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – A: *Aspidosperma subincanum* (planta adulta). B: Detalhe do fruto seco e capsular..... 4
- FIGURA 2 - Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg..... 17
- FIGURA 3 – Fotomicrografia de lesões hepáticas e renais em camundongos submetidos à intoxicação com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, HE. (A) Rim; dose 2000 mg/kg; hiperemia multifocal discreta (setas); obj. 10X; (B) Fígado; dose 300 mg/kg; hiperemia multifocal moderada (setas); obj. 10X; (C) Rim; dose 150 mg/kg; hemorragia focalmente extensa discreta (setas); obj. 10X; (D) Fígado; dose 300 mg/kg; degeneração microvacuolar focal discreta (setas); obj. 40X; 32

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1 - Relação de medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil. 2
- QUADRO 2 - Sinais observados no teste farmacológico para os camundongos que receberam dose de 200 mg/kg do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*. Goiânia, 2012. 21
- QUADRO 3 - Sinais observados no teste farmacológico para os camundongos que receberam dose de 400 mg/kg do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*. Goiânia, 2012. 22
- QUADRO 4 - Sinais observados no teste farmacológico para os camundongos que receberam dose de 750 mg/kg do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*. Goiânia, 2012. 22
- Quadro 5 - Sinais clínicos apresentados por camundongos fêmeas que receberam 300 mg/kg e 2000 mg/kg (intoxicação aguda) do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* e nos animais controle em dose única. Goiânia, 2012. 24
- Quadro 6 - Sinais clínicos apresentados por camundongos machos e fêmeas que receberam 300 mg/kg, 150 mg/kg e 75 mg/kg (intoxicação subcrônica) do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* e nos animais controle durante 28 dias. Goiânia, 2012..... 25

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Eritrograma e plaquetograma de camundongos Swiss adultos fêmeas (n=3) tratadas com 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação aguda), administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle). Goiânia, 2012..... 26
- TABELA 2 - Eritrograma e plaquetograma de camundongos Swiss adultos machos (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica), administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012..... 27
- TABELA 3 - Eritrograma e plaquetograma de camundongos Swiss adultos fêmeas (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos. Goiânia, 2012..... 27
- TABELA 4 - Valores médios do leucograma (\pm desvio padrão) em camundongos fêmeas tratadas com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação aguda) na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle). Goiânia, 2012..... 28
- TABELA 5 - Valores médios do leucograma (\pm erro padrão) em camundongos Swiss adultos fêmeas (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012..... 28

- TABELA 6 - Valores médios do leucograma (\pm erro padrão) em camundongos Swiss adultos machos (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos. Goiânia, 2012..... 29
- TABELA 7 - Valores médios da dosagem sérica (\pm desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB em camundongos Swiss adultos fêmeas tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg/dia (intoxicação aguda) e no grupo controle tratado com solução de cloreto de sódio 0,9%. Goiânia, 2012..... 29
- TABELA 8 - Valores médios da dosagem sérica (\pm desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB em camundongos Swiss adultos machos (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012..... 30
- TABELA 9 - Valores médios da dosagem sérica (\pm desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB em camundongos Swiss adultos fêmeas (n=5) de doses 75, 150 e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica), administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012. ... 30
- TABELA 10 - Médias (\pm desvio padrão) dos pesos corporais de camundongos machos Swiss (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012. 33

- TABELA 11 - Médias (\pm desvio padrão) dos pesos corporais de camundongos fêmeas *Swiss* (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012. 34
- TABELA 12 - Média (\pm desvios padrão) dos pesos corporais (gramas) de camundongos *Swiss* fêmeas (n=3) tratados via oral com 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7) e quatorze (D14) dias após exposição. Goiânia, 2012..... 34
- TABELA 13 - Médias (\pm desvio padrão) dos pesos dos órgãos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012. 35
- TABELA 14 - Médias (\pm desvio padrão) do índice de peso dos órgãos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012..... 36

RESUMO

Para se determinar a segurança do consumo de fitoterápicos é imperativo uma avaliação do potencial tóxico por meio de exames clínicos, laboratoriais e histopatológicos de animais após exposição ao extrato de partes da planta em diferentes intervalos de tempo. Pelo fato de infusos da casca de espécies do gênero *Aspidosperma* serem empregados, sem comprovação de seu potencial tóxico, no tratamento do diabetes *mellitus*, da hipercolesterolemia e de distúrbios gástricos, propõe-se um ensaio experimental com o objetivo de avaliar se o extrato etanólico de *Aspidosperma subincanum* (EEAs) induz toxicidade aguda e subcrônica no coração, fígado e rins de camundongos (*Mus musculus*). Os animais (machos e fêmeas) receberam por via oral a dose de 75, 150 e 300 mg/kg do extrato para a avaliação de intoxicação subcrônica por 28 dias de exposição diária ao extrato. Na avaliação da toxicidade aguda foram utilizados camundongos fêmeas que receberam a dose única de 300 e 2000 mg/kg do extrato e observados por 14 dias. Testes farmacológicos foram conduzidos para verificar a possível ação desse extrato no sistema nervoso central, sendo utilizados camundongos machos e as doses de 200, 400 e 750mg/kg por via oral, subcutânea e intraperitoneal. Os animais apresentaram alguns sinais de neurotoxicidade e os sinais tiveram intensidade proporcional à concentração do extrato, sendo letais na dose de 2000 mg/kg via oral. Dentre os exames laboratoriais realizados, o eritrograma, plaquetograma e leucograma, não apresentaram nenhuma alteração significativa. Nas provas bioquímicas não foram observadas alterações dignas de nota, à exceção de ALT e AST que apresentaram elevação significativa nos grupos expostos em relação ao grupo controle. Em relação ao exame histopatológico, observaram-se alterações compatíveis com injúrias estruturais hepáticas (microvacuolização e hiperemia) e renais (hiperemia e hemorragia). Conclui-se que o EEAs pode ser considerado tóxico quando administrado por via oral, tanto agudo como subcronicamente, em camundongos e a dose letal mediana (DL50) estimada encontra-se abaixo de 2000 mg/kg.

Palavras-chave: *Aspidosperma subincanum*, intoxicação subcrônica, intoxicação aguda.

ABSTRACT

In order to define the safety of phytotherapeutic use of plants is important an evaluation of the toxic potential by clinical, laboratory and histopathological studies in animals after exposure to extract of parts of the plant in different intervals of time. Due to bark infusion from species of *Aspidosperma* is employed without proof of its toxic potential in treatment of the diabetes mellitus, hypercholesterolemia and gastric disorders, this study proposes an experimental test with ethanolic extract of *Aspidosperma subincanum* to verify if induces acute and subchronic toxicity in heart, liver and kidneys of mices (*Mus musculus*). The animals (male and female) received orally a 75 mg/kg, 150 mg/kg and 300 mg/kg of the extract for subchronic intoxication evaluation by daily exposure along of 28 days. In the acute toxicity evaluation were used female mices that received an only dose of 300mg/kg and 2000 mg/kg of the extract and observed during to 14 days. Pharmacological tests were conducted to check the possible action of the extract in central nervous system in male mices submitted to 200 mg/kg, 400 mg/kg and 750 mg/kg by oral, subcutaneous and intraperitoneal ways. The animals showed some signs of neurotoxicity whose intensity was proportional to extract concentration and died with oral dose of 2000 mg/kg. Hematological parameters did not showed any significant abnormalities. Biochemical tests did not presented any changes, except ALT and AST measures which presented significant increases in exposed groups in relation to control group. Concerning histopathological exam it was possible to detect lesions that suggest the existence of injuries in liver (microvacuolization and hyperemia) and kidney (hyperemia and hemorrhage). Thus, it can be concluded that ethanolic extract of *Aspidosperma subincanum* is toxic orally, both acute and subchronically, in mices and the estimated median lethal dosis (LD₅₀) was below 2000 mg/kg.

Keywords: *Aspidosperma subincanum*, acute toxicity and subchronic toxicity.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido significativo nos últimos anos. Estima-se que 80% da população de países em desenvolvimento, não tem acesso a qualquer atendimento primário à saúde, seja pela distância dos centros de saúde ou por falta de recursos financeiros e, desta forma, o emprego empírico de plantas medicinais vem ganhando espaço como fonte de tratamento aos diferentes tipos de doenças em humanos (MARTINS, 1995).

Rizzo et al. (1997) afirma que o emprego de plantas medicinais também é bastante comum no estado de Goiás. O cerrado possui mais de 6.000 plantas de valor medicinal que vem sendo amplamente exploradas para a produção de analgésicos, tranquilizantes, diuréticos, laxativos, antibióticos, entre outros (SOUZA et al., 2005).

Dentre as plantas do cerrado com atividades farmacológicas comprovadas encontram-se plantas do gênero *Arnica*, *Pterodon* (sucupira), *Baccharis* (carqueja) e *Aspidosperma*, utilizadas popularmente como antiinflamatório, antibiótico, anticancerígeno, hipocolesterolemiantes e hipoglicemiantes (GOMES & CAVALCANTI, 2001).

As espécies definidas como fitoterápicos, estão relacionados na Instrução Normativa nº 05/2008 (BRASIL, 2008) (Quadro 1).

QUADRO 1 - Relação de medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil.

Nomenclatura Botânica	Nome Popular	Parte Usada	Derivado
<i>Aesculus hippocastanum L.</i>	Castanha da Índia	Sementes	Extratos/tintura
<i>Allium sativum L.</i>	Alho	Bulbo	Extratos/tintura/óleo
<i>Aloe vera (L.) Burm f.</i>	Babosa ou áloe	Gel mucilaginoso das folhas	Extrato obtido do gel
<i>Arctostaphylos uva-ursi Spreng.</i>	Uva-ursi	Folha	Extratos/tintura
<i>Arnica montana L.</i>	Arnica	Capítulo floral	Extratos/tintura
<i>Calendula officinalis L.</i>	Calêndula	Flores	Derivado de droga vegetal Extratos/tintura
<i>Centella asiatica (L.) Urban,</i>	Centela, Centela-asiática	Partes aéreas	Extratos
<i>Cimicifuga racemosa (L.) Nutt.</i>	Cimicífuga	Raiz ou rizoma	Extratos
<i>Cynara scolymus L.</i>	Alcachofra	Folhas	Extratos/tintura
<i>Echinacea purpurea Moench</i>	Equinácea	Partes aéreas floridas	Extratos
<i>Eucalyptus globulus Labill.</i>	Eucalipto	Folhas	Óleo essencial/extratos/tintura
<i>Ginkgo biloba L.</i>	Ginkgo	Folhas	Extratos
<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Alcaçuz	Raízes	Extratos/tintura
<i>Hamamelis virginiana L.</i>	Hamamélis	Folhas	Extrato/tintura
<i>Hypericum perforatum L.</i>	Hipérico	Partes aéreas	Extratos/tintura
<i>Matricaria recutita L.</i>	Camomila	Capítulos florais	Extratos/tintura
<i>Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss.</i>	Espinheira-Santa	Folhas	Extratos/tintura
<i>Melissa officinalis L.</i>	Melissa, Erva-cidreira	Folhas	Extratos/tintura
<i>Mentha piperita L.</i>	Hortelã-pimenta	Folhas	Óleo essencial
<i>Mikania glomerata Sprengl.</i>	Guaco	Folhas	Extrato/tintura
<i>Panax ginseng C. A. Mey.</i>	Ginseng	Raiz	Extratos, tintura
<i>Passiflora incarnata L.</i>	Maracujá, Passiflora	Partes aéreas	Extratos/tintura
<i>Paullinia cupana H.B.&K.</i>	Guaraná	Sementes	Extratos/tintura
<i>Peumus boldus Molina</i>	Boldo, Boldo-do-Chile	Folhas	Extratos/tintura
<i>Pimpinella anisum L.</i>	Erva-doce, Anis	Frutos	Extratos/tintura
<i>Piper methysticum G. Forst.</i>	Kava-kava	Rizoma	Extratos/tintura
<i>Polygala senega L.</i>	Polígala	Raízes	Extratos/tintura
<i>Rhamnus purshiana DC.</i>	Cáscara Sagrada	Casca	Extratos/tintura
<i>Salix alba L.</i>	Salgueiro branco	Casca	Extratos
<i>Sambucus nigra L.</i>	Sabugueiro	Flores	Extratos/tintura
<i>Senna alexandrina Mill., Cassia angustifolia Vahl ou Cássia senna L.</i>	Sene	Folhas e frutos	Extratos/tintura

QUADRO 1 - Relação de medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil
(Continuação).

Nomenclatura Botânica	Nome Popular	Parte Usada	Derivado
<i>Serenoa repens</i> (Bartram) J.K. Small	Saw palmetto	Frutos	Extrato
<i>Symphytum officinale</i> L.	Confrei	Raízes	Extrato
<i>Tanacetum parthenium</i> Sch. Bip.	Tanaceto	Folhas	Extratos/tintura
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valeriana	Raízes	Extratos/tintura
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Gengibre	Rizomas	Extratos

Fonte: Instrução Normativa nº 05/2008

1.2 Descrição da planta *Aspidosperma subincanum* (Guatambu)

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocynaceae (Dicotyledonae), descrita por Antoine Laurent de Jussieu, como pertencente à ordem Gentianales, subclasse Asteridae. A família das Apocynaceae inclui 165 gêneros, com aproximadamente 1.900 espécies tropicais e subtropicais (JOLLY, 1998; GOMES & CAVALCANTI, 2001). Na flora brasileira são catalogadas como apocináceas mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (CAMPBELL & HAMMOND, 1989).

As espécies do gênero *Aspidosperma* são encontradas apenas nas Américas, principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (PEREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). No Brasil, foram catalogadas aproximadamente 52 espécies desse gênero, distribuídas praticamente em todos os biomas, cujas espécies apresentam importância econômica e científica, como fornecedoras de madeira nobre e detentoras de alcalóides, sendo assim objetos de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (GOMES & CAVALCANTI, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

As diferentes espécies de *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambu, carapanaúba, pau-pereiro, amargoso e quina (OLIVEIRA et al., 2009). A espécie *Aspidosperma subincanum* é uma árvore de aproximadamente 15 a 20 metros, com tronco de 40 a 50 cm de

diâmetro (Figura 1). As flores desta planta podem ser encontradas entre os meses de setembro e novembro (DE LA CRUZ, 1997).

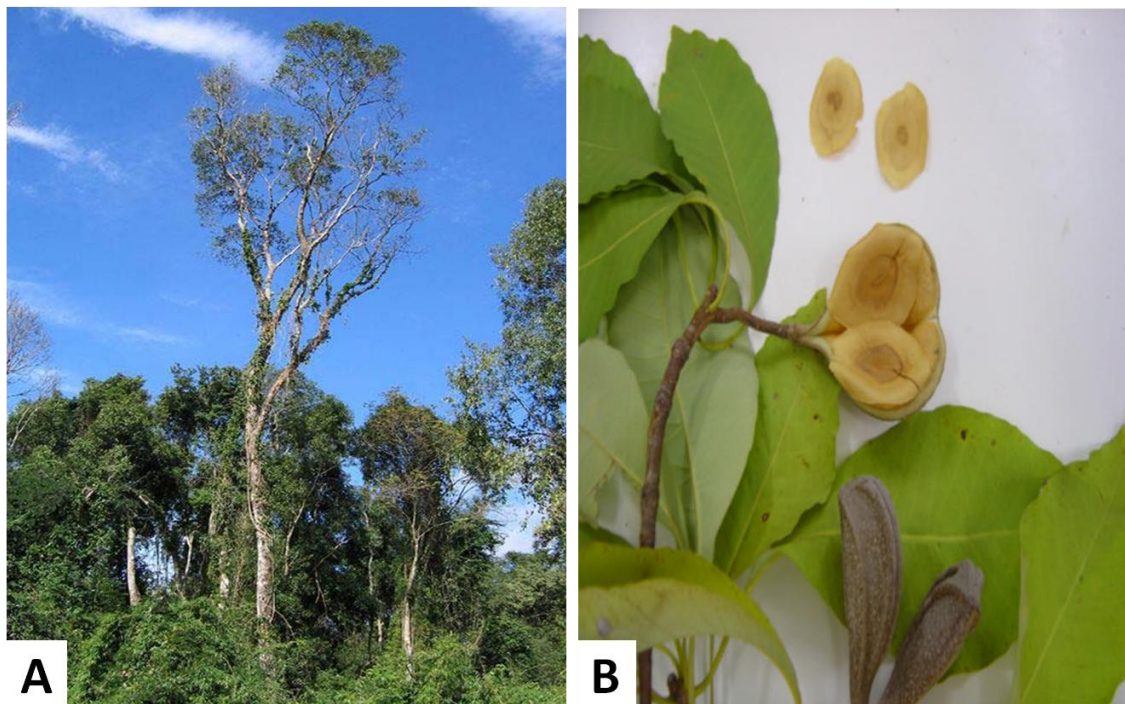


FIGURA 1 – A: *Aspidosperma subincanum* (planta adulta). B: Detalhe do fruto seco e capsular.

Fontes: www.viveiroipe.com.br e SANTOS, 2005.

Além da qualidade de suas madeiras (RIBEIRO et al., 1999), as cascas de espécies do gênero *Aspidosperma* são usadas comumente na forma de infusões pela medicina popular da Região Amazônica. Plantas do gênero possuem diversas finalidades medicinais, que vão desde a ação antiprotozoária até atividade antitumoral (BARBOSA et al., 2003). A baixa toxicidade e ausência de contraindicações atribuídas às infusões têm contribuído enormemente para difusão do uso das cascas de *Aspidosperma*, como agente medicinal (FERREIRA et al., 2004).

Em um levantamento realizado no município de Goiânia e cidades circunvizinhas, TRESVENZOL et al. (1997) verificaram que 60% dos raizeiros

entrevistados citaram o guatambu como sendo útil para o tratamento do *diabetes mellitus* e da hipercolesterolemia.

Devido à grande quantidade de alcalóides indólicos encontrados nas espécies de *Aspidosperma*, essas plantas se tornaram alvo de pesquisas para fins de investigar mais apuradamente uma correlação entre a ocorrência desse tipo de alcalóides com as atividades terapêuticas que lhe são atribuídas (PEREIRA et al., 2007).

Sabe-se que os alcalóides indólicos atuam em sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (RIVAS et al., 1999), sendo por isso, empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (GARRETT & GRISHAM, 1995). Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia, bem como pelas propriedades sedativas do maracujá (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980).

É atribuído aos alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma*, uma larga aplicação terapêutica (BOURDY et al., 2004). Dentre as várias atividades biológicas dos alcalóides indólicos, pode-se destacar a ergometrina obtida de *Secale cornutum* (espório de centeio) que apresenta propriedade de contração intensa dos músculos uterinos e é contra indicada para pacientes com disfunção cardíaca, hepática e renal, hipertensão e problemas vasculares, mas é muito útil na prevenção e tratamento de hemorragia pós-parto e pós-aborto devido à atonia uterina após a expulsão da placenta (SCHRIPSEMA et al., 2004).

De *Rauvolfia serpentina* pode ser obtido o alcalóide reserpina, que em associação com um diurético é efetivo na prevenção da retenção sódica e edema. Entre seus principais efeitos adversos podem ser citados hipotensão, depressão do sistema nervoso central, sonolência e hipotermia. Como a depressão do sistema nervoso central é um efeito adverso relacionado com a

dose, a menor dose possível deve ser administrada, não podendo ser utilizado por pacientes com histórico de episódios depressivos ou úlcera péptica (SCHRIPEMA et al., 2004).

Os alcalóides uleína, também encontrado no *Aspidosperma subincanum* e o 3,14-desidrouleína foram isolados do extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium* (JÁCOME et al., 1996; JÁCOME et al., 2004). A uleína foi testada contra *Trypanosoma cruzi* em doses de 1,4 mg/mL, 0,7 mg/mL e 0,3 mg/mL, apresentando 100% de atividade, causando porém hemólise parcial (JÁCOME et al., 1996). Na medicina popular, os *Aspidospermas* também são utilizados para tratamentos de febres e bronquites, afecções dos rins, fígado e estômago e ainda para tratamento de malária (HIDALGO, 2003).

PORTO et al. (2004) realizaram uma investigação fitoquímica de frações clorofórmicas resultantes dos extratos etanólicos do caule e raízes de *Aspidosperma subincanum* Mart, isolando três alcalóides indólicos pirocarbazóis. Destes, um foi identificado como a olivacina (1,5 dimetil-6H-piridol[4,3-b]carbazol), uma substância com atividade antitumoral, de ocorrência comum no gênero, previamente descrita nesta espécie. Outro alcalóide teve sua estrutura determinada como a guatambuína (Nb-metiltetraidroolivacina), presente no gênero *Aspidosperma*. Para o terceiro alcaloide, foi proposto por PORTO et al. (2004), a estrutura do 2,11-dimetil-10H-pirido[2,3-b]-carbazol, o qual não foi encontrado na literatura. MARQUES (1988) isolou e identificou a partir das cascas, dez alcalóides indólicos, dentre os quais, N-metiltetrahydro-elipticina, uleína, 3-epidasycarpidona, 3-epi-uleína e subincamina. Por meio de estudos fitoquímicos, foram isolados também das cascas desta planta, ácido oléico e os alcalóides indólicos subincanadineos A-C, subincanideos D-E e subincanideo F (KOBAYASHI et al., 2002; PORTO et al., 2004).

1.3 Toxicidade dos fitoterápicos

Principalmente, nos países em desenvolvimento, os apelos da mídia para o consumo de produtos naturais aumentam a cada dia. Os ervanários,

farmácias e lojas de produtos naturais prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população (VEIGA JUNIOR et al., 2005). O hábito da utilização de fitoterápicos sob várias formas de preparação (chá, abafado, garrafada, dentre outros), parte do pressuposto de que as plantas utilizadas, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos (CARLINI et al. 1988).

Nos Estados Unidos e na Europa há controle no registro e na comercialização dos produtos obtidos de plantas. Nesses países, as normas para certificação e o controle de qualidade de preparações vegetais são rígidos. Contudo, vale ressaltar que a comercialização se dá por preparações produzidas, em geral, a partir de plantas cultivadas, diferentemente daquelas preparações em que se utiliza quase sempre plantas da flora nativa, em que a coleta quase sempre é feita por pessoas pouco preparadas no reconhecimento das espécies, incorrendo-se em risco de troca do espécime (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

A toxicidade das plantas medicinais pode parecer não existir quando comparada com aquela apresentada pelos medicamentos convencionais. Entretanto, nem sempre isso é verdade e, assim, o uso indiscriminado das plantas ditas medicinais, passou a ser um problema de saúde pública (SIMÕES et al., 2003). As substâncias produzidas pelas plantas são idênticas àquelas sintetizadas em laboratório para a síntese de fármacos comerciais. Podem ser consideradas menos tóxicas devido às baixas concentrações encontradas nos vegetais ou pela interação direta ou indireta com outras substâncias existentes na planta que neutralizam em parte sua ação. Assim, esse conceito conferido, principalmente, aos chás e infusões deve ser revisto, pois, caso haja ingestão em excesso, os efeitos indesejados serão idênticos ou piores que aqueles descritos para os medicamentos sintéticos (SOARES, 2002).

A avaliação da toxicidade visa caracterizar os efeitos adversos inerentes a determinado agente químico (CORRÊA et al., 2003), quer seja um medicamento, um praguicida ou um agente químico industrial (KOETER, 1993; STOKES, 2002; MEYER, 2003). Os estudos toxicológicos, aplicados em animais

de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais expostos às mesmas (BARROS & DAVINO, 2003).

Sendo assim, os testes toxicológicos normalmente requeridos com propósito regulatório incluem: toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (SPIELMANN, 2002; BARROS & DAVINO, 2003).

É interessante notar que a maioria dos compostos de uso clínico isolados das Apocynaceas são alcalóides indólicos monoterpênicos (SCHRIPSEMA et al., 2004). Esta classe de alcalóide é conhecida pela presença de derivados do triptofano, apresentando um núcleo indólico responsável pela potente habilidade de promover relevantes mudanças fisiológicas, apresentando grau variado de toxicidade (CORDELL, 1981).

A maioria dos alcalóides indólicos atuam como agonistas parciais nos receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos. As diversas atividades dos vários compostos devem-se, aparentemente, às diferenças de atividade e interação frente aos vários receptores celulares. Já que cada classe de receptor possui diversos sub-tipos, com sensibilidade distinta aos vários compostos, existe uma gama de atividades dos alcaloides indólicos em diferentes órgãos (ROBERTS e WINK, 1998).

A maioria das espécies do gênero *Aspidosperma* são objetos de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). As subincanandinas E e F, isoladas de *Aspidosperma subincanum*, apresentaram atividade terapêutica, como a citotoxicidade *in vitro* em células de linfoma murino L1210 (CI₅₀= 0,03 e 2,4 µg/mL, respectivamente) e em carcinoma epidermóide humano KB (CI₅₀= 4,4 e 4,8 µg/mL, respectivamente) (KOBAYASHI et al., 2002). DOLABELA (2007) realizou ensaios de citotoxicidade para células NiH2T3 (linhagem de fibroblastos humanos) e determinou seus índices de seletividade. Os alcalóides 10-metoxi-aspidospermidina e N-formil-aspidospermidina mostraram citotoxicidade

moderada, enquanto que a aspidospermidina, palosina e aspidolidina apresentaram alta citotoxicidade. Todos os alcalóides apresentaram baixo índice de seletividade (<100) (MITAINE-OFFER et al., 2002).

Os efeitos tóxicos observados no homem encontram-se geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Soma-se ainda o fato de que a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (BARROS & DAVINO, 2003; KLAASSEN, 2006).

A extrapolação de doses dos animais para humanos é baseada em múltiplas suposições sobre o comportamento do composto entre as espécies. Uma aproximação comumente utilizada é baseada na dose do composto que possui ausência de efeitos tóxicos na mais sensível das espécies testadas em estudos toxicológicos pré-clínicos de quatro semanas, usando a NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*). (REIGNER & BLESCH, 2002).

Em teste de toxicidade aguda em camundongos albinos machos (*Mus musculus*) realizados por GOLONI et al. (2005), a *Aspidosperma subincanum* em dose única e dose letal aproximada, não gerou resposta significativa de letalidade para nenhum dos métodos aplicados. Nas doses entre 500 mg/kg a 5000 mg/kg, o que caracterizou a espécie praticamente como atóxica.

De acordo com estudos realizados por SANTOS et al. (2009), a administração oral de doses até 300 mg/kg de extrato etanólico, não produz qualquer sinal de toxicidade ou alteração no comportamento geral de camundongos. No entanto, doses de 500-2500 mg/kg resultaram em sinais e sintomas típicos de estimulantes do sistema nervoso central, como piloereção, tremores, convulsões, cianose e morte. Por via intraperitoneal, a administração do extrato produziu piloereção e tremores começando com 300 mg/kg/dose. Em doses de 350 mg/kg a 475 mg/kg, foram observados piloereção, tremores, convulsões, cianose e mortalidade em 100% dos ratos com a dose mais elevada. A administração oral subcrônica (5 mg/kg e 100 mg/kg) não gerou nenhum sinal tóxico.

Apesar da crescente importância dos fitoterápicos e sua baixa incidência de efeitos colaterais, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, além disso muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no conhecimento popular (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Dessa maneira, torna-se necessária a realização de ensaios toxicológicos para obter dados científicos referentes à segurança ou toxicidade das plantas (ASSEMI, 2001).

1.3.1 Teste de atividade farmacológica

O teste de atividade farmacológica (*screening* hipocrático) é um ensaio bastante útil e comumente empregado na triagem preliminar de plantas. Este teste detecta atividades farmacológicas e toxicológicas por meio da avaliação do comportamento de animais ante a administração de preparações à base de plantas com possível atividade no sistema nervoso central. Assim permite a seleção de espécies que apresentam resultados mais significativo (ALMEIDA et al, 1999; LUCIO et al., 2000).

Observações comportamentais fornecem uma estimativa geral da toxicidade da substância no estado consciente e na disposição geral, na atividade e coordenação do sistema motor, nos reflexos e nas atividades do sistema nervoso central (MALONE & ROBICHAUD, 1983). De acordo com protocolo padrão para observação dos parâmetros de comportamento, é possível definir dosagens intermediárias as usadas no teste de atividade farmacológica para avaliação de toxicidade subcrônica .

1.3.2 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade oral aguda é descrito pelo Guideline 423 (OECD 423; 2001) e tem como objetivo produzir efeitos adverso em um breve período após a administração oral de uma única dose de uma substância ou após múltiplas doses fornecidas durante 24 horas. Desta forma, pode fornecer

subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração (BRITO, 1994; DIPASQUALE & HAYES, 2001). Este protocolo experimental recomenda que se inicie o tratamento de três animais com a dose de 300 mg/kg quando se desconhece os efeitos da droga. Caso se observe um ou nenhum caso de morte, deve-se repetir a dose e com a confirmação do resultado anterior, o composto deve ser testado na dose de 2000 mg/kg para então, de acordo com o resultado obtido nos testes ser classificado na sua respectiva categoria segundo o *Globally Harmonized Classification System* (GHS). Porém, se ocorrer a morte de dois ou três animais após a administração da dose de 300 mg/kg deve-se diminuir a dose do composto administrado para 50 mg/kg e se nessa dose também ocorrer morte de dois ou três animais deve-se adotar a dose de 5 mg/kg para a realização do teste de toxicidade aguda. Os animais devem ser privados da alimentação por duas horas antes do início do experimento e por mais duas horas após a administração, por via oral (gavagem), das substâncias teste. A água deve ser oferecida *ad libitum* até o término do experimento.

1.3.3 Toxicidade subcrônica

O teste de toxicidade oral subcrônico realizado segundo o protocolo experimental OECD 407 (1995), permite observar se por um longo período de tempo se o produto testado causa efeitos tóxicos (VALADARES, 2006). Esse ensaio fornece informações acerca dos riscos potenciais sobre a saúde, resultantes da exposição contínua, além de informações satisfatórias sobre os níveis de exposição com segurança para o homem (BRITO, 1996).

A duração de exposição (28 dias) foi definida em função do que se pretende em termos de uso clínico do medicamento, de acordo com as diretrizes para estudo da toxicidade oral de doses repetidas de substâncias químicas da OECD 407 (1995). O modo de administração do extrato bruto, assim como a observação dos sinais de toxicidade, segue a mesma metodologia aplicada na avaliação da toxicidade aguda em dose única.

1.3.4 Observação dos sinais de toxicidade (*screening hipocrático*)

Para os três testes de toxicidade faz-se a avaliação dos sinais, onde a observação das alterações comportamentais nos animais é seguida pelo *screening hipocrático*, que considera os seguintes critérios comportamentais a serem observados: atividade geral, motilidade, frequência cardíaca, piloereção, exoftalmia, lamber patas, hipnose, coçar focinho, morder cauda, convulsão clônica/tônica, tremores finos/grosseiros, sialorreia, ereção da cauda (straub), tremor da cauda, sedação, catatonia, analgesia, anestesia, perda do reflexo corneano, diâmetro pupilar, lacrimação, ataxia. Na orelha será observado a palidez, cianose e hiperemia. Em relação à micção, observar-se-á o aumento ou diminuição do volume e a coloração da urina. Outros possíveis efeitos que poderão ser observados serão o aumento da defecação, diarreia, contorção, reação de fuga, agressividade e guinchar/chiar (frênito vocal), aperto da cauda, força para agarrar, hipotermia e morte.

1.4 Objetivos

1.4.1 Geral

- Avaliar em condições experimentais se o extrato bruto etanólico de *Aspidosperma subincanum* (guatambú) induz toxicidade aguda e subcrônica em camundongos (*Mus musculus*).

1.4.2 Específicos

- Verificar os sinais de toxicidade, por meio do teste de atividade farmacológica utilizando administração do extrato por diferentes vias e ao mesmo tempo estabelecer as dosagens para o teste de intoxicação subcrônica.
- Descrever os sinais clínicos sugestivos de intoxicação pelo guatambu em camundongos;
- Avaliar por meio de exames bioquímicos e hematológicos, a presença de lesões em fígado, coração e rins, produzidas pela toxicidade aguda e subcrônica, após administração oral de *Aspidosperma subincanum*;
- Identificar lesões macro e microscópicas no coração, fígado e rins de camundongos, compatíveis com a intoxicação pelo guatambu.
- Verificar variação no peso corporal em diversos momentos ao longo do experimento e peso dos órgãos ao final dos testes.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto etanólico de *Aspidosperma subincanum*

Foram realizadas coletas de *Aspidosperma subincanum* Mart na região de Nova América, Goiás, em agosto de 2009 pelo laboratório de gnosia da Faculdade de Farmácia da UFG. Do material coletado foram retiradas amostras da casca do caule, sendo oferecido o extrato bruto etanólico para a realização de todos os testes.

Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas II (ICB II) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, no período de janeiro de 2012 a julho de 2012. Previamente a execução das atividades, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFG (nº 84/12) e desenvolvido seguindo as normas de bem-estar e biossegurança na experimentação animal propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Exposição dos animais

Os animais, um total de 70 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* (variedade albino), machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), saudáveis, adultos e com peso corporal médio de 30 ± 10 g, com aproximadamente três meses de idade provenientes de colônias mantidas pela IQUEGO (Indústria Química do Estado de Goiás), passaram por um período de aclimatação no biotério-teste do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas II (Laboratório de fisiologia e farmacologia da reprodução) durante sete dias antes do início do experimento para a averiguação

do comportamento e das condições sanitárias. Foram mantidos em caixas de polipropileno com tampa em aço inox, com ração comercial balanceada para roedores e água, fornecidas à vontade, a iluminação da sala foi mantida em um ciclo claro/escuro de 12 horas, a fase clara iniciada às 7 horas. Durante todo o experimento, os animais permaneceram em sala com umidade e temperatura controladas (umidade relativa de 65 a 70% e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Os animais receberam extrato por gavagem orogástrica (intoxicação aguda e subcrônica), administração intraperitoneal e subcutânea (teste de atividade farmacológica). O extrato foi administrado na forma de solução aquosa e como veículo, solução fisiológica. O volume não excedeu a 1 mL/100g de peso. Em todos os testes foi incluído um grupo controle, tratado apenas com o veículo.

Teste de atividade farmacológica

Um total de 12 animais foram divididos em três grupos constituídos de quatro animais em cada, separados pela via de administração: via oral, via subcutânea e via intraperitoneal. As doses do extrato do guatambu foram de 200 mg/kg, 400mg/kg e 750 mg/kg para cada animal, na via correspondente ao seu grupo. Ao animais controle foi administrado água destilada. Os animais foram observados quanto a alterações comportamentais nos cinco minutos, dez minutos, 20 minutos, 30 minutos, 60 minutos, quatro horas, oito horas, 24 horas, 48 horas, quatro dias e sete dias a partir da hora de administração do extrato, de acordo com o *screening hipocrático* para observação destes parâmetros.

No sétimo dia, todos os animais foram anestesiados conforme protocolo sugerido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que preconiza para procedimentos de curta duração, a utilização de 60 a 80mg de cetamina (10%) associada na mesma seringa com 8 a 15mg de xilazina (2%) por via intraperitoneal e, após certificação da anestesia, submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

Toxicidade aguda

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2001) com dose inicial de 300 mg/kg, conforme apresentado na Figura 2 e seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os grupos experimentais de camundongos foram de adultos jovens (fêmeas nulíparas e não grávidas), com 8 a 10 semanas de idade (o peso de cada camundongo não excedeu a 20% da média do grupo). Os animais num total de 18 (seis para cada etapa), foram divididos em dois grupos, de três animais em cada (a saber: grupo controle recebeu somente o veículo (1 mL/100g de peso de solução de cloreto de sódio 0,9%) grupo teste gavagem do extrato etanólico da casca do *Aspidosperma subincanum*). Para acompanhamento da evolução da intoxicação, os animais foram marcados, a partir da base da cauda, com número de traços feitos com uma caneta marcadora permanente correspondente aos números ordinais de 1 a 3. O período total de observação após administração da dose única foram de 14 dias.

Os animais foram privados da alimentação por duas horas antes do início do experimento e por mais duas horas após a administração, por via oral, da substância teste. A água foi oferecida *ad libitum* até o término do experimento.

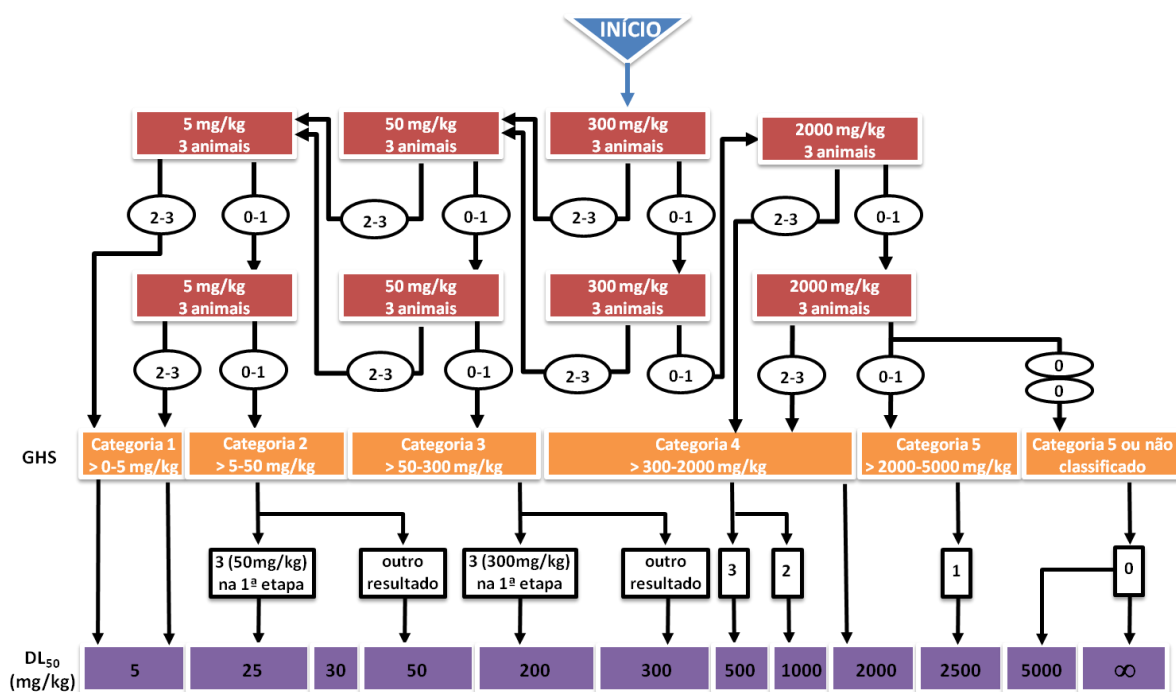


FIGURA 2 - Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg, empregando-se três animais de um único sexo por etapa (normalmente fêmeas).

Fonte: OECD (2001).

- 0,1,2,3: número de moribundos ou animais mortos em cada etapa.
- GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado (mg/kg de peso corporal).
- ∞: não classificado.

Toxicidade subcrônica

O teste de toxicidade oral subcrônico foi realizado segundo o protocolo experimental OECD 407 (1995).

Neste estudo, foram utilizados 40 animais separados em 4 grupos, com dez animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas nulíparas e não grávidas, entre 6 e 8 semanas de idade, onde cada grupo recebeu doses de concentrações diferentes (300 mg/kg, 150 mg/kg, 75 mg/kg e somente veículo), determinadas a partir dos resultados do teste de atividade farmacológica, uma vez ao dia do produto fitoterápico, sempre à mesma hora do ciclo claro/escuro,

por um período de 28 dias, pelo método de gavagem orogástrica. A evolução do quadro de intoxicação foi acompanhada individualmente, sendo que para isso, os animais foram marcados, a partir da base da cauda, com o número de traços, correspondente aos números ordinais (variando de 1 a 5) feitos com caneta marcadora permanente de cor azul para GT₇₅ (grupo teste 75 mg/kg), verde para GT₁₅₀ (grupo teste 150 mg/kg), vermelha para GT₃₀₀ (grupo teste 300 mg/kg) e preta para GC (grupo controle).

O modo de administração do extrato bruto, assim como a observação dos sinais de toxicidade, foram realizadas seguindo a mesma metodologia aplicada na avaliação da toxicidade aguda dose única.

Observação dos sinais de toxicidade (*screening hipocrático*)

Para a realização das observações das alterações comportamentais os animais foram colocados em arena e utilizado o *screening hipocrático*. As observações foram realizadas em diferentes períodos durante o dia, após a administração dos compostos, que foi de cinco minutos, dez minutos, 20 minutos, 30 minutos, 60 minutos, duas horas, quatro horas, seis horas, 12 horas e 24 horas e, a partir de então, periodicamente, até o 14^o dia para intoxicação aguda e até o 28^o dia para intoxicação subcrônica.

Avaliação ponderal

Os animais foram pesados em balança semi-analítica antes da administração do extrato ou solução fisiológica (M_{0d}), após sete dias (M_{7d}) e ao final de 14 dias (M_{14d}) após exposição para intoxicação aguda, acrescentando após 21 dias (M_{21d}) e após 28 dias (M_{28d}) para intoxicação subcrônica. De posse dos dados, foi calculado o ganho ponderal médio dos animais. E os órgãos pesados no final do experimento.

Colheita das amostras

Foram realizadas coletas de sangue, para avaliação dos animais submetidos a intoxicação aguda e subcrônica. Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas em período diurno no final de cada experimento e anestesiados com uma solução de xilazina e cetamina de no máximo 0,10mL/100g de massa corpórea, na proporção de 8,75mL de cetamina e 1,25mL de xilazina, submetidos a punção cardíaca para coleta de sangue e realização de exames hematológicos e bioquímicos. O sangue coletado para realização de hemogramas (1mL) foram armazenados em tubos com EDTA.

Para as bioquímicas séricas foram utilizados o plasma separado por aspiração, do sangue coletado com o tubo contendo EDTA.

Para os exames histopatológicos, as amostras dos órgãos (fígado, rins e coração) foram coletadas na necropsia ao final da exposição aos extratos.

Análises laboratoriais

O hemograma e as bioquímicas séricas foram realizados no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Os hemogramas foram realizados obtendo-se os valores de WBC (contagem de glóbulos brancos), RBC (contagem de glóbulos vermelhos), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), VCM (volume celular médio), CHCM (concentração média de hemoglobina corpuscular), HCM (hemoglobina corpuscular média), PLT (contagem de plaquetas) determinadas pelo método automático utilizando-se o aparelho BC-2800 VET/Mindray. A contagem diferencial foi realizada por meio de esfregaço de sangue corado por panótico.

Para cada prova bioquímica sérica realizada: ALT (, AST, CK-NAC, CK-MB, creatinina, GGT e ureia), foram utilizados reagentes comerciais padronizados (Labtest[®], Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa - MG), com metodologias cinéticas, enzimáticas ou colorimétricas, em temperatura de 37^o C,

sendo a leitura realizada em espectrofotômetro semi-automático (Analisador Bioquímico Bio-Plus[®], Produtos para Laboratórios Ltda, Barueri - SP).

Necropsia e histopatológico

Foram realizadas as necropsias em todos os animais, após o término da exposição ao extrato, de cada subgrupo, para avaliação macro e microscópica dos órgãos. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após serem anestesiados com uma solução de xilazina 2% (1mL) e cetamina 10% (0,5mL) diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9% (8,5 mL), aplicada por via intraperitoneal, na quantidade de 0,1mL/10g, conforme protocolo sugerido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para os exames histopatológicos foram coletadas amostras de fígado, rim e coração (1 cm de espessura) e fixadas em solução formol neutro e tamponado a 10%. As amostras foram processadas rotineiramente no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, que consistiu de, após fixação 24 horas, desidratação em séries crescentes de etanol (70-100%), diafanização em xilol, seguido de inclusão em parafina histológica. Os blocos de inclusão foram seccionados, em micrótomo convencional, em uma espessura de 3 µm e os cortes obtidos foram submetidos ao processo de coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Para avaliação dos rins foi realizado um corte longitudinal no órgão evidenciando medula e cortex renal, já para o fígado, o corte foi realizado em várias áreas aleatoriamente e, por fim, o coração com corte transversal para visualização dos dois ventrículos e o septo intraventricular. Foram avaliadas a presença e a característica das alterações e lesões celulares.

Análise estatística

Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas através do teste Student-Newman-Keuls. Para todos os grupos considerou-se resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

RESULTADOS

Screening hipocrático

Após a observação dos animais do teste de atividade farmacológica, constatou-se que aqueles que receberam dose de 200 mg/kg apresentaram as seguintes reações (Quadro 2):

QUADRO 2 - Sinais observados no teste farmacológico para os camundongos que receberam dose de 200 mg/kg do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*. Goiânia, 2012.

Animal	Peso	Via	Sinais
1	27g	Oral	pouca motilidade
2	32g	Subcutânea	-
3	32g	Intraperitoneal	pouca motilidade e contorção

Os sinais apareceram nos primeiros cinco minutos após administração do extrato e permaneceram até cerca de quatro horas na administração por via intraperitoneal e dez minutos para a via oral, desaparecendo em seguida.

Os animais que receberam a dose de 400 mg/kg apresentaram os sinais demonstrados no Quadro 3.

QUADRO 3 - Sinais observados no teste farmacológico para os camundongos que receberam dose de 400 mg/kg do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*. Goiânia, 2012.

Animais	Peso	Via	Sinais
1	30g	Oral	-
2	33g	Subcutânea	coçar focinho e pouca motilidade
3	30g	Intraperitoneal	Convulsão clônica, tremores finos e grosseiros, fasciculações, ereção de cauda e tremor, pouca motilidade, diarreia e chiados

Os sinais surgiram nos primeiros cinco minutos para a via intraperitoneal, cessando após quatro horas. Para a via subcutânea, os sinais surgiram nos primeiros dez minutos após administração e cessou uma após hora, quando os animais voltaram ao comportamento normal.

Quanto aos animais em que foi administrada a dose de 750 mg/kg, observou-se os sinais clínicos descritos no quadro 4.

QUADRO 4 - Sinais observados no teste farmacológico para os camundongos que receberam dose de 750 mg/kg do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*. Goiânia, 2012.

Animais	Peso	Via	Sinais
1	30g	Oral	pouca motilidade e contorção
2	31g	Subcutânea	Convulsão clônica e tônica clônica, tremores de cauda e pouca motilidade
3	31g	Intraperitoneal	Convulsão clônica e tônica clônica e morte

Para as vias subcutânea e intraperitoneal, os sinais apareceram nos primeiros dez minutos, enquanto para a via oral, os sinais apareceram nos primeiros 20 minutos, desaparecendo uma hora após a administração. O animal

submetido ao tratamento por via subcutânea apresentou sinais até o final das primeiras quatro horas após administração. O animal submetido à via intraperitoneal morreu nos primeiros dez minutos, após apresentar convulsão tônico-clônica.

Na intoxicação aguda empregando a dose inicial de 300 mg/kg, observou-se em geral diminuição de motilidade nas primeiras duas horas após receberem o extrato etanólico de *Aspidosperma subincanum*, um dos animais apresentou tremores finos nos primeiros 30 minutos e outro apresentou movimentos estereotipados, como coçar focinho, nas primeiras duas horas. O grupo controle não apresentou nenhum sinal clínico durante os 14 dias de observação e nenhum dos animais morreu. Como descrito no protocolo, ocorrendo até uma morte é necessário repetir a dose. Assim feito, na repetição, observou-se que os animais apresentaram diminuição de motilidade nos primeiros 60 minutos e todos os três demonstraram movimentos estereotipados, coçando o focinho várias vezes nos primeiros 20 minutos e um apresentou tremores finos nos primeiros 60 minutos de observação. Novamente, nenhum dos animais morreu. Dessa maneira, a dosagem foi aumentada para 2000 mg/kg, como orienta o protocolo. Neste procedimento, foi possível constatar diminuição de motilidade em todos os animais nos primeiros 15 minutos, acompanhado de tremores finos e convulsões, sendo que dois morreram 22 minutos após receber o extrato (Quadro 5).

Para a intoxicação subcrônica com diferentes doses de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, a dosagem de 300 mg/kg causou diminuição de motilidade em todos os animais em momentos diferentes até o 28º dia, destes, quatro fêmeas morreram no intervalo do primeiro ao 13º dia, todas após uma convulsão. Na dosagem de 150 mg/kg todos os animais apresentaram diminuição de motilidade em momentos diferentes, duas fêmeas apresentaram movimentos estereotipados, como coçar o focinho, uma apresentou contorção e tremores finos e uma morreu no quinto dia de experimento, juntamente com dois machos, um morreu também no quinto dia e o outro no 12º dia após apresentar chiados, andar rígido, cauda

levantada, convulsão e mioclonia. Somente um macho e uma fêmea apresentaram espasmos no 25º dia. Os camundongos machos que receberam doses de 75 mg/kg, apresentaram diminuição de motilidade a partir do 15º dia, permanecendo até o 28º dia. Somente uma fêmea apresentou diminuição de motilidade, observado no 19º dia com duração até o 24º dia. Os controles da intoxicação subcrônica, não apresentaram nenhum sinal clínico (Quadro 5).

Quadro 5 - Sinais clínicos apresentados por camundongos fêmeas que receberam 300 mg/kg e 2000 mg/kg (intoxicação aguda) do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* e nos animais controle em dose única. Goiânia, 2012.

Dose mg/kg	Sexo	Morte/tratado	Latência (min/h/dia)	Sinais
300 (1)*	F	0/3	30 min e 2h	pouca motilidade, tremores finos e coçar focinho
300 (2)*	F	0/3	20min e 60min	pouca motilidade, tremores finos e coçar focinho
2000	F	2/3	15min e 22min	pouca motilidade, tremores finos, convulsão e morte
Controle	F	0/9	-	Nenhum

*(1) primeira administração. (2) repetição da dose

Quadro 6 - Sinais clínicos apresentados por camundongos machos e fêmeas que receberam 300 mg/kg, 150 mg/kg e 75 mg/kg (intoxicação subcrônica) do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* e nos animais controle durante 28 dias. Goiânia, 2012.

Dose mg/kg	Sexo	Morte/tratado	Latência (min/h/dia)	Sinais
300	F	4/5	13º dia	pouca motilidade, convulsão
300	M	0/5	28 dias	pouca motilidade
150	F	1/5	5º dia	pouca motilidade, coçar focinho, contorção, tremores finos
150	M	2/5	5º e 12º dia	pouca motilidade, coçar focinho, contorção, tremores, rigidez, chiado, cauda levantada, espasmos, mioclonia, convulsão
75	M	0/5	A partir do 15º dia	pouca motilidade
75	F	0/5	19º dia até 24º	pouca motilidade
Controle	M/F	0/10	-	Nenhum

Exames laboratoriais (hemograma e provas bioquímicas séricas)

Os animais testados do grupo de intoxicação aguda nas doses de 300mg/kg e 2000 mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, tiveram seus resultados comparados com os animais controles, sendo que não foi constatada diferença significativa para os resultados do eritrograma e leucograma (Tabelas 1 e 4).

Já para os camundongos pertencentes ao grupo de intoxicação subcrônica com administração do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, foi possível constatar uma diferença significativa no valor de hematócrito de fêmeas entre o grupo que recebeu 300 mg/kg e o grupo que recebeu 75 mg/kg de extrato e deste último em relação ao grupo controle. O grupo de fêmeas tratadas com a dose de 300 mg/kg observou-se diferença significativa no resultado de HCM comparado ao grupo de fêmeas tratadas com a dose de 150 mg/kg e ao grupo de fêmeas controle. Quanto aos outros parâmetros do eritrograma e do leucograma, não houve diferença significativa comparando os grupos testados e o grupo controle, tanto para fêmeas e machos (Tabelas 2, 3, 5 e 6).

Nenhum parâmetro bioquímico avaliado, (AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB) nos grupos de intoxicação aguda, apresentou diferença significativa nos resultados. Já para os grupos da intoxicação subcrônica, houve uma diferença significativa nos valores de AST de fêmeas entre o grupo controle e os grupos de dose 150 mg/kg e 75 mg/kg e ALT de fêmeas entre o grupo dose 150 mg/kg e o grupo controle (Tabelas 7, 8 e 9).

TABELA 1 - Eritrograma e plaquetograma de camundongos Swiss adultos fêmeas (n=3) tratadas com 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação aguda), administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle). Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	300 mg/kg	2000 mg/kg	p*
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,86 ± 0,74	7,63 ± 0,74	6,52 ± 1,33	0.3001
Hematócrito (%)	33,07 ± 2,14	33,8 ± 2,88	30,4 ± 4,68	0.5599
Hemoglobina (g/dL)	11,25 ± 1,33	12,12 ± 2,25	10,8 ± 2,19	0.6332
VCM	47,73 ± 2,84	44,42 ± 2,6	47,03±2,67	0.1894
HCM	16,35 ± 0,8	15,72 ± 1,46	16,53±0,11	0.8191
CHCM	34,48 ± 3,03	35,64 ± 4,52	35,3 ± 1,97	0.7635
Plaquetas(/μL)	409,83±75,5	410,6±214,69	531±13,11	0.2171

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 2 - Eritrograma e plaquetograma de camundongos Swiss adultos machos (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica), administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p*
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,2±0,8	6,5±0,56	6,7±0,63	7,48 ± 0,45	0.065
Hematócrito (%)	25,25±4,14	27,5±2,86	29,72±0,84	30,86±1,21	0.064
Hemoglobina (g/dL)	10,2±1,17	10,22±1,44	10,65±1,38	12,02±0,66	0.086
VCM	43,42±0,98	42,46±2,15	44,75±4,74	41,38±1,33	0.311
HCM	16,42±0,39	15,66±0,95	15,82±0,96	16,02±0,5	0.468
CHCM	36,97±0,75	36,96±2,72	5,85±5,11	38,88±0,82	0.134
Plaquetas(/μL)	425±356,47	377,8±133,43	9±152, 47	403,8±253,81	0.996

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 3 - Eritrograma e plaquetograma de camundongos Swiss adultos fêmeas (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos. Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p*
Hemácias(x10 ⁶ /μL)	6,94±0,25	6,26±0,92	6,67±0,79	7,77±0,34	0.06
Hematócrito (%)	30,88±0,69 ^b	27,14±2,99 ^a	29,8±3,37 ^{ab}	34,9±5,37 ^b	0.024
Hemoglobina(g/dL)	11,76±0,3	10,18±1,34	11,32±1,36	12,27±0,74	0.094
VCM	44,36±1,55	43,72 ± 1,8	44,32±0,82	44,9±5,74	0.850
HCM	17,2±0,9 ^b	16,22±0,41 ^{ab}	16,77±0,2 ^b	15,73±0,6 ^a	0.022
CHCM	36,22±4,75	37,3±1,38	37,8±0,59	35,63±5,4	0.788
Plaquetas(/μL)	459,4±91,08	189±191,97	300,5±260,62	585,3±277,44	0.185

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05) *letras diferentes: diferenças significativas pelo teste Student-Newman-Keuls

TABELA 4 - Valores médios do leucograma (\pm desvio padrão) em camundongos fêmeas tratadas com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação aguda) na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle). Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	300 mg/kg	2000 mg/kg	p*
Leucócito(/ μ L)	2050 \pm 1532	2825 \pm 830,2	3500 \pm 2971,5	0.883
Monócitos	466,5 \pm 485,13	506,25 \pm 36,75	508 \pm 755,34	0.270
Linfócitos	2027,5 \pm 815,4	2685,6 \pm 1472,2	2406,3 \pm 1741,43	0.759
Eosinófilos	10,83 \pm 18,83	119,6 \pm 83,3	170,3 \pm 271,14	0.138
Segmentados	439,83 \pm 356,18	467 \pm 253, 46	415,3 \pm 244,84	0.895
Bastonetes	5,33 \pm 13,06	19 \pm 34,7	0 \pm 0	0.720

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 5 - Valores médios do leucograma (\pm erro padrão) em camundongos Swiss adultos fêmeas (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p*
Leucócitos (/ μ L)	2940 \pm 1285,7	3280 \pm 1149,8	7375 \pm 6040,1	7483,3 \pm 2576,01	0.106
Monócitos	282,4 \pm 140,37	333,5 \pm 215,06	670,25 \pm 450,82	643,3 \pm 604,24	0.350
Linfócitos	2162 \pm 969,6	2544 \pm 800,01	5358,25 \pm 4185,2	5319,67 \pm 3265,35	0.154
Eosinófilos	118 \pm 150,19	66,5 \pm 100,28	98 \pm 151,84	98, 66 \pm 170,9	0.9682
Segmentado	377,6 \pm 193,24	354,5 \pm 286,6	784,5 \pm 528,8	1321,3 \pm 926,5	0.1174
Bastonetes	0 \pm 0	26,5 \pm 30,7	64 \pm 78,4	100,3 \pm 101,01	0.2919

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 6 - Valores médios do leucograma (\pm erro padrão) em camundongos Swiss adultos machos (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos. Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p*
Leucócitos (/ μ L)	3575 \pm 512,35	4120 \pm 1386,36	4825 \pm 994, 57	3980 \pm 1349,8	0.529
Monócitos	411,5 \pm 73,65	738 \pm 738,63	465,5 \pm 132,32	893,2 \pm 966,09	0.9283
Linfócitos	2434 \pm 471,67	2496,4 \pm 976,24	3501,5 \pm 604,56	2398,8 \pm 823,20	0.196
Eosinófilos	73,6 \pm 93,52	82,4 \pm 113,9	127 \pm 110,96	24,8 \pm 55,45	0.5344
Segmentados	599,5 \pm 199,37	766 \pm 404,32	591 \pm 229,95	663,2 \pm 316,24	0.8422
Bastonetes	30,4 \pm 67, 98	37,2 \pm 83,18	112 \pm 224	12,4 \pm 27,72	0.9915

*Teste Kruskall-wallis. p(<0,05)

TABELA 7 - Valores médios da dosagem sérica (\pm desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB em camundongos Swiss adultos fêmeas tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg/dia (intoxicação aguda) e no grupo controle tratado com solução de cloreto de sódio 0,9%. Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	300 mg/kg	2000 mg/kg	p*
AST	314, 18 \pm 300,22	325,91 \pm 221,75	763,9 \pm 352,39	0.1411
ALT	93,96 \pm 140,7	54,72 \pm 29,9	136, 85 \pm 72,46	0.2785
Uréia	69,43 \pm 9,29	68,08 \pm 20,3	56,8 \pm 7,59	0.1881
Creatinina	0,46 \pm 0,1	0,57 \pm 0,19	0,53 \pm 0,23	0.5768
CK-NAC	1046,8 \pm 1656,62	1221,3 \pm 1396,12	2029,3 \pm 1625,87	0.2691
CK-MB	171,36 \pm 136,89	280,36 \pm 238, 45	273,45 \pm 76,27	0.2876

*Teste Kruskall-wallis. p(<0,05)

TABELA 8 - Valores médios da dosagem sérica (\pm desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB em camundongos Swiss adultos machos (n=5) de doses 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica) administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p*
AST	495 \pm 181,26	554,21 \pm 246,16	259,8 \pm 15,3	299,4 \pm 69, 69	0.0584
ALT	54,72 \pm 0,03	115 \pm 91,64	54,72 \pm 0,03	60,2 \pm 12,24	0.0541
Uréia	117,3 \pm 96,76	61,4 \pm 15,25	63 \pm 15,7	78,4 \pm 12,7	0.1712
Creatinina	0,44 \pm 0,22	0,52 \pm 0,23	0,53 \pm 0,3	0,48 \pm 0,1	0.8622
CK-NAC	2097 \pm 2375,	1037,2 \pm 644,7	1343,8 \pm 817,0	1713,6 \pm 2712,1	0.769
CK-MB	220,6 \pm 77,2	329,5 \pm 59,6	208,23 \pm 71	325,4 \pm 183,93	0.1632

*Teste Kruskall-wallis. p(<0,05)

TABELA 9 - Valores médios da dosagem sérica (\pm desvio padrão) de AST, ALT, ureia, creatinina, CK-NAC e CK-MB em camundongos Swiss adultos fêmeas (n=5) de doses 75, 150 e 300mg/kg tratados com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* (intoxicação subcrônica), administrado por via oral, dose única e com solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle) durante 28 dias consecutivos Goiânia, 2012.

Parâmetros	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p
AST	94,1 \pm 85,05 ^a	527,1 \pm 139,7 ^b	598,4 \pm 208,5 ^b	417,6 \pm 63,6 ^{ab}	0.0131
ALT	18,6 \pm 20,7 ^a	54,7 0,03 ^a	93,07 \pm 36,75 ^b	63,8 \pm 15,82 ^{ab}	0.0119
Uréia	29,3 \pm 29,02	51,37 \pm 8,6	51,7 \pm 13,8	41,5 \pm 4,5	0.1805
Creatinina	0,26 \pm 0,3	0,45 \pm 0,25	0,8 \pm 0,49	0,6 \pm 0,35	0.0938
CK-NAC	293,1 \pm 243,36	789,24 \pm 676,51	2074,2 \pm 2273,5	902 \pm 596,62	0.1362
CK-MB	153,05 \pm 230,72	148,2 \pm 57	379,2 \pm 189,38	312,5 \pm 132,5	0.0914

*Teste Kruskall-wallis. p(<0,05)*letras diferentes: diferenças significativas pelo teste Student-Newman-Keuls

Exame necroscópico e histopatológico

Todos os animais pertencentes ao grupo de intoxicação aguda (300 mg/kg e 2000 mg/kg) e da intoxicação subcrônica (300 mg/kg, 150 mg/kg e 75 mg/kg) que receberam extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, foram submetidos à necropsia após colheita de sangue, para fins de identificação de lesões macroscópicas nos rins, fígado e coração. Não foi observada nenhuma alteração macroscópicas nos referidos grupos.

Quanto às lesões microscópicas, 33% dos animais do grupo de intoxicação aguda que receberam 2000 mg/kg do extrato, apresentou hiperemia renal multifocal leve; 33% dos que receberam 300 mg/kg de extrato, apresentaram degeneração microvacuolar hepática focal leve. Para a intoxicação subcrônica, dentre os animais que receberam 300 mg/kg de extrato, 10% apresentaram hiperemia hepática multifocal moderada, 20% hiperemia hepática multifocal leve, 10% hiperemia renal multifocal moderada e 20% hiperemia renal multifocal leve; nos animais que receberam dose de 150 mg/kg, foram notadas hemorragia renal focalmente extensa e leve em 10%, hiperemia hepática multifocal moderada em 10% e degeneração microvacuolar hepática multifocal leve em 10%. Por fim, animais que foram submetidos a dose de 75 mg/kg do extrato, apresentaram hiperemia renal multifocal leve em 30% dos testados, hiperemia hepática difusa moderada em 10% e degeneração microvacuolar hepática multifocal leve. Não foi encontrada alterações microscópicas de musculatura cardíaca nos animais nas diferentes doses utilizadas. Os animais do grupo controle não apresentaram nenhuma lesão microscópica.

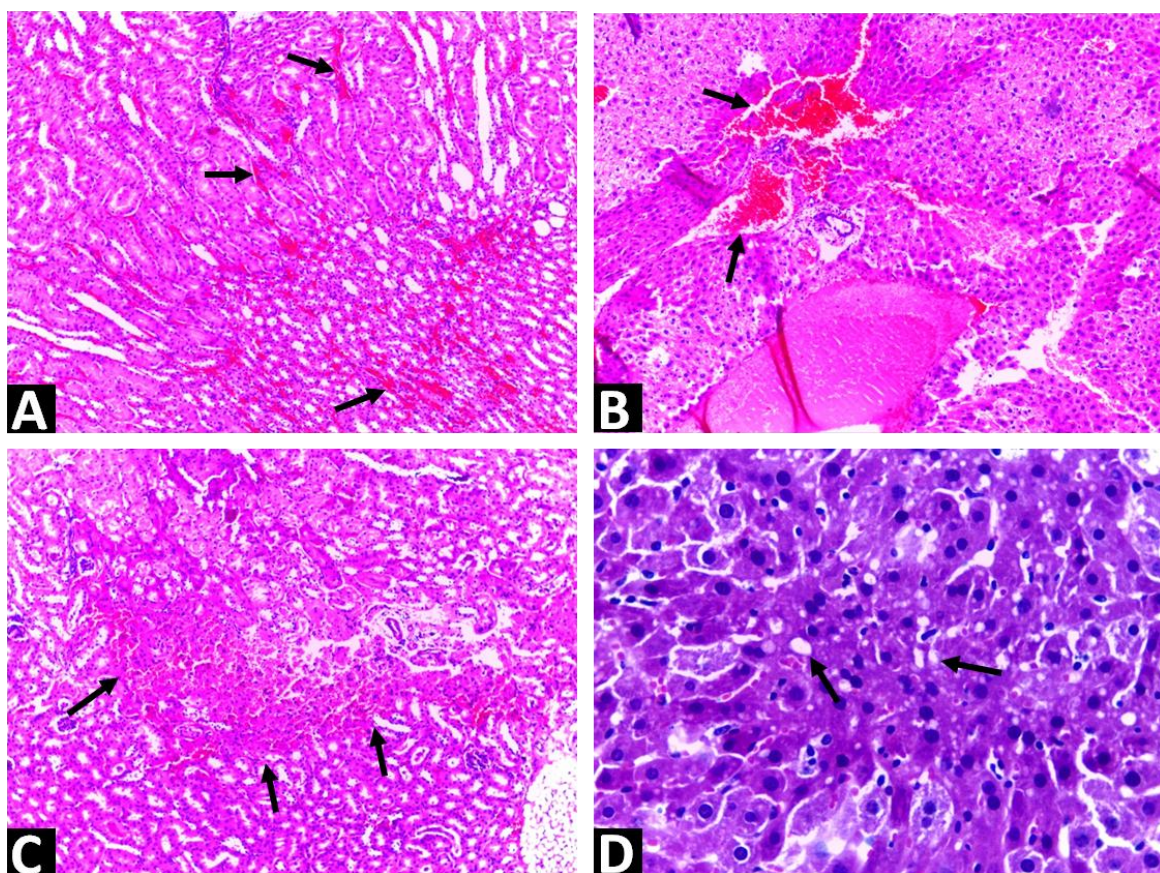


FIGURA 3 – Fotomicrografia de lesões hepáticas e renais em camundongos submetidos à intoxicação com extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, HE. (A) Rim; dose 2000 mg/kg; hiperemia multifocal discreta (setas); obj. 10X; (B) Fígado; dose 300 mg/kg; hiperemia multifocal moderada (setas); obj. 10X; (C) Rim; dose 150 mg/kg; hemorragia focalmente extensa discreta (setas); obj. 10X; (D) Fígado; dose 300 mg/kg; degeneração microvacuolar focal discreta (setas); obj. 40X;

Peso dos animais e órgãos

Em geral foi possível observar uma tendência de modificação do peso corpóreo dos animais, porém sem diferença significativa estatisticamente entre os grupos de doses 300 mg/kg, 150 mg/kg e 75 mg/kg do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, na intoxicação subcrônica, durante os 28 dias de análise (Tabelas 11 e 12). Para a

intoxicação aguda, com doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, os animais também apresentaram modificações no peso, porém o peso corporal durante os 14 dias não obteve diferença estatística entre os animais testados e os controles (Tabela 12).

Em relação ao peso dos órgãos, as médias dos animais testados para intoxicação subcrônica, com doses de 300 mg/kg, 150 mg/kg e 75 mg/kg do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum*, administrado por via oral, se encontraram próximos a média de peso dos órgãos dos camundongos do grupo controle, não tendo diferença significativa entre os grupos, como demonstra a Tabela 13. A relação percentual entre o peso dos órgãos e o peso corporal manteve-se bem próximas, sem diferença significativa entre animais testados e os controles, como pode ser verificado na Tabela 14.

TABELA 10 - Médias (\pm desvio padrão) dos pesos corporais de camundongos machos *Swiss* (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012.

Dias	Controle	75	150	300	p*
D1	37,3 \pm 3,6	31 \pm 3,04	34,2 \pm 2,95	34,3 \pm 3,6	0.1002
D7	38,5 \pm 5,26	32,6 \pm 3,77	37 \pm 4,6	37,3 \pm 2,95	0.2656
D14	40,6 \pm 5,26	33,4 \pm 4,81	37,3 \pm 4,66	38,7 \pm 3,15	0.1690
D21	40,0 \pm 4,55	35,1 \pm 5,63	39,5 \pm 4,27	40,5 \pm 2,23	0.3277
D28	42,2 \pm 4,02	34,2 \pm 5,95	41,2 \pm 3,76	42,3 \pm 5,08	0.1158

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 11 - Médias (\pm desvio padrão) dos pesos corporais de camundongos fêmeas *Swiss* (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012.

	Controle	75 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg	p*
D1	29,72 \pm 2,57	28,43 \pm 2,3	28,32 \pm 2,54	27,94 \pm 1,16	0.7734
D7	30,4 \pm 2,56	30,66 \pm 2,26	29,55 \pm 2,22	29,58 \pm 0,66	0.8024
D14	31,46 \pm 2,51	31,82 \pm 1,69	29,45 \pm 2,75	---	0.2436
D21	33,4 \pm 2,22	32,54 \pm 2,04	30,5 \pm 2,4	---	0.1537
D28	34,4 \pm 1,88	35,1 \pm 2,59	33,14 \pm 3,15	---	0.6496

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 12 - Média (\pm desvios padrão) dos pesos corporais (gramas) de camundongos *Swiss* fêmeas (n=3) tratados via oral com 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7) e quatorze (D14) dias após exposição. Goiânia, 2012.

Dias	Controle	300 mg/kg	2000 mg/kg	p*
D1	33,8 \pm 5,71	33,07 \pm 5,38	35,27 \pm 4,92	0.6765
D7	33,94 \pm 5,96	34,08 \pm 5,15	38.30 \pm 0	0.8973
D14	35,07 \pm 6,77	35,01 \pm 5,46	39.50 \pm 0	0.7963

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 13 - Médias (\pm desvio padrão) dos pesos dos órgãos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012.

Órgão	Tratamento	Machos	Fêmeas
Fígado	300	2,31 \pm 0,26	1,67 \pm 0
	150	2,36 \pm 0,18	1,72 \pm 0,24
	75	1,91 \pm 0,39	1,68 \pm 0,22
	Controle	2,29 \pm 0,12	1,71 \pm 0,13
	p*	0,207	0,872
Coração	300	0,17 \pm 0,01	0,14 \pm 0
	150	0,17 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01
	75	0,16 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02
	Controle	0,17 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02
	p*	0,992	0,716
Rins	300	0,55 \pm 0,06	0,37 \pm 0
	150	0,57 \pm 0,13	0,37 \pm 0,04
	75	0,48 \pm 0,17	0,36 \pm 0,04
	Controle	0,51 \pm 0,05	0,37 \pm 0,03
	p*	0,410	0,959

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

TABELA 14 - Médias (\pm desvio padrão) do índice de peso dos órgãos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas (n=5) tratados via oral com 300mg/kg, 150mg/kg e 75mg/kg de extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* antes da exposição (D1), sete (D7), quatorze (D14), vinte e um (D21) e vinte e oito (D28) dias após exposição. Goiânia, 2012.

Órgão	Tratamento	Machos	Fêmeas
Fígado	300	0,055 \pm 0,007	0,048 \pm 0
	150	0,057 \pm 0,0013	0,052 \pm 0,006
	75	0,055 \pm 0,003	0,048 \pm 0,004
	Controle	0,054 \pm 0,002	0,050 \pm 0,004
	p*	0,728	0,404
Coração	300	0,004 \pm 0,000	0,004 \pm 0
	150	0,004 \pm 0,0003	0,005 \pm 0,000
	75	0,005 \pm 0,001	0,004 \pm 0,000
	Controle	0,004 \pm 0,0005	0,004 \pm 0,001
	p*	0,2424	0,522
Rins	300	0,013 \pm 0,001	0,011 \pm 0
	150	0,014 \pm 0,001	0,011 \pm 0,000
	75	0,014 \pm 0,002	0,010 \pm 0,001
	Controle	0,012 \pm 0,0008	0,011 \pm 0,001
	p*	0,4082	0,1927

*Teste Kruskal-wallis. p(<0,05)

DISCUSSÃO

O teste farmacológico por via intraperitoneal revelou na análise do *screening hipocrático*, o aparecimento de sinais neurológicos a partir da dose 400 mg/kg, onde os camundongos apresentaram convulsão clônica, tremores finos e grosseiros, fasciculações, ereção de cauda, diminuição de motilidade, diarreia e granidos. A morte ocorreu na dose mais elevada de 750 mg/kg. Sinais semelhantes à análise do *screening hipocrático* do teste de intoxicação aguda por via intraperitoneal realizada por SANTOS et al (2009) em ratos *wistar* machos, revelou piloereção, tremores, convulsão e cianose em doses a partir de 350mg/kg e morte na maior dose, 450mg/kg. Em contrapartida, danos fatais não foram encontrados por GOLONI et al (2005) que utilizou doses crescentes do extrato etanólico de *A. subincanum* (500 mg/kg a 5000 mg/kg) em camundongos, por via intraperitoneal, como também em um experimento realizado por ALVES (2007), em que não houve qualquer sinal estimulante de sistema nervoso central, na intoxicação aguda por via intraperitoneal em ratos *wistar* utilizando o extrato etanólico do *A. subincanum*, nas dosagens de 500 mg/kg a 2000 mg/kg e não causou óbito na dose de 3000 mg/kg.

O aparecimento de sinais neurológicos e morte, em dosagens menores por via intraperitoneal do que em via oral, constatados também por SANTOS et al. (2009), demonstra que o extrato bruto etanólico da *A. subincanum*, assim como o extrato hidroetanólico da planta é melhor absorvido pela via intraperitoneal, devido às diferenças existentes entre os perfis de absorção estomacal e intestinal como pH, superfície de absorção, motilidade intestinal, irrigação sanguínea além do que, por via oral pode ocorrer uma pobre absorção da substância ou ainda ser metabolizada por sua passagem pelo fígado (LOOMIS & HAYES, 1996; KLAASSEN & WATKINS, 2001).

Os estudos realizados por SANTOS et al. (2005) revelaram a ausência de mudança comportamental em camundongos na dosagem de até 300 mg/kg por via oral. Já o presente experimento demonstrou a existência de sinais estimulantes do sistema nervoso central em doses de 300 mg/kg a 2000mg/kg

em camundongos para intoxicação aguda. Contudo, ressalta-se que os animais utilizados por SANTOS et al. (2005) eram machos, o que suscita a possibilidade de uma maior sensibilidade de camundongos machos expostos ao extrato bruto etanólico do *A. subincanum*. Ademais, a diferença observada pode ser decorrente da variação no poder de extração do solvente ou reforça os dados que apontam para a existência de diferentes concentrações do princípio nas diversas partes da planta. Os mesmos autores demonstraram por meio do estudo a presença de sinais típicos de estimulantes do sistema nervoso em doses de 500 mg/kg a 2500mg/kg para intoxicação aguda em camundongos, com morte de 100% dos animais na maior dose (2500 mg/kg), fato observado no presente trabalho que também apresentou morte em animais com dose de 2000 mg/kg. Entretanto, ALVES (2007) não verificou sinais de toxicidade na dose de 5000 mg/kg em ratos por via oral ao longo de 24 horas, e sugeriu que a planta é atóxica em exposição aguda e em altas doses na espécie, o que pode sugerir uma maior sensibilidade dos camundongos em relação aos ratos. GOMES (2011) utilizou a dosagem de 5000 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado do *Aspidosperma excelsum* (que possui alcalóides semelhantes ao *A. subincanum*) para intoxicação aguda em camundongos, não verificando aparecimento de nenhum sinal tóxico.

Sinais de toxicidade foram observados no teste de intoxicação subcrônica, nas doses de 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg em machos e fêmeas. ALVES (2007) utilizou as doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg em seu experimento, não encontrando nenhum sinal estimulante do sistema nervoso central ao longo dos dias de estudo. O mesmo ocorreu com o experimento de SANTOS et al. (2005) que utilizaram doses inferiores (5 mg/kg a 100 mg/kg) na realização do teste de intoxicação subcrônica em ratos. A diferença apresentada nos trabalhos pode estar relacionada a influências biogeográficas sofridas pelas plantas utilizadas, já que a não existência de toxicidade obtida ao avaliar extratos de plantas pode ocorrer devido a fatores inerentes à planta (localidade, fração avaliada e solvente utilizado), bem como os períodos e tipos de avaliação realizados nos estudos de toxicidade. Ainda que

orientada pelas características genéticas da planta, a síntese química das substâncias é controlada por fatores do ecossistema, iluminação, calor, constituição do solo, umidade, dentre outros (LAPA, 1999). Segundo HURST (1942), a toxicidade da planta pode variar devido a fatores ambientais como área geográfica, clima e condições de crescimento, sendo que em algumas plantas pode ser totalmente ausente (OERLICH et al., 1985).

De acordo com BEUTLHER et al. (2008), é possível que determinadas variedades da planta apresentem maior toxicidade quando comparadas a outras. Essa diferença provavelmente decorra do fato de que as plantas muitas vezes são classificadas apenas quanto à espécie e não quanto à variedade.

Na toxicidade subcrônica, os sinais de toxicidade sistêmica podem ser caracterizados por alterações de comportamento, dentre outros. (MELO, 2001). Sendo assim, visto que os grupos tratados por via oral com o extrato etanólico da casca do caule de guatambu (75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg), por 28 dias consecutivos, apresentaram alteração significativa nos parâmetros comportamentais, pode-se dizer que, de forma geral, o tratamento resultou em efeitos tóxicos em camundongos Swiss adultos machos e fêmeas.

As alterações no peso corporal têm sido utilizadas como um indicador de efeitos adversos das drogas e produtos químicos em animais testados (DESMARCHELIER et al. 1996). No ensaio de toxicidade subcrônica em camundongos machos e fêmeas na dose de 75 mg/kg, 150 mg/kg e 300 mg/kg, via oral, do extrato bruto etanólico de guatambu, não houve alteração de forma significativa no ganho de massa corporal. Contudo, observou-se uma tendência de ganho de peso ao longo do experimento observado também no grupo controle, como também verificado por ALVES (2007) com as doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg, via oral, em ratos Wistar machos.

Os animais apresentaram alterações hematológicas quanto ao valor de hematócrito em fêmeas na intoxicação subcrônica, com diferença significativa entre as doses de 300 mg/kg e a dose de 75 mg/kg. GOLONI et al. (2006) utilizaram ratos e doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500mg/kg para intoxicação subcrônica e não constataram nenhuma alteração hematológica em seus

animais. SANTOS et al. (2009) também não encontraram nenhuma alteração hematológica na intoxicação subcrônica com doses de 5 mg/kg a 100 mg/kg de extrato hidroetanólico de *A. subincanum*. ALVES (2007) observou diferenças significativas no valor de VCM, HCM e CHCM. Os valores desses índices foram maiores para o grupo satélite (grupo que recebeu maior dose do extrato) em comparação ao grupo controle, diferentemente do presente experimento em que houve variação de HCM em fêmeas com valores mais baixos para a dosagem maior (300 mg/kg) em relação ao grupo controle.

Não foram encontradas nenhuma alteração no leucograma dos animais testados. A ausência de alterações morfológicas nas células sanguíneas e na contagem das mesmas, demonstra que o *A. subincanum* não causa quaisquer efeitos tóxicos sobre a medula óssea e homeostase do sistema circulatório. A avaliação hematológica representa uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos animais e são descritas na literatura por ter alta correlação em prever toxicidade humana, ou seja, alterações no sistema hematológico em animais por determinadas substâncias também são encontradas em humanos na maioria das vezes (OLSON et al., 2000).

SANTOS et al. (2009) não encontraram nenhuma alteração nas análises bioquímica sérica. Contudo, ALVES (2007) observou, assim como neste experimento, um aumento no valor de AST em um grupo de animais testados (500 mg/kg) em relação ao grupo controle na intoxicação subaguda. Além do aumento no valor de AST em fêmeas, para as três dosagens diferentes na intoxicação subcrônica, também foi observado no presente trabalho, aumento no valor da ALT nas fêmeas testadas.

Várias enfermidades podem causar lesão de hepatócitos e extravasamento da ALT tais como hipóxia, alterações metabólicas que resultem em acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, drogas e substâncias químicas tóxicas, toxinas bacterianas, inflamação e neoplasia hepática (THRALL et al., 2007). Um aumento muito grande em ALT sugere uma hepatite aguda e aumentos mais brandos podem sugerir doença hepatocelular crônica, cirrose, neoplasia ou hepatopatia por parasitas (TENNANT, 1997).

Nas afecções agudas e crônicas do fígado, a atividade sérica da AST encontra-se aumentada, e também pode estar elevada em lesões musculares como traumatismos ou injeções intramusculares. Para se diferenciar o aumento de AST devido à lesão hepática ou muscular, usa-se o teste da enzima creatinaquinase (CK), que estará elevada, juntamente com a AST em casos de lesões musculares (TENNANT, 1997). O aumento de CK não foi constatado nesse trabalho.

Reações do hepatócito à agressão tóxica incluem tumefação celular e esteatose, acompanhada ou não de colestase. Em casos de intoxicação suficientemente grave isso pode progredir para necrose e insuficiência hepática (MACLACHLAN & CULLEN, 1998). Segundo YEH (2011), substâncias tóxicas podem provocar inflamação e degeneração gordurosa do fígado pela lesão de mitocôndrias, incapacitando o fígado de metabolizar adequadamente as gorduras, o que pode levar à destruição de células e inflamação. A elevação das enzimas AST e ALT nos animais testados demonstrou a presença de lesão hepática aguda, já que nas análises microscópicas foi possível observar hiperemia e degeneração microvacuolar hepática em alguns dos animais da intoxicação subcrônica. De acordo com MACLACHLAN & CULLEN (1998), a morfologia da lesão hepática induzida por toxinas varia consideravelmente com o tipo, dose e a duração da exposição à toxina.

A ausência de elevação de CK demonstra que não houve lesão muscular esquelética, descartando o aumento de AST decorrente do músculo. Nem tão pouco, lesão muscular cardíaca, já que o valor de CK-MB se encontrou sem diferença significativa entre animais testados e controles. Também não foi encontrada nenhuma lesão aparente na observação macroscópica e microscópica, descartando o fato da congestão hepática ter ocorrido por disfunção cardíaca.

Apesar de não ter sido observado alteração nos resultados das provas bioquímicas séricas de avaliação da função renal foi possível constatar, na análise histopatológica, hiperemia e hemorragia renal em alguns animais das diferentes dosagens na intoxicação subcrônica e aguda. A ausência de

alterações nas dosagens desses compostos nitrogenados exclui a presença de uma insuficiência renal, demonstrando que a hiperemia e a hemorragia não comprometeu mais de 75% do parênquima funcional responsável pela função renal conforme descrito por NISSENSON (1998) e NEWMAN et al. (2009).

Observou-se ainda a presença de cilindros hialinos em um único camundongo fêmea, que recebeu dose 300 mg/kg (intoxicação subcrônica). Os cilindros hialinos são formados por mucoproteína gelatinosa e não contem células (SINK & FELDMAN, 2006). São formados exclusivamente por proteínas, geralmente albumina (GARCIA-NAVARRO, 2005) que se dissolve rapidamente em urina diluída ou alcalina (BUSH, 2004). Não tem valor diagnóstico, sua presença indica uma forma leve de irritação renal, porém pequena quantidade pode ser visualizada em animais normais devido à febre, hiperemia renal e proteinúria fisiológica (COLES, 1984; GARCIA-NAVARRO, 1996), insuficiência cardíaca congestiva, estresse, desidratação, exercício físico intenso e exposição ao calor (LOPES, 2004).

CONCLUSÃO

- O extrato etanólico de *A. subincanum* promoveu alterações comportamentais indicativa de uma possível ação no sistema nervoso central em camundongos fêmeas e machos. O aparecimento de sinais neurológicos e morte, em dosagens menores, por via intraperitoneal demonstra que o extrato bruto etanólico da *A. subincanum*, é melhor absorvido pela via intraperitoneal.
- O extrato bruto obtido da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* pode ser considerado tóxico quando administrado por via oral em camundongos Swiss, já que a dose tóxica estimada está abaixo de 2000 mg/kg.
- A ausência de alterações morfológicas nas células sanguíneas e na contagem das mesmas, demonstra que o *A. subincanum* não causa quaisquer efeitos tóxicos na medula óssea e a homeostase do sistema circulatório.
- A ação do extrato etanólico de *Aspidosperma subincanum* provocou lesões agudas no fígado (hiperemia e degeneração microvacuolar) e nos rins (hiperemia e hemorragia), até mesmo na menor dose utilizada no estudo (75mg/kg). Confirmando assim seu efeito tóxico para os órgãos em questão.
- Por não ocorrer variação significativa no ganho de peso corporal, constata-se que o extrato bruto etanólico do *A. subincanum* não causa efeito adverso quanto a esse parâmetro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da toxicidade do *Aspidosperma subincanum*, tanto na intoxicação aguda, como na subcrônica é importante para a saúde pública por ser tratar de uma planta utilizada por populares no tratamento do diabetes mellitus e da hipercolesterolemia, sendo consumida na forma de infusos de modo constante e diário.

O teste farmacológico de dose única revelou a presença de sinais e morte na utilização da via intraperitoneal, porém o teste de intoxicação aguda demonstrou sinais de intoxicação até mesmo nas doses mais baixas utilizadas no experimento, por via oral, o que demonstra a possibilidade de intoxicação por essa via comumente utilizada para uso da planta por humanos.

Na avaliação histopatológica, o extrato etanólico de *A. subincanum* provocou lesões agudas em rins e fígados em todas as doses utilizadas, o que permite inferir que tais órgãos sofreram injúrias estruturais após a administração do extrato. A hiperemia e a hemorragia não comprometeram mais de 75% do parênquima renal, pois não houve alterações nas dosagens dos compostos nitrogenados (ureia e creatinina), o que confirma a ausência de insuficiência renal.

Apesar de não terem sido observadas alterações macroscópicas hepáticas, a hiperemia, hemorragia e degeneração microvacular determinaram um quadro de injúria hepática aguda. O aumento da dosagem de ALT confirma a condição. Contudo, para melhor entendimento do quadro hepático, é necessária melhor exploração consorciando dosagem de bilirrubina, de sais biliares, e de provas que avaliem a função hepática, para melhor caracterizar o quadro hepatotóxico.

Apesar das lesões microscópicas encontradas caracterizem-se por lesões agudas, deve-se levar em consideração que, doses mais elevadas ou até mesmo as empregadas no intoxicação subcrônica, utilizadas em um regime de uso constante, diário e por um tempo mais prolongado, poderá levar a lesões graves, podendo culminar com insuficiência hepática e renal.

Uma aproximação de dose segura utilizada para humanos é baseada na dose do composto que possui ausência de efeitos tóxicos na mais sensível das espécies testadas em estudos toxicológicos pré-clínicos de quatro semanas, usando a NOAEL conforme estabelecido por REIGNER & BLESCH (2002). A dose segura pode ser estimada usando a fórmula $1/10 \times \text{NOAEL} \times 70 \text{ kg} \times 1/10$, onde NOAEL, no nosso estudo, corresponde a menos de 75 mg/kg, já que essa dose ainda demonstrou presença de sinais decorrentes de estimulação de sistema nervoso central. A dose segura pode ser estimada em 42 mg/dia, utilizando cerca de 60mg/kg. Quando comparando a dose segura com a dose usualmente utilizada em preparações domésticas pela população (cerca de 25 mg/dia), pode-se dizer que as pessoas estão utilizando doses com limite de segurança cerca 1/2 vezes menor que a dose segura estimada, o que permite dizer que o uso de *A. subincanum* Mart. deve ser conduzido com cautela.

Os resultados aqui apresentados certamente contribuem para avaliação da segurança desta planta, pois foi possível demonstrar que o extrato etanólico do *A. subincanum* causa hepatotoxicidade e nefrotoxicidade discretas, por via oral. Porém, os efeitos do uso do guatambu como fitoterápico em outras preparações e a segurança do consumo alimentar ainda precisam ser melhor estudadas. É necessário que sejam conduzidos mais estudos toxicológicos pré-clínicos com o extrato etanólico de *A. subincanum*, como estudos de toxicidade crônica e de genotoxicidade. Além disso, obviamente, deverão ser efetuados estudos clínicos para concluir a avaliação da segurança do uso de *A. subincanum*.

REFERÊNCIAS

1. ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R.; **Phytochemistry**, v.19, p.1573-1582, 1980.
2. ALVES, N. M. Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.), **Universidade de Brasília**, 2007.
3. ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Gingko, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v.44, n.4, p.824-835, 2001.
4. BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed., p. 57-68, 2003.
5. BEUTLER, A. N.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; FERREIRA, M. M.; PEREIRA FILHO, I. A.; CRUZ, J. C. Agregação de Latossolo Vermelho distrófico típico relacionado com o manejo na região dos cerrados no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.129-136, 2001.
6. BOURDY, G.; CHAVEZ DE MICHEL, L. R.; ROCA-CULTHARD, A. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.269-277, 2004.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº89 de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado". **Diário Oficial da União Poder; Executivo**. Brasília, DF. 11 de Dezembro de 2008.
8. BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, p.376, 2004.
9. CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D.; Floristic Inventory of Tropical Countries: The Status of Plant systematics, Collections, and Vegetation, plus Recommendations for the Future. **NY Botanical Garden**: New York, 1989.

10. CARLINI, E. A, MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; BARBOSA, V. P. Toxicologia pré - clínica da Espinheira - Santa (*Maytenus ilicifolia*). In **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* e outras)** CEME, Brasília, 1988.
11. COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3ª. ed. São Paulo: Manole, p.566, 1984.
12. CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: A biogenetic approach**. John Wiley & Sons, New York, p.1055, 1981.
13. CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R.M.S. Avaliação do risco. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed., 2003.
14. DE LA CRUZ, M.G.F. - **Plantas Medicinais Utilizadas por Raizeiros: Uma Abordagem Etnobotânica no Contexto da Saúde e Doença em Cuiabá, Mato Grosso**. Dissertação de Mestrado em Saúde e Ambiente, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá – MT, 1997.
15. DI STASI, L.C. Asteridae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2º ed. São Paulo: Editora UNESP, p.372-93. 2002.
16. DOLABELA, M.F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de E. febrífuga (A.St.Hill.)Juss. Ex. Mart. (Rutaceae) e espécies de Aspidosperma Mart.(Apocynaceae)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, UFMG, p.154, 2007.
17. FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI-FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B.; Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma Ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.99, n.3, p.325-327, 2004.
18. GARCIA-NAVARRO C.E.K.; **Manual de Urinálise Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, p.95, 2005.
19. GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de urinálise veterinária**. São Paulo:

Varela, p.95, 1996.

20. GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M.; **Biochemistry**, Saunders Coll. Publishing: Orlando, 1995.

21. GOLONI, R. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* MARTIUS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 2005.

22. GOMES, S.M.; CAVALCANTI, T.B. Morfologia floral de *Aspidosperma* mart. & zucc. (Apocynaceae). **Acta bot. bras.**, São Paulo, v.15, n.1, 2001.

23. HURST, E. **Poisonous plants of New South Wales**. Plants Committee, NSW, Sydney, 342p. 1942.

24. JÁCOME, R.L.P.; RASLAN, D.S.; DOLABELA, M.F.; LOPES, M.T.P.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B. Atividade citotóxica, tripanosomicida e antitumoral dos extratos das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. Anais. In: **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia– SP, p.56, 1998.

25. JÁCOME, R.L.R.P.; A. B.; RASLAN, D.S.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“pau-pereira”). **Química Nova**. v. 27, n.6, 2004.

26. JOLY, A.B. **Botânica Introdução à taxonomia vegetal**. 12.ed. São Paulo, Companhia. Editora Nacional, Biblioteca Universitária, série 3, Ciências Puras, v.4, 1998.

27. KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. Casarett & Doull's: **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos**. Compêndio. 5. ed., Portugal: Mc Graw-Hill, 2001.

28. KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11º ed. 2006.

29. KOBAYASHI, J; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A-C, novel quaternary indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. **Journal of Organic Chemistry**, v.67, n.18, p.6449-55, 2002.

30. KOETER, H. B. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. **Reprod. Toxicology.**, v. 7, supl. 1, p. 117-123, 1993.
31. LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 181-196, 1999.
32. LOOMIS, M.D.; HAYES, A.W. **Loomis essentials of toxicology**. 4 ed. California: academia press, 1996.
33. LOPES, H. J. J. **O laboratório clínico na avaliação da função renal**. Belo Horizonte: Gold Analisa Diagnóstico Ltda, p.27, 2004. [Apostila].
34. MACLACHLAN, N. J., CULLEN, J. M. Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino. In: Carlton, W.W., McGavin, M.D. **Patologia Veterinária Especial**. 2.ed. Artmed, São Paulo, p.95-131, 1998.
35. MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D. C. & DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Edição Imprensa Universitária - UFV. Viçosa. Minas Gerais. 1995. p.220.
36. MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de Lantana camara (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. Porto Alegre, 120p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001
37. MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology. Letters**, 2003.
38. MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.; ZECHES-HANROT, M.. Antiplasmodial activity of Aspidosperma indole alkaloids. **Phytomedicine**, v.9(2), p.142-145, 2002.
39. NISSENSON, A..R. Acute renal failure: definition and pathogenesis, **Kidney Int Suppl**. v. 66, p.S7-10, 1998.

40. OECD- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, 2001.
41. OELRICHS, P. B.; HILL, M. W.; VALLEY, P. J., MACLEOD, J. K., MOLINSKI, T. F. Toxis tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, 22 (2): 531534, 1985.
42. OLIVEIRA, V.B. FREITAS, M.S.M., MATHIAS, L., BRAZ-FILHO, R., VIEIRA, I.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.11, n.1, p.92-99, 2009.
43. OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n.1, p. 56-67, 2000.
44. OMS/Unicef. Cuidados primários de saúde. **Relatório da conferência Internacional sobre cuidados primários da saúde**, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da Saúde, 1991. 64p.
45. PEREIRA, M.M., JÁCOME, R.L.R.P., ALCÂNTARA, A.F.C., ALVES, B., RASLAN, D.S., Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.4, p.970-983, 2007.
46. PORTO, K.R.A.; HUMBERTO, M.M.S.; SANT'ANA, A. E. G.; SILVA, R.S.; ARGOLO, A.C.M. Alcalóides piridocarbazóis e avaliação da toxicidade de *Aspidosperma subincanum* frente *Artemia salina*, *Biomphalaria glabrata* e *Aedes aegypti*. Anais. In: **XVIII Simpósio de Plantas Medicinai**s do Brasil, Manaus – AM, p. 25, 2004.
47. REIGNER, B.G. & BLESCH K.S. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. **European Journal of Clinical Pharmacology**.

n. 57, p. 835-845, 2002.

48. RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; Effects of some beta-carboline alkaloid on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochemistry Physics**, Part C, v.122, n.1, p.27. 1999.

49. RIZZO, J. A; CAMPOS, I. F. P. E JAIME, M. C. **Utilização de plantas medicinais nas cidades de Goiás e Pirenópolis**. Estado de Goiás, CEGRAF - Editora da Universidade Federal de Goiás, 1997.

50. RIZZO, J. A; MONTEIRO, M. S. R. E BITTENCOURT, C. Utilização de plantas medicinais em Goiânia. In Congresso de Botânica, 36, Curitiba, 1985. Anais. Curitiba, **Sociedade Botânica do Brasil**, vol 2, p 691-714, 1990.

51. ROBERTS, M.F.; WINK, M. **Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications**. New York: Plenum Press, p.486, 1998.

52. SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, p.221, 1998.

53. SANTOS, S.R.; RANGEL, E.T.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R.M.; LOPES, L.; NOLDIN, V.F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; MARTINS, D.T.O. **Toxicological and phytochemical studies of *Aspidosperma subincanum* Mart. stem bark (Guatambu)**. UFMT, 2009.

54. SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p.819-46, 2004.

55. SIMÕES, C.M.O.; SANTOS, S.C.; MELO, J.C.P.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

56. SINK, C. A.; FELDMAN, B. F. **Urinálise e Hematologia Laboratorial para o Clínico de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca Ltda, p.111, 2006.

57. SOARES, A. C., Se não fizer bem, mal também não fará. **Revista Eletrônica de Ciências**, v. 12, 2002.

58. SOUZA, L.G.; LINO, R.C.; GARROTE, C.F.D. Estudo farmacognóstico de *Aspidosperma subincanum* Mart. Apocynaceae. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Goiânia, suplemento v.2, n.2, 2005.
59. SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, 2002.
60. STOKES, W. S. Humane endpoint for laboratory animals used in regulatory testing. **ILAR Journal**, 2002.
61. TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. London: Academic Press, p.327-352, 1997.
62. THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed., Ed Roca, p.582, 2007.
63. TRESVENZOL, L.M.F; PAULA. J.R; RIBEIRO. A.F.; FERREIRA. H.D.; Levantamento das plantas medicinais do estado de Goiás. In: **IV encontro de pesquisadores da UFG**. 1997, Goiânia. Resumos, 1997.
64. VEIGA. J. V. F.; PINTO. A. C.; MACIEL. M. A. M. Medicinal plants: safe cure?. **Química Nova**. V.28, n.3, p.519-528, 2005.
65. YEH, M. M., Nonalcoholic Fatty Liver Disease, in: Saxena, R., **Practical Hepatic Pathology**. A Diagnostic Approach, Elsevier, Philadelphia, p. 435-440, 2011.