

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS DE  
PLANTAS AMAZÔNICAS EM  
CAMUNDONGOS: Estudo em *Abarema*  
*auriculata* e *Symphonia globulifera***

**DANIELA FERNANDES GUSMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Medicina Veterinária  
da Universidade Paulista – UNIP para a  
obtenção do título de mestre em  
Medicina Veterinária.

**SÃO PAULO**

**2011**

**DANIELA FERNANDES GUSMÃO**

**TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS DE PLANTAS  
AMAZÔNICAS EM CAMUNDONGOS: Estudo em *Abarema auriculata*  
e *Symphonia globuifera***

**Dissertação de Mestrado apresentado  
à Universidade Paulista para a Defesa  
do curso de Pós-Graduação em  
Imunopatologia Veterinária**

**Orientador: Profª Dra. Maria Martha Bernardi**

**Colaborador: Profª Dra. Ivana Barbosa Suffredini**

**SÃO PAULO**

**2011**

**DANIELA FERNANDES GUSMÃO**

**TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS DE PLANTAS  
AMAZÔNICAS EM CAMUNDONGOS: Estudo em *Abarema Auriculata*  
e *Symphonia Globulífera***

**Dissertação de Mestrado apresentado  
à Universidade Paulista para a Defesa  
do curso de Pós-Graduação em  
Imunopatologia Veterinária**

**Aprovado em:**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Martha Bernardi  
Universidade Paulista- UNIP**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Ivana Barbosa Suffredini  
Universidade Paulista- UNIP**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Elizabeth Teodorov  
Universidade Federal do ABC**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Martha, pela dedicação em suas orientações, sugestões e apoio prestado, pontos fundamentais na elaboração desta dissertação, me incentivando e colaborando no desenvolvimento de minhas idéias;

Agradeço aos meus Pais e irmão, pelo apoio nesta minha jornada;

Ao Claudinho, por acreditar e ter interesse em minhas escolhas, apoiando-me e esforçando-se junto a mim, para que eu suprisse todas elas;

À professora Ivana, pela preciosa colaboração no período de organização dos dados coletados nos experimentos;

À Michele, pela colaboração na realização dos experimentos que enriqueceram esta pesquisa.



## Resumo

Este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa em bioprospecção implementado pelo Laboratório de Extração da Universidade Paulista (UNIP) com o objetivo de identificar extratos vegetais e novos produtos naturais antitumorais e antibacterianos. Dentre muitos extratos que apresentaram atividade biológica nos modelos *in vitro*, este projeto visou o estudo de dois deles, o extrato orgânico obtido do caule de *Abarema auriculata* (nº689) e o extrato orgânico obtido do caule de *Symphonia globulifera* (nº 1257). Estudos prévios demonstraram que o extrato de *A.auriculata* (EB- 689) apresentou atividade antitumoral contra células de tumor de mama, de sistema nervoso central e de próstata. Já o extrato de *S. globulifera* (EB- 1257) apresenta atividade contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A partir da identificação de extratos ativos *in vitro*, a necessidade de se testar extratos e seus produtos em animais de laboratório é o passo natural a ser seguido. Porém, antes que estudos farmacológicos sejam efetivamente realizados, é importante que alguns estudos toxicológicos sejam feitos, de modo a se caracterizar possíveis efeitos indesejados que podem interferir na atuação farmacológica plena dos compostos ativos. Para tanto, foram selecionados ensaios toxicológicos agudos que proporcionam a observação de efeitos indesejados, caso ocorram, em um número significativo de sistemas fisiológicos de camundongos. Esses ensaios foram feitos em duas etapas. Na primeira executou-se uma prospecção dos efeitos tóxicos de diferentes concentrações do extrato, seus efeitos na atividade geral observada em campo aberto e a resposta em labirinto em cruz elevada. Ao final dessa etapa os camundongos foram necropsiados. Na segunda etapa, investigaram-se os efeitos da dose não letal dos extratos seguida também da observação da atividade geral em campo aberto dos animais.

## ABSTRACT

This study is part of a research project on bioprospecting implemented by the Laboratory of Extraction of Universidade Paulista (UNIP) in order to identify plant extracts and new natural products and antitumor antibiotics. Among these extracts that showed biological activity in vitro models, the present research aimed to study two of them, the organic extract obtained from stem *Abarema auriculata* (No. 689) and the organic extract obtained from the stem of *Symphonia globulifera* (No. 1257). In this respect, previous studies showed that the extract. *A.auriculata* (EB-689) presented antitumor activity against tumor cells in breast, central nervous system and prostate. The extract of *S. globulifera* (EB-1257) shows activity against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. Before the pharmacological studies to be carried out, it is important that toxicological studies be made in order to identify possible unwanted effects that may interfere with the performance of the full pharmacological active compounds. Thus the main objective of the present study was to established the toxicological profile of the EB-689 and the EB-1257 throughout a toxicity test performed in animals using a number of physiological systems of mice. These tests were performed in two steps. The first series of experiments investigated the toxicity of different concentrations of both the extract, its effects on general activity in open field and plus maze. At the end of this stage the mice were autopsied. In the second step, the signs of toxicity and the mice general activity observed in the open field were assessed after the administration of the extracts non-lethal dose.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 01- Relação de letalidade de extratos.....                     | 02 |
| TABELA 02- Metabólitos secundários isolados de <i>Symphonia</i> ..... | 08 |
| TABELA 03- Parâmetros da atividade geral e Sistema Sensorial.....     | 20 |
| TABELA 04- Parâmetros Psicomotores.....                               | 23 |
| TABELA 05- Parâmetros do Sistema nervoso central e autônomo.....      | 25 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 01- Distribuição do gênero <i>Abarema</i> .....                  | 03 |
| FIGURA 02- Delineamento experimental dos experimentos .....             | 31 |
| FIGURA 03 - Delineamento experimental da avaliação da Toxicidade.....   | 32 |
| FIGURA 04 – Latência para morte de camundongos EB-689.....              | 33 |
| FIGURA 05 – Escores de sinais de toxicidade EB-689.....                 | 36 |
| FIGURA 06 – Escores de sinais de toxicidade EB-689.....                 | 37 |
| FIGURA 07 – Escores de sinais de toxicidade EB-689.....                 | 38 |
| FIGURA 08 – Escores de sinais de toxicidade EB-689.....                 | 39 |
| FIGURA 09 – Frequência de locomoção em campo aberto EB-689.....         | 41 |
| FIGURA 10 – Frequência de levantar em campo aberto EB-689.....          | 42 |
| FIGURA 11– Duração de imobilidade em campo aberto EB-689.....           | 43 |
| FIGURA 12– Frequência de limpeza de face em campo aberto EB-689.....    | 44 |
| FIGURA 13– Frequência de defecação em campo aberto EB-689.....          | 45 |
| FIGURA 14– Nº de entradas no braço aberto no Labirinto EB-689.....      | 47 |
| FIGURA 15– Tempo no braço aberto no Labirinto EB-689.....               | 48 |
| FIGURA 16– Nº de entradas no braço fechados no Labirinto EB-689.....    | 49 |
| FIGURA 17– Nº de cruzamentos no centro do Labirinto EB-689.....         | 50 |
| FIGURA 18– Atividade geral observada na caixa de observação EB-689..... | 52 |
| FIGURA 19– Sinais sensoriais EB-689 na dose não letal.....              | 53 |
| FIGURA 20– Sinais psicomotores EB-689 na dose não letal.....            | 55 |
| FIGURA 21– Sinais ligados ao SNA EB-689 na dose não letal.....          | 57 |
| FIGURA 22– Atividade geral campo aberto EB-689 na dose não letal.....   | 59 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 23– Latência para morte de camundongos EB-1257.....               | 60 |
| FIGURA 24 – Escores de parâmetros psicomotores EB-1257.....              | 62 |
| FIGURA 25 – Escores de sinais de sensoriais EB-1257.....                 | 63 |
| FIGURA 26 – Escores dos parâmetros ligados ao SNC EB-1257.....           | 64 |
| FIGURA 27 – Escores dos parâmetros ligados ao SNA EB-1257.....           | 65 |
| FIGURA 28 – Frequência de locomoção em campo aberto EB-1257.....         | 67 |
| FIGURA 29 – Frequência de levantar em campo aberto EB-1257.....          | 68 |
| FIGURA 30– Duração de imobilidade em campo aberto EB-1257.....           | 69 |
| FIGURA 31– Frequência de limpeza de face em campo aberto EB-1257.....    | 70 |
| FIGURA 32– Frequência de defecação em campo aberto EB-1257.....          | 71 |
| FIGURA 33– Nº de entradas no braço aberto no Labirinto EB-1257.....      | 73 |
| FIGURA 34– Tempo no braço aberto no Labirinto EB-1257.....               | 74 |
| FIGURA 35– Nº de entradas no braço fechados no Labirinto EB-1257.....    | 75 |
| FIGURA 36– Nº de cruzamentos no centro do Labirinto EB-1257.....         | 76 |
| FIGURA 37– Atividade geral observada na caixa de observação EB-1257..... | 78 |
| FIGURA 38– Sinais psicomotores EB-1257na dose não letal.....             | 79 |
| FIGURA 39– Sinais sensoriais EB-1257na dose não letal.....               | 81 |
| FIGURA 40– Sinais ligados ao SNC EB-1257 na dose não letal.....          | 83 |
| FIGURA 41– Sinais ligados ao SNA EB-1257 na dose não letal.....          | 85 |
| FIGURA 42– Atividade geral campo aberto EB-1257 na dose não letal.....   | 87 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                                | 01 |
| 1.1 Sobre a <i>A.Auriculata</i> (fabaceae, mimosoidae) EB-689.....                                               | 02 |
| 1.2 Sobre a <i>S. Globulífera</i> (clusiaceae) EB-1257 .....                                                     | 05 |
| 1.3 Estudos Toxicológicos e seu contexto na descoberta de novos<br>Fármacos a partir de Plantas Brasileiras..... | 14 |
| 2 OBJETIVOS.....                                                                                                 | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                                                                          | 17 |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                                                                                   | 17 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                                       | 18 |
| 3.1 Animais.....                                                                                                 | 18 |
| 3.2 Técnicas de Coleta de Extração.....                                                                          | 18 |
| 3.3 Procedimentos .....                                                                                          | 19 |
| 3.3.1 Toxicidade Aguda.....                                                                                      | 19 |
| 3.3.2 Teste do Campo Aberto.....                                                                                 | 28 |
| 3.3.3 Labirinto em Cruz Elevado.....                                                                             | 28 |
| 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                                                                                 | 30 |
| 4.1Prospecção da Toxicidade dos EB-689 e EB-1257.....                                                            | 30 |
| 4.2 Avaliação da Toxicidade Aguda da Dose não letal dos EB-689 e EB-<br>1257.....                                | 32 |
| 5 RESULTADOS.....                                                                                                | 33 |
| 5.1 Experimento 1: Prospecção da Toxicidade do EB-689.....                                                       | 33 |
| 5.2 Experimento 2: Necropsia dos animais tratados com o EB-689.....                                              | 51 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3 Experimento 3: Avaliação da Toxicidade Aguda não letal do EB-689.....  | 51 |
| 5.4 Experimento 4: Prospecção da Toxicidade do EB-1257.....                | 60 |
| 5.5 Experimento 5: Necropsia dos animais tratados com o EB-1257.....       | 77 |
| 5.6 Experimento 6: Avaliação da Toxicidade Aguda não letal do EB-1257..... | 78 |
| 6 DISCUSSÃO.....                                                           | 88 |
| 7 CONCLUSÃO.....                                                           | 97 |
| 8 BIBLIOGRAFIA .....                                                       | 99 |

## 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa em bioprospecção implementado pelo Laboratório de Extração da Universidade Paulista (UNIP) com o objetivo de identificar extratos vegetais e novos produtos naturais antitumorais e antibacterianos.

Dentre muitos extratos que apresentaram atividade biológica nos modelos *in vitro*, este projeto visou o estudo de dois deles, o extrato orgânico obtido do caule de *Abarema auriculata* (nº689) e o extrato orgânico obtido do caule de *Symphonia globulifera* (nº 1257). Estudos prévios demonstraram que o extrato de *A.auriculata* (EB- 689) apresentou atividade antitumoral contra células de tumor de mama, de sistema nervoso central e de próstata (Suffredini *et al*, 2006). A tabela 1 mostra a relação dos índices de letalidade obtidos dos extratos testados a uma concentração de 100 µg/mL em células tumorais humanas. O extrato de *S. globulifera* (EB-1257) apresenta atividade contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (Suffredini *et al.* , 2007a ; Suffredini *et al.* , 2006) .

Os extratos selecionados foram obtidos de espécies vegetais cujo montante de informações relacionadas com estudos farmacológicos, toxicológicos ou fitoquímicos são limitados ou inexistentes. Nesses relatos da literatura, as espécies citadas neste projeto são pouco estudadas, havendo necessidade de se tomar como referência estudos realizados com plantas próximas em termos taxonômicos.

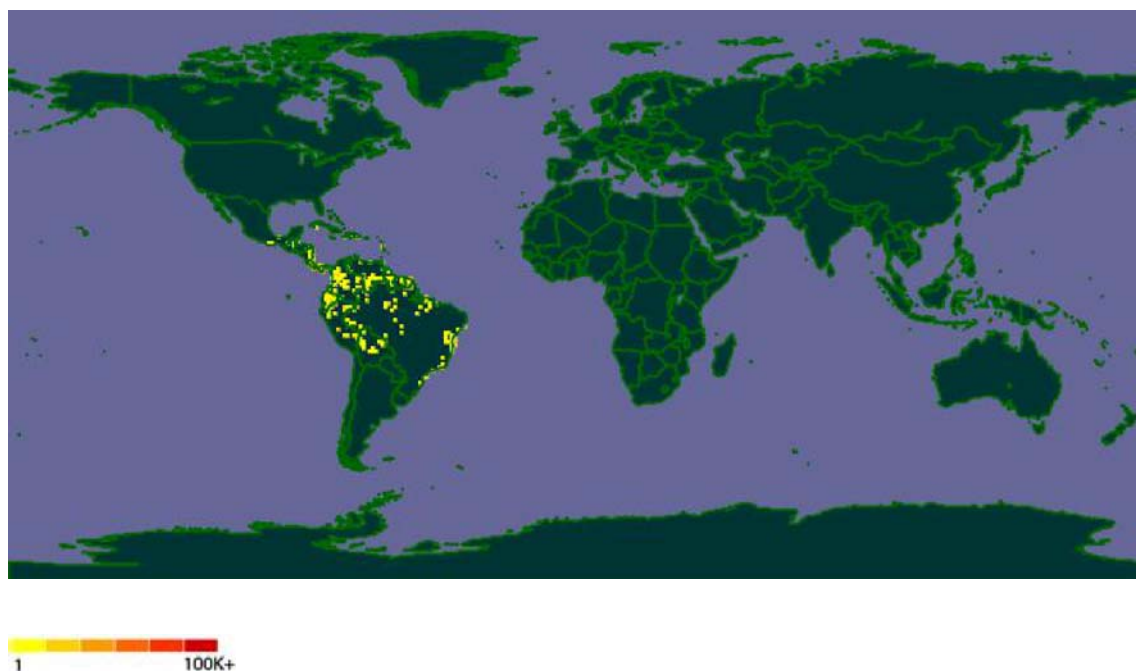


**Tabela 1.** Relação de letalidade de extratos da *Simphonia globulifera* e *A.auriculata* em células tumorais humanas de mama, próstata e no sistema nervoso central.

|                              | Mama                         | Próstata                     | Sistema nervoso central   |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| <i>A.auriculata</i>          | Não ativo                    | -32,66                       | -24,69                    |
| <i>Symphonia globulifera</i> | -10,38                       | Não ativo                    | Não ativo                 |
| Referências bibliográficas   | (Suffredini et al. 2007a)    | (Suffredini et al. 2006)     | (Suffredini et al. 2007b) |
|                              | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                           |
| <i>A.auriculata</i>          | Não ativo                    | Não ativo                    |                           |
| <i>Symphonia globulifera</i> | 40 µg/mL (MIC=MBC)           | 40 µg/mL (MIC=MBC)           | (Suffredini et al. 2006)  |

### 1.1 Sobre a *A.auriculata* (fabaceae, mimosoidae) EB- 689

*Abarema* é um gênero de grandes árvores pertencentes à família Fabaceae. São espécies tropicais distribuídas pela América até o México (*Abarema idiopoda*) e Bolívia. A maioria das espécies é encontrada na bacia Amazônica e nas terras altas da Guiana. Têm folhagem verde escura com folhas bipinadas. De acordo com a revisão do Barneby e Grimes (1996) e Giuliatti *et al.* (2005) o gênero inclui cerca de 45 espécies. A distribuição geográfica da *A. auriculata* encontra-se na figura abaixo.



**Fig.1** Distribuição do gênero *Abarema* (pontos amarelos).

<http://www.barcodinglife.com/views/taxbrowser.php?taxid=209502>

Segundo os trabalhos de Iganci e Morim (2009) e Lewis e Rico-Arce (2005), a família Leguminosae Adans compreende cerca de 730 gêneros e 19.400 espécies. No Brasil, existem cerca de 176 gêneros e 3.200 espécies de Leguminosae (Giulietti *et al.* 2005). Estudos filogenéticos demonstram a existência de monofiletismo da família, adotando-se a classificação tradicional em três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae). No tratamento mais recente para Leguminosae (Lewis *et al.* 2005), Mimosoideae abrange quatro tribos: Acacieae Dumort., Ingeae Benth., Mimoseae Bronn e Mimozygantheae Burkart. A tribo Ingeae é caracterizada por numerosos estames com filetes unidos em tubo; os frutos são, na grande maioria, do tipo legume e apresentam adaptações a diferentes agentes dispersores (Bentham 1865). No mais recente tratamento da tribo Ingeae (Lewis *et al.* 2005), são reconhecidos 36 gêneros (24 destes endêmicos do Novo Mundo) e 935 a 966 espécies, distribuídos nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. O Brasil estima-se que existam 16 gêneros e cerca de 327 espécies.

O gênero *Abarema* é reconhecido como gênero monofilético (Grimes, 1995), posicionado na tribo Ingeae, no grupo denominado "Abarema-alliance". Na flora brasileira são citadas 30 espécies com centros de diversidade na Floresta Amazônica e na Floresta Pluvial Atlântica (Barneby & Grimes 1996; Iganci & Morim, 2009).

Com relação a sua classificação, não é citada na Flora Brasiliensis. *A. auriculata* da Amazônia é classificada no Herbário Neotrópica como do gênero Fabaceae No International Legume Database and Information Service (ILDIS)- <http://www.ildis.org> - é classificada entre as Leguminosae (Fabaceae): Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Ordem: Fabales, Família: Fabaceae, Subfamília: Mimosoideae, Tribo: Ingeae, Gênero: *Abarema*

*A. auriculata* não apresenta estudos fitoquímicos ou farmacológicos. Os extratos metanólico (EM) e aquoso quente (AQ) e aquoso frio (AF) da casca do caule de *A. cochliacarpus* foram avaliados quanto à atividade antinociceptiva, obtendo-se como resultados de 68%, 73% e 39%, respectivamente, e as análises fitoquímicas qualitativas revelaram resultados positivos para saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas (SILVA et al 2009).

Para a subfamília Mimosoideae relata-se a presença de lectinas em *Parkia platycephala* (Gallego del Sol et al., 2002), a presença de saponinas triterpenóides inibidoras da ativação de NF- $\kappa$ B (Haridas et al., 2001) e supressoras de mutações em H-ras e aneuploidia em modelo experimental com carcinogênese em pele murina (Hanausek et al., 2001). Uma das espécies mais estudadas a *A. cochliacarpus*, popularmente denominada de barbatimão, é uma planta nativa brasileira, encontrada, principalmente, na Mata Atlântica. A decocção de casca do caule é usada frequentemente como medicamento tradicional para cicatrização de feridas, como analgésico, anti-inflamatório, antisséptico e para o tratamento de leucorreia, entre outros usos (Agra et al. 2008; Silva 2006). A solução aquosa do extrato alcoólico da casca reduz a

lesão gástrica (Silva 2003) e o extrato hidroalcoólico da casca apresenta atividade antimicrobiana (de Araujo *et al.* 2002; Santos *et al.* 2007). Nesses extratos sugeriu-se a presença de taninos, triterpenoides e catequinas.

Silva *et al.* (2009) identificaram atividade antinociceptiva dos extratos aquosos e metanólico produzidos com a casca do caule de *A.cochliacarpus*, uma espécie da Mata Atlântica com diversas indicações populares. Ambos os extratos apresentam atividade analgésica quando avaliados pelo teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético via intraperitoneal, apresentando respostas superiores às drogas usadas como referência, bem como no modelo da dor induzida por capsaicina. A avaliação fitoquímica desses extratos demonstrou a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenois e antraquinonas.

## 1.2 Sobre a *S. Globulifera* (Clusiaceae) EB- 1257

*S. globulifera* é uma árvore tropical com uma história que remonta a cerca de 45 milhões de anos, na África. É uma árvore de copa de florestas tropicais primárias em todo o Neotrópico e África, apesar de seus 17 congêneres serem restritos a Madagascar. Recebe a denominação de Anani, na Amazônia e Guanandi, no Sudeste do Brasil. É considerada um fóssil vivo em estudo genético de dispersão realizado por Dick & Heuertz (2008).

É classificada pela Flora Brasiliensis (Suppl. pl. 302 1781 ,1782] em: fam. Guttiferae (Clusiaceae); subfam. Clusioideae; trib. Moronobae; Symphonia L.f.; *S. globulifera* Linn .f.

Pode ser identificada no campo pela combinação de folhas opostas simples, látex amarelo brilhante e raízes aéreas. Há alguma variação morfológica nas regiões Neotropicais, embora a *S. globulifera* normalmente se apresente como grande árvore do dossel. Em algumas populações na Costa Rica aparecem apenas como arvoretas em sub-bosque com um tamanho adulto reprodutivo de menos de 10 cm diâmetro à altura do peito (DAP). Na Guiana Francesa, apresenta-se

como árvores grandes, folhas e flores grandes com a forma comum, e é tratada como espécie separadas por trabalhadores locais. Nada disto foi ainda considerado suficiente para merecer uma divisão de variação morfológica de *S. globulifera* em mais de uma espécie Neotropical (Dick & Heuertz 2008), a espécie é hermafrodita com flores vermelhas brilhantes, visitadas por macacos e pássaros bananaquits (*Coereba flaveola*). Os morcegos parecem ser o principal agente de dispersão, embora os pássaros, macacos e até mesmo os ruminantes foram relatados como potenciais vetores (Aldrich *et al.* 1998). Possui um néctar servindo de alimentação para as aves, incluindo beija-flores, que polinizam as pequenas flores vermelhas (Dick & Heuertz 2008). Já se detectou destruição maciça dessa planta em algumas áreas por macacos da espécie *Ateles geoffroyi* (Riba-Hernandez *et al.* 2005).

O gênero de *Symphonia* tem fósseis, morfológicamente distintos de pólen utilizados pela indústria do petróleo em estudos estratigráficos. Por esse motivo, registra-se um grande número de amostra de fósseis de *S. globulifera* na África e nos países neotrópicos. Os fósseis combinados e provas de DNA indicam que *S. globulifera* migrou da África para a região neotropical através de dispersão. As primeiras evidências aparecem em depósitos em meados do Eoceno na Nigéria. Depois de um registro de fósseis de 30 milhões de anos na África equatorial, o pólen desse gênero apareceu abruptamente nos sedimentos do Mioceno ao largo da costa da Venezuela e Brasil. Foi, também, relatada a partir de meados do Plioceno em sedimentos do México e Sudeste Costa Rica . Além disso, em particular, o estudo de *S. globulifera* sugere que populações de árvores da floresta tropical são mais diferenciadas na América Central do que em escalas espaciais semelhantes na bacia amazônica (Dick & Heuertz 2008).

Partes dessa planta ou a própria planta são empregadas medicinalmente. Por exemplo, nas províncias do sul e do leste de Camarões, é utilizada como laxante para as mulheres grávidas e um tônico geral (Nkengfack *et al.* 2002). Nesse caso, os autores isolaram e

caracterizaram dois novos derivados de xantona com grupos isoprenoides nomeado globulixantonas A e B no extrato da casca da raiz dessa planta extraído com cloreto de metileno-metanol (1:1)). Para afecções cutâneas, foram encontrados os seguintes dados: - Clusiaceae: *Vismia macrophylla* Kunth (AL-05), (a) local de coleta: Bacia do Médio Caquetá, (b) Nome comum: Lacre, nome Uitoto: Yiikoai (Yii = que muda de cor; -Al = árvore de pequeno porte). As folhas levemente torradas são utilizadas como um curativo sobre acidentes ofídicos e colocado em cima das feridas. A casca é usada externamente, no tratamento de infecções cutâneas, enquanto a resina é usada para a condição conhecida como "carate", e a seiva é usada no tratamento de problemas relacionados com a visão. A decocção da casca é esfregada sobre a pele para o tratamento da leishmaniose cutânea (Lopez *et al.* 2001).

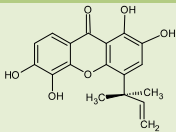
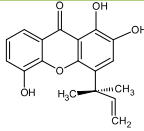
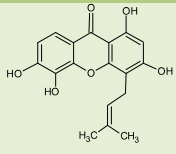
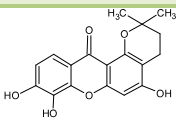
Espécies de *Symphonia*, encontradas em várzeas de florestas tropicais, já foram amplamente investigadas fitoquimicamente e quanto aos seus efeitos biológicos (Marti *et al.* 2010) detectaram do extrato etil-acetato da casca das raízes da *S.globulifera*, grande atividade antimalárica (97% a 10µg/mL). A investigação fitoquímica desse extrato levou ao isolamento de nove compostos do tipo acilfloroglucinois poliprenilados policíclicos (PPAPs) e dois derivados oxidados. Todos compostos apresentaram atividade antimalárica com concentração inibitória 50% variando de 2,1 A 10,1 Mm. Ngouela *et al* (2006) detectaram também atividade antimalárica em uma xantona denominada gaboxantona, isolada da casca da semente de *S. globulifera*, junto com outros conhecidos, como sistosterol, ácido oleanólico e citrato de metila. A estrutura do composto foi determinada como 5,10-dihidroxi-8,9-dimetoxi-2,2-dimetil-12-(3-metilbut-2-enil) pirano [3,2-b]xanten-6(2H)-ona, por meio de análises espectroscópicas. Bayma *et al.* (1998) isolaram da casca da raiz de *S. globulifera* uma nova xantona prenilada, ananixantona. Nkengfack *et al.* (2002), usando fracionamento biodirecionado do extrato da casca da raiz de *S. globulifera*, isolaram estigmasterol e duas novas xantonas com unidades isoprenoides,

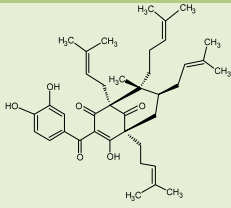
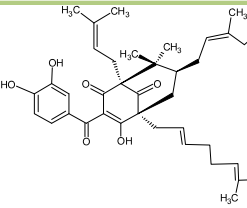
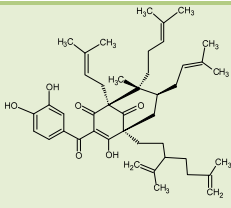
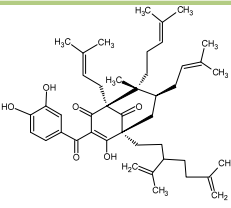
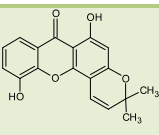
denominadas globulixantonas A (1) e B (2). As estruturas desses compostos foram elucidadas por espectroscopia e em outras apresentaram citotoxicidade significativa contra células KB.

Estudos realizados pelo grupo demonstram que esses extratos apresentaram atividade biológica em modelos *in vitro* contra células tumorais e contra bactérias patogênicas. A identificação dos compostos responsáveis por tal atividade, assim como informações a respeito da toxicidade do extrato ainda não foram descritos.

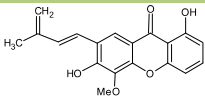
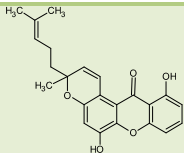
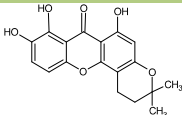
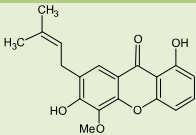
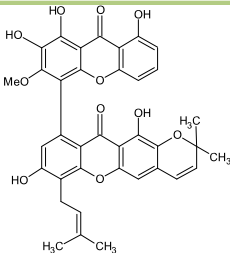
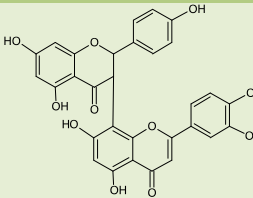
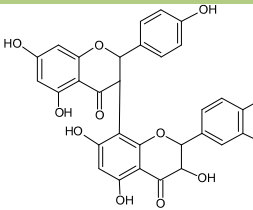
A tabela a seguir apresenta uma revisão química e farmacológica do gênero.

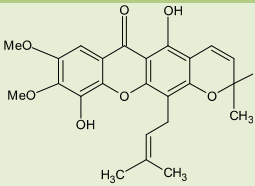
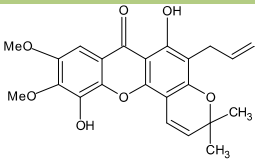
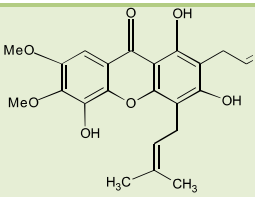
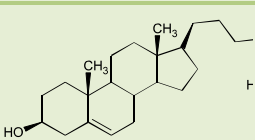
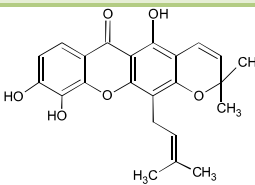
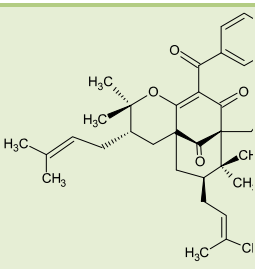
**Tabela 2.** Metabólitos secundários isolados de *Symphonia globulifera*.

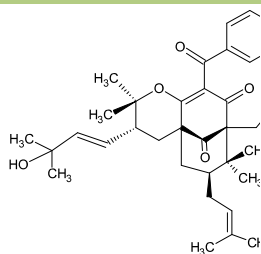
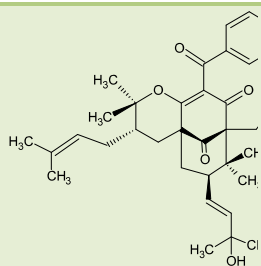
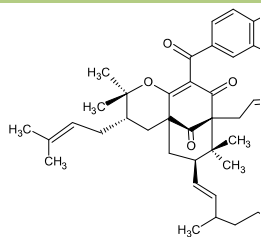
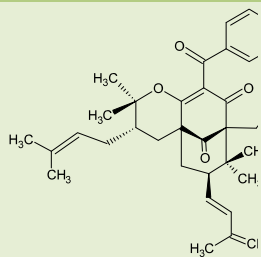
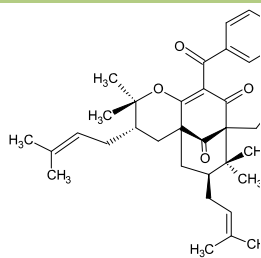
| Substância                                                                          | Nome          | Parte   | Referência                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------|----------------------------------------------|
|  | Simfoxantona  | madeira | LOCKSLEY<br>et al 1966a<br><br>LI et al 2002 |
|  | Globuxantona  |         |                                              |
|  | Ugaxantona    | madeira | LOCKSLEY<br>et al 1966b                      |
|  | Mbarraxantona |         | LOCKSLEY<br>et al 1966c                      |

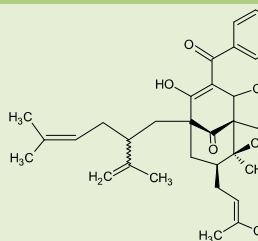
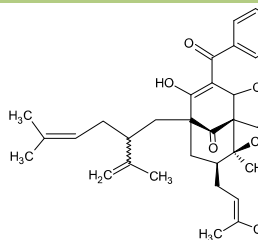
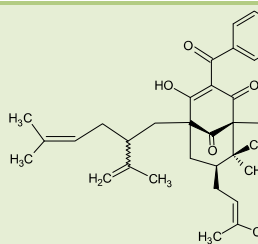
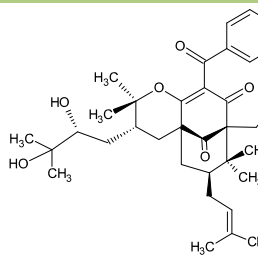
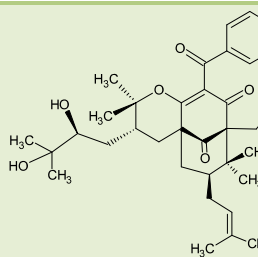
|                                                                                     |               |                        |                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|    | Guttiferona A | Raízes                 | GUSTAFSO<br>N et al 1992                                                         |
|                                                                                     |               | Cascas das<br>sementes | NGOUELA<br>et al 2006                                                            |
|                                                                                     |               | Folhas                 | LENTA et al<br>2007                                                              |
|    | Guttiferona B | Raízes                 | GUSTAFSO<br>N et al 1992                                                         |
|  | Guttiferona C |                        |                                                                                  |
|  | Guttiferona D |                        |                                                                                  |
|  | Ananixantona  | Casca                  | GUSTAFSO<br>N et al 1992<br><br>NGOUELA<br>et al 2006<br><br>LENTA et al<br>2007 |

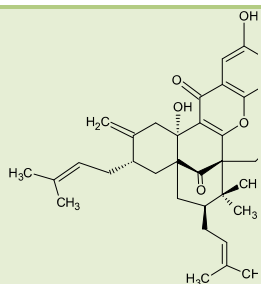
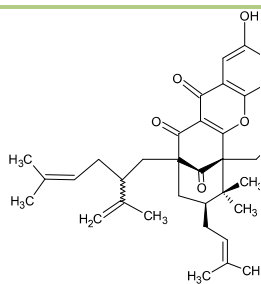


|                                                                                     |                     |                     |                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
|    | Globulixantona<br>A | Casca de<br>raízes  | NKENGFAC<br>K et al<br>2002a |
|    | Globulixantona<br>B |                     |                              |
|    | Globulixantona<br>C | Cascas da<br>raízes | NKENGFAC<br>K et al<br>2002b |
|    | Globulixantona<br>D |                     |                              |
|   | Globulixantona<br>E |                     |                              |
|  | Morelloflavona      | Folhas              | LI et al 2002                |
|  | GB-2                |                     |                              |

|                                                                                     |                        |                     |                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|
|    | Gaboxantona            | Cascas das sementes | NGOUELA et al 2006 |
|    | Simfonin               |                     |                    |
|    | Globuliferin           |                     |                    |
|  | Sitosterol             | Casca das sementes  | NGOUELA et al 2006 |
|  | Xantona V <sub>1</sub> | Folhas              | LENTA et al 2007   |
|  | 7-epi-isogarcinol      |                     |                    |







### 1.3 Estudos Toxicológicos e seu Contexto na Descoberta de Novos Fármacos a partir de Plantas Brasileiras

Para que os ensaios farmacológicos possam ser realizados com segurança e responsabilidade ética, é imprescindível que alguns estudos toxicológicos devem ser feitos de antemão, de modo a se dar início ao estabelecimento da dose terapêutica. Um dado de importância é a dose letal 50%, que hoje é protagonista de discussões científicas, éticas e filosóficas.

A necessidade de se estabelecer os parâmetros toxicológicos de uma nova droga de qualquer natureza, seja vegetal, sintética, seja animal, em animais de laboratório, é uma das condições fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos.

Segundo diretrizes aceitas, como o tratado de Nuremberg e a Declaração de Helsinki (1964, e revisada em 1975), os experimentos em humanos devem ser planejados e precedidos por experimentos realizados em animais, por outro lado, grupos de manifestantes contra a

utilização de animais em experimentos científicos têm chamado atenção ao fato do uso indiscriminado de animais de laboratório.

Visto que as questões éticas ficaram em evidência, a otimização do uso de animais, assim como a otimização do delineamento experimental baseado em estudos estatísticos, como poder do teste, e mesmo a observação preliminar da tendência de toxicidade, em particular nos experimentos realizados com amostras complexas como extratos vegetais, vêm ao encontro da necessidade de se considerar os três princípios introduzidos por Russel e Burch, em 1959 (Artigo 7 da Diretiva 86/609/EEC), conhecidos como os três Rs: “replacement”, “reduction” e “refinement”, que, quando traduzidos podem significar a recolocação, a redução e o refinamento como direcionadores do delineamento experimental em toxicologia.

A recolocação seria a substituição dos ensaios *in vivo* por experimentos *in vitro* e experimentos baseados em modelos computadorizados. A redução seria a utilização de ferramentas estatísticas para orientar o delineamento experimental, de modo que um número significativo de animais seja utilizado para a pesquisa. Aqui, podem-se introduzir novos protocolos experimentais. E, por último, o refinamento envolve os cuidados necessários para minimizar o desconforto do animal durante os experimentos, desde acomodação adequada, anestesia, analgesia, manter a qualidade do pessoal envolvido na sua manipulação.

Este trabalho envolve não somente a questão ética, como também a questão de se estudar, com fins de se obter um medicamento no futuro, espécies vegetais coletadas de áreas de proteção ambiental brasileiras. Esta breve revisão da literatura deixa claro que as análises referentes às respostas toxicológicas e outras que se possam obter *in vivo* não foram publicadas até o momento, e tais estudos são importantes na estratégia de isolamento de compostos potencialmente úteis em Farmacologia. A partir da identificação de extratos ativos *in*

*vitro*, a necessidade de se testar extratos e seus produtos em animais de laboratório é o passo natural a ser seguido. Porém, antes que estudos farmacológicos sejam efetivamente realizados, é importante que alguns estudos toxicológicos sejam feitos, de modo a se caracterizar possíveis efeitos indesejados que podem interferir na atuação farmacológica plena dos compostos ativos. Para tanto, foram selecionados ensaios toxicológicos agudos que proporcionam a observação de efeitos indesejados, caso ocorram, em um número significativo de sistemas fisiológicos murinos.

Além disso, pouco se conhece sobre as características fitoquímicas desses extratos e seu estudo será estratégico para a definição de compostos ativos nos modelos biológicos selecionados.

O Brasil é o reduto da mais alta biodiversidade mundial e tal riqueza perfaz as bases do desenvolvimento de futuros fármacos quimioterápicos. Esforços como o realizado pela UNIP em conjunto com o Ministério do Meio Ambiente através do Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (Cgen) são importantes para que programas de bioprospecção consigam se estabelecer, fortalecer-se e cujos resultados possam fundamentar continuamente o desenvolvimento intelectual e científico do país. Para tanto, em programa estabelecido pela UNIP há 12 anos, o grupo possui autorização de coleta e de acesso aos recursos genéticos e em conjunto com a FAPESP através de seu incentivo 1999/05904-6 vem realizando estudos iniciais visando os estudos farmacológicos, fitoquímicos e toxicológicos detalhados dos extratos vegetais selecionados como os atuais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar a composição química dos extratos orgânicos de *A.auriculata* e *S. globulifera* e testar sua toxicidade em camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar prospecção dos efeitos tóxicos de diferentes doses dos *A.auriculata* e *S. globulifera* em camundongos.
- Estudar a toxicidade da dose não letal dos extratos orgânicos de *A.auriculata* e *S. globulifera* em camundongos.
- Calcular a DL 50% dos EB-689 e EB-1257 em camundongos



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados 85 camundongos Balb-c, adultos, machos, pesando entre 25 - 30 g provenientes do Biotério de Experimentação Animal da UNIP, do Centro de Pesquisa e Pós-Graduação, mantidos em microisoladores. Essas unidades estavam em laboratório de experimentação de animais com luz controlada (12 h de claro/12 escuro). Os camundongos receberam ração e água *ad libitum* durante todo procedimento experimental, exceto durante os experimentos.

#### **3.2 Técnicas De Coleta E Extração**

As partes das plantas de extratos com atividade biológica significativa foram obtidas e coletadas novamente. A recoleta do material botânico para a produção de extratos é orientada pelos dados obtidos no campo na primeira coleta, incluindo dados de georreferenciamento. Toda e qualquer coleta de plantas realizada pela UNIP é feita somente com autorização do IBAMA e do CGen, órgãos vinculados ao Ministério do Meio Ambiente, que controlam o acesso aos recursos genéticos brasileiros.

Os extratos foram obtidos por maceração e os solventes utilizados foram água estéril (Milli-Q, Millipore) e uma mistura de metanol e diclorometano (1: 1) (Merck). Os extratos aquosos foram liofilizados (freezer Revco -70 °C e liofilizador Virtis) e os orgânicos, evaporados a pressão reduzida (Buchii), antes de serem estocados a -20 °C em câmara fria (Younes et al. 2000). Neste

trabalho foram empregados os extratos do caule da *A.auriculata* (EB-689) e da *S. globulifera* (EB-1257).

### **3.3 Procedimentos**

#### **3.3.1 Toxicidade Aguda**

A toxicidade aguda foi avaliada com base no método proposto por Brito (1994) modificado. Os extratos selecionados foram avaliados quanto à tendência à toxicidade sobre vários sistemas do camundongo, em especial, sobre o sistema nervoso autônomo e central, sistema psicomotor, e outros. Os parâmetros observados foram: atividade geral, irritabilidade, resposta ao toque, aperto de cauda, contorção, trem posterior, endireitamento, tônus corporal, força de agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, estimulações, *straube tail*, sedação, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose e morte (Brito, 1994). Após os animais receberem injeções intraperitoneais dos extratos ressuspensos em óleo de amêndoas doce, foram observados nos intervalos 7-10, 15-20, 25-30, 55-60, 115-120 e 175-180 minutos, e diariamente, por 14 dias consecutivos. Os animais foram necropsiados após morte, ou ao término do período de observação. Os parâmetros dispostos nas tabelas 3,4 e 5 foram avaliados através da análise não paramétrica de Kruskal-Wallis com teste posterior (GraphPad Prism5.0).

**Tabela 3.** Parâmetros da atividade geral e sistema sensorial: descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo Brito (1994).  
O valor base é o apresentado pelo animal do grupo controle.

| Função            | Parâmetro         | Descrição dos sinais de toxicidade.                                                                                                                                                            | Escores atribuídos                                                                                                                                                         |
|-------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Atividade         |                   |                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                            |
|                   | Atividade geral   | Verificar a atividade geral do animal na gaiola moradia após estímulo. Entende-se, como atividade geral, dentre outros comportamentos a presença de locomoção, levantar, farejar e/ ou parado. | 0- não se move<br>1- animal dá um passo.<br>2- animal dá meia volta na caixa de observação.<br>3- animal dá duas voltas na caixa (base)<br>4- animal andando com agilidade |
| Sistema sensorial |                   |                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                            |
|                   | Frêmito vocal     | Observar se há emissão de som sem nenhuma estimulação ou toque.                                                                                                                                | 0- ausente<br>4- presente                                                                                                                                                  |
|                   | Irritabilidade    | Assoprar o animal e tocá-lo levemente para examinar reação.                                                                                                                                    | 0- ausente<br>4- presente                                                                                                                                                  |
|                   | Reflexo auricular | Observar a posição da orelha, quanto mais próxima da cabeça, menor é o reflexo. Estalar dos dedos uma vez e analisar reflexo. Logo após estalar várias                                         | 0- orelha totalmente em pé ausente.<br>1- orelha um pouco mais em pé (base).                                                                                               |

|  |                 |                                                                                          |                                                                                                                                                      |
|--|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |                 | vezes seguidas e observar reflexos                                                       | <p>2-orelha metade em pé.</p> <p>3- orelha colada ligeiramente na cabeça..</p> <p>4- ausente – orelha colada à cabeça.</p>                           |
|  | Aperto de cauda | <p>Apertar com uma pinça a região próxima à ponta da cauda com bastante intensidade.</p> | <p>0- sem reação.</p> <p>1- move-se ligeiramente</p> <p>2- se move mais rápido.</p> <p>3- se move e pula(base).</p> <p>4- se move, pula e corre.</p> |

Tabela 3. Continuação.

| Função            | Parâmetro         | Descrição dos sinais de toxicidade                                                                                           | Escores atribuídos                                                                                                                                                                                       |
|-------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sistema sensorial |                   |                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                          |
|                   | Reflexo Corneal   | Aproximar uma pinça, lentamente, até os olhos do animal, sem encostá-la, e verificar se o animal tem o reflexo de fechá-los. | 0- olhos permanecem abertos.<br>1- quase não se movem.<br>2-se movem um pouco.<br>3- fecha os olhos pela metade na aproximação da pinça.<br>4- fecha os olhos totalmente na aproximação da pinça (base). |
|                   | Resposta ao toque | Tocar o animal com uma pinça num intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e examinar as respostas            | 0- não se move.<br>1- apresenta pouco movimento.<br>2- animal dá um passo.<br>3- anda com dificuldade.<br>4- anda com agilidade (base)                                                                   |

**Tabela 4.** Parâmetros psicomotores : descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo Brito (1994). O valor base é o apresentado pelo animal do grupo controle.

| Psicomotor | Parâmetro      | Descrição dos sinais de toxicidade.                                                                             | Escores atribuídos                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | Contorção      | Movimento vermiforme do corpo.                                                                                  | 0- ausência (base).<br>4- presente.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | Trem Posterior | Verificar se o animal está com a postura normal ou se o trem posterior está caído (intensidade, modo de andar). | 0- ausente (base).<br>1- queda do trem posterior pouco visível.<br>2- queda do trem posterior visível. Animal andando com dificuldade.<br>3- trem posterior visivelmente caído. Animal andando com dificuldade.<br>4- trem totalmente caído. Animal andando com dificuldade, arrastando o trem posterior. |

|  |                           |                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Reflexo de Endireitamento | Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que o animal volta à sua posição normal em até 15 segundos. | 0- não se move.<br>1- volta-se lentamente com dificuldade. 2- volta-se lentamente<br>3- volta-se mais rápido.<br>4- volta-se imediatamente com agilidade (base).                                                                            |
|  | Tônus Corporal            | Verificar sua presença ou não e o grau do mesmo.                                                                               | 0- ausente.<br>4- presente (base).                                                                                                                                                                                                          |
|  | Força de agarrar          | Colocar animal em cima de uma grade e avaliar intensidade em que se segura na mesma.                                           | 0- não se agarra à grade.<br>1- segura inicialmente e larga a barra.<br>2- segura por um tempo mais prolongado, mas solta a barra.<br>3- segura firmemente a barra mas solta a barra.<br>4- segura firmemente a barra e não a solta (base). |

**Tabela 5.** Parâmetros do sistema nervoso central e autônomo; descrição dos sinais de toxicidade e valores dos escores, segundo Brito (1994).  
O valor base é o apresentado pelo animal do grupo controle.

| Sistema nervoso central | Parâmetros   | Descrição do parâmetro                                                             | Escores atribuídos                 |
|-------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                         | Tremores     | Observar se estão presentes ou não e qual a intensidade.                           | 0- ausente (base).<br>4- presente. |
|                         | Convulsões   | Observar a presença ou não (0 – ausência, 1- presença).                            | 0- ausente (base).<br>4- presente. |
|                         | Straube Tail | Verificar se a cauda está normal ou ereta.                                         | 0- normal (base).<br>4- ereta.     |
|                         | Sedação      | Animal quieto, sem movimento, mas se tocado responde ao estímulo e abre os olhos.  | 0- ausente (base).<br>4- presente. |
|                         | Anestesia    | A ausência de resposta a estímulo doloroso com perda do reflexo de endireitamento. | 0- ausente (base).<br>4- presente. |
|                         | Ataxia       | Movimentos descoordenados devido à dismetria (distúrbio de coordenação             | 0- ausente (base).                 |



|                          |            |  |                                                                                                                         |                                                                                                                                                         |
|--------------------------|------------|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          |            |  | dos movimentos por estados de inconsciência e consciência compensatória).                                               | 4- presente.                                                                                                                                            |
| Sistema Nervoso autônomo |            |  |                                                                                                                         |                                                                                                                                                         |
|                          | Ptose      |  | Olho fechado ou semi-fechado mesmo após um estímulo. O animal se locomove ou não, mas continua com as pálpebras caídas. | 0- ausente (base).<br>1-olho ligeiramente fechado.<br>2-olho ligeiramente fechado.<br>3- olho fechado pela metade.<br>4- olho quase totalmente fechado. |
|                          | Lacrimação |  | Presença e grau                                                                                                         | 0- ausente(base).<br>4- presente.                                                                                                                       |
|                          | Micção     |  | Número de micções                                                                                                       | Número de poças de urina.                                                                                                                               |

|  | Defecação  | Número de bolos fecais                   | Número de cíbalas.                                                                                                                                                     |
|--|------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Cianose    | Alteração da coloração da pele - azulada | 0- ausente (base).<br>1- ligeiramente pálido.<br>2- ligeiramente cianótico.<br>3- moderadamente cianótico.<br>4- totalmente cianótico.                                 |
|  | Hipotermia | Diminuição da temperatura corpórea       | 0- ausente (base).<br>1- com ligeira diminuição de temp.<br>2- com leve diminuição de temp.<br>3- com moderada diminuição de temp.<br>4- com grave diminuição de temp. |

### **3.3.2 Teste do Campo Aberto**

O campo aberto empregado foi construído conforme proposto por Broadhurst (1960) e adaptado ao tamanho dos camundongos. Para as observações foram computadas as frequências de locomoção, de levantar e a duração de imobilidade dos animais.

Um animal de cada grupo foi introduzido individualmente no centro do aparelho e observado por 5 minutos em condições de ausência de estímulos externos. A frequência de locomoção foi definida como o número de quadrados que o animal penetrou com as 4 patas e a de levantar pelo número de vezes que o animal ergueu a parte frontal do corpo apoiado apenas nas pernas traseiras. A duração de imobilidade foi medida em segundos sendo computado o valor ao final das observações. Entre a observação de cada animal o campo aberto foi limpo com uma mistura de água e álcool a 5%. Os animais dos grupos controle e experimental foram observados no período da tarde, entre 13:00 e 17:00 horas, intercaladamente para evitar influências circadianas. Os tempos de observação foram de 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185.

### **3.3.3 Labirinto em Cruz Elevado**

A avaliação da ansiedade foi também avaliada no labirinto em cruz elevado, em momento subsequente ao utilizado para observação em campo aberto. Os animais foram colocados no centro do labirinto, limpo previamente com álcool 5%, e foram observados quanto ao número de entradas nos braços abertos e fechados, tempo de permanência nos braços abertos e fechados e

número de cruzamentos no centro. Os tempos de observação foram de 15-20, 35-40, 65-70, 125-130 e 185-190 minutos após a administração dos extratos vegetais. Utilizou-se ANOVA de duas entradas como teste estatístico (GRaphPad Prism 5.0).

## **4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

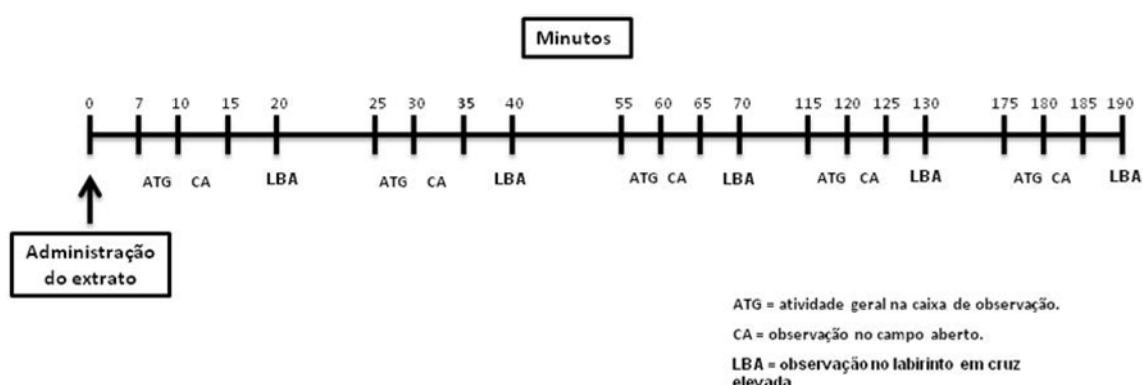
### **4.1 Prospecção da Toxicidade dos EB-689 e EB-1257**

Este experimento teve como finalidade examinar os efeitos tóxicos dos extratos a partir de observação direta dos animais e em modelos comportamentais. O esquema utilizado segue as propostas modernas para análise toxicológica empregando-se 3 animais/dose e observando-se os sinais de toxicidade (Botham 2004). Além disso, nesses experimentos a quantidade de extrato empregada não pode ser elevada, uma vez que há uma limitação na quantidade de plantas a serem coletadas por determinação do Ministério do meio Ambiente.

Empregaram-se diferentes doses dos extratos, iniciando-se com 5 g/Kg; as doses seguintes foram diluições a metade até se atingir a dose que não levasse à morte os animais. Foram injetadas via intraperitoneal (i.p) e foram observados os parâmetros de toxicidade, a atividade geral em campo aberto e o comportamento dos camundongos em labirinto em cruz elevado. Em paralelo aos grupos injetados com os extratos, outros 3 camundongos foram tratados com o veículo do extrato (salina e óleo de amêndoas) e observados da mesma forma que aqueles dos grupos experimentais, sendo tomados então como grupo controle.

As observações dos efeitos tóxicos foram feitas em uma caixa de vidro, de dimensões de 20 x 10 x 15, durante três horas em intervalos regulares segundo a Fig.2, a partir de sete minutos após a administração do extrato bruto e até 190 minutos. Após esse período, observou-se por até 14 dias

consecutivos, a presença ou não de morte, incluindo o dia da experiência. E os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. No final do experimento, os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia e necropsiados, de modo a determinar a *causa mortis* e verificar possíveis alterações macroscópicas em diferentes órgãos.



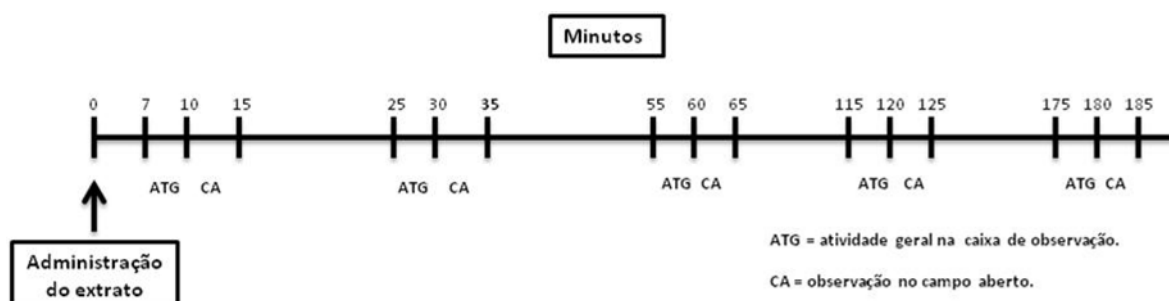
**Fig.2** Delineamento experimental dos experimentos da prospecção da toxicidade dos EB-689 e EB-1257.

Calculou-se a latência em horas para morte das doses letais, e os resultados foram apresentados sob a forma de média e respectivo erro-padrão (Fig.4 e Fig.23). A respeito dos dados da observação geral, os escores atribuídos em cada momento e em cada dose para os três animais foram somados e com esses valores realizou-se uma mediana em que se aplicou uma ANOVA de uma via não paramétrica (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). Nas figuras, os dados são apresentados como média e respectivo erro-padrão. Os dados do campo aberto e labirinto em cruz elevada foram tratados da mesma forma. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os dados.

## 4.2 Avaliação da Toxicidade Aguda da Dose Não Letal dos EB-689 e EB-1257

Quarenta camundongos foram divididos em quatro grupos iguais: dois controles e dois experimentais. Os camundongos dos grupos experimentais receberam a dose não letal dos extratos EB-689 ou EB-1257. Foi observada sua toxicidade e atividade geral em campo aberto da mesma forma que no experimento 1 (Fig.4). Não foram estudados os seus efeitos em labirinto em cruz elevado. No início e ao final dos experimentos os camundongos foram pesados e procedeu-se a necropsia dos animais e retirada dos órgãos para análise histológica.

Nas observações de toxicidade, aplicou-se um teste estatístico não paramétrico (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas). Nos dados de campo aberto, aplicou-se uma ANOVA de duas vias paramétrica seguida pelo teste *post hoc*. Os resultados da toxicidade foram apresentados sob forma de mediana e os de campo aberto sob a forma de média e respectivo erro-padrão. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os dados.

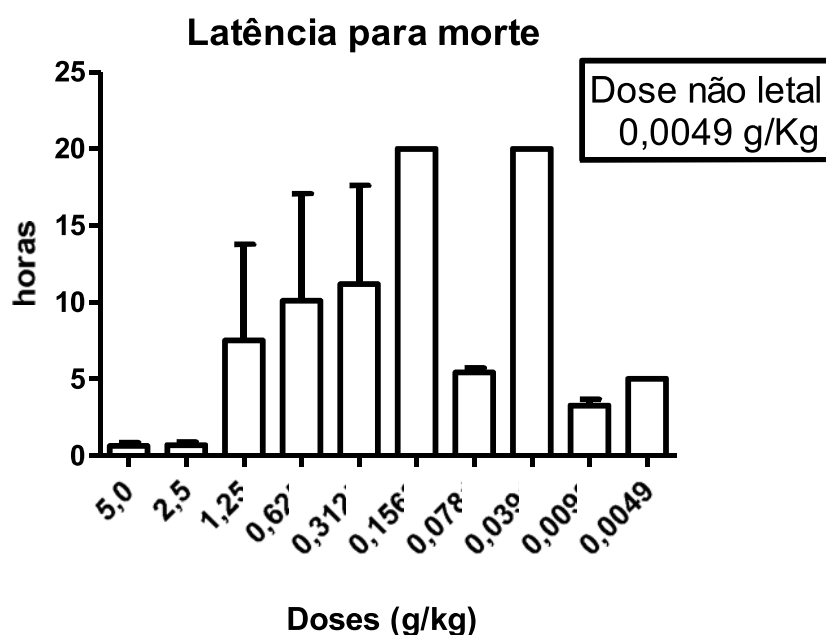


**Fig.3** Delineamento experimental da avaliação da toxicidade aguda da dose não letal dos EB-689 e EB-1257.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento 1: Prospecção da Toxicidade do EB-689

A DL50 do EB- 689 calculada foi de 0,015 g/Kg. A Fig. 4 ilustra os resultados da latência para morte induzida em camundongos tratados com diferentes doses do EB-689. Houve relação dose relação dose resposta na latência para morte até a administração da dose de 0,1563 g/Kg. Nas demais doses houve variação entre as latências para morte não estreitamente relacionada a dose empregada. A dose não letal foi de 0,0049 g/Kg..



**Fig.4** Latência para morte de camundongos tratados com as diferentes doses de EB-689. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão em horas. N= 3 /dose.



As Figs 5-8 ilustram os sinais de toxicidade do EB-689 induzida em camundongos tratados com diferentes doses do extrato. Os parâmetros foram divididos em psicomotores, sensoriais, ligados ao sistema nervoso central (SNC) e autônomo (SNA). A ANOVA de uma via indicou a existência de variações significantes em todos parâmetros psicomotores, sensoriais, ligados ao SNC e SNA entre os resultados do grupo controle e experimentais. Os dados da análise estatística se encontram no anexo 1. Em todos os momentos do experimento não foram observadas respostas positivas para a estimulação e tampouco para ptose.

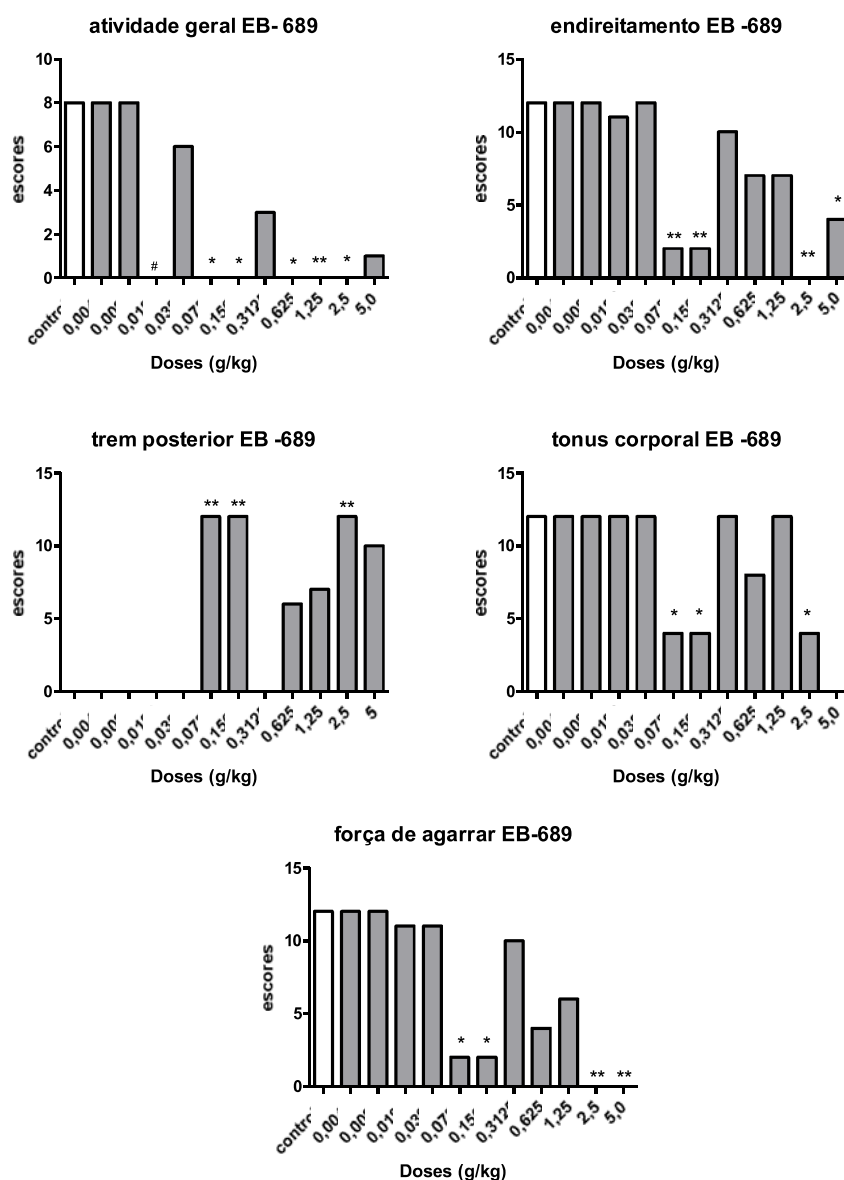
Com relação a atividade geral, verificou-se redução nos escores após a administração de 0,0198, 0,0781, 0,0625, 2,5 e 2,5 g/kg. Houve, também, redução significativa nos escores do reflexo de endireitamento, tônus corporal e força de agarrar com relação ao grupo controle nas doses 0,0781, 0,156, 0,625 e 2,5 g/kg. Observou-se em todos esses parâmetros redução na dose de 5, mg/kg, exceto para a atividade geral e tônus corporal (Fig. 5).

A respeito dos parâmetros sensoriais (Fig.6) verificou-se variações significantes em todos os parâmetros. Nas doses de 0,0781, 0,1563, 1,5, 2,5 e 5,0 g/kg notou-se redução com relação aos animais do grupo controle. O reflexo corneal foi reduzido após a dose de 0,625 g/kg.

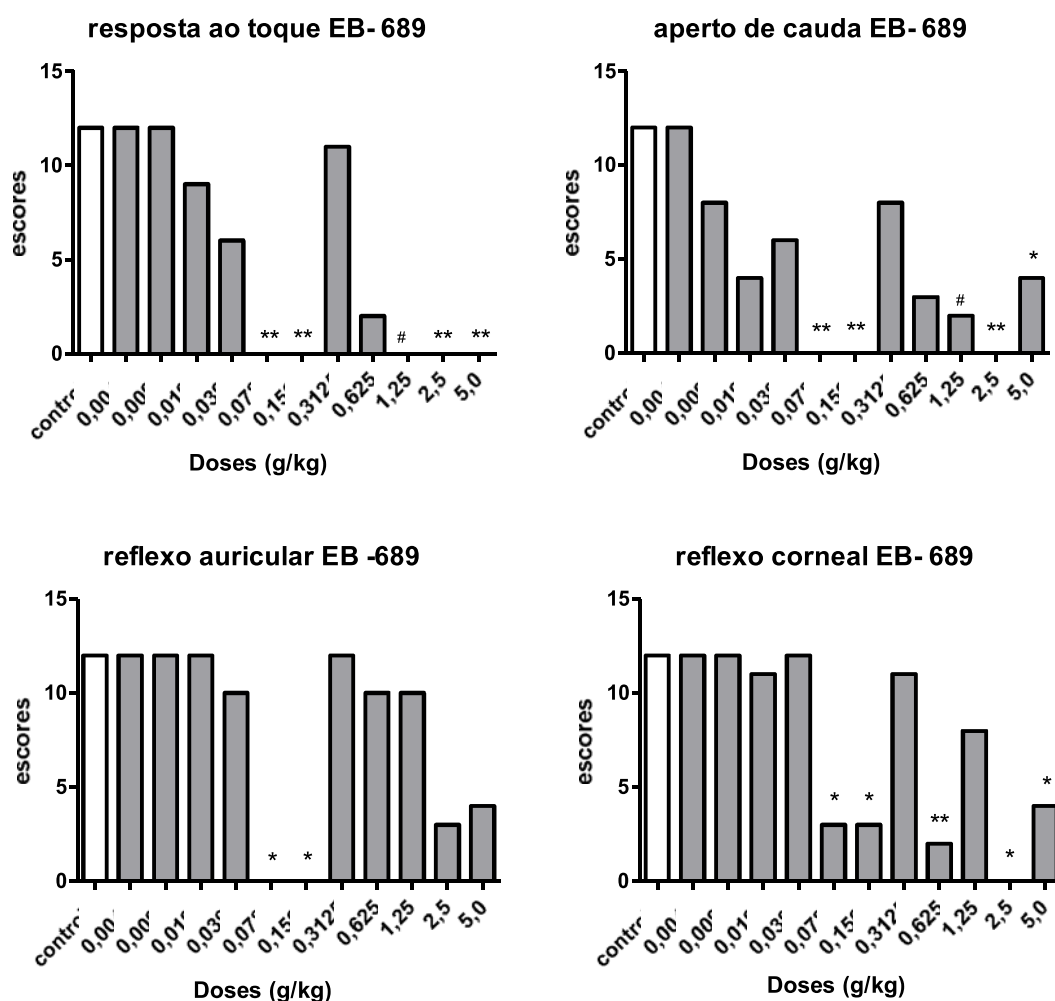
Os parâmetros relativos a ações no SNC foram pouco alterados (Fig.7). A ANOVA de uma via mostrou variações significantes na ataxia e tremores, com aumento significantes em relação aos animais do grupo controle, respectivamente nas doses de 1,25g/kg (ataxia) e 0,0781 e 0,1563

g/kg(tremores). Não se observaram respostas dos dois grupos às estimulações.

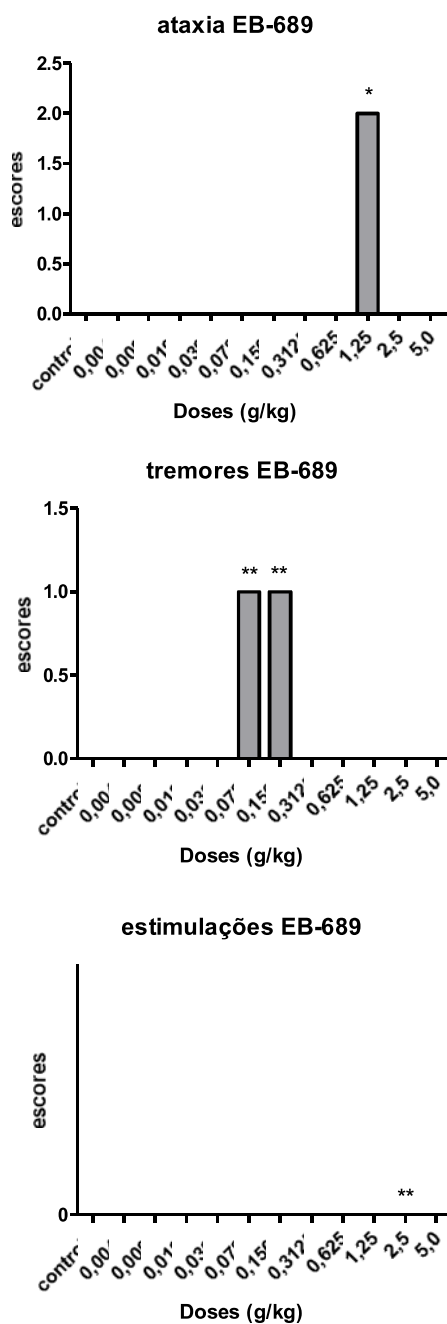
Com relação aos parâmetros ligados ao SNA (Fig.8) notou-se a presença de micção logo nas primeiras doses do EB- 689 de forma similar ao grupo controle; nas demais doses do extrato o parâmetro foi nulo. A defecação foi aumentada em todas as doses do extrato com relação aos animais do grupo controle. A respiração e piloereção foram aumentadas significativamente após as doses 0,0781,0,1563, 2,5 e 5,0 g/kg. A hipotermia foi aumentada significativamente nas maiores doses e a cianose na maioria das doses do EB- 689.Os dados da análise estatística se encontram nos anexos.



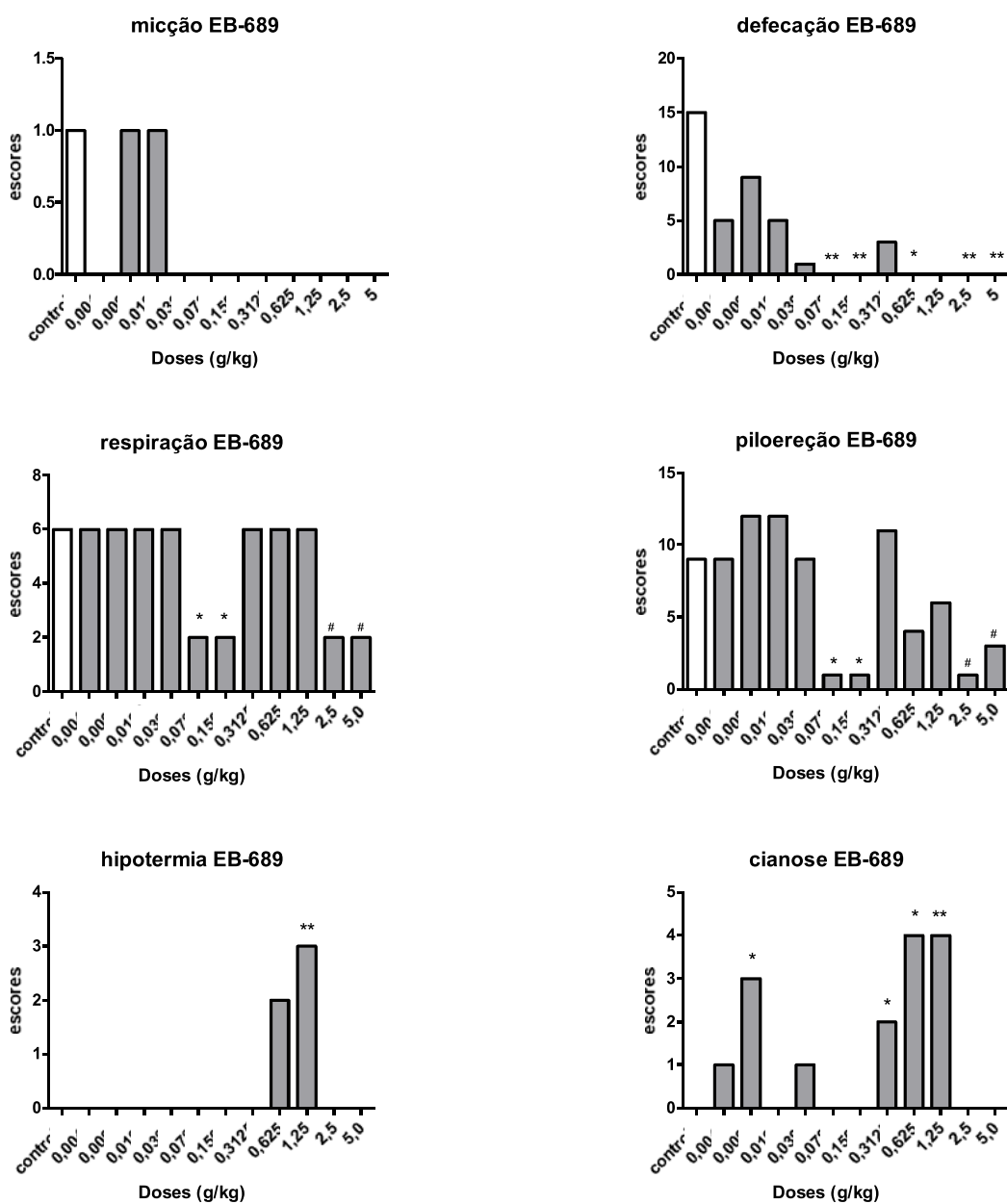
**Fig.5** Escores dos sinais de toxicidade observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-689. São apresentadas as medianas dos dados da atividade geral e dos parâmetros psicomotores. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$ .



**Fig.6** Escores dos sinais de toxicidade observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-689. São apresentadas as medianas dos dados dos parâmetros sensoriais. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$ .

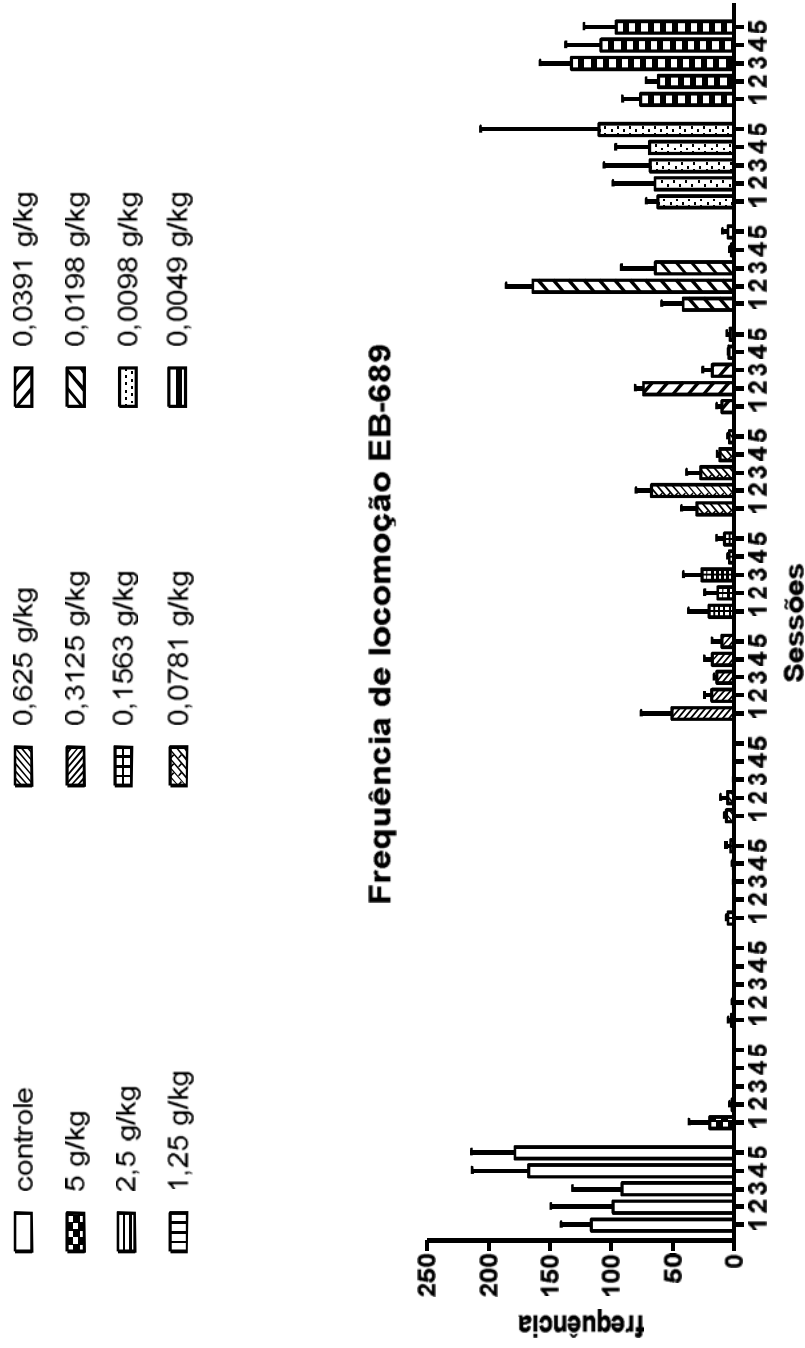


**Fig.7** Escores dos sinais de toxicidade observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-689. São apresentadas as medianas dos dados dos parâmetros ligados ao SNC. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$



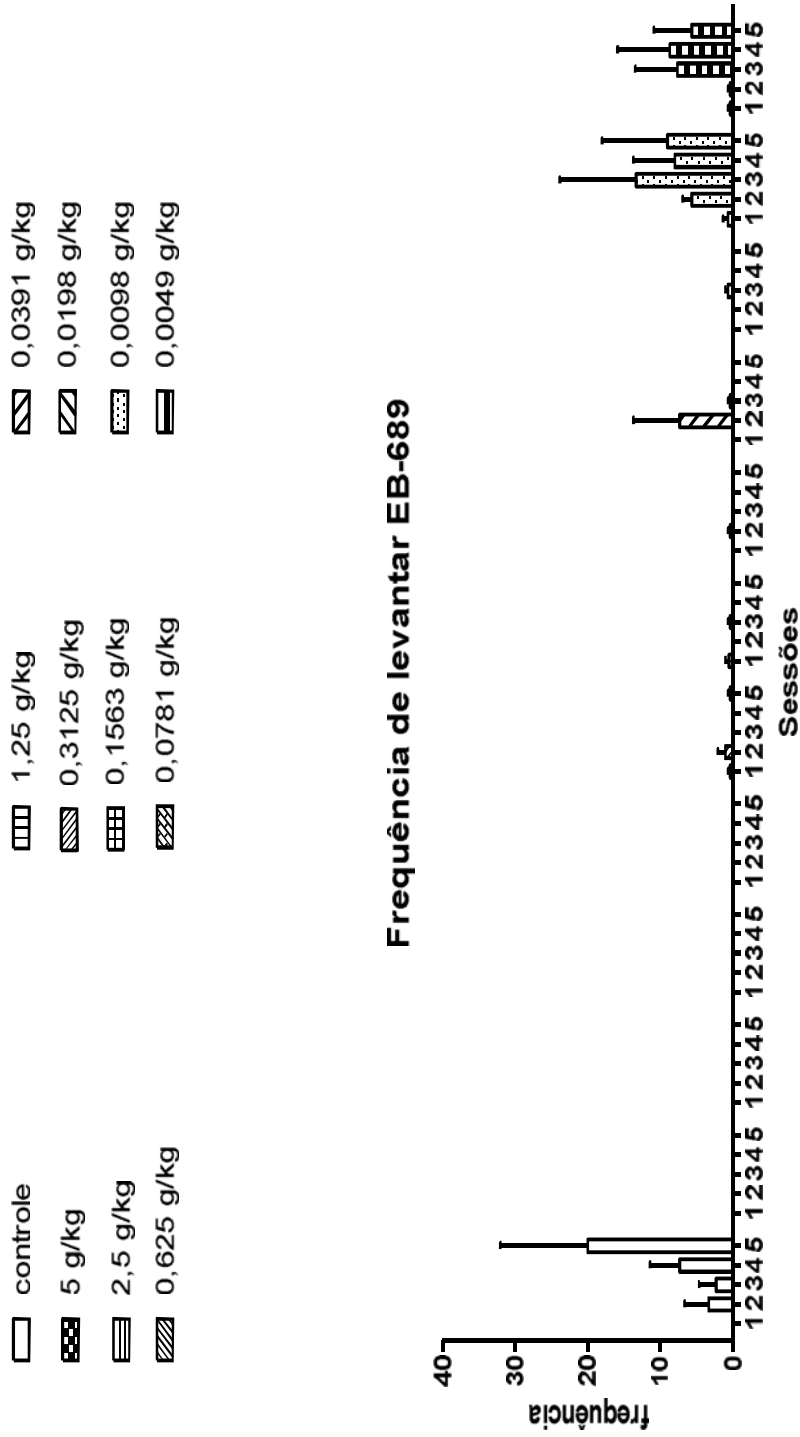
**Fig.8** Escores dos sinais de toxicidade observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-689. São apresentadas as medianas dos dados dos parâmetros ligados ao SNA. ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$ .

As Figs. 9-13 ilustram os resultados da atividade geral observada em campo aberto nas 5 sessões. A ANOVA de duas entradas aplicada às frequências de locomoção ( Fig.8) indicou a existência de diferenças significantes entre os tratamentos, porém não entre as sessões, havendo interação entre ambos (análise estatística em anexo). Na frequência de levantar a ANOVA indicou a existência de diferenças significantes entre os tratamento; não houve diferença estatisticamente significantes entre as sessões e interação entre os dois fatores. Na duração de imobilidade, observaram-se diferenças significantes entre os tratamentos e na interação entre os fatores (Fig.11). Na limpeza de face (Fig.12) e frequência de defecação (Fig.13) foram observadas diferenças significantes entre os tratamentos, mas não entre as sessões e na interação entre os fatores. Os dados estatísticos desse comportamento são apresentados em anexo.

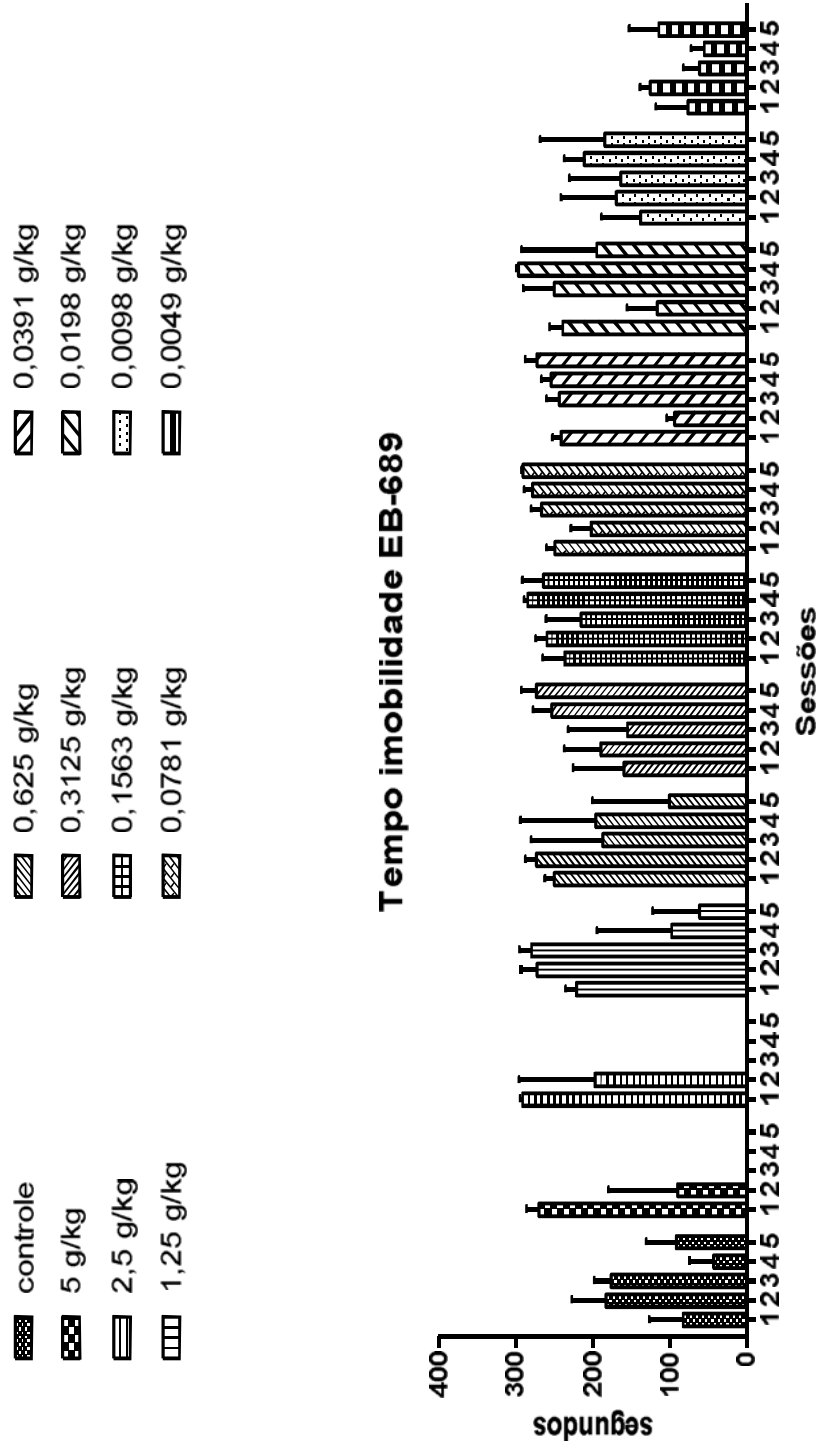


**Fig.9** Frequência de locomoção observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

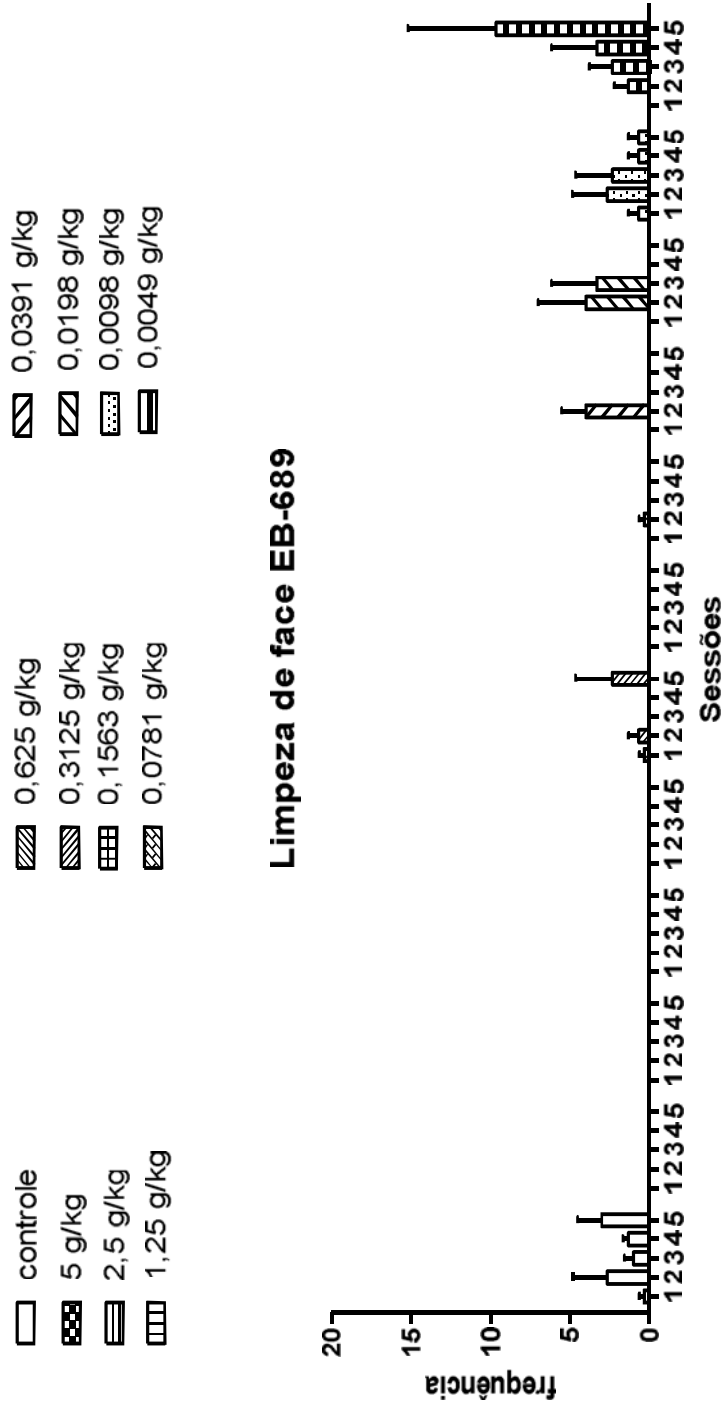




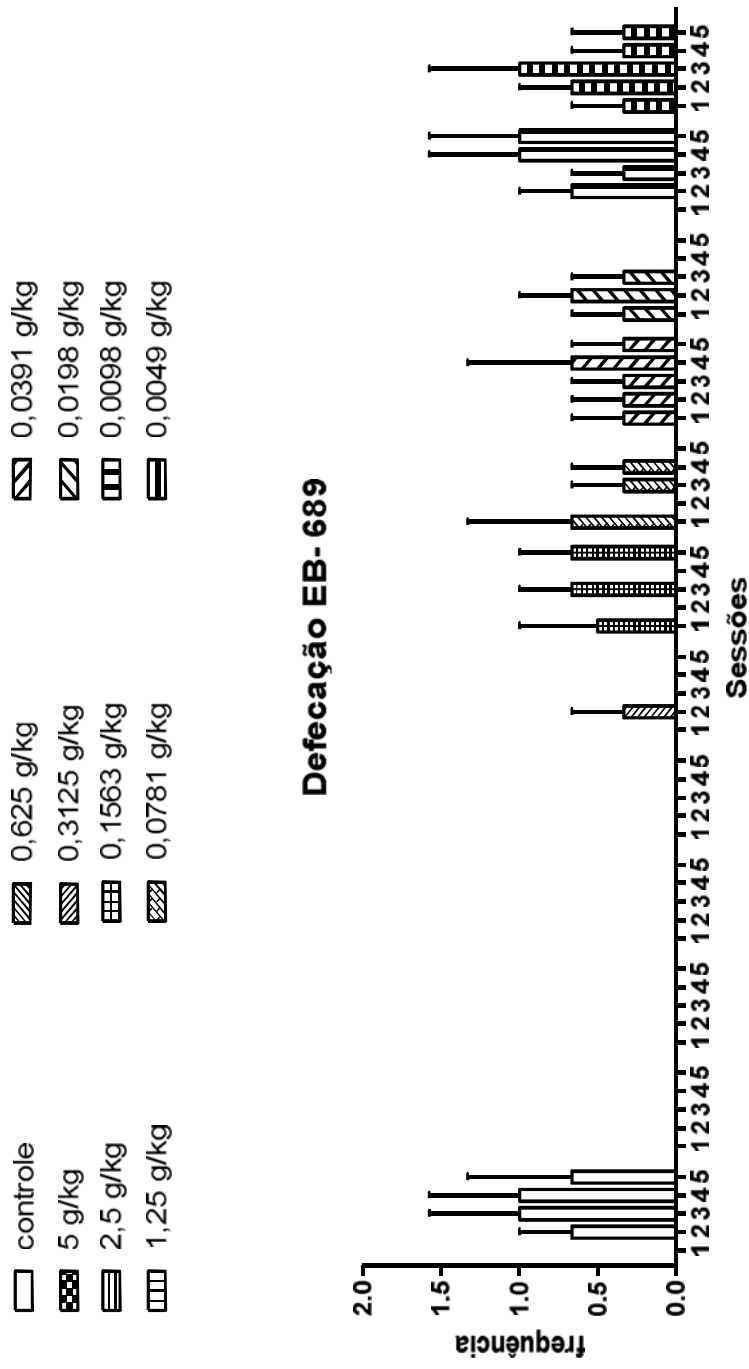
**Fig.10** Frequência de levantar observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.11** Duração de imobilidade (seg) observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.12** Frequência de limpeza de face observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

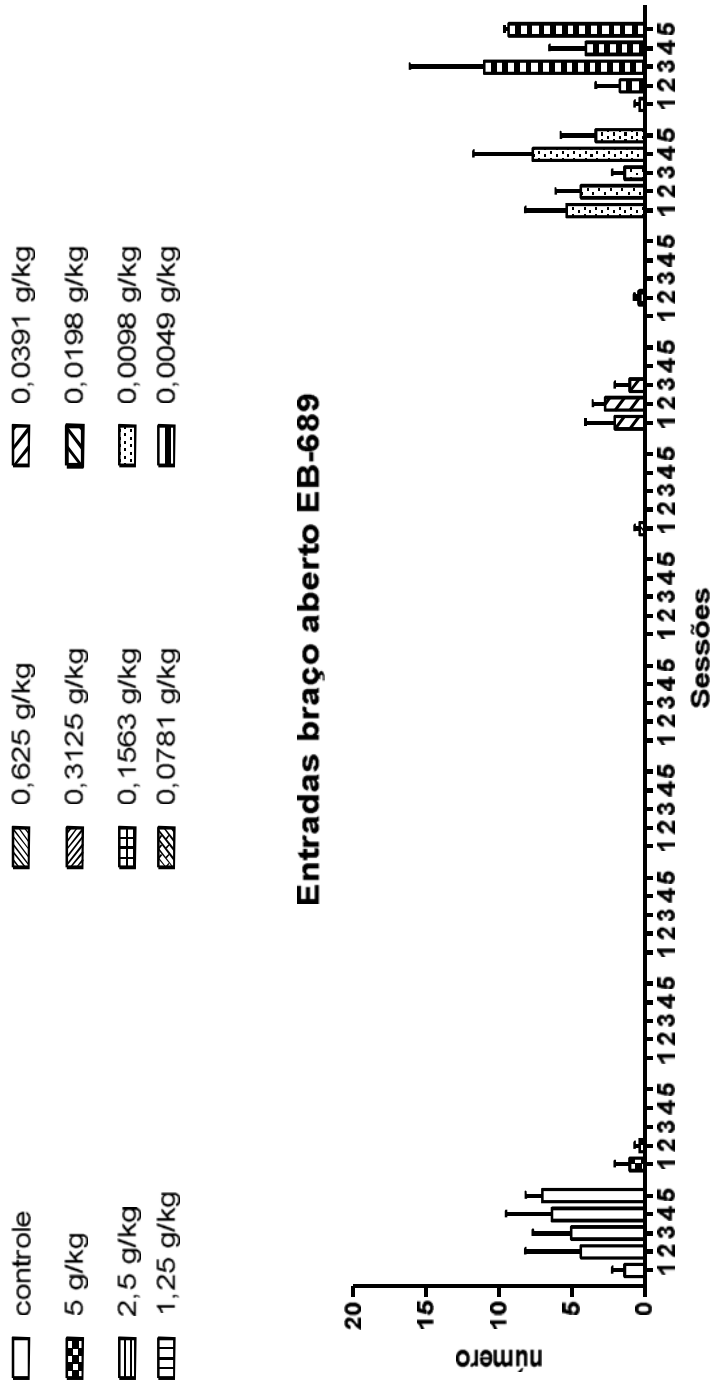


**Fig.13** Frequência de defecação observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 10-15, 30-35, 60-65, 120-125 e 180-185 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

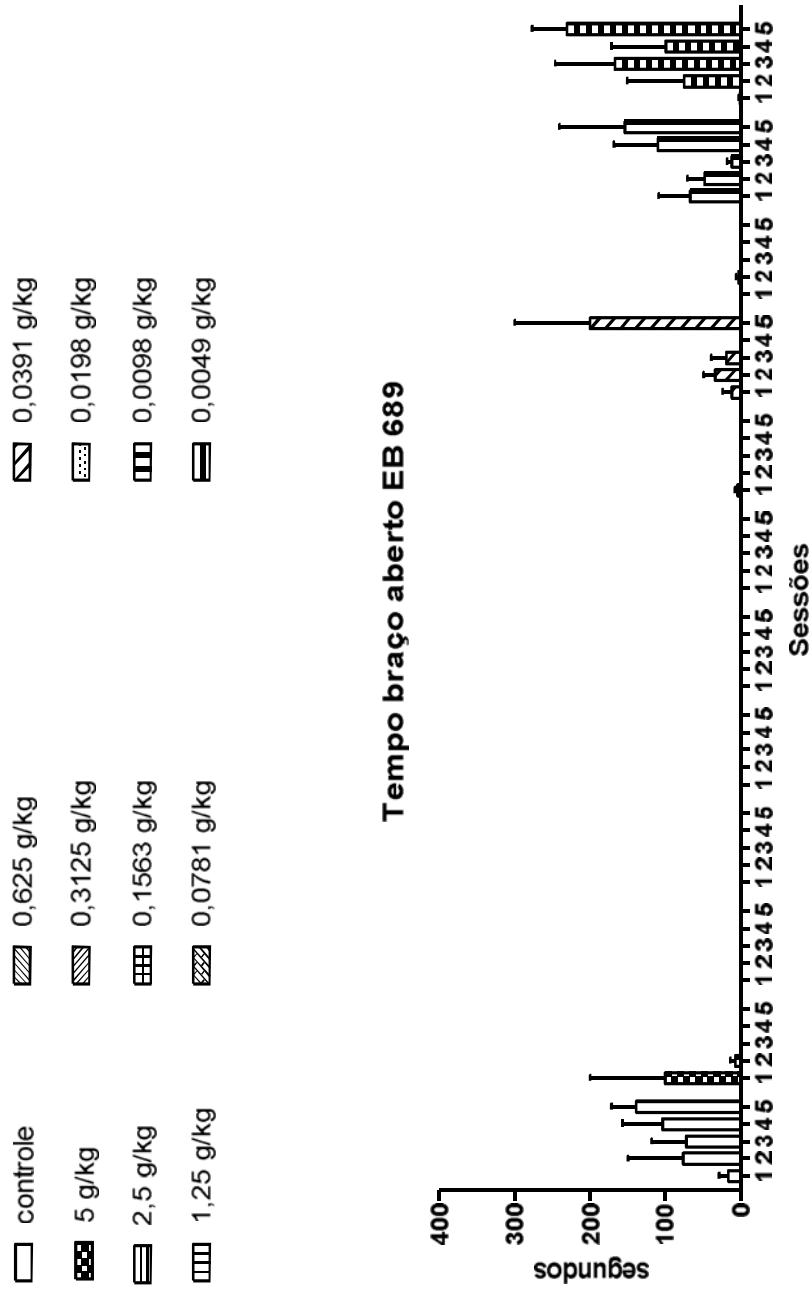
As Figs 14- 17 ilustram os dados das exposições repetidas ao labirinto em cruz elevada de camundongos que receberam as diferentes doses do EB-689.

Nos animais do grupo controle, nota-se que a exposição ao aparelho por 5 vezes aumentou o número de entradas no braço aberto, o tempo gasto nesse braço, o número de cruzamentos. O número de entradas no braço fechado permaneceu similar em todas as repetições.

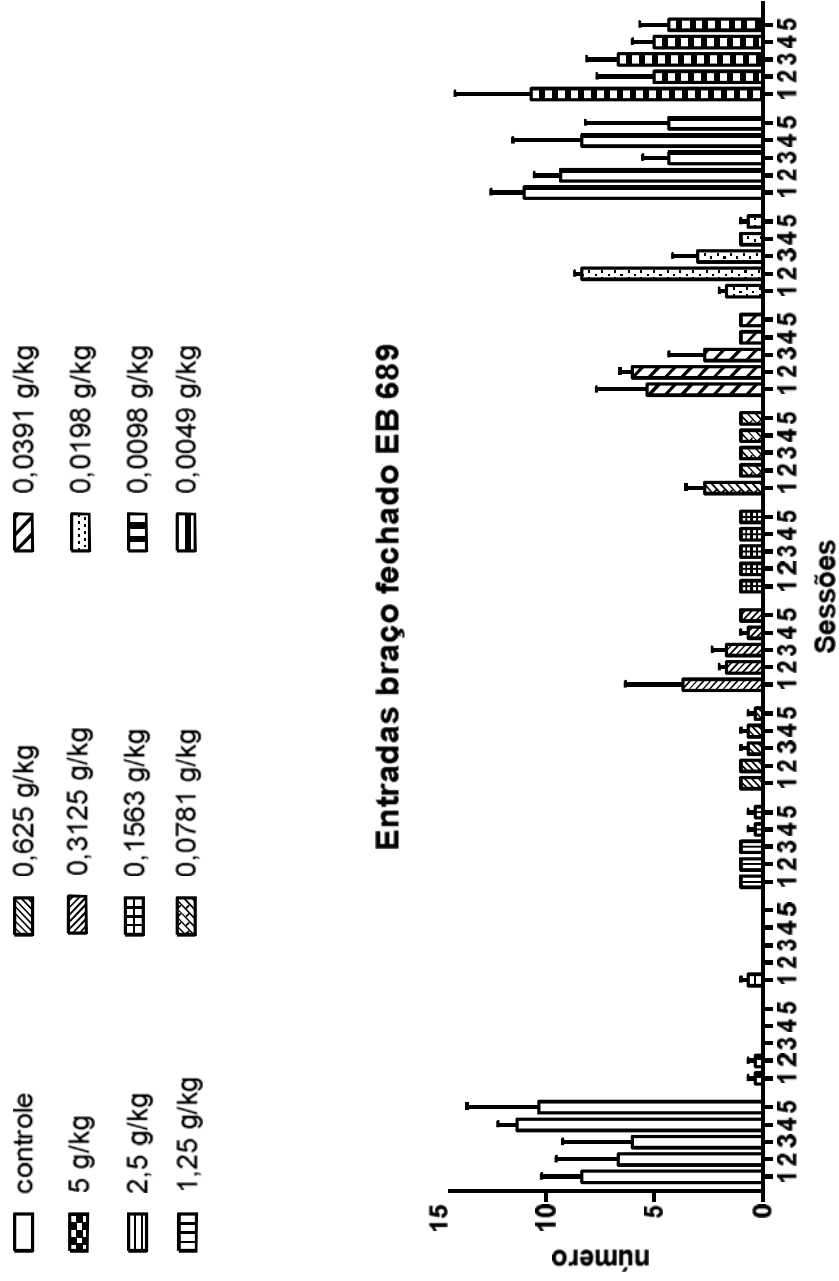
A ANOVA de duas vias indicou que os tratamentos afetaram os resultados de todos os parâmetros. O tempo interferiu no número de entradas no braço fechado e no tempo do braço aberto. Os dados estatísticos são apresentados nos anexos.



**Fig.14** Número de entradas no braço aberto no labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB-689. As sessões 1,2 ,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

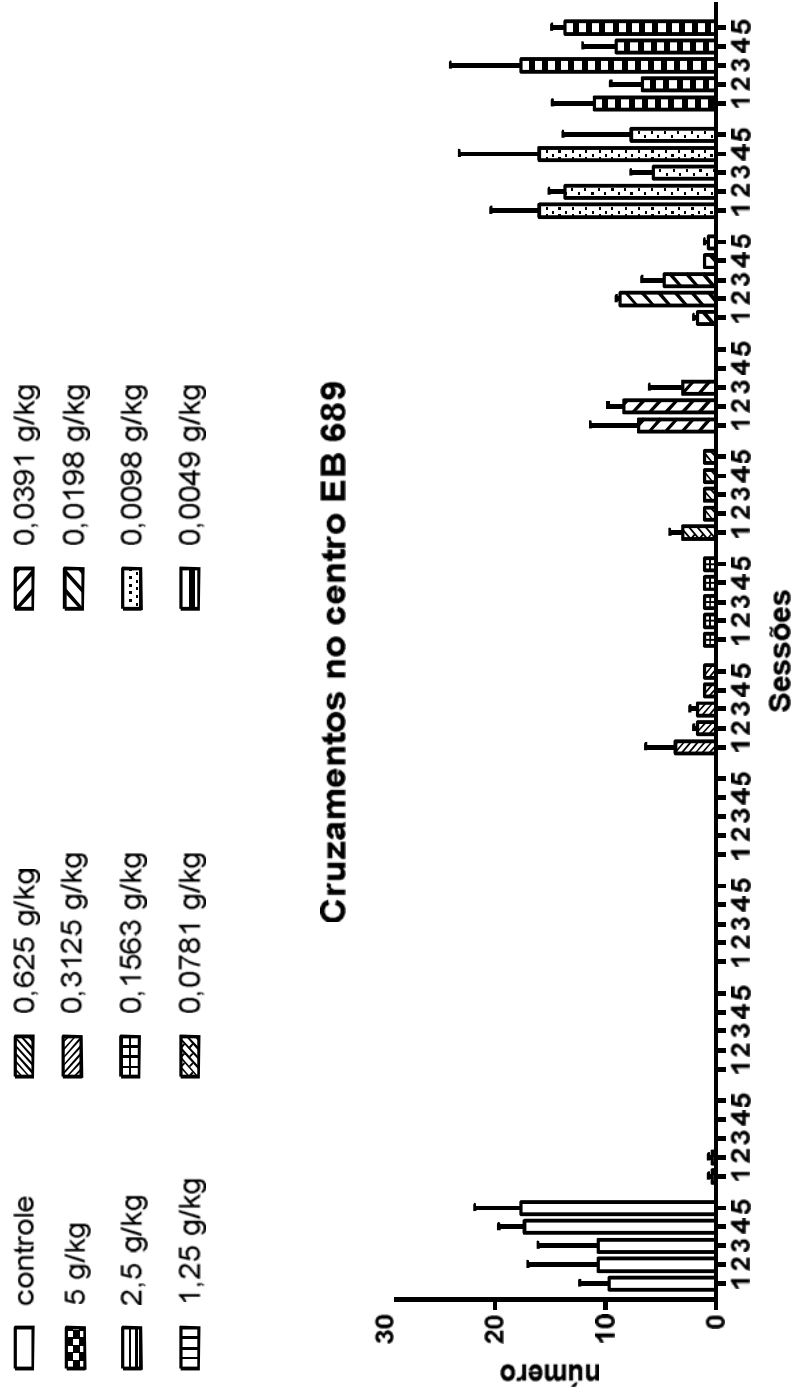


**Fig.15** Tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2, 3 e 4 foram feitas,respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.16** Número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 689. As sessões 1,2, 3 e 4 foram feitas,respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.





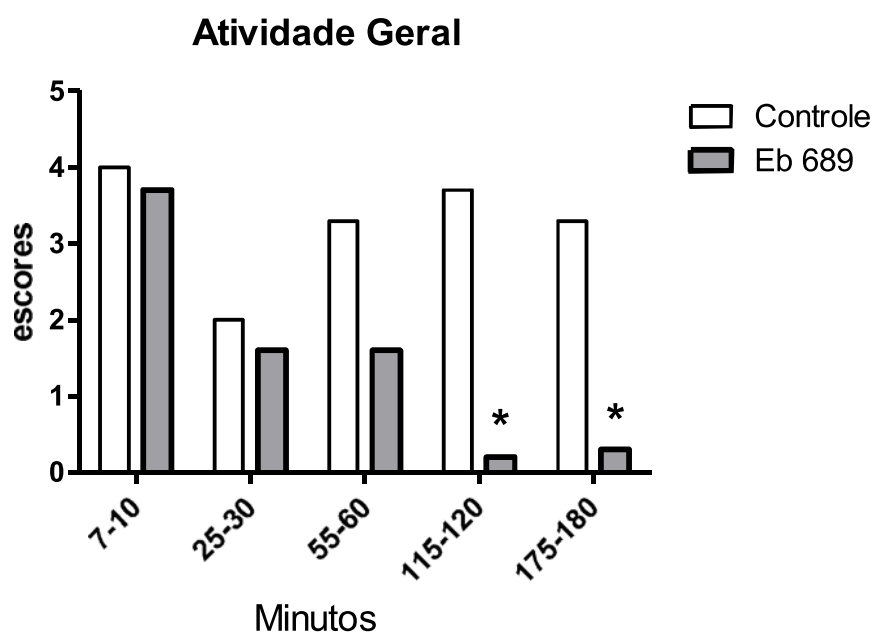
**Fig.17** Número de cruzamentos no centro do labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB-689. As sessões 1,2, 3 e 4 foram feitas,respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-689. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

## **5.2 Experimento 2: Necropsia dos Animais Tratados com o EB-689**

Nos ensaios que foram feitos para se chegar à dose não letal, foram observados os seguintes aspectos na necrópsia: na dose de 5 g/kg, os camundongos apresentaram uma intensa hemorragia interna, provavelmente causada por um extravasamento dos capilares intestinais. Nesses animais, porções extensas de intestino delgado se apresentaram avermelhadas e com veias e capilares endoteliais dilatados, além de edemas na região, indicando que, provavelmente, esse quadro levou à hemorragia. Do mesmo modo, a hemorragia persistiu em todas as doses inferiores, com exceção àquela em que os animais não vieram a perecer, de 0,0049 g/kg.

## **5.3 Experimento 3: Avaliação Da Toxicidade Aguda da Dose Não Letal do EB-689**

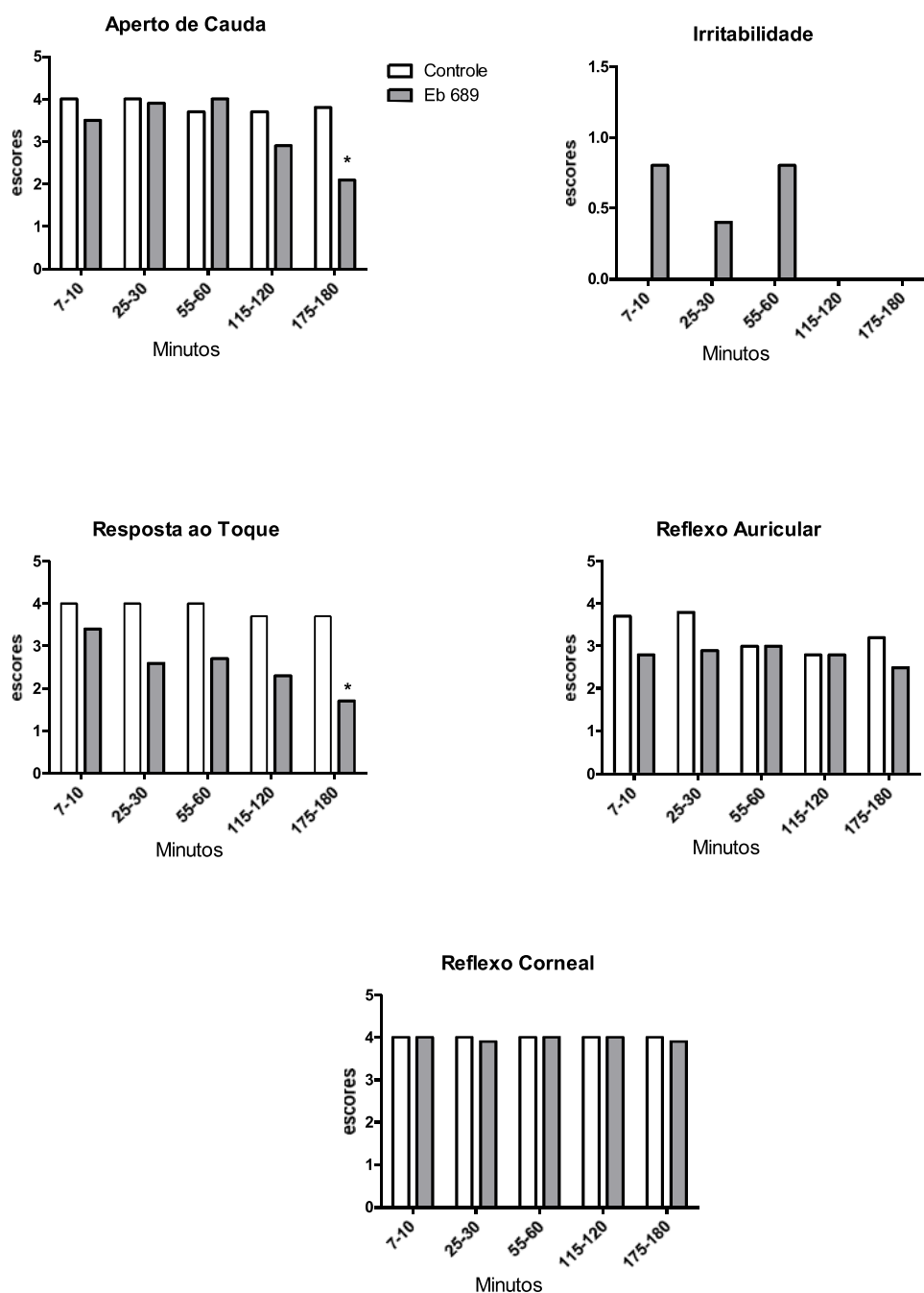
A DI<sub>50</sub> calculada para o EB-689 foi 0,355 g/Kg. Nesse experimento é apresentada uma análise temporal dos sinais de toxicidade em dez camundongos da dose não letal do EB-689 ou com o veículo do EB-689, permitindo uma análise mais detalhada da toxicidade do extrato. A Fig. 18 ilustra os resultados obtidos na avaliação da mediana dos sinais de toxicidade da dose não letal do extrato de EB-689. A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças significantes nos parâmetros da atividade geral devida ao tratamento [  $F(1/70) = 24,23$ ,  $p < 0,0001$ ] e sessões de observação [ $F(4/70) = 18,48$ ,  $p < 0,0001$ ].



**Fig.18** Atividade geral observada em caixa de observação de camundongos tratados com a dose não letal do EB-689. Os dados são apresentados em medianas. N do grupo controle= 6; N= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.

A Fig. 19 ilustra os dados obtidos na avaliação dos sinais sensoriais em camundongos tratados com o EB-689 na dose não letal.

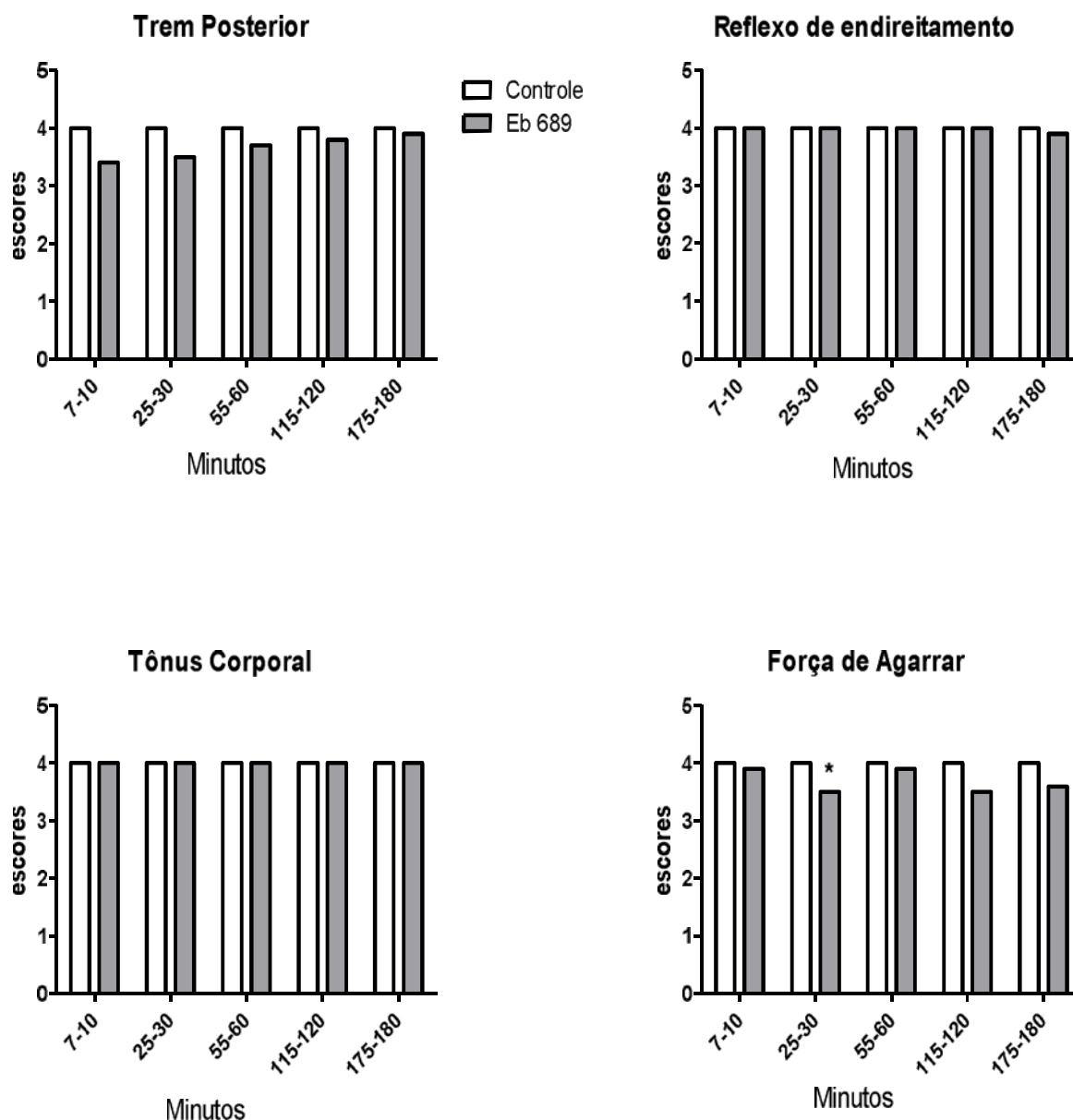
A ANOVA de duas vias indicou que houve variações na resposta ao toque devidas ao tratamento [ $F(4/70) = 20,01$ ,  $p < 0,012$ ] porém não devidas às sessões [ $F(1/70) = 5,10$ ,  $p = 0,31$ ]. No aperto de cauda verificaram-se diferenças significantes em relação ao tratamento [ $F(4/70) = 6,66$ ,  $p = 0,012$ ] e sessões [ $F(1/70) = 12,09$ ,  $p = 0,026$ ]. O teste post hoc indicou redução na resposta desses sinais sensoriais na sessão de 175-180 minutos.



**Fig.19** Sinais sensoriais em camundongos tratados com o EB-689 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

A Fig. 20 ilustra os dados obtidos da avaliação dos sinais psicomotores em camundongos tratados com o EB-689 na dose não letal. A ANOVA de duas

vias indicou que houve alteração na força de agarrar no que se refere ao tratamento [ $F(4/70) = 7,87$ ,  $p = 0,006$ ], mas não devidas às sessões [ $F(1/70) = 0,65$ ,  $p = 0,63$ ]. O teste post hoc indicou redução na força de agarrar na segunda sessão de observação ( $p, 0,05$ ). Nos demais parâmetros não houve alterações.

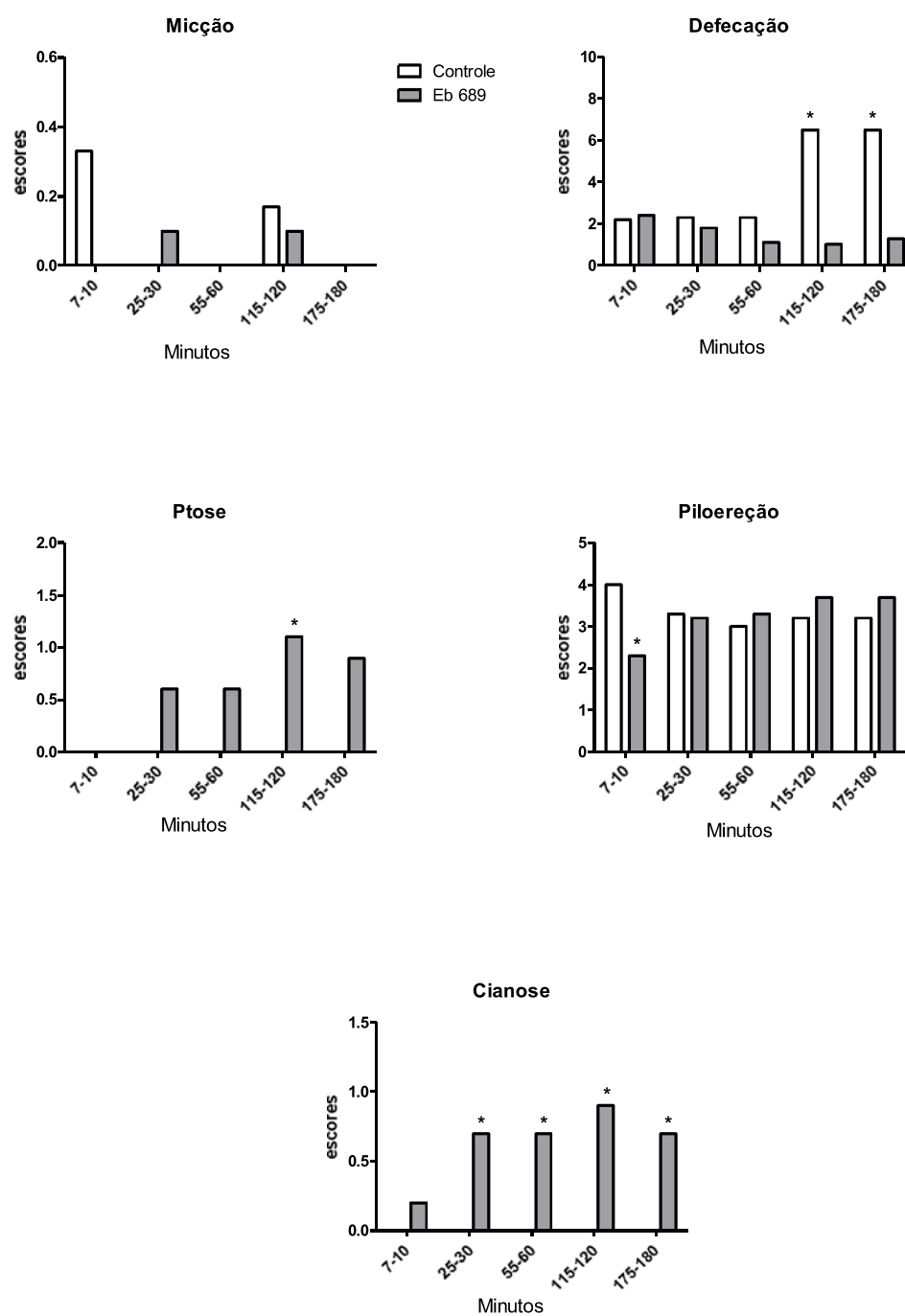


**Fig.20** Sinais psicomotores em camundongos tratados com o EB-689 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

A fig.21 ilustra os dados obtidos na avaliação dos sinais de alterações no sistema nervoso autônomo em camundongos tratados com o

EB-689 na dose não letal. A ANOVA de duas vias indicou que o tratamento interferiu com a ptose [ $F(4/70) = 15,39$ ,  $P=0,0003$ ], mas não modificou as respostas nas sessões [ $F(1/70) = 5,20$ ,  $p = 0,31$ ]. Houve aumento desse parâmetro na segunda sessão de observação.

A mesma análise indicou a existência de diferenças significantes na cianose no que se refere ao tratamento [ $F(4/70) = 25,58$ ,  $p < 0,0001$ ], mas não entre as sessões [ $F(1;70) = 3,43$ ,  $p = 0,36$ ]. Nesse caso, ocorreu aumento na primeira sessão de observação. Quanto à defecação houve alterações tanto no que se refere ao tratamento [ $F(4/70) = 17,45$ ,  $p < 0,0001$ ] quando devidas às sessões [ $F(1;70) = 9,65$ ,  $p = 0,23$ ]. Notou-se aumento significantes nas sessões 4 e 5 de observação. Quanto a piloereção, a ANOVA indicou a existência de interações entre o tratamento e tempo de observação [ $F(4/70) = 2,95$ ,  $p = 0,26$ ]. Não foram observados sinais de alterações nos parâmetros ligados a ativação do sistema nervoso central.

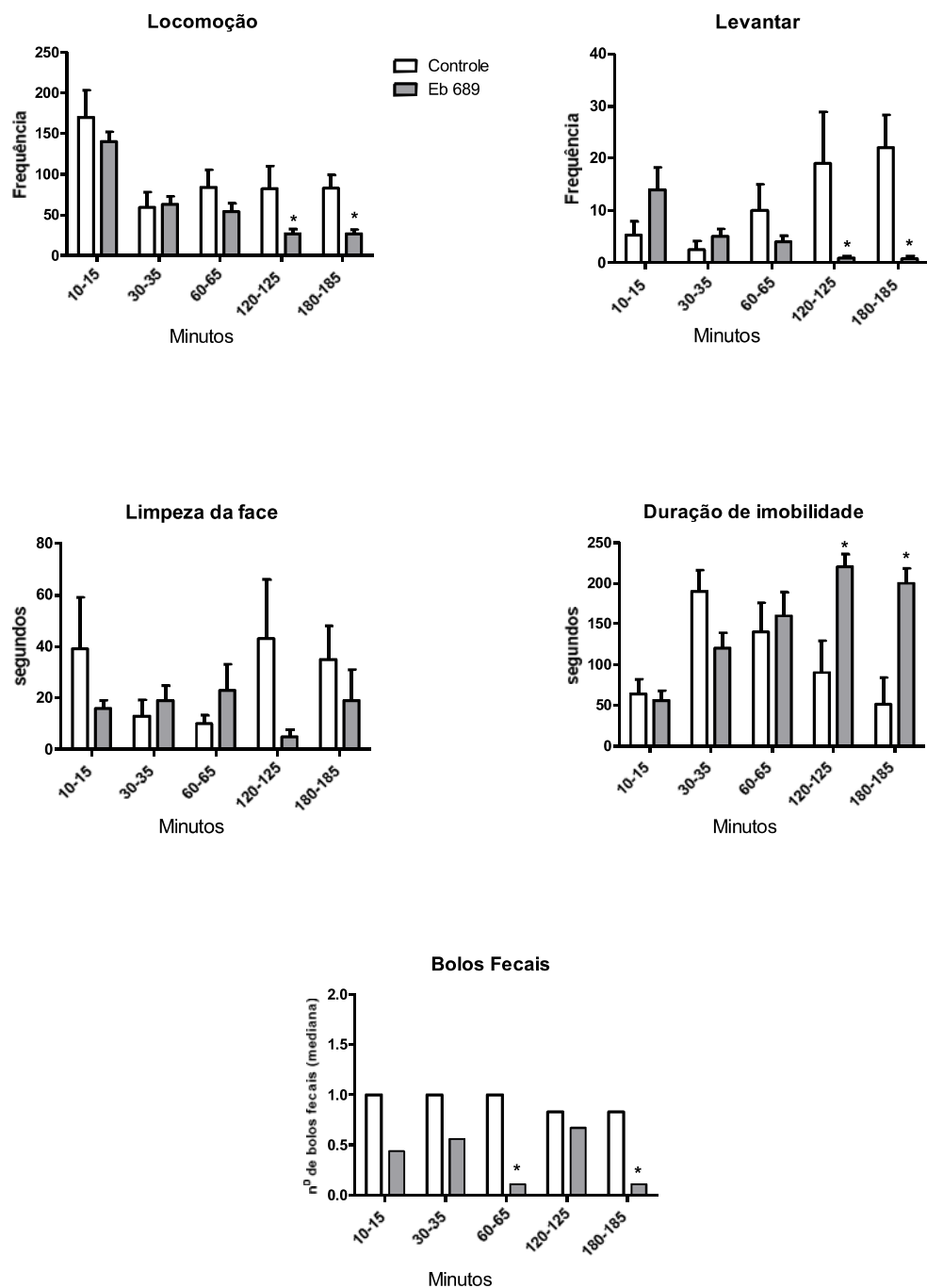


**Fig.21** Sinais ligados ao SNA em camundongos tratados com o EB-689 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.



A Fig. 22 ilustra os dados obtidos na atividade geral observada em campo aberto de camundongos tratados com o EB-689. A ANOVA de duas vias indicou a existência de variações entre os grupos em todos os parâmetros exceto na limpeza de face { locomoção- tratamento de observação  $-F(4/65) = 11,25$ ,  $p = 0,003$ , sessões  $-F(1/65) = 14,90$ ,  $p < 0,0001$  ; levantar- tratamento  $-F(4/65) = 7,99$ ,  $p = 0,006$ , sessões  $-F(1/65) = 14,24$ ,  $p = 0,30$ ; imobilidade- tratamento  $-F(4/65) = 6,51$ ,  $p = 0,006$ , sessões  $-F(1/65) = 17,49$ ,  $p = 0,0008$ ; defecação- tratamento  $-F(4/65) = 9,93$ ,  $p = 0,0025$ , sessões  $-F(4/65) = 0,47$ ,  $p = 0,75$ , limpeza de face- tratamento  $-F(4/65) = 3,76$ ,  $p = 0,09$ , sessões  $-F(1/65) = p = 0,71$  }.

O teste post hoc indicou que as frequências de locomoção e levantar foram reduzidas nas 4ª e 5ª sessões de observação comparadas a daqueles do grupo controle, enquanto a duração de imobilidade aumentou significativamente nessas mesmas sessões. A frequência de defecação foi reduzida significativamente nas sessões 3 e 4 de observação.

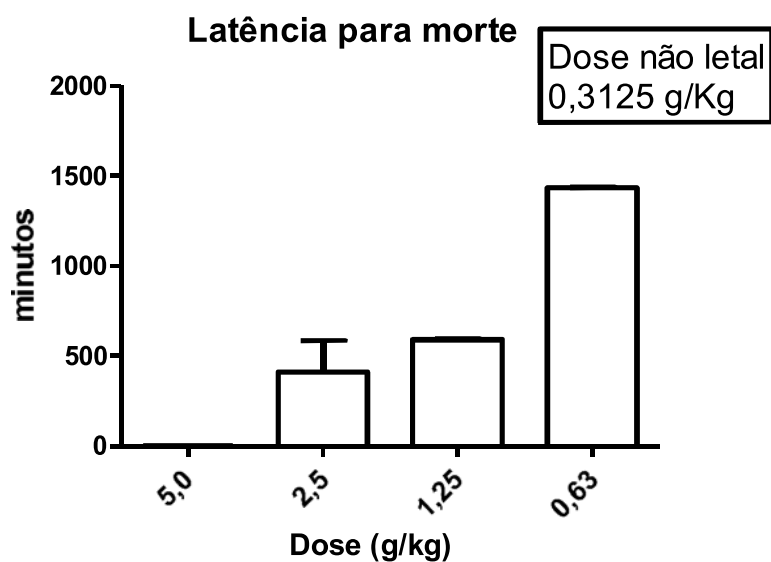


**Fig. 22** Atividade geral observada em campo aberto de camundongos tratados com o EB-689 na dose não letal. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo controle.

#### 5.4 Experimento 4: Prospecção da Toxicidade do EB-1257

A DL50 do EB-1257 foi 0,355 g/Kg.

A Fig. 23 ilustra os resultados da latência para morte induzida em camundongos tratados com diferentes doses do EB-1257. Houve correlação dose x latência para morte, sendo a dose não letal 0,3125 g/kg.



**Fig. 23** Latência para morte de camundongos tratados com as diferentes doses de EB-1257. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão em minutos. N= 3 /dose.

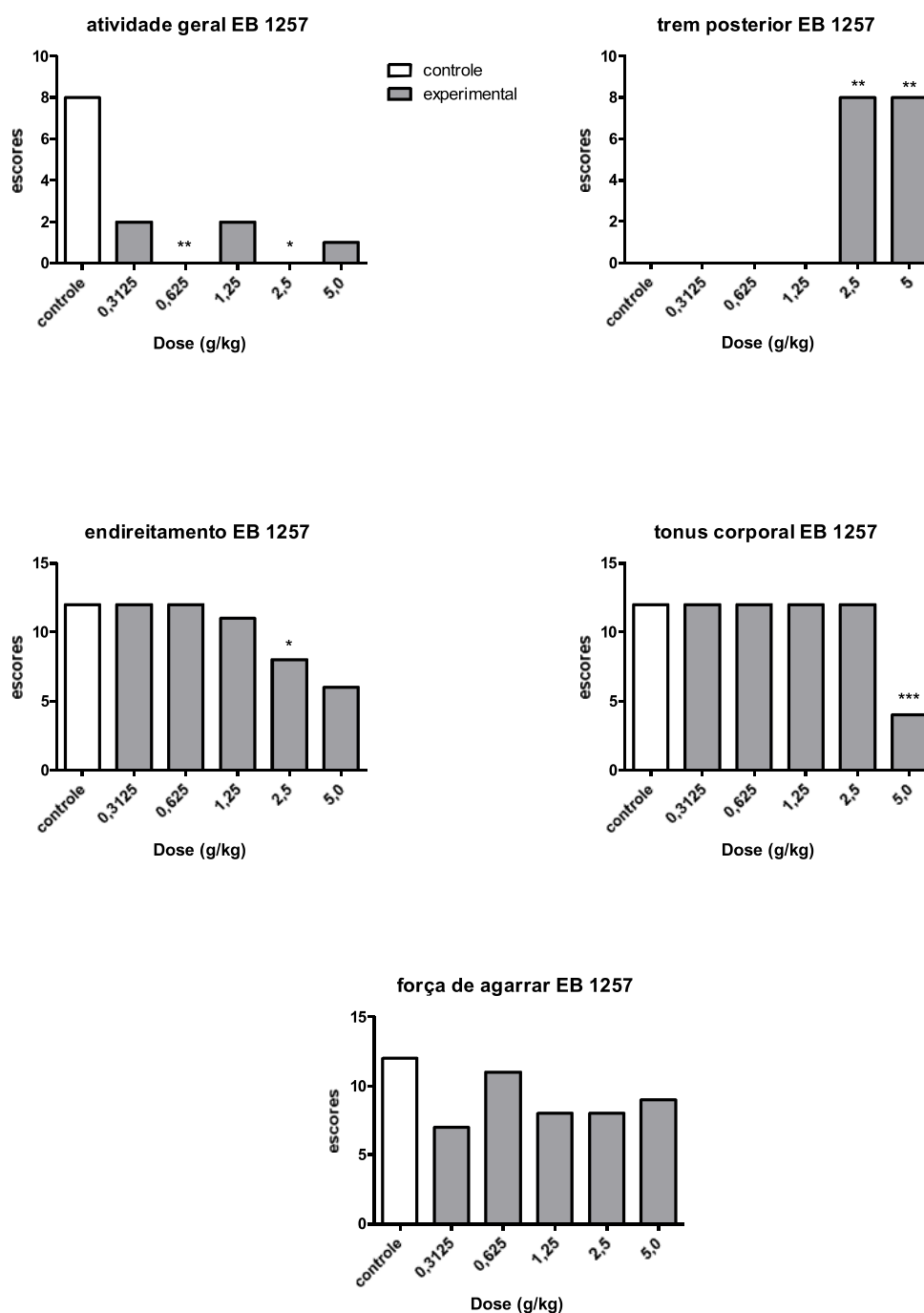
As Figs 24-27 ilustram os sinais de toxicidade do EB-1257 induzida em camundongos tratados com diferentes doses do extrato. Os parâmetros foram divididos em psicomotores, sensoriais, ligados ao sistema nervoso central (SNC) e autônomo (SNA).

Na atividade geral e nos parâmetros psicomotores (fig.24) a ANOVA indicou a existência de variações na atividade geral e em todos os parâmetros psicomotores exceto na força de agarrar. Na atividade geral notou-se redução significativa nas doses de 0,625 e 2,5 g/Kg. Houve aumento significativo na queda do trem posterior após a dose de 2,5 e 5,0 g/KG e redução no reflexo de endireitamento e no tônus corporal na dose de 2,5 g/Kg ; ainda houve redução no tônus corporal na dose de 5,0 g/Kg.

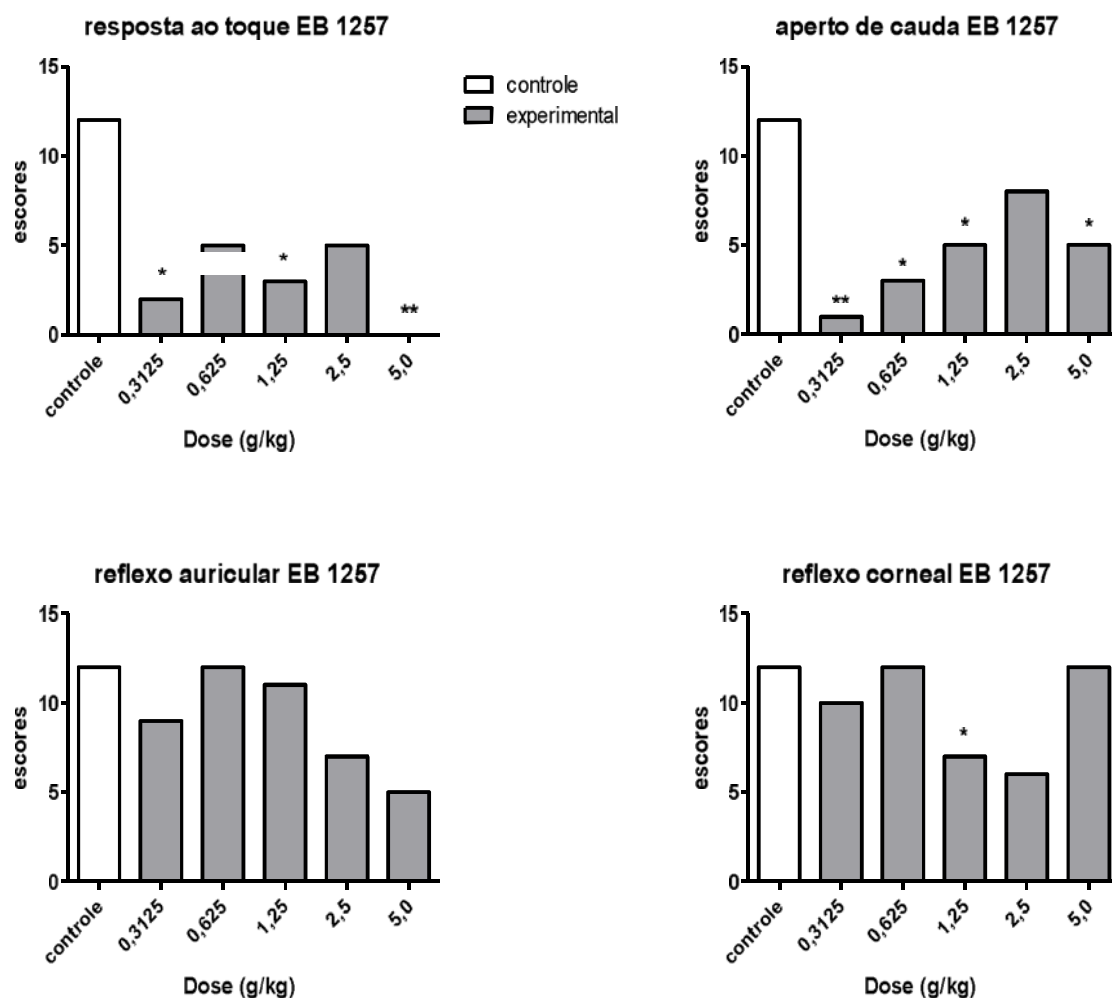
Nos parâmetros sensoriais (fig.25) a ANOVA indicou a existência de variações na resposta ao toque, no aperto da cauda e reflexo corneal. As respostas ao toque e aperto da cauda foram reduzidas após todas as doses do EB-1257; houve redução no reflexo corneal após a dose de 1,25 g/Kg.

Nos parâmetros ligados ao SNC (fig.26), houve variações significantes na ataxia e tremores, ocorrendo aumento significativo nestes parâmetros após o tratamento com 5,0 g/Kg.

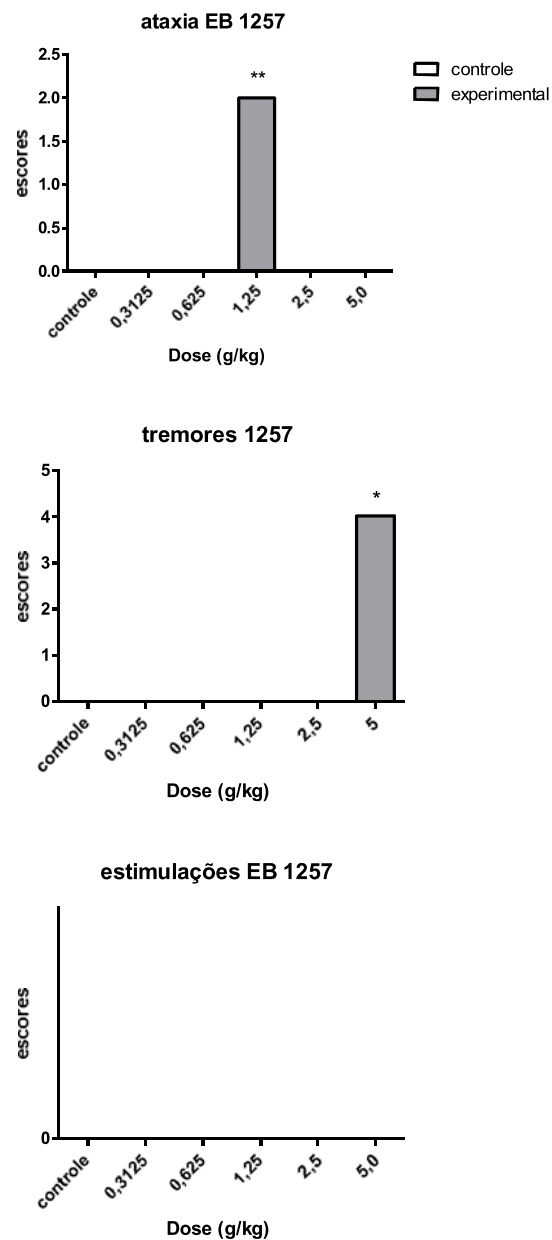
Quanto aos parâmetros ligados ao SNA (fig.27) a ANOVA indicou variações na piloereção e defecação. A piloereção mostrou-se reduzida após a dose de 2,5g/kg e a defecação em todas as doses, exceto, na dose de 1,25 g/Kg. Os dados estatísticos são apresentados nos anexos.



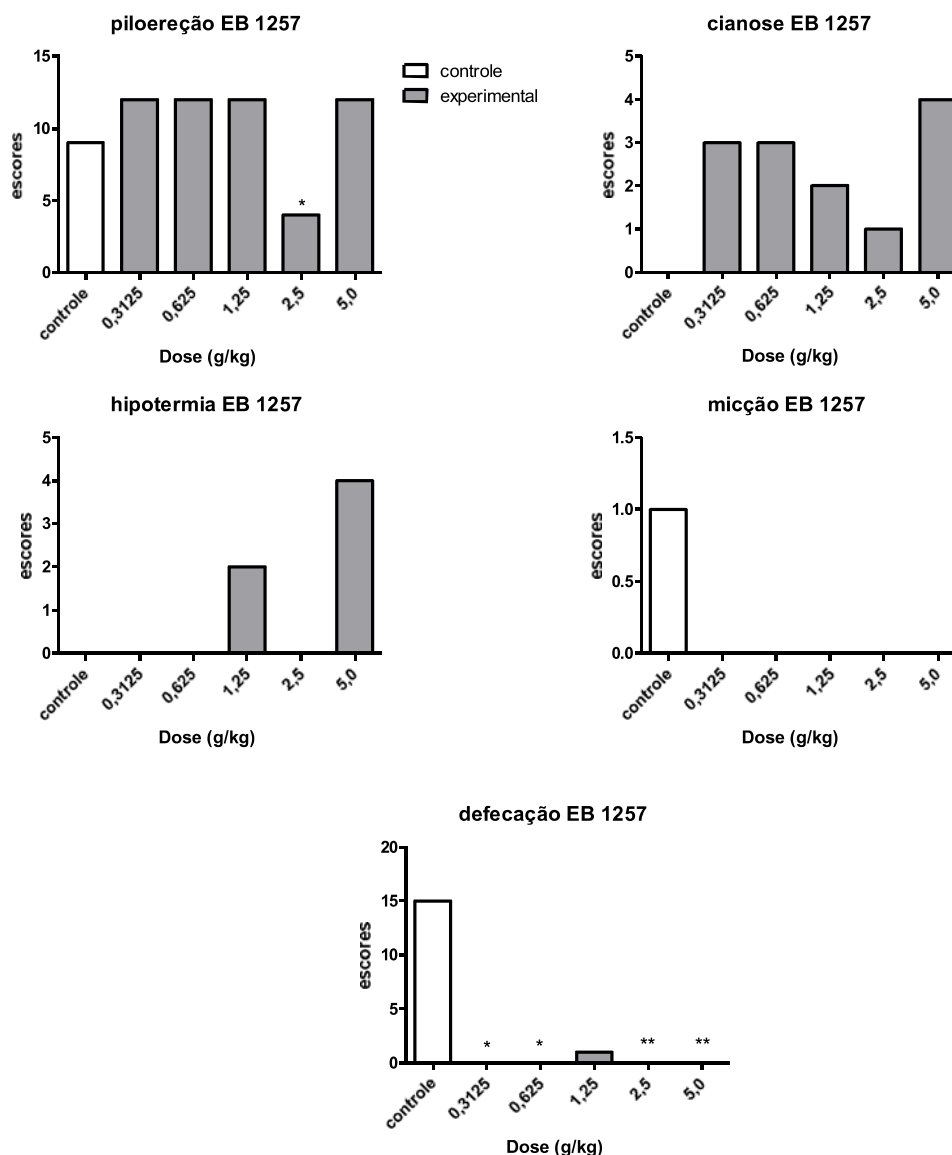
**Fig.24** Escores de parâmetros psicomotores observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. São apresentadas as medianas dos dados da atividade geral e dos parâmetros psicomotores. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$ .



**Fig.25** Escores dos sinais sensoriais observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. São apresentadas as medianas dos dados dos parâmetros sensoriais.. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$ .



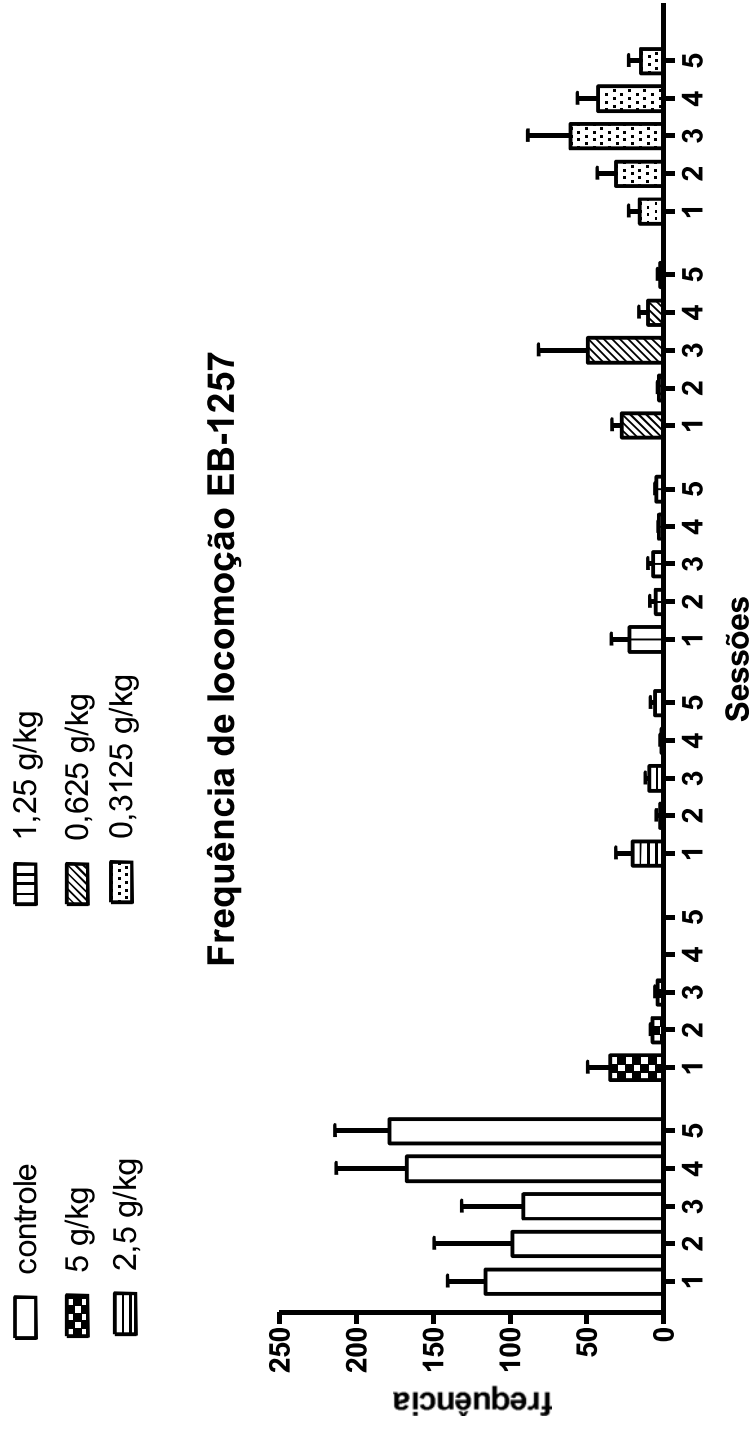
**Fig.26** Escores dos parâmetros ligados ao SNC observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. São apresentadas as medianas dos dados dos parâmetros ligados ao SNC. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3/\text{grupo}$ .



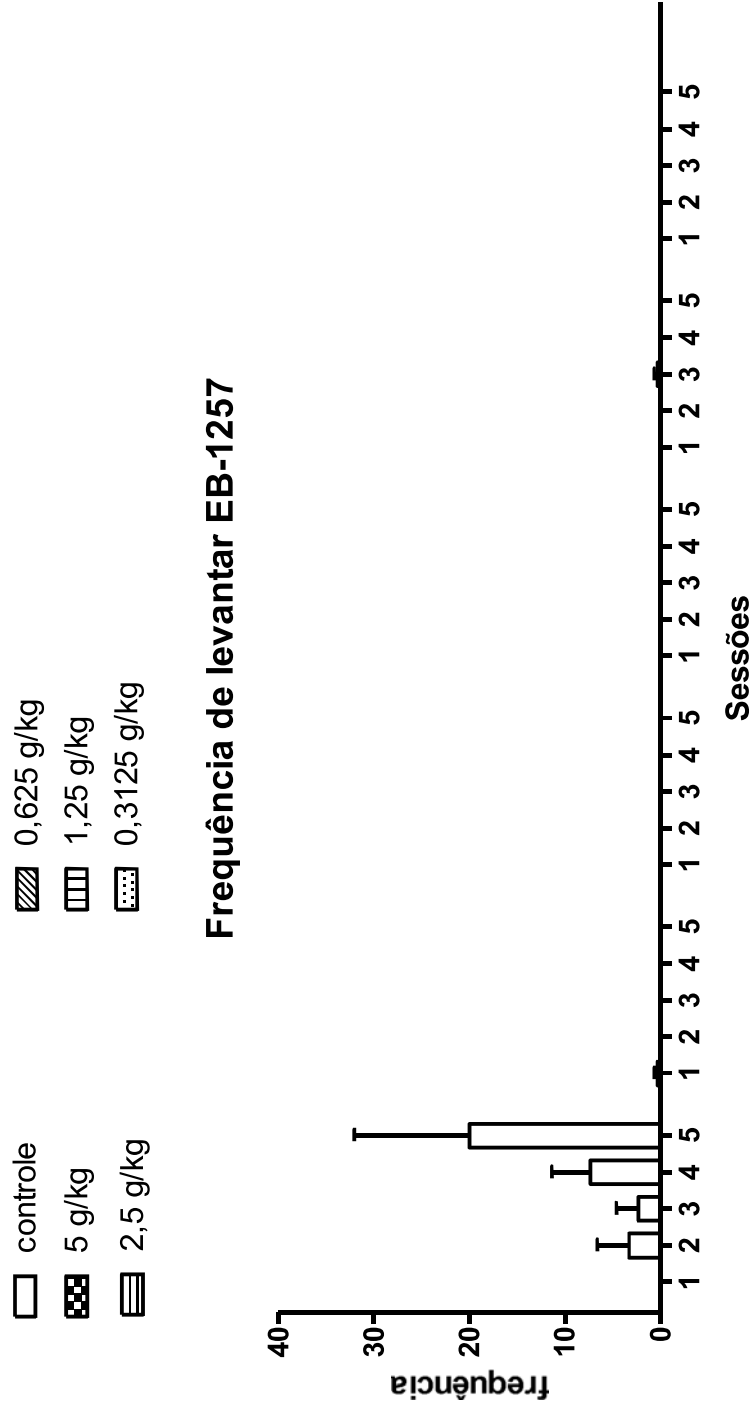
**Fig.27** Escores dos parâmetros ligados ao SNA observados em camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. São apresentadas as medianas dos dados dos parâmetros ligados ao SNA. ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc.  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $N = 3$ /grupo.



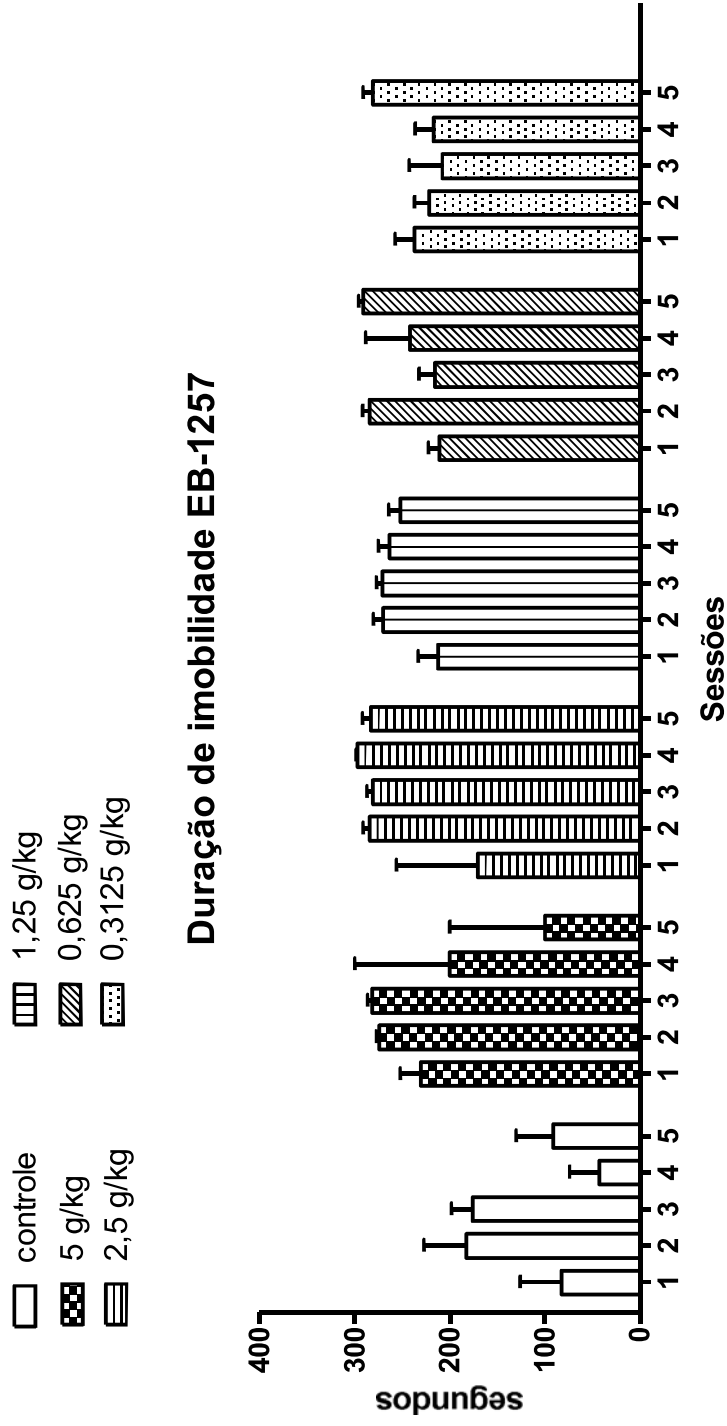
As Figs. 28-32 ilustram os resultados da atividade geral observada em campo aberto nas 5 sessões. A ANOVA de duas entradas aplicada às frequências de locomoção (Fig.28) indicou a existência de diferenças significantes entre os tratamentos, porém não entre as sessões sem interação entre ambos. Na frequência de levantar a ANOVA indicou a existência de diferenças significantes entre os tratamentos e interação entre os fatores, porém não houve diferenças significantes entre as sessões (Fig.29). Na duração de imobilidade (Fig.30), observaram-se diferenças significantes entre os tratamentos, sessões e na interação entre os fatores. Na limpeza de face (Fig.31) e frequência de defecação (Fig.13) foram observadas diferenças significantes entre os tratamentos mas não entre as sessões e na interação entre os fatores. Os dados estatísticos deste comportamento são apresentados no anexo.



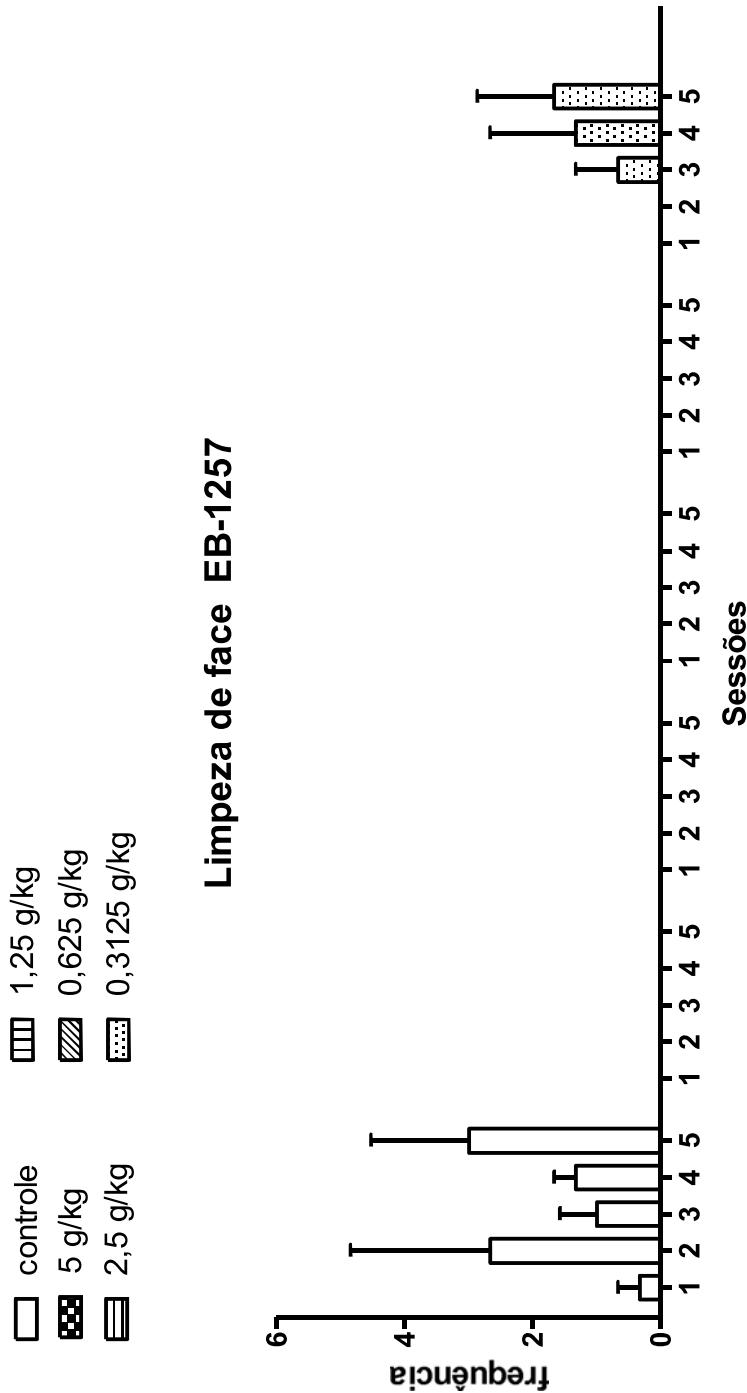
**Fig.28** Frequência de locomoção observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 1257. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 30-35, 65-70,125-130 e 180-185 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



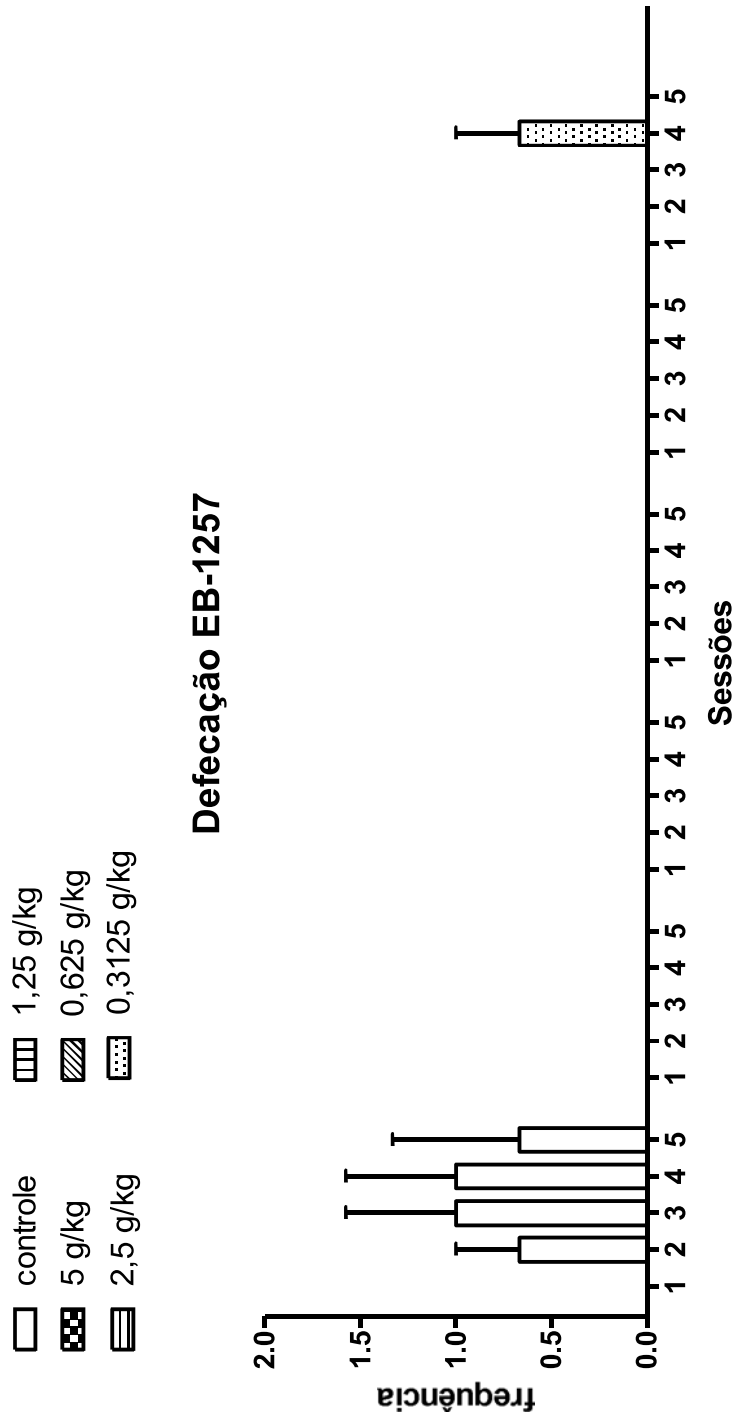
**Fig.29** Frequência de levantar observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 1257. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 30-35, 65-70,125-130 e 180-185 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.30** Duração de imobilidade (seg) observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 1257. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 30-35, 65-70,125-130 e 180-185 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.31** Frequência de limpeza de face observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 30-35, 65-70,125-130 e 180-185 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.32** Frequência de defecação observada no campo aberto de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 1257. As sessões 1,2,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 30-35, 65-70,125-130 e 180-185 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

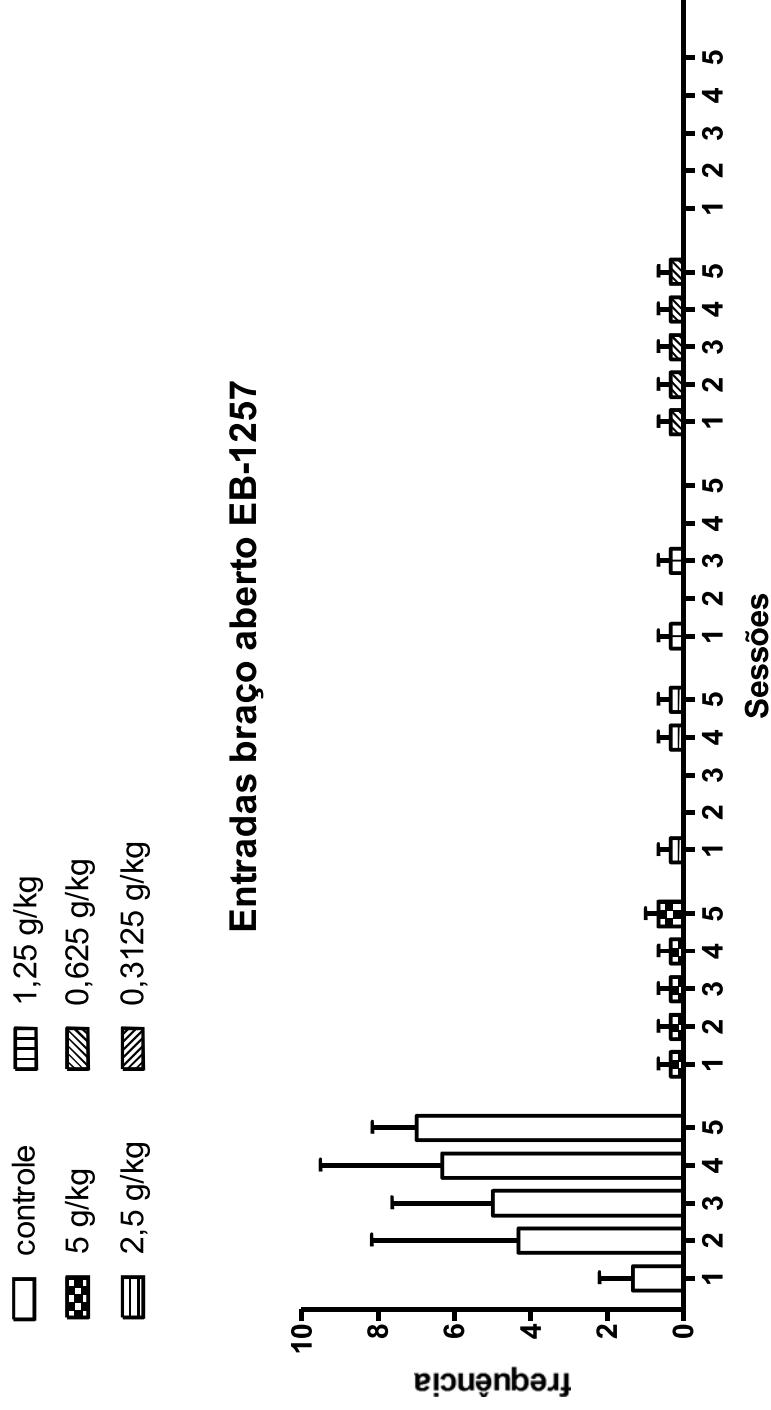
As figs 32-35 ilustram os efeitos do EB-1257 no comportamento dos camundongos em labirinto em cruz elevada.

A ANOVA de duas vias indicou variações significantes no número de entradas no braço aberto entre os tratamentos [ $f(5/60) = 14,83$ ,  $p < 0,0001$ ], porém as sessões não interferiram nos resultados [ $F(4/60) = 0,67$ ,  $p = 0,612$ ] e tampouco houve interação entre os parâmetros.

Em relação ao tempo no braço aberto, a ANOVA de duas vias indicou variações significantes entre os tratamentos [ $f(5/60) = 2,61$ ,  $p = 0,033$ ] porém as sessões não interferiram nos resultados [ $F(4/60) = 0,28$ ,  $p = 0,82$ ] e tampouco houve interação entre os parâmetros.

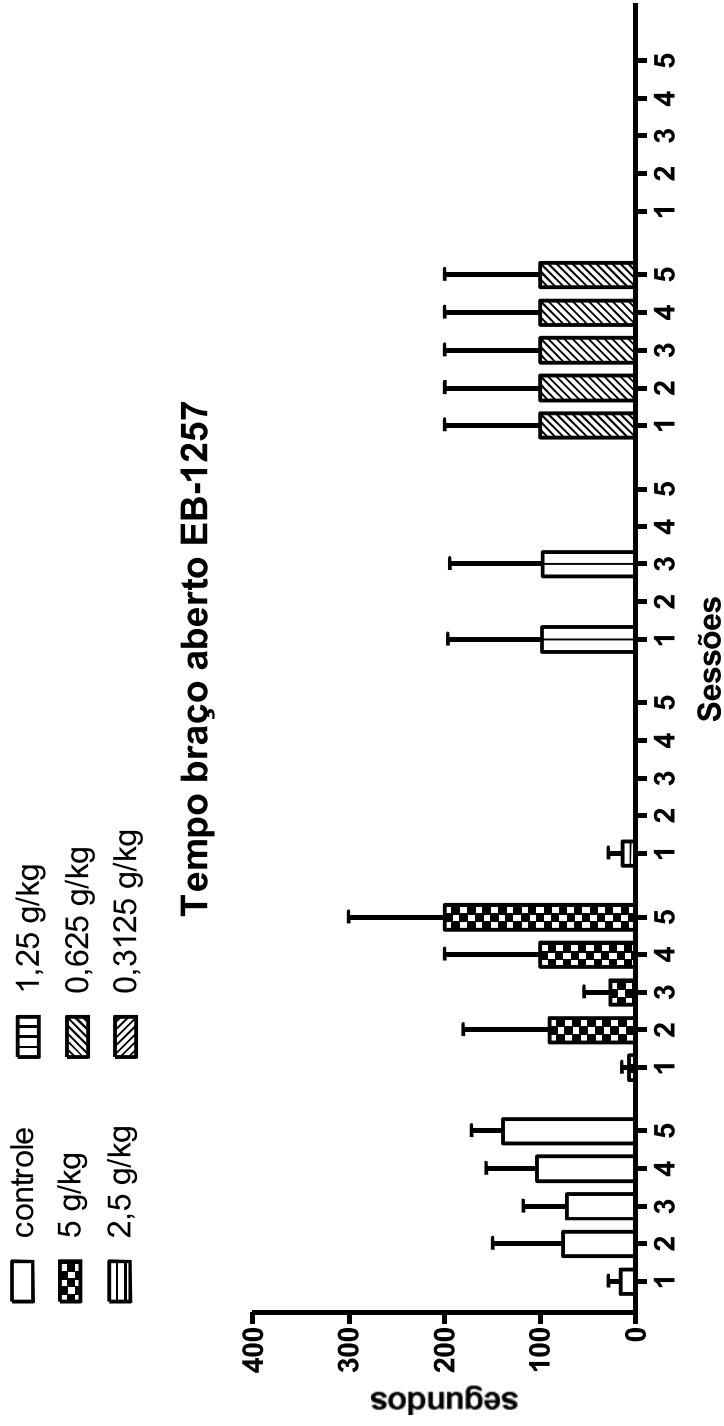
Em relação ao número de entradas no braço fechado verificaram-se variações significantes entre os tratamentos [ $F(5/60) = 38,15$ ,  $p < 0,0001$ ] e não nas sessões [ $F(4/60) = 0,26$ ,  $p = 0,90$ ] não havendo interação entre os parâmetros.

Quanto ao número de cruzamentos verificou-se variação entre os tratamento [ $F(5/60) = 39,10$ ,  $p < 0,0001$ ] mas não entre as sessões [ $F(4/60) = 0,53$ ,  $p = 0,75$ ] não havendo interação entre os parâmetros.

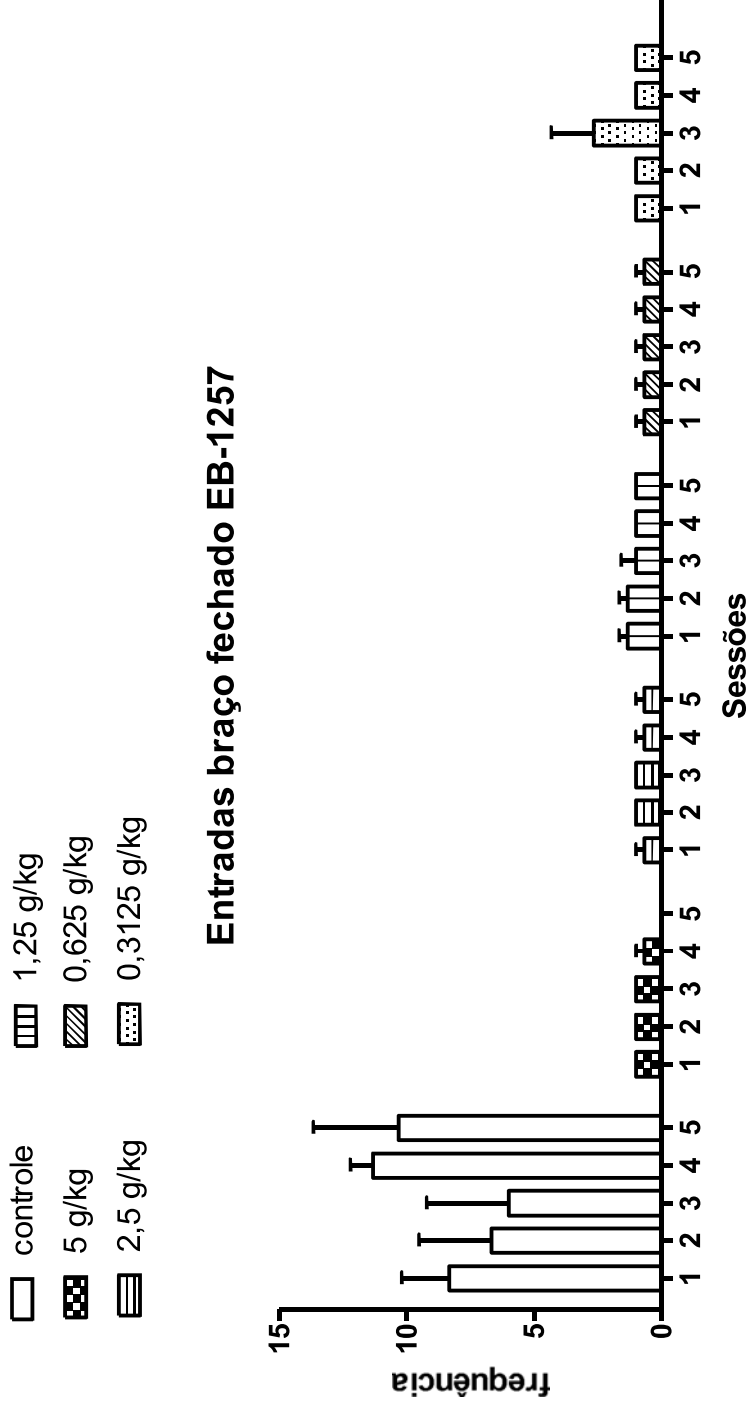


**Fig.33** Número de entradas no braço aberto no labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. As sessões 1,2 ,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

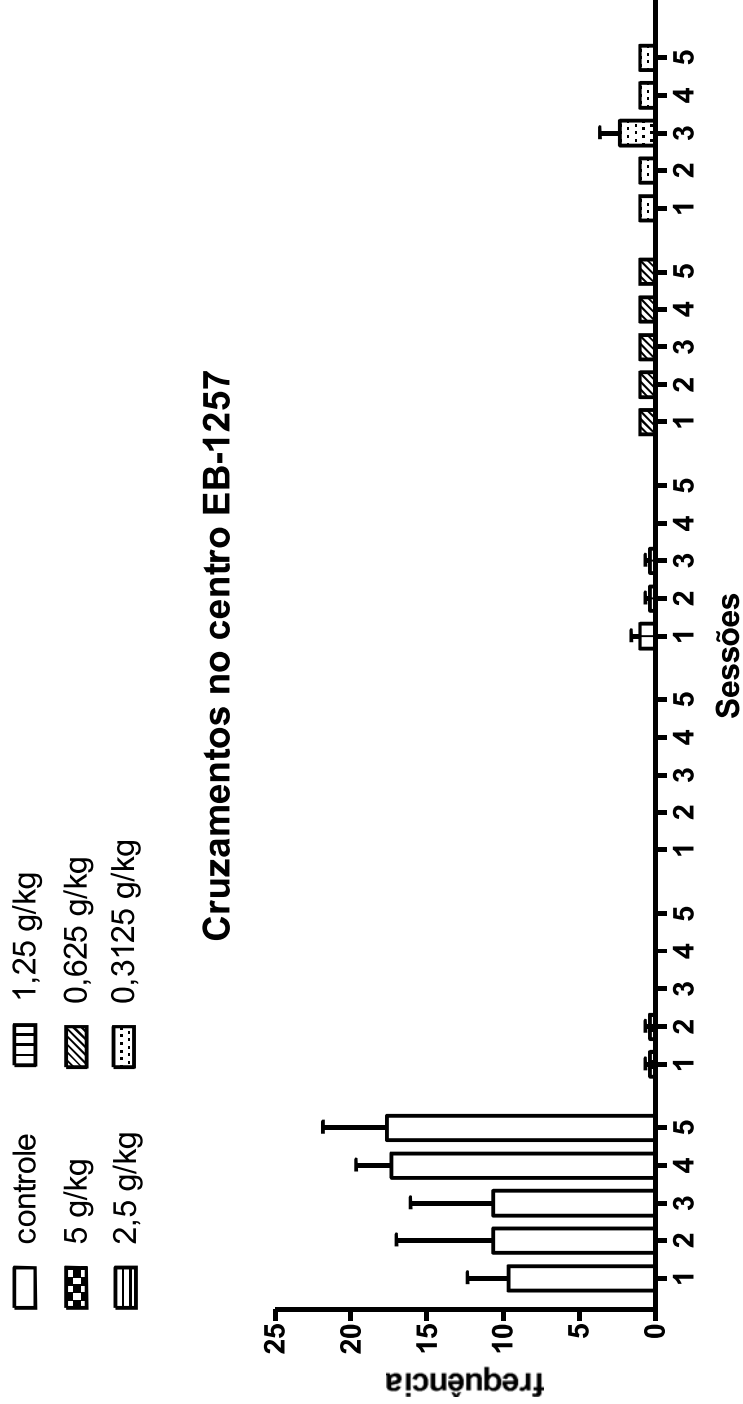




**Fig.34** Tempo (seg) no braço aberto do labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 1257. As sessões 1,2 ,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



**Fig.35** Número de entradas no braço fechado no labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB- 1257. As sessões 1,2 ,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.



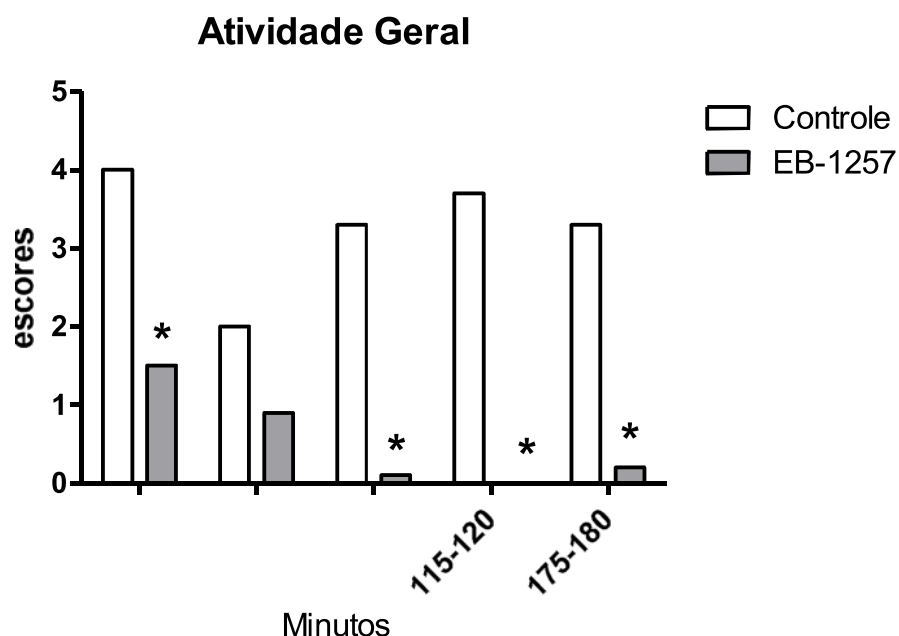
**Fig.36** Número de cruzamentos no centro do labirinto em cruz elevado de camundongos que receberam diferentes doses do EB-1257. As sessões 1,2 ,3 e 4 foram feitas, respectivamente, aos 15-20, 35-40, 65-70,125-130 e 185-190 minutos após a administração do EB-1257. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros padrão de 3 animais /grupo.

### **5.5 Experimento 5: Necrópsia dos Animais Tratados com o EB-1257**

Durante a necrópsia realizada com esse extrato, após administração de 5 g/kg, houve uma leve alteração intestinal, com sangramento interno, e fígado “pálido”. Conforme as doses diminuía, os efeitos foram amenizados, e a causa da morte não pôde ser relacionada a processos macroscópicos ou alterações na hegemonia anatômica e tecidual, havendo a necessidade de relacionar a estudos histopatológicos.

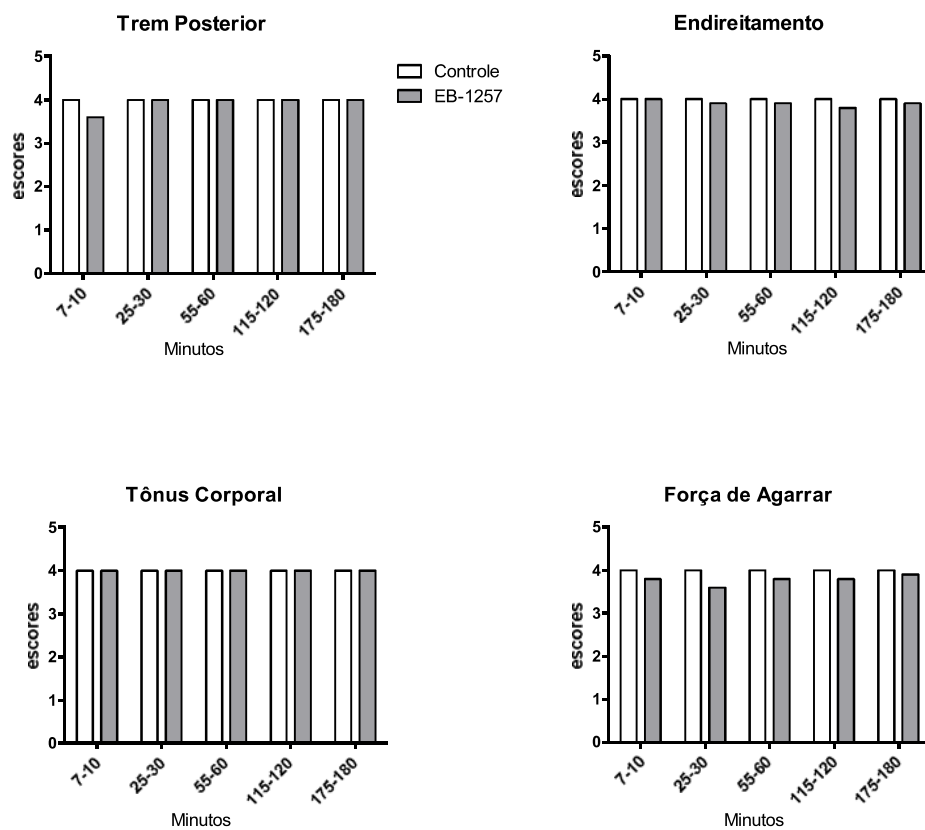
### 5.6. Experimento 6: Avaliação da Toxicidade Aguda da Dose Não Letal do EB-1257

A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças significativas entre os grupos [tratamento-  $F(1/70) = 111,8$ ,  $p < 0,0001$ ; Sessões-  $F(4/70) = 2,73$ ,  $p = 0,03$ ]. O teste *post hoc* mostrou que a atividade geral do grupo experimental foi reduzida significativamente em relação ao grupo controle nas sessões 2.3.4 e 5 de observação (fig.37).



**Fig. 37** Atividade geral observada em caixa de observação de camundongos tratados com a dose não letal do EB-1257. Os dados são apresentados em medianas. N do grupo controle= 6; N= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.

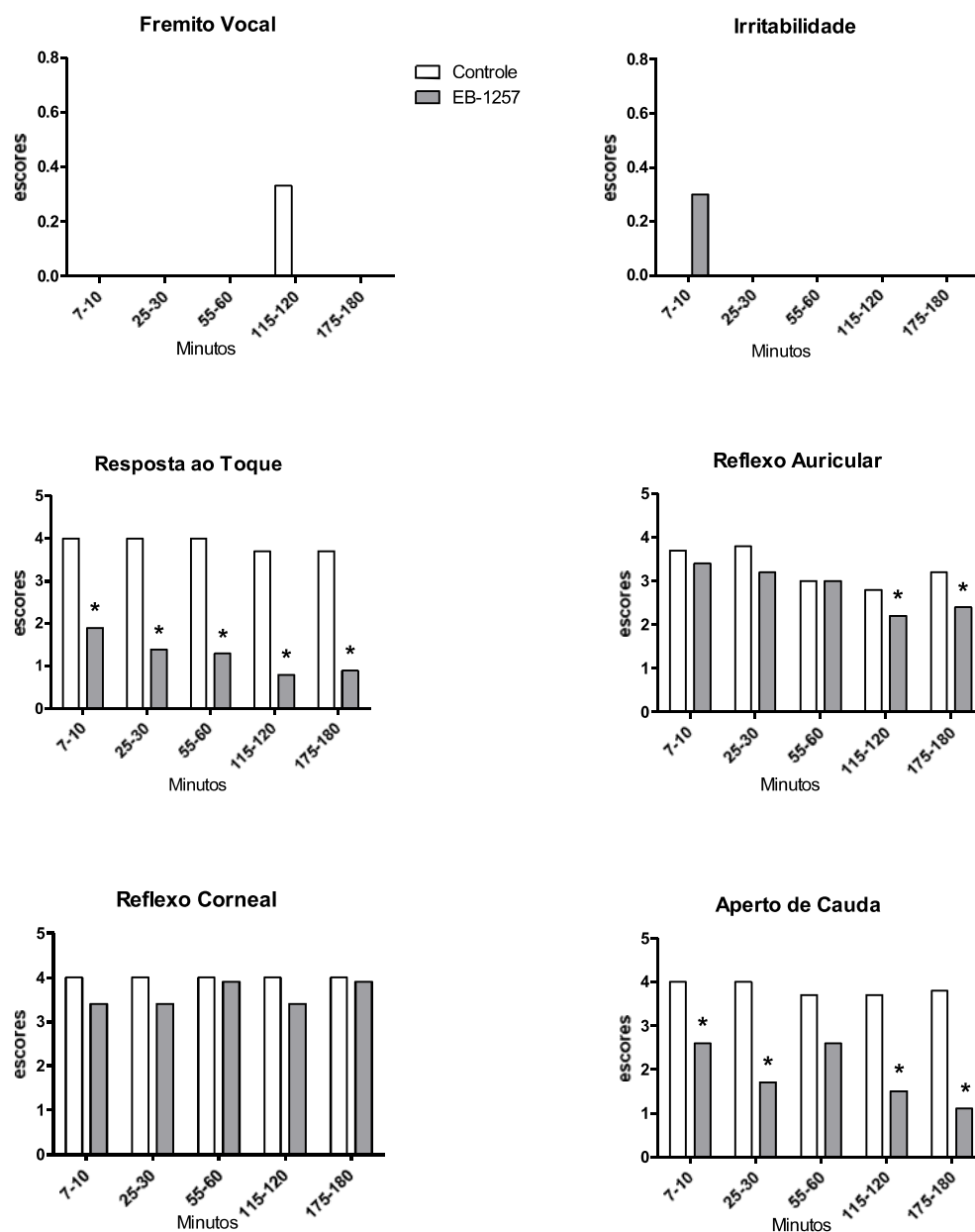
A Fig. 38 ilustra os sinais psicomotores de camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. A ANOVA de duas vias não indicou a existência de diferenças significantes entre os grupos.



**Fig.38.** Sinais psicomotores em camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo controle.

A Fig. 39 ilustra os sinais sensoriais em camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças na resposta ao toque [tratamento- $F(1/65) = 147,84$ ,  $p < 0,0001$ , sessões-  $F(4/65) = 1,48$ ,  $p=0,21$ ], no aperto de cauda [tratamento-  $F(1/65) = 54,87$ ,  $p < 0,0001$ , sessões-  $F(4/65) = 1,50$ ,  $p= 0,21$ ], no reflexo auricular [tratamento-  $F(1/65) = 4,53$ ,  $p=0,030$ , sessões- $F(4/65) = 3,50$ ,  $p=0,01$ ] e corneal (tratamento- $F(1/65) = 6,27$ ,  $p=0,014$ , sessões- $F(4/64) = 0,59$ ,  $p = 0,67$ ).

O teste post hoc indicou que as respostas ao toque e no aperto de cauda nos animais do grupo experimental apresentaram redução significativa em todas as sessões comparadas às respostas do grupo controle. O reflexo auricular teve redução significativa nas duas últimas sessões de observação nos camundongos do grupo experimental. A irritabilidade e frêmito vocal não foram modificados pelo tratamento e nas sessões de observações.

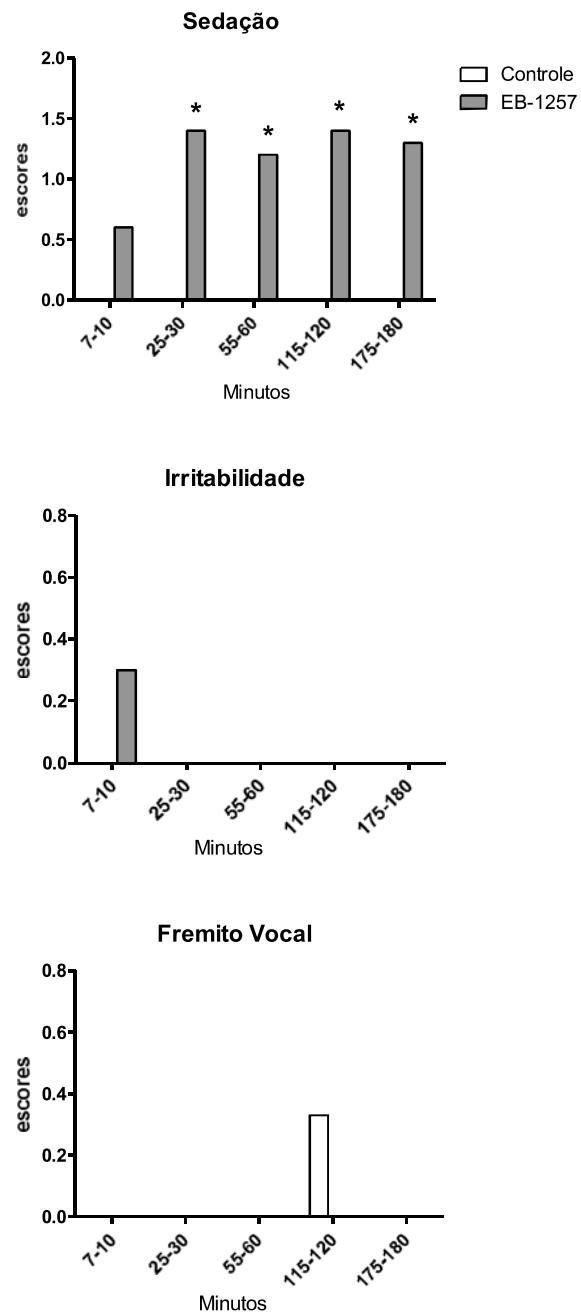


**Fig.39.** Sinais sensoriais em camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo controle.

A Fig. 40 ilustra os sinais de toxicidade de camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal, ligados ao SNC. A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças significantes na sedação quanto ao tratamento  $F(1/70)$



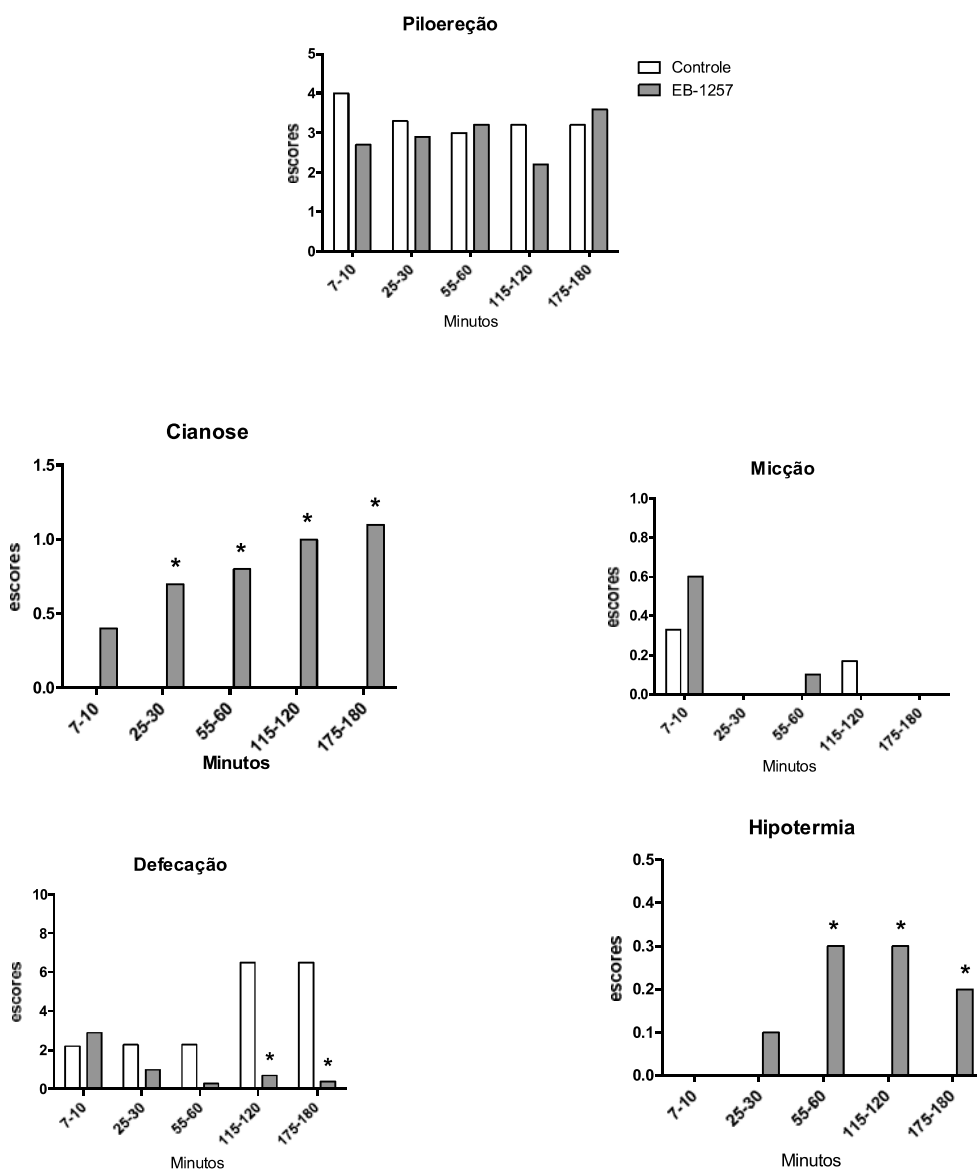
=21,53,  $P < 0,0001$ ] e não entre as sessões  $F(4/70) = 0,35$ ,  $p = 0,845$ ], não havendo interação entre os fatores. O teste post hoc indicou que, na sedação, os animais do grupo experimental apresentaram escores significativamente superiores àqueles do grupo controle nas sessões 2,3,4 e 5. Quanto aos demais parâmetros não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos.



**Fig. 40.** Sinais ligados ao SNC em camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo controle.

A Fig. 41 ilustra os sinais de toxicidade de camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal ligados ao SNA.

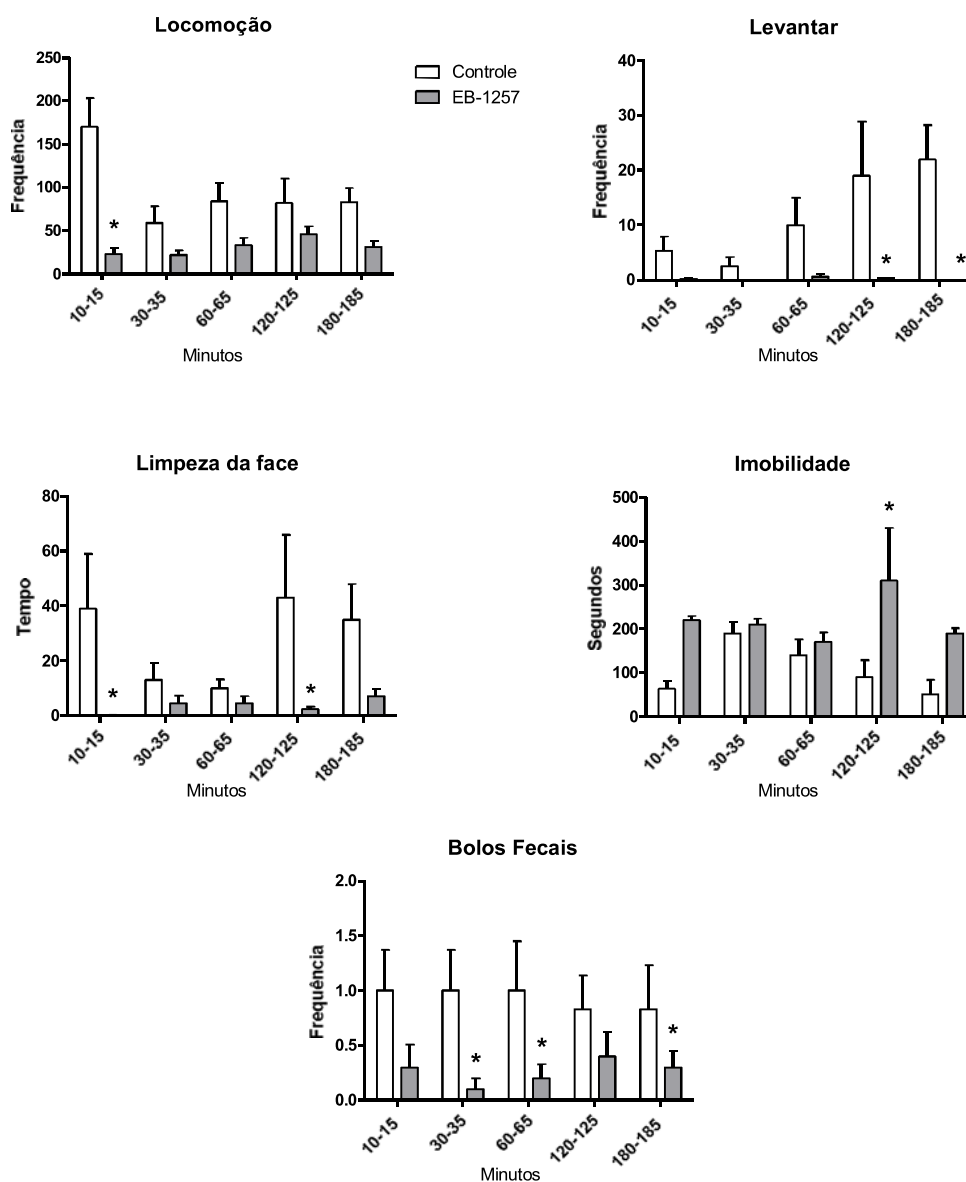
A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças significantes na cianose [tratamento-  $F(1/65) = 95,73, p < 0,0001$ , sessões-  $F(4/65) = 2,24, p = 0,07$ ], defecação [tratamento-  $F(1/65) = 31,29, p < 0,0001$ , sessões-  $F(4/65) = 3,18, p = 0,01$ ] e hipotermia (Tratamento-  $F(1/65) = 6,57, p = 0,01$ , sessões-  $F(4/65) = 6,57, p = 0,01$ , sessões-  $F(94/65) = 0,69, p = 0,60$ ). O teste post hoc indicou que a cianose dos animais do grupo experimental apresentaram escores superiores àqueles do grupo controle nas sessões 2,3 , 4 e 5. Mesmo fato ocorreu para a hipotermia, porém as diferenças significantes ocorreram nas sessões 3,4 e 5. Ainda houve redução na defecação nos camundongos do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle nas sessões 4 e 5. Não foi verificada alteração na piloereção.



**Fig. 41.** Sinais ligados ao sistema nervoso autônomo em camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. Os dados são apresentados em medianas. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo controle.

A Fig. 42 ilustra a atividade geral observada em campo aberto de camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. A ANOVA de duas vias indicou a existência de variações em todos os parâmetros, exceto na defecação

(locomoção-tratamento-  $F(1/65) = 45,18$ ,  $p < 0,0001$ ; sessões-  $F(4/65) = 41,65$ ,  $p = 0,009$ ; levantar – tratamento-  $F(1/65) = 30,01$ ,  $p < 0,0001$ , sessões-  $F(4/65) = 3,24$ ,  $p = 0,017$ ; imobilidade – tratamento-  $F(1/65) = 11,97$ ,  $p = 0,001$ , sessões- $F(4/65) = 0,95$ ,  $p = 0,44$ , limpeza de face- tratamento- $F(1/65) = 18,68$ ,  $p < 0,0001$ , sessões- $F(4/65) = 1,34$ ,  $p = 0,26$ ; defecação-tratamento-  $F(1/65) = 16,41$ ,  $p = 0,0001$ , sessões- $F(4/65) = 0,05$ ,  $p = 0,99$ ) . Em relação ao grupo controle, o teste post hoc mostrou que a frequência de locomoção foi reduzida na sessão 1 e o levantar aumentado nas sessões 3 e 4. Verificou-se, nos animais do grupo experimental, que a limpeza de face foi reduzida nas sessões 2-4. A imobilidade dos animais do grupo experimental foi maior apenas na sessão 4 ; a defecação foi reduzida nas sessões 2,3 e 5.



**Fig.42.** Atividade geral observada em campo aberto de camundongos tratados com o EB-1257 na dose não letal. Os dados são apresentados em medias e respectivos erros-padrão. N= grupo controle= 6; n= do grupo experimental = 10. ANOVA de duas vias.\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que os extratos orgânicos da *A.auriculata* e *Symphonia globulifera*, respectivamente, EB-689 e EB-1257, apresentam graus de toxicidade diferentes; assim, a dose não letal do EB-689 é 0,0049 g/Kg e a do EB-1257, 0,312,5 g/Kg. A análise dos sinais de toxicidade mostra também que os extratos promovem diferentes sinais de toxicidade em vários níveis do organismo animal.

A metodologia empregada neste trabalho baseou-se naquela proposta por Brito (1994), adaptada às perspectivas atuais da análise toxicológica. Nesse sentido, desde muitos anos ocorrem debates e discussões acerca do teste da DL50 (dose letal mediana), pois esse índice além de ser questionável pela sua variabilidade e difícil replicabilidade o é também pelos seus aspectos éticos (Botham 2004). Os testes de toxicidade foram desenvolvidos para determinar o potencial de novas substâncias e produtos capazes de causar danos à saúde humana e animal. O primeiro teste proposto pela legislação é o da toxicidade aguda. Sua finalidade é classificar um determinado agente quanto ao seu potencial de toxicidade e o risco da exposição a esse agente por meio da incidência de letalidade. No entanto, outros parâmetros podem ser investigados nesses estudos, permitindo, por vezes, identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, sua toxicocinética e a relação-dose resposta. Desses testes podem derivar informações sobre a toxicodinâmica desse agente (Blaauboer 2003; Coecke *et al.* 2006; Prieto *et al.* 2006).

O teste da DL50 foi introduzido em 1927 por Trevan (1927) e tornou-se um padrão para análise da toxicidade de substâncias químicas. Nos protocolos propostos e exigidos por lei, a letalidade era o dado mais importante e cerca de 100

animais eram empregados para construir curvas de letalidade e cálculo da DL50 (Gubbels-van Hal *et al.* 2005). Nas décadas de 1980-1990 foram propostos novos critérios para os testes de toxicidade em particular, de toxicidade oral cujos sinais de se mostram suficientes para demonstrar a toxicidade do produto por estimativa da DL50, evitando-se a morte de tantos organismos. Finalmente, o teste da DL50 foi banido dos estudos de toxicidade.

Na medida em que a sociedade tornou-se consciente acerca do bem estar animal, os aspectos éticos forçaram novas propostas para a avaliação da toxicidade. Surgiram três propostas para estimar a DL50 oral, os sinais de toxicidade aguda e os órgãos alvo. São eles: o teste de dose fixa, da classe tóxica e “*Up and Down*” ( para detalhes ver- [oecd.org/ehs/test/testlist.htm](http://oecd.org/ehs/test/testlist.htm)). Embora existam diferenças entre os métodos, em todos esses protocolos, o número de animais empregados é menor e a redução do sofrimento animal é controlada (Valadares 2006).

Neste trabalho propõem-se alterações no protocolo elaborado por Brito (1994) no que se refere ao número de animais a serem empregados, ou seja, utilizaram-se 3 camundongos por dose e os sinais de toxicidade foram observados pela bateria de teste do protocolo inicial. Acrescentou-se um teste comportamental, a atividade geral observada em campo aberto e o teste do labirinto elevado. Para melhor caracterizar os efeitos tóxicos, introduziu-se um estudo temporal, em intervalos regulares até 180 minutos após a administração dos extratos. Nesse protocolo empregou-se a via intraperitoneal, pois além de se ter a certeza da dose administrada, a biodisponibilidade do agente é total. O objetivo final do protocolo foi



de se atingir uma dose não letal, porém com sinais de toxicidade evidentes. Foi possível classificar os extratos segundo seu grau de toxicidade.

Verificou-se que o EB-689 é altamente tóxico, pois segundo os padrões substanciais que apresentam valores menores que 5 mg/Kg estão classificadas nesse patamar. Por outro lado, o EB-1257 pode ser classificado como moderadamente tóxico. O cálculo das DL50% aproximadas dos dois extratos reforçaram essas afirmativas, pois obteve-se para o EB-689 A DL50% de 15mg/Kg e para o EB-1257 , 355 mg/Kg.

Na prospecção da toxicidade do EB-689, a análise da atividade motora espontânea do extrato EB-689 mostrou redução gradativa do parâmetro até níveis estatisticamente significantes nas doses maiores do extrato. Os parâmetros psicomotores mostram que houve redução gradativa dos reflexos de endireitamento, tônus corporal e força de agarrar dos animais, paralelamente, a um aumento gradativo com a dose de queda do trem posterior. No mesmo sentido, verificou-se perda dos reflexos sensoriais na medida em que a dose administrada aumentou. Surpreendentemente, foram observados poucos efeitos nos parâmetros ligados ao sistema nervoso central, uma vez que a redução na atividade geral, parâmetros psicomotores e sensoriais poderiam ser indicativos de efeito depressor central. A atividade geral em campo aberto foi reduzida nas maiores doses do extrato, uma vez que se verificou redução nas frequências de locomoção e levantar, paralelamente, ao aumento na imobilidade de forma dose-dependente.

A necropsia desses animais indicou a presença de hemorragia interna em todas as doses administradas exceto na dose não letal. A hemorragia interna pode desencadear choque hipovolêmico, em que se observam pulso fraco e rápido; pele

fria e úmida (pegajosa); queda da pressão arterial; ansiedade, respiração rápida e profunda; perda de consciência e parada respiratória; e finalmente choque. As reações observadas no período anterior à morte dos animais podem estar associadas ao processo hemorrágico, como hipotermia, cianose e outras reações ligadas ao sistema nervoso autônomo. Estudos histopatológicos complementarão essas informações. Esse fato também explicaria não só a redução da dose dependente da atividade geral observada em campo aberto como também os resultados no labirinto em cruz elevada. Neste aparelho verificou-se redução em todos os parâmetros observados que seriam um reflexo da redução da atividade motora em resultado da hemorragia. Finalmente, o aumento da hipotermia e cianose bem como a redução da respiração e piloereção têm explicação plausível pela presença de hemorragia.

Segundo o protocolo proposto, a análise dos efeitos da dose não letal empregou um número maior de animais, permitindo a análise estatística mais fidedigna dos efeitos do EB-689. Além de não ter-se ocorrido morte dos animais, também não foi observada hemorragia na necropsia. Esses dados apontam para a *causa mortis* desse extrato como sendo a hemorragia. O mecanismo pelo qual esse fato ocorre deverá ser investigado posteriormente.

A análise dos sinais de toxicidade da dose não letal confirmou a redução da atividade geral observada na gaiola moradia evidente a partir dos 115 min de observação. Houve também, redução ao final das observações em alguns sinais sensoriais e psicomotores. Por outro lado, tanto a cianose como a ptose aumentaram no decorrer das sessões na prospecção dos efeitos tóxicos da dose não letal do EB-689. A cianose representa redução da oxigenação do animal

podendo ser um primeiro sinal do processo hemorrágico observado nas doses maiores do extrato.

A presença de ptose poderia refletir toxicidade autonômica, em particular interferência com o nervo oculomotor por aumento da atividade colinérgica (Morato et al. 1989). A estimulação colinérgica leva ao aparecimento de ptose (Brimijoin & Lennon 1991) e broncoconstrição (Vital 2006) e, a redução da oxigenação pela broncoconstrição poderia levar à cianose, fatos observados após a administração da dose não letal do EB-689. Esse dados em conjunto poderiam sugerir um efeito pró-colinérgico do EB-689 (Vital 2006). O aumento da defecação, parâmetro que pode ser relacionado a efeitos colinérgicos periféricos (Brading & Ramalingam 2006), sofreu incremento significativo ao final das observações, sugerindo ativação, mais uma vez, do sistema do sistema nervoso parassimpático. Além disto, aumento da emocionalidade leva a defecação reativa e redução na atividade geral o que reforça a hipótese de um efeito pró-colinérgico do extrato (Broadhurst 1960). Parâmetros como lacrimação e salivação, sabidamente relacionados à estimulação colinérgica, não foram modificados.

No teste do campo aberto houve redução nas frequências de locomoção e levantar dos camundongos que receberam a dose não letal do EB-689 e concomitante aumento na duração de imobilidade. Esses efeitos foram diferentes daqueles do grupo controle a partir dos 115 min de observação.

O campo aberto foi introduzido por Calvin Hall (1934), esse teste foi primeiramente usado para avaliar a emocionalidade. Hall define o termo *emocionalidade* como um estado emocional formado por um grupo de reações orgânicas e expressivas que denotam uma condição de excitação no animal. Walsh

e Cummins (1976) reformularam o conceito, passando a defini-lo como uma entidade com componentes afetivos não-específicos do comportamento. A exposição ao campo aberto para medida de emocionalidade é feita em condições de alta intensidade de luz e, por vezes, de altos níveis de som tendo, conotações aversivas. Em nossas condições experimentais, os camundongos foram observados em condições menos agressivas tais como, baixa luminosidade, ausência de sons, e assim, a frequência de locomoção e levantar dos animais passaria a expressar outros tipos de comportamento como o exploratório e o motor (Batatinha et al. 1995; Bernardi et al. 1991; Bernardi et al. 1981). Nas condições experimentais empregadas pode-se supor que houve redução da atividade motora dos camundongos. Esse fato ocorreu tanto na gaiola moradia quanto no próprio campo aberto. No entanto, parâmetros como o reflexo de agarrar, queda do trem posterior, força de agarrar e o reflexo de endireitamento, que representam respostas psicomotoras (Moser et al. 2007) não foram modificados.

Embora esses últimos resultados possam ser indicativos de um efeito do EB-689 tanto no sistema nervoso central como no periférico, podem também estar ligados a efeitos comportamentais da exposição a dose pré-letal EB 689 como descrito por Cox; Smith (1992) em ratos expostos a doses pré-letais de anticoagulantes. Ainda, é importante lembrar que os extratos são misturas de princípios ativos complexos, cuja administração pode resultar em efeitos contraditórios. Assim, no caso da análise toxicológica do EB-689 os resultados revelaram alta toxicidade e um perfil toxicológico bem definido promovendo hemorragia.

Estudos químicos desse extrato poderão contribuir para o melhor entendimento dos efeitos tóxicos observados.

A análise do EB-1257 indicou que o extrato apresenta toxicidade moderada, sendo a dose não letal de 0,3125 g/kg. Nota-se que a latência para morte foi dose dependente.

O estudo de prospecção da toxicidade, de forma geral, mostrou redução da atividade geral, aumento de queda do trem posterior, perda do reflexo de endireitamento e do tônus corporal nas maiores doses. Nesse sentido, a redução da atividade geral pode ter relações com a queda do trem posterior, redução do tônus corporal e certo grau de ataxia promovido pela perda do reflexo de endireitamento, parâmetros tidos como representativos da função psicomotora.

O EB-1257, também, promoveu alterações em parâmetros sensoriais, em particular na resposta ao toque e ao aperto da cauda. Nos parâmetros ligados ao SNC verifica-se a presença de tremores na maior dose do EB-1257. Quanto ao sistema nervoso autônomo, o dado mais relevante foi a redução na defecação, embora se observe um certo grau de hipotermia, cianose e piloereção.

A análise da atividade geral em campo aberto após a administração das diferentes doses do EB1257 mostrou que tanto a frequência de locomoção, de levantar e limpeza foram significativamente reduzidas paralelamente a um aumento da duração de imobilidade.

Esses dados tomados em conjunto com os psicomotores sugerem um efeito depressor do extrato na função motora. Esse efeito pode ser o responsável pela redução em todos os parâmetros no labirinto em cruz elevada uma vez que tanto o

número de entradas nos braços abertos e fechados bem como o número de cruzamentos foi reduzido.

A análise dos sinais de toxicidade da dose não letal do EB-1257 mostrou redução consistente na atividade geral observada na gaiola moradia e no campo aberto. Nesse último, houve redução nas frequências de locomoção, levantar e limpeza de face; e imobilidade nas diferentes doses foi aumentada. De forma ampla, a defecação apresentou-se menor após a administração do extrato.

A função motora foi prejudicada nos animais, confirmando os resultados da prospecção da toxicidade acima apresentada. No entanto, os dados de parâmetros psicomotores periféricos nessa dose não foram alterados sugerindo uma origem central para as alterações motoras promovida pelo EB-1257.

Esse extrato alterou parâmetros sensoriais. Assim, a resposta ao toque, ao aperto de cauda e o reflexo auricular foram reduzidos. Por outro lado, observa-se aumento da sedação, parâmetros ligados à ativação do sistema nervoso central. Esses dados em conjunto sugerem que o EB-1257 promove analgesia e sedação de forma similar a drogas hipnoanalgésicas.

A análise dos parâmetros ligados ao sistema nervoso autônomo indica aumento da ativação desse sistema, ou seja, observa-se incremento na cianose e hipotermia e redução na defecação.

Desde que foi proposto efeito analgésico desse extrato, justifica-se o aumento da cianose e a hipotermia, pois hipnoanalgésicos produzem depressão dos centros respiratórios e levam a hipotermia, além de reduzir a motilidade intestinal (Górniak, 2006). Nesse sentido, na atividade geral observada em campo aberto nota-se

redução na frequência de defecação, corroborando com a ideia de redução na motilidade intestinal.

Na atividade geral observa-se ainda redução das frequências de locomoção, levantar e limpeza de face. No entanto, esta redução não foi acompanhada por aumento consistente na duração de imobilidade.

Duas hipóteses poderiam explicar os presentes resultados: uma seria de que a planta tenha diminuído a função motora dos animais e a outra que a exploração é que teria sido reduzida. Para tanto, os resultados da imobilidade são críticos. Nesse sentido, quando se observa redução na locomoção e/ou levantar sem interferência na duração de imobilidade sugere-se que a alteração seja no comportamento exploratório dos animais (Frussa-Filho *et al*, 2010). Ao contrario, redução nesses parâmetros acompanhada por aumento na imobilidade sugere disfunção motora (Frussa-Filho *et al*, 2010). Como o EB-1257 alterou a frequência de locomoção e de levantar sem interferência na duração de imobilidade, quando comparada com o grupo controle, propõe-se que tenha ocorrido alteração do comportamento exploratório dos animais. Além disso, a limpeza de face que representa atividades voltadas ao próprio sujeito foi reduzida.

O conjunto desses dados sugere ação depressora nervosa do EB-1257 tanto no sistema nervoso central como no periférico, sem conotações importantes motoras. Além disso, produziu analgesia, pois reduziu as respostas sensoriais.

Este trabalho, pela sua natureza comportamental, sugere alguns efeitos e mecanismos dos extratos utilizados, porém estudos químicos e dos princípios ativos deles derivados poderão confirmar ou não o que aqui foi exposto.

## 7 CONCLUSÃO

I- A análise da toxicidade do EB-689 mostrou que :

- 1) a DL50% aproximada é de 0,015 g/Kg.
- 2) a dose não letal detectada foi 0,0049 g/Kg, indicando que o extrato é altamente tóxico.
- 3) na prospecção da toxicidade de diferentes doses ocorreu redução dos parâmetros psicomotores e sensoriais. No sistema nervoso autônomo, houve alterações na respiração e defecação e aumento da hipotermia e cianose. Na dependência da dose, ocorreu redução da atividade geral observada em campo aberto e dos parâmetros do labirinto em cruz elevada.
- 4) na análise dos sinais de toxicidade da dose não letal notou-se aumento na cianose e redução da atividade geral.
- 5) na necropsia verificou-se a presença de hemorragia.

Esses sinais e sintomas da intoxicação pelo EB-689 foram interpretados como resultado da hemorragia produzida pelo extrato.

II- A análise do EB-1257 mostrou que:

- 1) a DL50% é de 0,355 g/Kg.
- 2) a dose não letal detectada foi 0,3125 g/Kg indicando que o extrato apresenta toxicidade mediana.
- 3) na prospecção da toxicidade de diferentes doses verificou-se redução da atividade geral na gaiola moradia, aumento na queda do trem posterior, redução no



reflexo de endireitamento e tônus corporal. Houve redução consistente nos parâmetros sensoriais. Os parâmetros da atividade geral e no labirinto em cruz elevada foram reduzidos tendo sido sugerido efeito depressor na atividade motora e analgésico.

4) na análise dos sinais de toxicidade da dose não letal nota-se, novamente, redução na atividade geral nos parâmetros sensoriais e a presença de sedação.

5) na necropsia notou-se que após administração de 5 g/kg, uma leve alteração intestinal, com sangramento interno, e fígado “pálido”. Conforme as doses diminuía, os efeitos foram amenizados, e a causa da morte não pôde ser relacionada a processos macroscópicos ou alterações na hegemonia anatômica e tecidual.

Sugeriu-se que dentre os princípios ativos do EB-1257 há uma substância com propriedades depressoras do SNC e analgésicas.

## 8 BIBLIOGRAFIA

Agra, M. F., Silva, K. N., Basílio, I. J. L. D., França, P. F. & Barbosa-Filho, J. M. 2008, 'Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil.', *Rev Bras Farmacogn* vol. 18, p. 17.

Aldrich, P. R., Hamrick, J. L., Chavarriaga, P. & Kochert, G. 1998, 'Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*', *Mol Ecol*, vol. 7, no. 8, pp. 933-44.

Barneby, R. C. & Grimes, J. W. 1996, 'Silk Tree, Guanacaste, Monkey's Earring: A generic system for the synandrous Mimosaceae of the Americas. Part I. *Abarema*, *Albizia*, and Allies. ', *Memoirs of the New York Botanical Garden*, vol. 74, p. 292.

Barneby & J.W.Grimes (Mimosaceae) ', *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* vol. 19, p. 5.

Batatinha, M. J., de Souza-Spinosa, H. & Bernardi, M. M. 1995, 'Croton zehntneri: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents', *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 45, no. 1, pp. 53-7.

Bayma, J. C., Arruda, M. S. P. & Neto, M. S. 1998, 'A prenylated xanthone from the bark of *symphonia globulifera*', *Phytochemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 1159-60.

Bentham, G. 1865, 'Leguminosae', in *Genera Plantarum*. , eds G. Bentham and J.D. Hooker, Lovell Reeve & Co, London, pp. 434-600.

Bernardi, M. M., De Souza-Spinosa, H., Batatinha, M. J. & Giorgi, R. 1991, 'Croton zehntneri: possible central nervous system effects in rodents', *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 33, no. 3, pp. 285-7.

Bernardi, M. M., De Souza, H. & Palermo Neto, J. 1981, 'Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats', *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 73, no. 2, pp. 171-5.

Blaauboer, B. J. 2003, 'Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment', *Altern Lab Anim*, vol. 31, no. 3, pp. 277-81.

Botham, P. A. 2004, 'Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies', *Toxicol In Vitro*, vol. 18, no. 2, pp. 227-30.

Brading, A. F. & Ramalingam, T. 2006, 'Mechanisms controlling normal defecation and the potential effects of spinal cord injury', in *Progress in Brain Research*, eds C.W. Lynne and P. Canio, Elsevier, pp. 345-58.

Brimijoin, S. & Lennon, V. A. 1991, 'Selective destruction of preganglionic sympathetic nerves by antibodies to acetylcholinesterase.', *J Neural Transm Suppl*, vol. 34, p. 6.

Brito, A. S. (ed) 1994, *Manual de ensaios de toxicidade*, Unicamp, Campinas.

Broadhurst, P. L. 1960, 'Experiments in psychogenetics: Applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour', in *Experiments in personality*, ed H.J. Eysenck, Routledge & Kegan Paul, London, pp. 1-256.

Coc, P; Smith, RH. Rodenticide ecotoxicology:pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. 1992. Vertebrate Pest Conference Proceedings collection Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest.Conference 1992. University of Nebraska – Lincoln.

Coecke, S., Ahr, H., Blaauboer, B. J., Bremer, S., Casati, S., Castell, J., Combes, R., Corvi, R., Crespi, C. L., Cunningham, M. L., Elaut, G., Eletti, B., Freidig, A., Gennari, A., Gherzi-Egea, J. F., Guillouzo, A., Hartung, T., Hoet, P., Ingelman-Sundberg, M., Munn, S., Janssens, W., Ladstetter, B., Leahy, D., Long, A., Meneguz, A., Monshouwer, M., Morath, S., Nagelkerke, F., Pelkonen, O., Ponti, J., Prieto, P., Richert, L., Sabbioni, E., Schaack, B., Steiling, W., Testai, E., Vericat, J. A. & Worth, A. 2006, 'Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54', *Altern Lab Anim*, vol. 34, no. 1, pp. 49-84.

de Araujo, C. W., de Sa Peixoto Neto, P. A., Campos, N. V., Porfírio, Z. & Caetano, L. C. 2002, 'Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotemo* bark', *Fitoterapia*, vol. 73, no. 7-8, pp. 698-700.

Dick, C. W. & Heuertz, M. 2008, 'The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species.  
' , *Evolution*, vol. 62, no. 11, p. 15.

Frussa-Filho, R., D. F. Fukushima, et al. (2010). Assessment of motor function in rodents: behavioral models sharing simplicity and multifaceted applicability - Part 1: the open-field test. . Animal models as tools in ethical biomedical research. . M. L. Andersen and S. Tufik. São Paulo, AFIP/CEPID. 1: 286-313.

Galledo del Sol, F., Maiques, S. R., Santos, C. F., Grangeiro, T. B., Nagano, C. S., Farias, C. M. S. A., Cavada, B. S. & Calvete, J. J. 2002, 'Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the seed from *Parkia platycephala*', *Act. Crystallograph. D*, vol. 58, no. 1, p. 3.

Grimes, J. W. 1995. Generic relationships of Mimosoideae Tribe Ingeae, with emphasis on the New World *Pithecellobium*-Complex. In: Crisp, M. & Doyle, J. J.(eds.). *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp.101-121.

Giulietti, A. M., Harley, R. M., Queiroz, L. P., Wanderley, M. G. L. & Berg, C. 2005, 'Biodiversity and conservation of plants in Brazil', *Conservation Biology* vol. 19, p. 8.  
Grimes, J. W. 1995, 'Generic relationships of Mimosoideae Tribe Ingeae, with emphasis on the New World *Pithecellobium*-Complex', in *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*, eds M. Crisp and J.J. Doyle, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 101-21.

Gubbels-van Hal, W. M., Blaauboer, B. J., Barentsen, H. M., Hoitink, M. A., Meerts, I. A. & van der Hoeven, J. C. 2005, 'An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 42, no. 3, pp. 284-95.

Gustafson, K. R.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G.; Fuller, R. W.; McKee, T. C.; Cardenilla, J. H.H.; Mc Mahon, J. B.; Boyd, M. R. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphoniaglobulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusiarosea*. *Tetrahedron* 1992, 48, 10093–10102.

Hall, C. S. 1934, 'Emotional behavior in the rat. I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality', *Journal Comparative of Psychology*, vol. 18, p. 8.

Hanausek, M., Ganesh, P., Walaszek, Z., Arntzen, C. J., Slaga, T. J. & Gutterman, J. U. 2001, 'Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 20, pp. 11551-6.

Haridas, V., Arntzen, C. J. & Gutterman, J. U. 2001, 'Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 20, pp. 11557-62.

H. D. Locksley, I. Moore and F. Scheinmann. Extractives from guttiferæ. Part III. The isolation and structure of symphoxanthone and globuxanthone from *Symphoniaglobulifera* L. **J. Chem. Soc. C**, 1966b, 2186-2190

H. D. Locksley, I. Moore and F. Scheinmann. Extractives from guttiferæ. Part IV. Isolation and structure of ugaxanthone and mbarraxanthone from *Symphoniaglobulifera* L. *Chem. Soc. C*, 1966c, 2265-2269.

Iganci, J. R. V. & M.P., Morim. 2009, 'Abarema (Leguminosae, Mimosideae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil', *Rodriguésia* vol. 60, no. 3, p. 13.

LENTA, 2007- Bruno Ndjakou Lenta 1,2,\* , Catherine Vonthron-Sénécheau 3,\* , Bernard Weniger 4,\* , Krishna Prasad Devkota 2, Joseph Ngoupayo 5, Marcel Kaiser 6, Qamar Naz 7, Muhammad Iqbal Choudhary 7, Etienne Tsamo 5 and Norbert Sewald 2,\* Leishmanicidal and Cholinesterase Inhibiting Activities of Phenolic Compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphoniaglobulifera* *Molecules* 2007, 12, 1548-1557

Lewis, G. P. & Rico Arce, M. L. 2005, 'Tribe Ingeae', in *Legumes of the world*, eds G.P. Lewis, B. Schrire, B. Mackinder and M. Lock, Kew, pp. 193-213.

Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B. & Lock, M. (eds) 2005, *Legumes of the world*, The Royal Botanic Gardens, Kew.

Li et al 2002—Xing-Cong Li, Alpana S. Joshi,† Hala N. ElSohly,† Shabana I. Khan,† Melissa R. Jacob,† Zhizheng Zhang,† Ikhtlas A. Khan,†,‡ Daneel Ferreira,† Larry A. Walker,†,§ Sheldon E. Broedel, Jr.,^,| Robert E. Rauli,^,r and Ronald L. Cihlar O. Fatty Acid Synthase Inhibitors from Plants: Isolation, Structure Elucidation, and SAR Studies. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1909-1914

Locksley, H. D; Moore, I and Scheinmann, FJ. Extractives from Guttiferae. Part II. The isolation and structure of four polyhydroxyxanthenes in *Symphoniaglobulifera*. *Chem. Soc. C*, 1966a, 430-432

Lopez, A., Hudson, J. B. & Towers, G. H. N. 2001, 'Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants', *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 77, no. 2-3, pp. 189-96.

Marti, G., Eparvier, V., Moretti, C., Prado, S., Grellier, P., Hue, N., Thoison, O., Delpech, B., Guéritte, F. & Litaudon, M. 2010, 'Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae)', *Phytochemistry*, vol. 71, no. 8-9, pp. 964-74.

Morato, G. S., Lemos, T. & Takahashi, R. N. 1989, 'Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. ', *Neurotoxicol Teratol*, vol. 11, no. 5, p. 5.

Moser, V. C., Phillips, P. M., McDaniel, K. L. & Sills, R. C. 2007, 'Neurotoxicological evaluation of two disinfection by-products, bromodichloromethane and dibromoacetonitrile, in rats', *Toxicology*, vol. 230, no. 2-3, pp. 137-44.

Nkengfack, A. E.; Azebaze, G. A.; Vardamides, J. C.; Fomum, Z. T.; van Heerden, F. R. Aprenylatedxanthone from *Allanblackia floribunda*. *Phytochemistry* 2002,a, 60, 381-384.

Nkengfack, A. E.; Mkounga, P.; Meyer, M.; Fomum, Z. T.; Bodo, B. Globulixanthonones C, D and E: three prenylatedxanthonones with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry* 2002,b, 61, 181-187.

Nkengfack, A. E., Mkounga, P., Meyer, M., Fomum, Z. T. & Bodo, B. 2002, 'Globulixanthonones C, D and E: three prenylated xanthonones with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*', *Phytochemistry*, vol. 61, no. 2, pp. 181-7.

Ngouela, S, Lenta, B.N., NOUNGOUÉ, D.T., Ngoupayo, J., BOYOM, F.F., TSAMO, E., GUT, J, Rosenthal, P.J, Connolly, J.D. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry*, 67(3)2006, P.302-306

Ossenkopp, K. P. & Mazmanian, D. S. 1985, 'The measurement and integration of behavioral variables: aggregation and complexity as important issues', *Neurobehav Toxicol Teratol*, vol. 7, no. 1, pp. 95-100.

Pare, W. P. 1964, 'The Effect of Chronic Environmental Stress on Stomach Ulceration, Adrenal Function, and Consummatory Behavior in the Rat', *J Psychol*, vol. 57, pp. 143-51.

Prieto, P., Baird, A. W., Blaauboer, B. J., Castell Ripoll, J. V., Corvi, R., Dekant, W., Dietl, P., Gennari, A., Gribaldo, L., Griffin, J. L., Hartung, T., Heindel, J. J., Hoet, P., Jennings, P., Marocchio, L., Noraberg, J., Pazos, P., Westmoreland, C., Wolf, A., Wright, J. & Pfaller, W. 2006, 'The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56', *Altern Lab Anim*, vol. 34, no. 3, pp. 315-41.

Riba-Hernandez, P., Stoner, K. E. & Lucas, P. W. 2005, 'Sugar concentration of fruits and their detection via color in the Central American spider monkey (*Ateles geoffroyi*)', *Am J Primatol*, vol. 67, no. 4, pp. 411-23.

Santos, s. c., Ferreira, F. S., Rossi-Alva, J. C. & Fernandez, L. G. 2007, ' Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. ', *Rev Bras Farmacogn* vol. 17, p. 5.

Silva, M. S. 2003, '*Avaliação farmacológica de plantas medicinais de uso popular contra distúrbios do trato gastrintestinal no Povoado Colônia Treze*', *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.* , vol. 19, p. 1.

Silva, M.S., 2003. Avaliação farmacológica de plantas medicinais de uso popular contra

Silva, M. S., Antoniolli, A.R., Batista, J.S., Mota, C.N 2006, '*Plantas medicinais usadas 632 nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, 633 Brasil. Acta botânica brasileira 20, 815*', *Acta Botanica Brasilica* vol. 20, p. 15.

Silva, N. C. B., Esquibel, M. A., Alves, I. M., Velozo, E. S., Almeida, M. Z., Santos, J. S., Campos-Buzzi, F. & Meira, A. V. 2009, '*Antinociceptive effects of Abarema cochliocarpos* (B.A. Gomes)

Suffredini, I. B., Paciencia, M. L., Frana, S. A., Varella, A. D. & Younes, R. N. 2007a, '*In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts*', *Pharmazie*, vol. 62, no. 10, pp. 798-800.

Suffredini, I. B., Paciencia, M. L., Varella, A. D. & Younes, R. N. 2006, '*In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts*', *Pharmazie*, vol. 61, no. 8, pp. 722-4.

Suffredini, I. B., Paciencia, M. L., Varella, A. D. & Younes, R. N. 2007b, '*In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extract against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia*.', *Fitoterapia*, vol. 78, no. 3, p. 4.

Trevan, J. 1927, '*The error of determination of toxicity*', *Proceedings of the Royal Society*, vol. 101B, p. 21.

Valadares, M. C. 2006, '*[Acute toxicity evaluation: strategies post "DL50 test era"]*', *Revista Eletrônica de Farmácia*, vol. 3, no. 2, pp. 93-8.

Vital, M. A. F. 2006, '*Introdução ao sistema nervoso autônomo*', in *Farmacologia Aplicada à Medicina Veerínária*, eds H.S. Spinosa, S.L. Górnaiak and M.M. Bernardi, Guanbara Koogan, Rio de Janeiro, p. 895.

Walsh, R. N. & Cummins, R. A. 1976, 'The Open-Field Test: a critical review', *Psychol Bull*, vol. 83, no. 3, pp. 482-504.

Whimbey, A. E. & Denenberg, V. H. 1967, 'Two independent behavioral dimensions in open-field performance', *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, vol. 63, no. 3, pp. 500-4.

Younes, R. N., Varella, A. D. & Suffredini, I. B. 2000, 'Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras', *Acta Oncologica Brasileira*, vol. 20, p. 5.