

Avaliação toxicológica do extrato acetato de etila de *Spigelia antheimia* Linn, em ratos e camundongos

Toxicological evaluation of an ethyl acetate extract of *Spigelia antheimia* Linn in rats and mice

A. L. F. Camurça-Vasconcelos,* L. M. Melo,* N. R. F. Nascimento,* P. G. M. Teixeira,* D. B. Menezes,** R. A. Silva,***
I. P. Souza,*** M. G. R. Queiroz,*** S. M. Morais,* C. M. L. Bevilaqua*

Resumo

O extrato acetato de etila de *Spigelia antheimia* (EASa) mostrou formalmente ser altamente eficaz contra o desenvolvimento larvar e a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*, um importante parasito de ruminantes, *in vitro*. A LD_{10} e a LD_{50} de EASa foram administradas subcrônica e cronicamente pela via oral em ratos *wistar* e o perfil bioquímico foi comparado antes e após cada tratamento e com veículo. Vários órgãos foram coletados e processados para análise histopatológica. Os parâmetros hematológicos foram avaliados antes e depois da administração de EASa durante 30 dias. E os efeitos do EASa administrado pela via oral durante o período embriogênico ou organogênico a camundongas gestantes foram estudados. Os efeitos diretos de EASa, *in vivo*, foram calculados na pressão sanguínea arterial média e no eletrocardiograma (ECG), e *in vitro* no coração isolado e no átrio isolado de ratos. A administração de EASa não afetou qualquer parâmetro bioquímico, hematológico ou reprodutivo estudado. EASa induziu um efeito hipotensivo de curto prazo em ratos normotensivos sem qualquer alteração concomitante nos parâmetros do ECG. As maiores doses de EASa induziram uma significativa diminuição da amplitude de contração do coração e átrio direito. EASa é desprovido de toxicidade significativa e tem leves efeitos no sistema cardiovascular.

Palavras-chave: *Spigelia antheimia*, toxicidade sistêmica, ratos e camundongos.

Abstract

Ethyl acetate of *Spigelia antheimia* (EASa) was formely shown to be effective against larval development and egg hatching of *Haemonchus contortus*, an important ruminant parasite, *in vitro*. The calculated LD_{10} and LD_{50} of EASa were administered subchronically and chronically by oral route to Wistar rats and the serum biochemical profile was compared before and after treatments and with the control. Several organs were collected and processed for histopathological examination. Hematological parameters were evaluated before and after administration of EASa during 30 days. The effects of EASa administered by oral route during the embryogenic or organogenic period to pregnant mice were studied. The direct effects of EASa, *in vivo*, were evaluated on mean arterial blood pressure (MAP) and electrocardiogram (ECG), and *in vitro* on the isolated heart and atria of rats. The oral administration of EASa, did not affect any of the biochemical, hematological or reproductive parameters. EASa induced only a short-term hypotensive effect in normotensive rats, without any concomitant alteration in ECG parameters. The higher doses of EASa induced a significant decrease in the contraction amplitude of the isolated heart and in the right atria. The EASa is devoid of systemic toxicity and has slight effects on the cardiovascular system.

Keywords: *Spigelia antheimia*, systemic toxicity, rats and mice.

Introdução

Spigelia antheimia é uma erva da família das loganiáceas conhecida no Brasil como “erva-lombrigueira” e é utilizada no Nordeste do Brasil por suas reputadas propriedades anti-helmínticas. Estudos prévios mostram que o extrato aquoso e extratos orgânicos desta planta inibem a eclosão de ovos e o desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*, o mais importante parasito gastrointestinal de ruminantes do nordeste do Brasil (Batista et al., 1999; Assis, 2000). Entretanto, somente

informações escassas com respeito ao seu perfil toxicológico estão disponíveis. Braga (1976) e Basílio et al. (2001) reportam que esta espécie é letal para bovinos e induz êmese e convulsões em animais monogástricos. Alguns autores relatam o isolamento de alcalóides quaternários nesta espécie e caracterizaram suas atividades cardiodepressoras em músculo papilar isolado de porquinhos-da-índia (Wagner et al., 1993; Achenbach et al., 1995; Hübner et al., 2001). Camurça-Vasconcelos (2002) avaliaram os efeitos neuromusculares e a toxicidade aguda de um extrato acetato

* Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, CEP 60770-000, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: claudiam@fortalnet.com.br

** Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina - UFC

***Departamento de Análises Clínicas. Faculdade de Farmácia - UFC.

de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) relatando que esta planta induz paralisia tônica *in vivo*, diminui a amplitude de contração e aumenta o tônus de músculos esqueléticos *in vitro*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade sistêmica e reprodutiva de extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) relativa a administração por um longo período pela via oral e depois seus efeitos cardiovasculares agudos gerais. A administração de doses repetidas foi realizada com o objetivo de avaliar os efeitos sistêmicos de EASa tendo sido mensurados pela variação de parâmetros bioquímicos específicos, *status* hematológico e estudo histopatológico dos órgãos principais. O estudo reprodutivo foi realizado para determinar a potencial embriofetividade e os efeitos organogênicos ou teratogênicos deste extrato. Os efeitos cardiovasculares foram investigados *in vivo* na pressão sanguínea arterial média (PAM) e no eletrocardiograma (ECG), e *in vitro* em coração e átrio isolados perfundidos.

Material e métodos

Animais

Camundongos Albino Swiss e ratos Wistar, oriundos do Biotério do Instituto de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará onde foram alojados, tendo livre acesso à água de bebida e alimentação (Fri-Ribe Laboratory Animals Chow Ô). Os desenhos experimentais descritos aqui foram submetidos ao comitê de ética local e seguiu as normas para cuidado e utilização do Instituto de Saúde Nacional dos Estados Unidos.

Preparação do extrato acetato de etila de *S. anthelmia* (EASa)

A planta foi coletada no campus da Universidade Federal do Ceará e a exsiccata está depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 24.470. As partes aéreas da planta sofreram extração com etanol e submetidas a cromatografia de coluna a vácuo e eluídas com hexano, clorofórmio, acetato e metanol. Após evaporação, o extrato acetato de etila (EASa) foi suspenso em TWEEN 80 a 3% em salina com objetivo de preparar soluções estoque para os testes farmacológicos.

Toxicidade sistêmica

Ratos Wistar de ambos os sexos, foram tratados pela via oral, através de gavagem, durante 30 dias (subcrônica). Os animais foram divididos em três grupos (n=10/grupo), dos quais o primeiro e o segundo grupo receberam 73,4 e 147,3 mg/kg/dia de EASa, respectivamente, e o terceiro grupo recebeu 1mL/kg/dia de salina + tween (controle). Estas doses de EASa correspondem a DL₁ e DL₁₀ obtidas em estudos prévios em camundongos Camurça-Vasconcelos (2002) e o volume fornecido de veículo corresponde ao maior volume de extrato fornecido nos grupos anteriores, e foram empregados no delineamento dos estudos de toxicidade subcrônica ou crônica no que se refere à escolha de doses (Barros e Davino, 1996). Em outro experimento, os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo recebeu a dosagem de 147,3 mg/kg/dia de EASa e o segundo grupo recebeu 1 mL/kg de salina + tween (controle), sendo que estes animais foram tratados durante 60 dias (toxicidade crônica) pela via oral,

através de gavagem. Amostras de sangue foram coletadas antes e após o tratamento para determinação da concentração sérica de uréia, creatinina, albumina, bilirrubina total, bilirrubina direta e indireta, transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) que foram comparadas entre e dentro dos grupos. As amostras de sangue foram coletadas do plexo infraorbital em tubos com gel separador para soro (Vacuette, São Paulo, Brasil) e centrifugadas a 3.000 g e as análises bioquímicas foram realizadas com o uso de *kits* disponíveis comercialmente (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). No final do período experimental, dos animais de todos os grupos foram coletados coração, pulmão, fígado, rins e baço, que foram fixados em formol, processados e corados com Hematoxilina-Eosina para análise histopatológica.

Toxicidade hematológica

Ratos Wistar do sexo feminino (n=6) foram tratados durante 30 dias pela via oral, através de gavagem, com 147,3 mg/kg/dia de EASa. Após este período, foi coletado sangue do plexo infraorbital e preparados esfregaços rapidamente corados com a coloração modificada de May-Grünwald-Giemsa para estudos hematológicos. Os valores de contagem de células sanguíneas vermelhas, hemoglobina, hematócrito, concentração de hemoglobina corpuscular média, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio e os valores de contagem total e diferencial de células sanguíneas brancas, obtidos antes e após tratamento, foram comparados.

Toxicidade Reprodutiva

Camundongos albinos Swiss, pesando entre 20-30g, com idade em torno de 80-90 dias, foram distribuídos ao acaso em caixas de polipropileno de 30 x 40cm (1 macho : 3 fêmeas) e observados toda manhã para detecção do *plug* vaginal, como diagnóstico do dia zero de gestação, sendo que este método de diagnóstico apresenta 91 a 93% de estimativa de acerto (Szabo et al., 1969; Champlin, et al., 1973). À medida que era feita a comprovação de gestação, as fêmeas gestantes eram randomicamente separadas e os tratamentos com 147,3mg/kg de EASa ou salina + tween (0,1 mL/10g) iniciados, por via oral através de gavagem. Em um dos experimentos, as fêmeas gestantes receberam EASa durante sete dias (n=9), que corresponde ao período de implantação em ratas (Lemonica, 1996). Após três dias do término do tratamento, estas fêmeas foram sacrificadas, após anestesia com éter e por deslocamento cervical, e foi contado o número de locais de implantação, pontos de reabsorção e corpos lúteos, através de observação macroscópica com o auxílio de uma lupa. Em outro experimento, 147,3mg/kg/dia de EASa foi administrado do 1º até o décimo quarto dia de gestação que corresponde ao período de implantação e organogênico em ratas (Lemonica, 1996), quando foi finalizado. As camundongas foram sacrificadas, conforme citado anteriormente, no vigésimo dia para a contagem de fetos vivos, pontos de reabsorção e corpos lúteos e observação de anomalias viscerais. Estes dados foram comparados para diferenças estatísticas entre os animais tratados com EASa e salina + tween (veículo).

Efeitos cardiovasculares

Os efeitos de EASa no sistema cardiovascular foram avaliados na pressão sanguínea arterial média (PAM) e coração e átrio isolados de ratos. A PAM foi mensurada, em ratos wistar normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg; i.p), diretamente através de uma cânula implantada na artéria carótida e conectada a transdutores de pressão (P23 Statham, Gould, Oxnard, CA, USA) com registros em fisiógrafo. Os ratos foram impalados com eletrodos subcutâneos de platina e o eletrocardiograma (ECG) monitorado continuamente através de uma interface analógica digital acoplada a um instrumento computadorizado para aquisição de dados (Axon Instruments, Union City, CA, USA) e processados por Axo Scope 9.0. A seguir, as drogas teste foram injetadas com bólus na veia jugular através de um tubo de polietileno (PE20). Os efeitos de 0,3; 1; 3 e 10mg/kg de EASa foram avaliados e comparados com a administração isovolumétrica de salina + tween (controle negativo) e 40mg/kg de acetilcolina (controle positivo). Em outra série de experimentos, os efeitos desta mesma variação de doses foram analisados em coração de rato perfundido. Os corações foram isolados de ratos Wistar e perfundidos via aorta a um fluxo constante (10mL/min) com uma solução modificada de Krebs-Henseleit (SKH) aerada com 95% de O₂ em 5% de CO₂. A SKH estava composta por (mM):166 de NaCl; 4,75 de KCl; 1,2 de MgSO₄; 1,2 de NaH₂PO₄; 25 de NaHCO₃; 0,45 de CaCl₂ e 11 de glicose d glucose, modificada pela adição de 1mg/ml de ácido ascórbico e dietilestilbestrol. Finalmente, os átrios foram isolados de ratos Wistar com o objetivo de estudar os efeitos de EASa na frequência e força de contração separadamente. A atividade mecânica espontânea do átrio direito foi avaliada sob condições de controle interno (antes da administração de drogas) e depois com a adição de 1, 3, 10, 30 e 100 mg/mL de EASa ou veículo isovolumetricamente. Por outro lado, a atividade mecânica do átrio esquerdo estimulado eletricamente (pulsos de onda quadrada submaximais, 2Hz e 5 ms) foi estudada sob o mesmo protocolo. A frequência dos batimentos espontâneos do átrio direito e a amplitude de contração do átrio esquerdo foram expressos como porcentagem do controle interno (antes da administração de EASa) e comparados com os tecidos tratados com salina (controle negativo).

Análise estatística

Os dados foram reportados como média ± erro-padrão da média (EP) de pelo menos cinco observações. A variação das observações e o intervalo de confiança de 95% foram apresentados para os dados bioquímicos e hematológicos. A comparação entre os grupos foi determinada pela análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey com o nível de significância estabelecido em 5%. Quando apropriado o teste t de Student foi aplicado para avaliar diferenças dentro (pareado) e entre (não-pareado) os grupos. A CE₅₀, definida aqui como a dose requerida para produzir metade do efeito máximo, foi calculada com os correspondentes 95% de intervalo de confiança pelo Graph Pad Prism Software. Os dados foram processados inferência descritiva e estatística pelo Graph Pad Prism software versão 2.0 for Windows.

Resultados

A administração de EASa em doses correspondentes a DL₁ ou DL₁₀ não causou alterações significantes no comportamento padrão dos animais quando comparados com os animais tratados com salina. Os animais tratados com EASa, no experimento crônico, até tiveram um aumento líquido no ganho de peso corporal, que foi maior que o do grupo controle tratado com salina (37,2 ± 7,5% vs. 56,5 ± 7,47; p<0,05). Os parâmetros bioquímicos analisados não foram notavelmente afetados pelos protocolos de tratamento usados (Tabelas 1 e 2). Os perfis séricos dos vários marcadores não foram alterados quando comparados com o controle interno, i.e., os valores obtidos antes dos tratamentos ou com os grupos tratados com salina. A análise histopatológica não revelou alterações na estrutura padrão dos tecidos estudados. Por isso, a administração da DL₁ e DL₁₀ de EASa a ratos durante 30 ou 60 dias não induziu manifestações significantes sistêmicas de toxicidade.

Similarmente, os perfis hematológicos de seis ratos não foram afetados, exceto pelo valor de VCM, que foi significante maior no grupo tratado (66,5 ± 1,6 fl. vs. 89,8 ± 1,2, p<0,001) (Tabela 3).

Após sete dias recebendo oralmente a DL₁₀ de EASa, o número de locais de implantação no décimo dia de gestação não foi significante diferente (7,7 ± 1 vs. 8,6 ± 1,5) quando comparado com os animais tratados com salina. O número de corpos lúteos permaneceu inalterado, sendo 8,6 ± 0,6 para o grupo tratado com EASa e 10,3 ± 0,6 para o grupo tratado com salina. Similarmente, o grupo tratado com EASa do 1º ao 14º dia de gestação não mostrou diferenças quando comparado ao grupo tratado com salina para fetos vivos. O número de fetos vivos foi de 8,2 ± 0,6 no grupo tratado com EASa e 7,2 ± 0,5 no grupo tratado com veículo (Figura 1). A avaliação macroscópica dos fetos não mostrou qualquer alteração externa ou visceral.

A administração intravenosa de baixas doses de EASa induziu um pequeno aumento na PAM equivalente àquela obtida após injeção isovolumétrica de veículo. A maior dose usada (10mg/kg) diminuiu a PAM com início rápido e de curta duração (<1 min). Este efeito não foi equivalente à diminuição induzida por 1mg/kg de acetilcolina, usada como controle positivo (20,4 ± 10,5 mmHg vs. 56,6 ± 9,7 mmHg, respectivamente) (Figura 2). Além disso, este efeito da EASa na PAM não foi acompanhado por uma alteração significante na frequência cardíaca ou nos parâmetros eletrocardiográficos estudados (Figura 3 e Tabela 4). A frequência cardíaca antes da administração de EASa foi de 333,8 ± 28,9 e, após a maior dose usada (10mg/kg), a frequência variou para 322,3 ± 28,1 batimentos por minuto (p>0,05).

A administração de EASa como bólus em injeção até 10 mg não foi capaz de induzir alguma alteração na frequência dos batimentos espontâneos do coração isolado (Fig. 4). A frequência variou de valores do controle de 162,6 ± 18,1 para 176,2 (6 ± 0,7% de variação). Similarmente, a frequência da atividade espontânea mecânica do átrio direito (Fig. 5) não foi alterada após adição cumulativa de EASa ao meio do banho até 100mg/mL (452,5 ± 54,9 para 407,5 ± 45,7 – 9,9 ± 2,5 % de variação).

Tabela 1: Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar antes e depois do tratamento por 30 dias com 73,3mg/kg/dia (DL₁) de extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) ou 150mg/kg/dia (DL₁₀) de EASa ou veículo

Grupos	Parâmetros Bioquímicos / Toxicidade Subcrônica							
	Albumina	Uréia	Creatinina	TGO	TGP	Bilirrubina	Bilirrubina	Bilirrub.
						Total	Direta	Indireta
Controle	3.03±0.62 (n=10)	44±3.1 (n=10)	0.45±0.03 (n=10)	50.5±1.7 (n=8)	15.1±1.4 (n=7)	0.18±0.03 (n=10)	0.04±0.004 (n=7)	0.11±0.03 (n=7)
Veículo	3.8±0.18 (n=9)	40.3±3.0 (n=9)	0.41±0.011 (n=9)	46.9±2.05 (n=9)	17.0±1.0 (n=9)	0.17±0.019 (n=9)	0.03±0.003 (n=9)	0.14±0.06 (n=9)
Controle	3.15±0.12 (n=10)	43.9±2.3 (n=9)	0.42±0.015 (n=9)	42.8±2.4 (n=8)	15.0±1.7 (n=8)	0.18±0.017 (n=9)	0.05±0.017 (n=8)	0.13±0.02 (n=8)
EASa DL ₁	4±0.17 (n=10)	41.0±3.4 (n=10)	0.44±0.016 (n=10)	43.5±2.8 (n=10)	16.4±1.5 (n=10)	0.18±0.017 (n=9)	0.04±0.007 (n=9)	0.13±0.015 (n=10)
Controle	3.44±0.11 (n=10)	48.1±1.8 (n=10)	0.4±0.023 (n=9)	40.5±1.2 (n=10)	16.1±1.7 (n=10)	0.17±0.021 (n=10)	0.05±0.006 (n=7)	0.15±0.02 (n=6)
EASa DL ₁₀	3.9±0.13 (n=10)	45.7±2.5 (n=10)	0.44±0.026 (n=10)	43.4±1.5 (n=10)	14.4±0.9 (n=10)	0.16±0.013 (n=9)	0.05±0.010 (n=10)	0.10±0.019 (n=10)

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar antes e depois de tratamento oral durante 60 dias com 147,3 mg/kg/dia (DL₁₀) com extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) ou veículo.

Grupos	Parâmetros Bioquímicos / Toxicidade Crônica							
	Albumina	Uréia	Creatinina	TGO	TGP	Bilirrubina	Bilirrubina	Bilirrubina
						Total	Direta	Indireta
Controle	2.98±0.24 (n=5)	37.5±2.19 (n=5)	0.38±0.02 (n=5)	42.9±3.9 (n=5)	15.5±1.4 (n=5)	0.16±0.03 (n=5)	0.03±0.007 (n=3)	0.10±0.014 (n=3)
Veículo	3.3±0.14 (n=6)	57.7±2.9 (n=5)	0.5±0.077 (n=5)	46.6±1.1 (n=5)	17.3±2.9 (n=5)	0.17±0.012 (n=5)	0.05±0.014 (n=5)	0.12±0.027 (n=5)
Controle	3.35±0.13 (n=8)	47.7±3.5 (n=8)	0.4±0.012 (n=8)	43.3±2.2 (n=8)	17.3±2.0 (n=8)	0.17±0.017 (n=8)	0.04±0.003 (n=6)	0.12±0.02 (n=6)
EASa	3.2± 0.16 (n=8)	56.1±1.9 (n=8)	0.46±0.026 (n=8)	51.3±1.5 (n=8)	20.6±2.2 (n=8)	0.2±0.022 (n=8)	0.04±0.004 (n=8)	0.16±0.020 (n=8)

Tabela 3: Parâmetros hematológicos de ratos Wistar antes e depois de tratamento oral com 147,3mg/kg/dia (DL₁₀) de extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) ou veículo.

PARÂMETROS	Dia Zero			
	Dia Zero		30 dias após tratamento com EASA	
	Média ± EP	IC (95 %)	Média ± EP	IC (95 %)
Hemácias (mm ³)	6875000 ± 188900	6389000-7361000	6250000-176500	5796000-6704000
Hemoglobina: g/dL	14.63 ± 0.61	13.06 – 16.21	14.97 ± 0.30	14.20 – 15.74
Hematócrito: %	45.33 ± 0.56	43.90 – 46.77	48.17 ± 0.54	46.77 – 49.56
VCM (fl)	66.50 ± 1.65	62.26 – 70.74	89.83 ± 1.17	86.83 – 92.83
HCM (pg)	21.17 ± 0.75	19.24 – 23.09	24 ± 0.82	21.90 – 26.10
CHCM (%)	32.17 ± 1.11	29.32 – 35.62	31.17 ± 0.48	29.94 – 32.39
Leucócitos	18950 ± 2032	13730 - 24170	10880 ± 1271	7616 - 14150
Neutrófilos	4901 ± 590	3383 - 6416	2183 ± 321	1757 - 3008
Bastonetes	23.30 ± 15.68	-12.18 ± 58.78	0	0
Segmentados	4881 ± 588	3370 - 6392	2183 ± 321	1757 - 3008
Eosinófilos	522 ± 84.82	304 - 740	253 ± 84.5	36.05 – 470.3
Basófilos	0	0	0	0
Linfócitos	13280 ± 2040	8034 - 18520	8307 ± 988	5766 - 10850
Monócitos	250 ± 41.4	143 - 356	109 ± 12.7	76.2 – 141

DOSE	P (A – D)	QRS (A – D)	T (A – D)
Veículo	0.14 ± 0.03- 16.1±1.3	2.21±0.6-28.2±2.8	0.47±0.036 - 33±2.8
EASa 1 mg/kg	0.138±0.05-16.0±1.3	2.12±0.43-24.6±2.3	0.51±0.06 - 34±3.1
EASa 3 mg/kg	0.143 ± 0.04-23.4±2.7	2.1±0.36-30.6±3.1	0.47±0.036 - 35±2.1
EASa 10 mg/gk	0.151 ± 0.06-22.5±1.8	1.79±0.26-39.5±3.6	0.47±0.036 - 35±2.1

*INTERVALOS (ms) – **SEGMENTOS (ms)

	PR	Q T (ms)	Q T _c	R R (ms)	S T (ms)
* 52.3±4.7-** 31.4±2.4		79.7 ± 5.9	5.3 ± 0.62	235.1 ± 21.5	43.6 ± 3.7
* 51.5±3.8-** 26.6±1.9		77.3 ± 4.7	5.02 ± 0.63	236.7 ± 22.4	45.1 ± 3.8
* 51.5±3.8-** 32.2±2.3		73.3 ± 4.7	5.33 ± 0.63	235.1 ± 20.4	42.7 ± 2.8
* 52.3±3.6-** 30.6±2.1		73.3 ± 4.7	4.71 ± 0.53	242.4 ± 23.7	43.5 ± 3.4

A = amplitude em milivolts (mv); D = duração em milissegundos (ms); QT_c = intervalo QT corrigido

Tabela 4: Efeitos do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) nos parâmetros eletrocardiográficos em ratos anestesiados

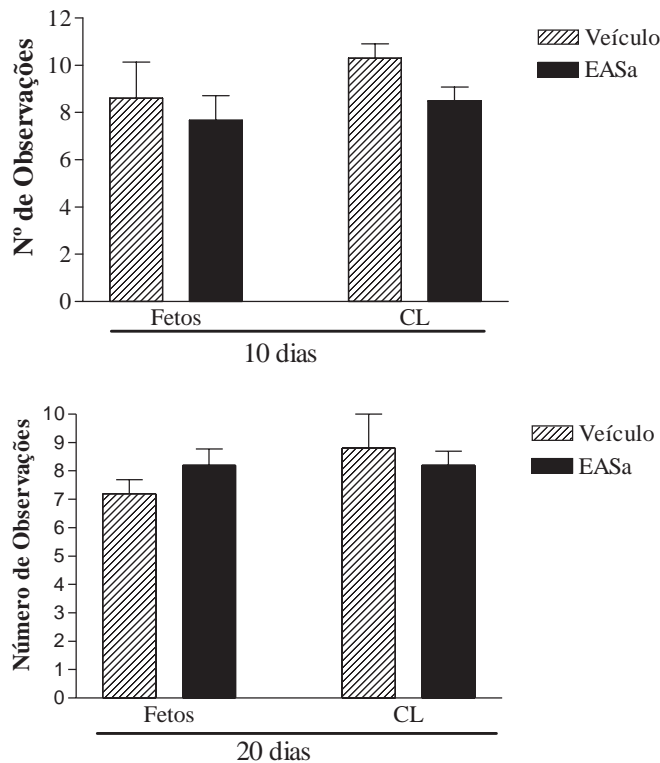


Figura 1: Número de fetos e corpos lúteos em animais tratados com extrato acetato se etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) e salina (controle) durante os sete (1a) e os 14 (1b) dias iniciais de gestação em camundongas.

O EASa induziu um decréscimo significativo na amplitude de contração do coração perfundido isolado (Figura 6) e na amplitude da atividade mecânica de átrio esquerdo eletricamente estimulado (FigUR 7). As injeções de EASa em bólus nas doses 0,3; 1; 3 e 10mg reduziram a amplitude de contração do coração para $11 \pm 2,3\%$, $23 \pm 6\%$, $33 \pm 7\%$ e $64 \pm 11\%$ ($p < 0,05$ vs. veículo), respectivamente (Figura 6). A CE_{50} para este efeito foi de 7,5mg [5,5-9,5]. Similarmente, a incubação do átrio esquerdo estimulado eletricamente com 30 e 100mg/mL reduziu a amplitude de contração em $30,6 \pm 11,9\%$ e $55,4 \pm 12,7\%$, respectivamente (Figura 7). A CE_{50} para esta redução da amplitude no átrio esquerdo foi de 48,3 mg/mL [12,1-194,2].

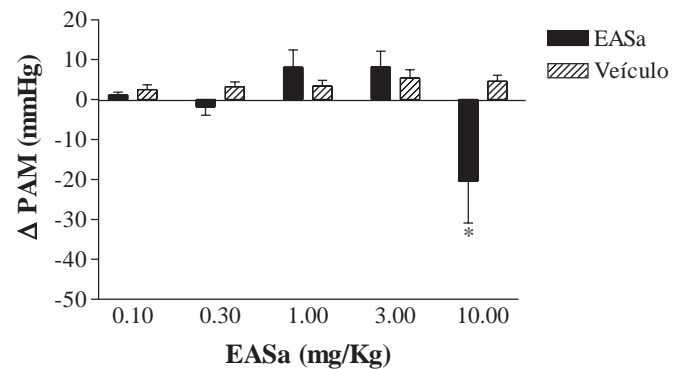


Figura 2: Efeito do extrato acetato de etila (EASa) de *Spigelia anthelmia* sobre a média da pressão arterial de ratos normotensos. Os dados são apresentados como média ± erro-padrão da média. * $p < 0,05$.



Figura 3: Traçado original representativo do efeito do extrato acetato de etila (1 – 10 mg/kg) de *Spigelia anthelmia* sobre parâmetros eletrocardiográficos de ratos anestesiados.

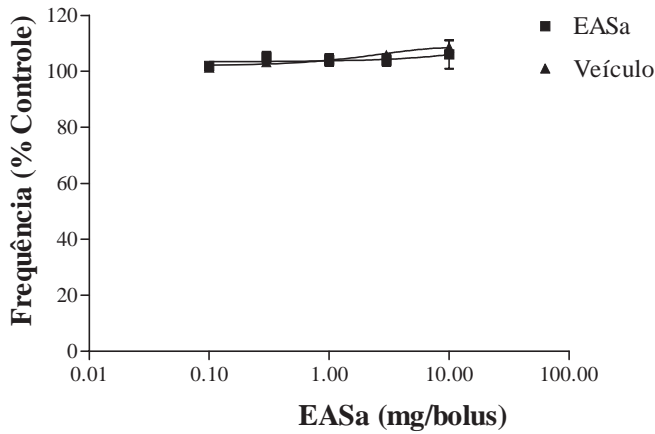


Figura 4: Efeito de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10mg/kg de extrato acetato de etila (EASa) injetado em bolus via aorta na frequência de contrações do coração isolado. Os dados são apresentados como média \pm erro-padrão da média. * $p < 0,05$.

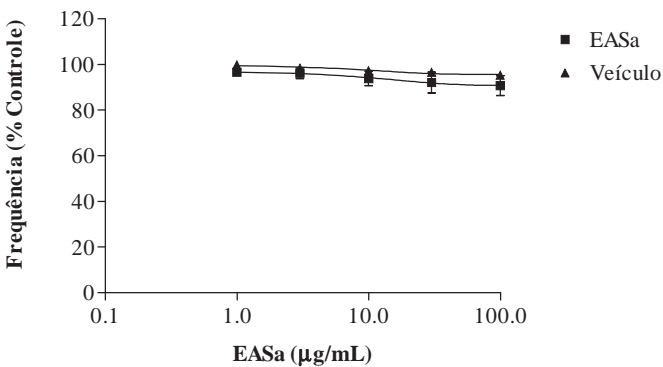


Figura 5: Efeito de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10mg/kg do extrato acetato de etila (EASa) de *Spigelia anthelmia* sobre a frequência de contrações do átrio direito. Os dados são apresentados como média \pm erro-padrão da média.

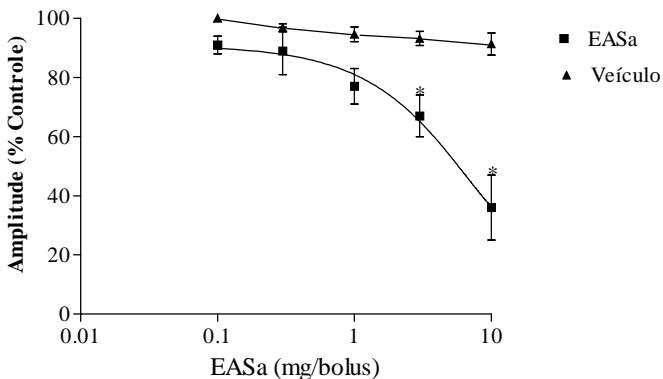


Figura 6: Efeito da adição de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10mg/kg de extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) em bólus na amplitude de contração do coração isolado de rato comparado com tecidos tratados com veículo, isovolumetricamente. Os dados são apresentados como média \pm erro-padrão da média. * $p < 0,05$.

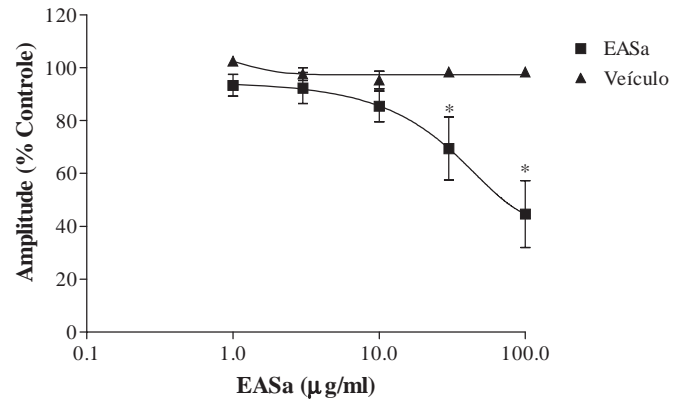


Figura 7: Efeito do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* (EASa) (1 a 10 mg/ml) sobre a amplitude de contrações causadas por estímulo elétrico no átrio esquerdo. Os dados são apresentados como média \pm erro-padrão da média. * $p < 0,05$.

Discussão

As partes aéreas de *S. anthelmia* são amplamente usadas na medicina popular do Brasil como anti-helmíntico. A eficácia de alguns extratos orgânicos foi validada, *in vitro*, por Batista et al. (1999) e Assis (2000). Porém, não existem relatos científicos sobre a segurança após administração aguda ou prolongada. Recentemente, Camurça-Vasconcelos (2002) relatou seus efeitos agudos em camundongos e pintos e sua atividade bloqueadora neuromuscular levando à paralisia tônica.

O presente estudo revelou que a administração até 60 dias de uma dose correspondente a DL_{10} não afetou qualquer parâmetro bioquímico, hematológico ou reprodutivo estudado. A exceção a esta declaração é uma leve alteração nos níveis de TGO observada nos grupos tratados com 147,3mg/kg de EASa. Contudo, o aumento nos níveis séricos de TGO (de $43,3 \pm 2,2$ mg/dL para $51,3 \pm 1,5$ mg/dL; $n=8$; $p < 0,05$), apesar da diferença estatisticamente significativa, é de pequena significância clínica. Realmente, o nível obtido após o tratamento estava dentro da variação de valores de referência para esta espécie (Mitruka e Ramsley, 1977; Shanker et al., 2002) e dentro da variação dos valores controle obtidos em animais normais antes do tratamento (28,5-58,2mg/dL) (Tabela 3). O aumento de TGO não foi acompanhado por nenhuma alteração em TGP, bilirrubina ou albumina e pode refletir uma variação fisiológica antes do que uma manifestação toxicológica. Mesmo assim, longos períodos de administração necessitam ser realizados para esclarecer se esta alteração é uma manifestação inicial tóxica ou somente uma flutuação normal sob a variação fisiológica. Além disso, uma vez que EASa está sendo testado para sua eficácia anti-helmíntica para nematódeos gastrintestinais e para sua segurança com relação ao hospedeiro, o período de administração é suficiente para atestar que este extrato é imparcialmente seguro para administração oral em protocolos com dosagens simples ou repetidas como proposta terapêutica até o limite da DL_{10} .

A contagem de células vermelhas do sangue também foi normal após tratamento durante 30 dias com EASa e nenhuma alteração foi observada no hematócrito ou valores de hemoglobina. As plaquetas também permaneceram

inalteradas em número e forma. Por isso, a administração por longo prazo de EASa é improvável causa de danos diretos nas células sangüíneas, na medula óssea ou de anormalidades na absorção ou incorporação de nutrientes necessários para a eritropoiese, pelo menos num grau suficiente para causar anemia. Similarmente, a administração durante 30 dias de EASa não causou efeitos significantes na contagem total ou diferencial das células sangüíneas da linhagem branca. Assim, estes efeitos dão suporte à falta de efeitos tóxicos induzidos por EASa diretamente nas células sangüíneas e nenhum dano direto à medula óssea. Além do mais, uma atividade imunodepressora deste extrato é também improvável.

Em outros aspectos, a falência na implantação embrionária pode ser relacionada com a exposição maternal a agentes químicos que podem interferir com este evento por diferentes mecanismos. Isto inclui alterações morfológicas no embrião que interferem com a implantação ou promovem embriofetalidade; modificação dos níveis hormonais, assim interferindo com a implantação embrionária; alteração das condições uterinas necessárias para nidação, ou distúrbios no transporte tubáreo, e conseqüente interferência com o tempo correto de chegada do blastocisto no útero (Cummings, 1990).

A administração de EASa no período de pré-implantação não induziu diminuição estatisticamente significante no número de locais de implantação. Isto pode insinuar que o extrato não afeta qualquer dos passos necessários para nidação e implantação dos embriões. Similarmente, a administração de 147,3mg/kg de EASa durante o período organogênico a camundongas prenhes não afetou a taxa de concepção (embriofetalidade) e não causou malformações externas ou viscerais (teratogenia).

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao LabTeste pela generosa doação de reagentes bioquímicos, ao CNPq (protocolo 46390/01), FUNCAP (protocolo 147/00) e CAPES pelo suporte financeiro, ao laboratório de Histologia da Universidade Estadual do Ceará e Maria do Carmo de Oliveira, pela valiosa assistência no estudo histológico, e ao IBIMED (Instituto de Biomedicina – UFC) pela especial recepção e colaboração.

Referências

- ACHENBACH, H.; HÜBNER, H.; VIERLING, W.; BRANDT, W.; REITER, M. Spiganthine, the cardioactive principle of *Spigelia anthelmia*. *J. Nat. Prod.*, v. 58, p. 1092-1096, 1995.
- ASSIS, L. M. Atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos de *Spigelia anthelmia* sobre *Haemonchus contortus*. 2000. 44 f. Dissertação (Mestrado)—Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual do Ceará, 2000.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação de toxicidade. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p.87-94.
- BASÍLIO, I. J. L. D.; SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Etnomedicina e farmacobotânica das Loganiáceas da Mata Atlântica Paraibana, Brasil. *Anais do IX Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba*, v. 01.10.07., 2001.
- BATISTA, L.M.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; MORAIS, S. M. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* sobre o nematódeo de ovinos *Haemonchus contortus*. *Ciência Animal*, v. 9, p. 67-73, 1999.

A administração de EASa (i.v) em bólus não teve efeitos significantes na pressão arterial média de ratos normotensos anestesiados. A maior dose usada (10mg/kg) induziu um leve efeito hipotensivo de início rápido e de curta duração com pouco impacto hemodinâmico. Além do mais, o extrato não induziu um decréscimo concomitante na taxa cardíaca ou alteração no perfil do ECG. Este último efeito mostra que este extrato não tem potencial arritmogênico.

Achenbach et al., (1995) relatam que um extrato de *S. anthelmia* e a espigantina e outros compostos tipo rianodina isolados desta espécie aumentam a latência da contração de músculo papilar de porquinhos-da-índia (atividade cardiodepressora). Entretanto, o extrato acetato de etila de *S. anthelmia* é desprovido de qualquer efeito na frequência espontânea dos batimentos em ratos e somente na mais alta dose foi capaz de diminuir a amplitude de contração do coração inteiro isolado perfundido e a amplitude de contração do átrio esquerdo estimulado eletricamente. Isto pode sugerir que o efeito cardiodepressor encontrado no músculo papilar de porquinhos-da-índia (Hübner et al., 2001) é irrelevante para o coração inteiro e para a função isolada do átrio. Isto é mais fortemente suportado pela falta de efeito significativo do EASa na PAM ou nos parâmetros de ECG estudados.

A administração por longo prazo da DL₁ ou DL₁₀ de EASa é rigorosamente segura e é provavelmente desprovida de toxicidade significativa. Além de tudo, os alcalóides tipo rianodina que foram isolados desta espécie (Morais et al, 2002) podem ser responsáveis por sua reputada atividade bloqueadora neuromuscular (Camurça-Vasconcelos, 2002) e o uso desta planta em triagens clínicas de caprinos ou outras espécies domésticas necessita ser precedida de determinação rigorosa de sua segurança específica e de uma janela terapêutica.

BRAGA, R. *Plantas do nordeste, especialmente do Ceará*. 3. ed. Coleção Mossoroense XLII, p. 322-323, 1976.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. Estudo farmacológico e toxicológico do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* Linn em animais de laboratório. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado)—Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual do Ceará, 2002.

CHAMPLIN, A. K.; DORR, D. L.; GATES, A. H. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biology of Reproduction*, v. 8, p. 491-494, 1973.

CUMMINGS, A.M. Toxicological mechanisms of implantation failure. *Fundam Appl Toxicol*, v. 15, n. 3, p. 571-579, 1990.

HÜBNER, H.; VIERLING, W.; BRANDT, W.; REITER, M.; ACHENBACH, H. Minor constituents of *Spigelia anthelmia* and their cardiac activities. *Phytochemistry*, v. 57, p. 285-296, 2001.

LEMONICA, I. P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 87-94.

MITRUKA B. M.; RAMSLEY, H. M. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals*. New York: Masson Publishing, 1977.

MORAIS, S. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, J. A.; ASSIS, L. M. Chemical investigation of *Spigelia anthelmia* Linn. used in Brazilian folk medicine as an anthelmintic. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, suplemento, p. 81-82, 2002.

SHANKER, K.; PATHAK, N. K. R.; TRIVEDI, V. P.; CHANSURIA, J. P. N.; PANDEY, V. B. An evaluation of toxicity of *Taxus baccata* Linn. (Talispatra) in experimental animals. *J. of ethnopharmacology*, v. 79, n. 1, p. 69-73, 2002.

SZABO, K. T.; FREE, S. M.; BIRKHEAD, H. A.; GAY, P. E. Predictability of pregnancy from various signs of mating in mice and rats. *Laboratory Animal Care*, v. 19, p. 822-825, 1969.

WAGNER, H.; SEEGERT, K.; ODENTHAL, K. P.; ESPOSITO, M.; VILARREAL, E.; SOLIS, G.P.; GUPTA, M. P. Preliminary pharmacologic evaluation of *Spigelia anthelmia* aerial parts. *Int. J. Pharmacog.* v. 31, p. 7-14, 1993.