

GUILHERME NOBRE LIMA DO NASCIMENTO

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO EXTRATO BRUTO
ETANÓLICO DAS SEMENTES DE *ANNONA CORIACEA* MART.
(ARATICUM) EM CAMUNDONGOS SUBCRONICAMENTE
EXPOSTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Dr(a). Marize Campos Valadares Bozini

Co-orientador: Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira

Goiânia - GO

2008

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

244i Nascimento, Guilherme Nobre Lima do.
Investigação do potencial tóxico do extrato bruto etanólico das sementes de *Annona Coriacea* Mart. (Araticum) em camundongos subcronicamente expostos [manuscrito] / Guilherme Nobre Lima do Nascimento. – 2008.
76f. f. : il., figs., quads., tabs

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis; Co-orientador: Tales Alexandre Aversi-Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2008.

Bibliografia: f.69-76.
Inclui lista de figuras, quadros e tabelas e de abreviaturas e siglas.

1. Araticum (*Annona coriacea* Mart) 2. Plantas medicinais – Toxicidade – Avaliação 3. Neurotoxicidade 4. Hepatotoxicidade 5. Nefrotoxicidade I. Bozinis, Marize Campos Valadares Bozinis. II. Aversi-Ferreira, Tales Alexandre III. Universidade Federal de Goiás. **Faculdade de Farmácia** IV. Título.

CDU: 615.9:582.677.5

A meus pais; José Nobre e
Elizabeth Lima, irmão Márcio e irmã
Jackeline, pelo amor, ensinamentos
e apoio.
Obrigado por acreditarem!

AGRADECIMENTO

- ✓ Ao Supremo pela vida e oportunidade apresentada;
- ✓ À professora, orientadora e amiga Dr(a). Marize Campos Valadares Bozinis pela oportunidade e confiança em mim depositada, além da paciência e amizade;
- ✓ Ao professor, orientador e amigo Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira pela amizade, conhecimento e, sobretudo sua paciência com os erros;
- ✓ Aos professores Dr. Zenon Silva, Dr(a) Veridiana Rodrigues de Melo Ávila, Dr. Cezar Laerte Natal por terem me orientado durante a graduação formando em mim a base necessária para trilhar o caminho o qual sonhei e que hoje trilho;
- ✓ Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Neurociências (LABINE) – UFG;
- ✓ Aos colegas e amigos do programa de pós-graduação, em especial ao Daniel, Raphael, Adryanno, Rodrigo, Lílian, Liuba, Carla e Flávia;
- ✓ A todos que participaram de minha formação até aqui;
- ✓ Aos irmãos Júnior e Rafael por sempre estarem ao meu lado;
- ✓ A minha prima Nalanda pelos conselhos;
- ✓ Aos colegas e amigos;
- ✓ Aos animais de laboratório que mesmo contra sua vontade, "doaram" suas vidas para o auxílio deste estudo e de tantos outros;
- ✓ A Capes pela bolsa concedida.

Fui à floresta porque queria
viver profundamente...
... e sugar a essência da vida!
Eliminar tudo que não era vida...
E não, ao morrer, descobrir
que não vivi.
(H. D. Thoreau – D.P.S.)
Scire, potere, audere, tacere
(Zoroastro)

RESUMO

O Araticum (*Annona coriacea* Mart.) é um fruto típico do cerrado brasileiro utilizado popularmente para remediar processos inflamatórios. A família *Annonaceae* apresenta como principais constituintes as acetogeninas, uma classe de substâncias com grande potencial citotóxico, genotóxico e ainda citado como o responsável por uma doença similar ao parkinsonismo em uma população caribenha que utilizava o fruto tanto como alimento quanto para fins medicinais. O objetivo deste estudo foi avaliar a putativa atividade do extrato bruto etanólico das sementes da *A. coriacea* sobre o córtex cerebral de camundongos expostos nas doses de 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg, além de avaliar sua atividade sobre diferentes áreas do encéfalo, sobre o fígado e rins. Foram utilizados 30 camundongos Swiss machos adultos divididos em grupos controle, solvente e tratados (12,5; 25; 50 e 100 mg/kg). O extrato foi administrado por via oral durante quatro dias. Os órgãos-alvo foram extirpados, fixados em etanol 70% (v/v) e processados para método histológico - hematoxilina e eosina. A análise das lâminas foi executada via sistema de processamento de imagens para a contagem das células e demais análises morfométricas. Os estudos morfológicos não demonstraram alterações significativas para o cérebro em suas diferentes áreas, da mesma forma que não foram detectadas alterações nos rins. Por outro lado, foi detectado uma redução da frequência de células por área do fígado, assim como verificamos uma diminuição no consumo de ração, água e produção de excreta. Concluímos com este trabalho uma possível atividade hepatotóxica induzida pela exposição ao extrato bruto etanólico das sementes da *A. Coriacea* Mart., observada pela diminuição da frequência de células por área do fígado, correlacionado com reduções de consumo de ração/água e produção de excretas pelos animais.

Palavras – Chave: *Annona coriacea* Mart., toxicologia, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade.

ABSTRACT

The araticum (*Annona coriacea* Mart.) is a typical fruit of the Brazilian cerrado used popularly to overcome inflammatory processes. The family *Annonaceae* presents as the main constituents acetogenins, a class of substances with great cytotoxic and genotoxic potential, and cited as responsible for a disease similar to Parkinson in a Caribbean population that used the fruit as much as food and for medicinal purposes. The aim of this study was to evaluate the putative activity of crude ethanolic extract of seeds of *A. coriacea* on the cerebral cortex of mice exposed at doses of 12.5, 25, 50 and 100 mg / kg, and evaluate its activity on different areas of the brain, the liver and kidneys. We used 30 adult male Swiss mice divided into groups control, solvent and treated (12.5, 25, 50 and 100 mg / kg). The extract was administered orally for four days. The target organs were extirpated, fixed in 70% ethanol (v / v) and processed for histological method - hematoxylin and eosin. The analysis of the slides was performed by image processing system for counting cells and other morphometric analysis. The morphological studies showed no significant changes to the brain in different areas, just as no changes were detected in the kidneys. On the other hand, was found a reduction on the frequency of cells per area of the liver, like as a reduction on the consumption of food, water and production of excreta. We conclude with this work a possible hepatotoxic activity induced by exposure to crude ethanol extract of seeds of *A. Coriacea* Mart., observed by the decrease in frequency of cells per area of the liver, correlated with reductions in consumption of food / water and production of excreta by animals.

Keywords: *Annona coriacea* MART, toxicology, neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Descrição histológica segundo Brodmann do córtex cerebral adulto coradas utilizando três técnicas diferente; A) método de Golgi para corpo dos neurônios e prolongamentos; B) método de Nissl para corpo dos neurônios; C) método de Weigert para fibras mielínicas (modificado de Machado, 2000).....	19
Figura 2	Fotomicrografia do córtex motor de recém-nascido impregnado pelo método de Golgi-rápido evidenciando as 6 camadas corticais (modificado de MARÍN-PADILLA, 1998).....	20
Figura 3	(A) Detalhe do fruto e (B) ramos da palnta Annona coriácea, no cerrado goiano.....	27
Figura 4	Fluxograma de extração do EBSAC.....	33
Figura 5	Animais experimentas agrupados em sua devida gaiola.....	34
Figura 6	Protocolo experimental para avaliação do potencial tóxico do EBSAC em camundongos.....	35
Figura 7	Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no córtex de animal do grupo solvente em aumento de 400X.....	37
Figura 8	Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no mesencéfalo de animal do grupo solvente em de 400X.....	38
Figura 9	Exemplo de fotomicrografia para contagem de células nas camadas molecular e de células de Purkinje no cerebelo de animal do grupo solvente em aumento de 200X.....	39
Figura 10	Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no bulbo olfatório de animal do grupo solvente em aumento de 400X.....	40
Figura 11	Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no fígado de animal do grupo solvente em de 1008X.....	41
Figura 12	Exemplo de fotomicrografia para medida do diâmetro interno e externo do tufo glomerular e cápsula de Bowman do rim de animal do grupo solvente em aumento de 640X.....	42

Figura 13	Exemplo de fotomicrografia para medida do perímetro da cápsula de Bowman do rim de animal do grupo solvente em aumento de 640X.....	43
Figura 14	Frequência de células por área (38000 μm^2) do lobo frontal (A) de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras B e C ilustram o córtex de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	48
Figura 15	Frequência de células por área (38000 μm^2) do lobo parietal (A) de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras B e C ilustram o córtex de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	49
Figura 16	Frequência de células por área (38000 μm^2) do lobo occipital (A) de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras B e C ilustram o córtex de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	50
Figura 17	Frequência de células por área (152550 μm^2) da camada molecular (A) e camada das células de Purkinje (B) de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras C e D ilustram o cerebelo de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	51
Figura 18	Frequência de células por área (38000 μm^2) do mesencéfalo de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras B e C ilustram o mesencéfalo de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	52
Figura 19	Frequência de células por área (38000 μm^2) do bulbo olfatório de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras B e C ilustram o bulbo olfatório de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	53

Figura 20	Frequência de células por área ($19000\ \mu\text{m}^2$) do fígado de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas. As figuras B e C ilustram o fígado de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	54
Figura 21	Diferença morfológica do núcleo e citoplasma celular de hepatócitos dos grupos controle (A) e exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg)(A), respectivamente.....	55
Figura 22	Diâmetro maior (μm) – cápsula de Bownan (A), diâmetro menor (μm) – tufo glomerular (B) e perímetro da cápsula de Bowman (μm^3) (C) do rim de animais (n=5) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média de 20 lâminas por grupo $\pm$ D.P. As figuras D e E ilustram diâmetro maior (μm) e menor (μm) de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente. As figuras F e G ilustram perímetro da cápsula de Bowman de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.....	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Divisão dos grupos experimentais e forma de exposição.....	34
Tabela 1	Média do Peso (g) $\pm$ D.P. dos animais (n=5) por grupo experimental por dia do tratamento.....	45
Tabela 2	Consumo de Alimento (g) por grupo experimental (n=5) por dia do tratamento.....	46
Tabela 3	Consumo de Água (g) por grupo experimental por dia do tratamento	46
Tabela 4	Excreta (g) por grupo experimental por dia do tratamento.....	47
Tabela 5	Diâmetro interno, entre os limites do tufo glomerular e diâmetro externo, entre os limites da cápsula de Bowman (μm). Cada valor corresponde a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Raio maior
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
b	Raio menor
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
D.P.	Desvio padrão
EBSAC	Extrato bruto etanólico das sementes da <i>Annona coriacea</i> Mart.
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
h	Hora
IQUEGO	Indústria Química do Estado de Goiás
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilo
min	Minutos
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
°C	Graus Celsius
µm	Micro-metros
µm ²	Micro-metros quadrados
µm ³	Micro-metros cúbicos
π	Constante de Arquimedes

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Neurociências.....	16
1.2 Neuromorfologia – Citoarquitetura.....	17
1.2.1 Córtex.....	17
1.2.2 Cerebelo.....	20
1.2.3 Bulbo olfatório.....	21
1.2.4 Mesencéfalo.....	21
1.3 Morfologia do Fígado.....	22
1.4 Morfologia do Rim.....	22
1.5 Toxicidade, Neurotoxicidade e Fitoterápicos.....	23
1.6 Família Annonaceae – atividade biológica.....	25
1.7 <i>Annona coriacea</i> Mart.	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Coleta e preparo do extrato bruto etanólico das sementes da <i>Annona coriacea</i> Mart.....	32
3.2 Animais de experimentação.....	33
3.3 Administração do EBSAC.....	34
3.4 Coleta de dados diários.....	35
3.5 Eutanásia.....	35
3.6 Tratamento dos tecidos para coloração em Hematoxilina-Eosina.....	36
3.6.1 Retirada dos órgãos alvo e fixação.....	36
3.6.2 Desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina.....	36

3.7 Corte e preparo das lâminas.....	36
3.8 Análise das lâminas.....	37
3.8.1 Córtex.....	37
3.8.2 Mesencéfalo.....	38
3.8.3 Cerebelo.....	39
3.8.4 Bulbo olfatório.....	40
3.8.5 Fígado.....	41
3.8.6 Rim.....	42
3.9 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Peso dos animais, consumo de água, ração e produção de excreta.....	45
4.2 Análise do córtex cerebral, mesencéfalo, cerebelo e bulbo olfatório corados pelo método de H.E.. ..	47
4.3 Análise do Fígado corado pelo método de H.E.. ..	53
4.4 Análise do RIM corado pelo método de H.E.. ..	55
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÃO.....	65
7 PERSPECTIVAS.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurociências

Observamos nas últimas décadas um grande avanço da ciência em todos os seus aspectos, porém muitas questões ainda se encontram sem resposta, e uma das áreas com uma grande quantidade de questionamentos é a Neurociência. O estudo do sistema neural e suas funções ainda envolvem uma série de dúvidas a serem exploradas (KANDEL et al., 2000).

Segundo Lent (2005) o sistema neural pode ser observado e abordado de diversos modos, originando assim divisões em suas formas de estudos, conhecidas de um modo geral por neurociências. Entre estas divisões estão a neurociência molecular, responsável pelo estudo do material genético dos neurônios e glia; a neuroquímica, estudo dos neurotransmissores e neuromoduladores, neurohistologia e neuroanatomia, que aborda populações de células situadas em regiões específicas com enfoque morfológico, e a neurofisiologia que tem por finalidade o estudo das funções destas estruturas (SQUIRE et al., 2008).

Tantas maneiras de abordar o sistema neural podem ser utilizadas conjuntamente para um estudo ainda mais amplo que permita a observação da ação de drogas e fármacos sobre o sistema neural, pois o conhecimento básico da sua morfologia e fisiologia implica em inferirmos alterações no mesmo sistema. São escopos, a neurofarmacologia e a neurotoxicologia (SQUIRE et al., 2008). Uma vez conhecida a estrutura morfológica deste sistema e sua relação com a função, estes dados possibilitam estudos da exposição deste sistema frente à xenobióticos.

Historicamente, os modos de se conhecer e entender o funcionamento do sistema neural central tem sido por meio do estudo da modulação da atividade deste sistema utilizando-se diferentes xenobióticos. Caviness Jr. (1975), cita que o estudo morfológico do córtex cerebral é uma referência comum para trabalhos onde se relacionam estrutura *versus* atividade.

As células que constituem o sistema neural são muito sensíveis a variações bioquímicas em seu meio, podendo causar morte por mecanismos apoptóticos, por exemplo, neurônios que não apresentam produção de seus neurotransmissores,

seja por efeito genético ou por inibição da produção sobre efeito de drogas e fármacos (AVERSI-FERREIRA et al., 2005; TILSON e HARRY,1999).

1.2 Neuromorfologia - citoarquitetura

Alterações do metabolismo celular, geradas pela exposição à xenobióticos, geram muitas vezes respostas morfológicas nas mesmas (TILSON e HARRY,1999). Estas alterações da morfologia celular podem ser utilizadas para identificar os efeitos de substâncias sobre as células, sendo assim de suma importância o bom conhecimento da organização tecidual dos órgãos a serem avaliados em estudos que correlacionem análise de substâncias através da sua morfologia.

Dentro do escopo morfológico, o sistema neural é dividido em sistema neural central, constituído de encéfalo, contido no crânio e medula espinhal contida na coluna vertebral; e sistema neural periférico, constituído pelos nervos aferentes e eferentes que se projetam para fora do sistema neural central (BURT, 1995; MOORE e DALLEY, 2006).

1.2.1 Córtex

O sistema neural central é constituído pela grande maioria das células, prolongamentos e conexões, sendo que, a maior parte dos neurônios está localizado principalmente na substância cinzenta telencefálica (LENT, 2005)

As células que compõem o sistema neural são divididas em duas classes; os neurônios e as células da glia. Estas últimas estão em uma proporção de 9 células para cada 1 neurônio. Estas células desempenham diversas funções, entre elas a de nutrir os neurônios e permitir seu bom funcionamento. Estas células são responsáveis pela barreira hemato-encefálica, e estão associadas à memória (FIELDS e STEVENS-GRAHAM, 2002).

Histologicamente o córtex adulto é dividido em seis camadas horizontais, conhecidas como camadas de Brodmann (MACHADO, 2000; MARIN-PADILLA, 1992), sendo estratificado também em colunas verticais, responsáveis pelo comando motor de várias regiões do corpo e pela recepção, reconhecimento, integração e compreensão das informações aferentes vindas de várias partes do corpo (AVERSI-FERREIRA e PENHA SILVA, 2005). Qualquer dano a esta estrutura cortical, como

diminuição da árvore dendrítica ou tamanho do soma, pode implicar em perdas motoras e cognitivas. Estas camadas são formadas principalmente por quatro tipos de células neuronais: 1) células piramidais: possuem soma em forma de triângulo tendo um proeminente dendrito emergindo de seu ápice; 2) células granulares: células com forma estrelada com irradiação tridimensional dos dendritos; 3) células fusiformes: células alongadas lembrando um charuto; 4) células horizontais: células pequenas limitadas à camada-I (MACHADO, 2000; ROSS e PAWLINA, 2008).

Para camundongos a citoarquitetura do córtex adulto segue padrões semelhantes aos descritos em humanos por Brodmann (CAVINESS Jr., 1975) descritas da porção mais externa para a interna (Fig. 1) (BURT, 1995; MACHADO, 2000):

Camada – I ou molecular: contem raras células horizontais, porém rica em fibras formando o chamado estrato tangencial;

Camada – II ou granular externa: apresenta grande quantidade de células granulares e algumas células piramidais pequenas;

Camada – III ou piramidal externa: presença de células piramidais pequenas próximo a camada – II e células piramidais maiores mais profundamente, tendo ainda a presença de um estrato tangencial de fibras;

Camada – IV ou granular interna: abundante em neurônios granulares, maiores que os da camada – II, considerada estação receptora do córtex, contendo muita mielina e pequenos neurônios piramidais;

Camada - V ou piramidal interna: possui células piramidais de pequeno e médio porte com presença de pequenas células granulares, sendo a camada com maior uniformidade celular;

Camada – VI ou fusiforme: apresenta células com formas globulares mais externamente, e células alongadas, fusiformes, na porção mais interna.

Podendo ainda sofrer outras divisões por alguns grupos de pesquisadores como é demonstrado na Figura 2.

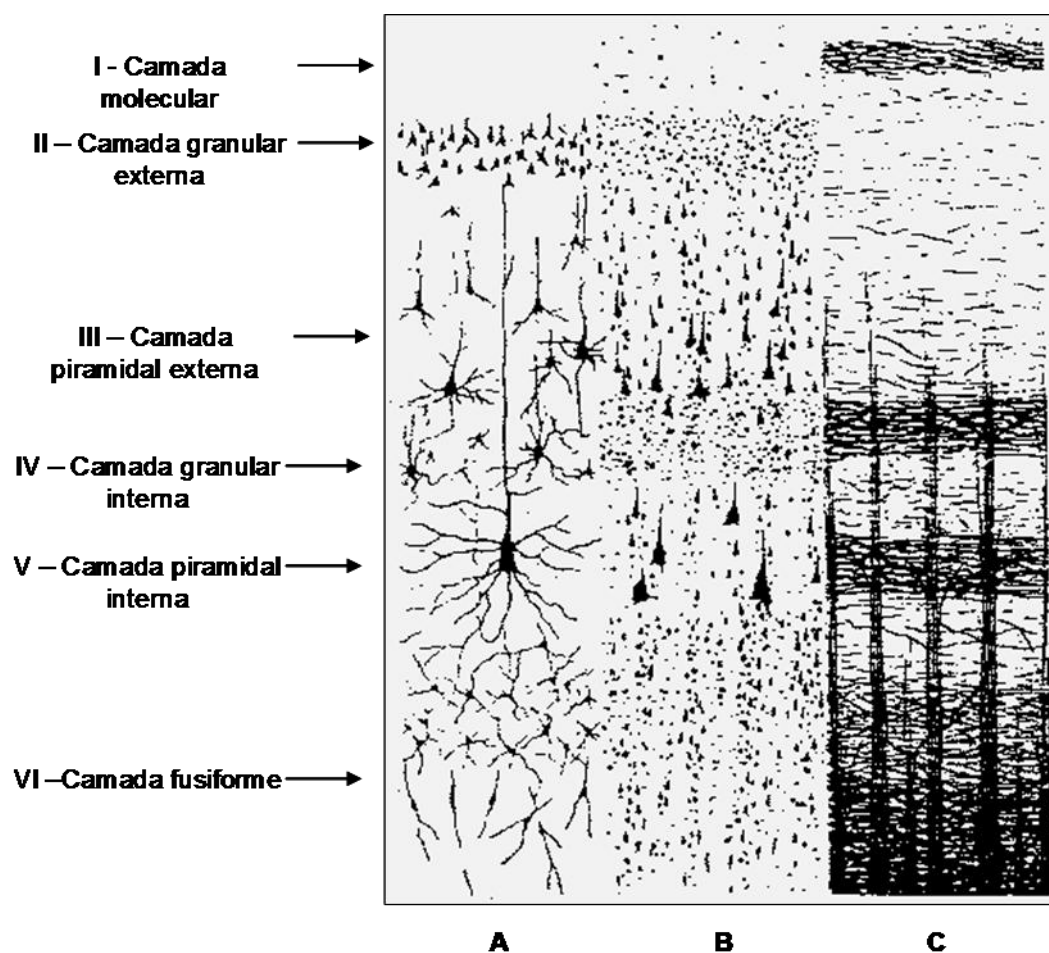


Figura 1: Descrição histológica segundo Brodmann do córtex cerebral adulto coradas utilizando três técnicas diferente; A) método de Golgi para corpo dos neurônios e prolongamentos; B) método de Nissl para corpo dos neurônios; C) método de Weigert para fibras mielínicas (modificado de Machado, 2000).

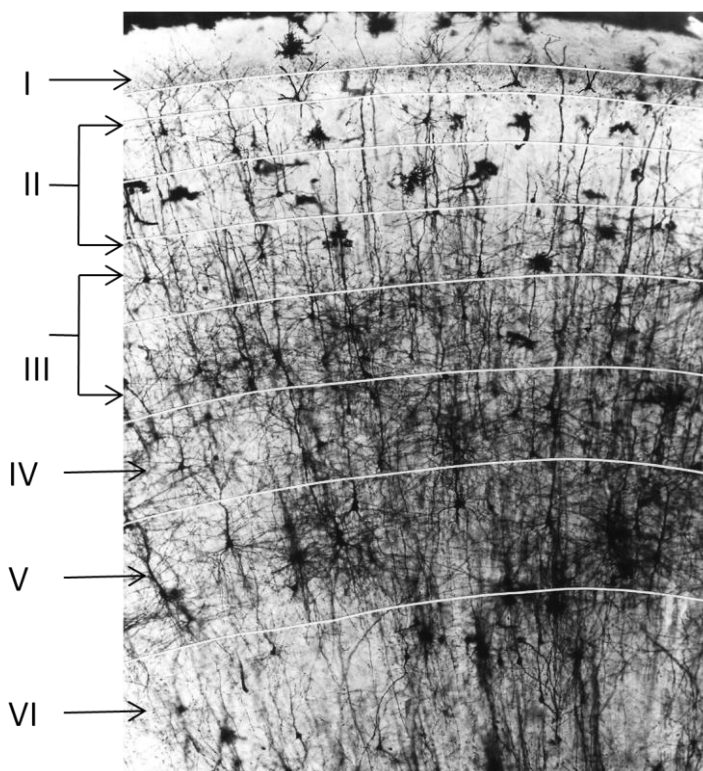


Figura 2: Fotomicrografia do córtex motor de recém-nascido impregnado pelo método de Golgi-rápido evidenciando as 6 camadas corticais (modificado de MARÍN-PADILLA, 1998).

1.2.2 Cerebelo

O cerebelo situado posterior dorsalmente à ponte e ao bulbo apresenta convoluções em seu córtex, sendo a unidade moduladora e reguladora da função motora do organismo (VOOGD e GLICKSTEIN, 1998).

O córtex cerebelar apresenta uma citoarquitetura contendo três camadas: (1) camada molecular, (2) camada das células de Purkinje e a (3) camada granular (VOOGD e GLICKSTEIN, 1998).

A primeira camada, molecular, apresenta células estreladas e dendritos das células de Purkinje. As células de Purkinje aparecem com formato de cesto formando a segunda camada (SOUZA et al., 2006), responsável por enviar as informações para fora do córtex cerebelar, uma vez que são os únicos neurônios do cerebelo a emitir axônios para fora do cerebelo (VOOGD, 2003; VOOGD e GLICKSTEIN, 1998). A terceira camada, a camada granular, contém células granulares e glomérulos em animais adultos. Estas células granulares são pequenas e são o elemento mais abundante no cerebelo onde correspondem a cerca de 95%

do total de células do cerebelo (SOUZA et al., 2006; VOOGD, 2003; VOOGD e GLICKSTEIN, 1998).

1.2.3 Bulbo olfatório

O bulbo olfatório é formado por um par de estruturas situadas na face anterior do lobo frontal imediatamente acima da placa crivosa do osso etmóide (AVERSI-FERREIRA et al., 2006; BURT, 1995). Tem a função de receber informações de moléculas de odor captadas nos receptores olfatórios do nariz e as redirecionar ao neocórtex (FUJISAKI et al., 2004; MORI et al., 1999).

Esta estrutura é uma das poucas que está presente no sistema neural de mamíferos, entre eles o humano, em que há contínua geração de neurônios (BEDARD e PARENTE, 2004).

Histologicamente visualizam-se cinco camadas circundando uma região de substância branca formada pelos axônios das fibras aferentes e eferentes ao bulbo olfatório (BURT, 1995).

1.2.4 Mesencéfalo

Esta é uma pequena e fina região que se estende da parte superior da ponte até a parte inferior do diencéfalo (CROSSMAN e NEARY, 2007). No mesencéfalo estão os pedúnculos cerebrais, vias para a informação motora, transmitida do córtex cerebral para a ponte e medula espinhal, e pela informação sensitiva, transmitida da medula ao tálamo, que por sua vez conecta o mesencéfalo ao córtex cerebral (BURT, 1995).

Outra estrutura presente nesta região é a formação reticular, contendo neurônios responsáveis por receber e integrar informações provenientes do córtex cerebral, tálamo, hipotálamo, cerebelo e medula espinhal (BURT, 1995; CROSSMAN e NEARY, 2007).

A dopamina é o principal neurotransmissor utilizado pelos neurônios desta região. Normalmente, é excitatório e está ligado a respostas emocionais e movimentos subconscientes da musculatura esquelética (LENT, 2005).

1.3 Morfologia do fígado

O fígado é a mais pesada glândula do corpo, pesando cerca de 1,4 kg no adulto médio. Está localizado na cavidade abdominal, inferior ao músculo diafragma, mais proeminente no lado direito do corpo. Participa da digestão de carboidratos, proteínas e gorduras. Secrete ainda a bile, responsável por emulsificar lipídios em uma suspensão, o que facilita sua absorção (AIRES, 2007; TORTORA e GRABOWSK, 2002).

É um órgão com alta atividade metabólica visto que, grande parte das substâncias absorvidas pelo intestino se destinam ao fígado, o qual tem a função de metabolizar, armazenar ou sintetizar estas substâncias colaborando assim para a homeostasia corpórea. Este órgão possui grande perfusão sanguínea e, em função disto, toda substância absorvida pelo organismo atinge rapidamente as células hepáticas. Ademais, o fígado é responsável por promover a eliminação de xenobióticos, nocivos ou não, do organismo, tais como drogas, sendo então um órgão de grande importância em estudos que avaliem os efeitos de diferentes substâncias (BORGES et al., 2002; LEMES e BRACCINI, 2004).

Histologicamente o fígado é formado por unidades funcionais denominadas de lóbulos, que compreendem células hepáticas, os hepatócitos, que se agrupam e anastomosam entre si formando fileiras de células dispostas radialmente em torno de uma veia central em uma estrutura hexagonal, tendo nas extremidades as tríades portais, com a artéria hepática, veia porta e ducto biliar. Entre estas fileiras de hepatócitos, encontram-se capilares denominados sinusóides cujas paredes são formadas por dois tipos de células, as células endoteliais típicas das paredes dos capilares e células reticuloendoteliais estreladas fagocíticas conhecidas como células de Kupffer (GERBER e THUNG, 1987; ROSS e PAWLINA, 2008).

1.4 Morfologia do rim

Os rins situam-se acima da cintura contra a parede posterior da cavidade abdominal, sendo o rim direito levemente inferior ao esquerdo (TORTORA e GRABOWSK, 2002). Histologicamente os rins são constituídos pelas zonas medular e cortical, cápsula, hilo e pelve. A unidade funcional dos rins é o nefrón, este é constituído de corpúsculo renal, túbulos contorcidos e alça de Henle.

É nos corpúsculos renais que temos a filtração do plasma sanguíneo. Cada corpúsculo é formado pelo glomérulo e cápsula de Bowman. As células da parede interna da cápsula se aderem às células endoteliais dos capilares formando assim uma membrana de filtração (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; TORTORA e GRABOWSK, 2002).

Os rins têm a função de regular a composição e volume do sangue, eliminando ou reabsorvendo substâncias essenciais para a homeostasia. O primeiro passo para esta regulação está na atividade exercida pelos corpúsculos renais, a denominada filtração glomerular (AIRES, 2007). Esta atividade é de grande importância uma vez que está relacionada com a eliminação de substâncias nocivas ao organismo.

A quantidade de aporte de sangue e a quantidade de filtrado formado pelos corpúsculos renais influenciam em sua morfologia, sendo estas alterações, um indício significativo para maior ou menor atividade renal, podendo ser este um parâmetro para avaliação do efeito tóxico de substâncias sobre este órgão (RHODEN et al., 2001).

1.5 Toxicidade, neurotoxicidade e fitoterápicos

Os estudos toxicológicos são a essência para uma atividade importante conhecida como avaliação de risco. Esta avaliação caracteriza-se por estudar possíveis efeitos adversos a saúde de humanos e ao ambiente. Tais estudos seguem uma série de métodos e protocolos os quais são regulados e estabelecidos por diversos órgãos como a *Food and Drug Administration* (FDA) americana, a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) europeia e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) brasileira. Uma grande variedade de métodos e protocolos já foram estabelecidos para se investigar efeitos tóxicos de xenobióticos, utilizando metodologia *in-vitro*, *ex-vivo*, porém um componente chave são ainda os bioensaios em animais, em gênero e espécies diferentes como ratos e camundongos (KLAASSEN et al., 2007).

A neurotoxicologia é uma área da toxicologia que estuda os efeitos adversos de substâncias exógenas sobre o sistema neural as quais levam a prejuízos irreversíveis ou lentamente reversíveis. Esta exposição à xenobióticos neurotóxicos

resulta em alterações comportamentais, fisiológicas e morfológicas complexas (MASSARO, 2002).

São conhecidas mais de 1000 desordens neurológicas em humanos, sendo muitas delas de etiologias ainda não conhecidas. A neurotoxicologia estuda substâncias que podem produzir efeitos deletérios sobre o sistema neural. Estes efeitos podem atuar sobre deficiências pré-existentes do sistema, por mecanismos de potencialização ou atuar de forma sinérgica sobre desordens já conhecidas. Este fato possibilita o estudo dos mecanismos envolvidos em tais deficiências favorecendo a sua compreensão e um possível meio de tratamento tanto para as intoxicações quanto para os agentes testados, ou ainda para as desordens neurológicas (ABOU-DONIA, 1992).

O contingente de trabalhos relacionando efeitos tóxicos ao uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos vem crescendo gradativamente (OLIVEIRA e GONÇALVES, 2006).

Substâncias presentes em medicamentos fitoterápicos ou mesmo alimentos, como os alcalóides pirrolizidínicos, presente no confrei (*Symphytum officinale* L.) (STICKEI e SEITZ, 2000) e mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), podem resultar em sintomas como anorexia, letargia, dor abdominal, depleção dos hepatócitos, carcinogênese e trombose (COUET et al., 1996)

Mais recentemente, a *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., popularmente conhecido por cimicifuga, um fitoterápico bastante utilizado em mulheres de meia idade para o tratamento dos sintomas decorrentes da menopausa, tem despertado interesse, uma vez que foram relatados diferentes efeitos adversos decorrente do seu uso crônico em doses terapêuticas, dentre eles, disfunções hepáticas e problemas circulatórios (HUNTLEY e ERNST, 2003). Além disto, alguns relatos de casos evidenciam um aumento da taxa de creatina fosfatase e lactato desidrogenase no sangue (MINCIULLOA et al., 2006).

Outra planta, com fruto bastante consumido, a *Averrhoa carambola* L. cujo fruto é a carambola, demonstrou efeitos adversos em pacientes urêmicos, os quais estão associados à confusão mental e perda de consciência, relacionados a uma possível neurotoxina (NETO et al., 2003; TSE et al., 2003).

A idéia de que alimentos ditos “naturais” sejam exclusivamente benéficos para a saúde ou importantes no tratamento de diversas moléstias, tem sido amplamente difundida entre a população, que desconhece a função real dos

alimentos ou ainda a possibilidade de efeitos adversos provenientes de seu consumo (OLIVEIRA e GONÇALVES, 2006; STOPER et al., 2005).

Plantas como a Kava-Kava (*Piper methysticum* L.), o Cardo-do-visco (*Atractylis gummifera* L.), o Chaparral (*Larrea tridentata* Cav.), e o confrei (*Symphytum officinale* L.) apresentam ainda efeitos hepatotóxicos decorrentes da utilização com finalidades terapêuticas (SEEFF, 2007).

1.6 Família *Annonaceae* – atividade biológica

A família *Annonaceae* é constituída de aproximadamente 130 gêneros e 2300 espécies de árvores e arbustos tropicais e subtropicais, frutíferas (ALALI et al., 1999; FECHINE et al., 2002; SANTOS e SALATINO, 2000), caracterizadas por suas folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos (ALMEIDA et al., 1998). No Brasil há registros de 29 gêneros compreendidos em 230 espécies (BARROSO, 1978). Dentro desta família estão presentes plantas como a graviola (*Annona muricata* L.) e a ata (*Annona squamosa* L.).

O interesse sobre esta família se deve aos estudos promissores relacionando-as a efeitos antitumorais (AHAMMADSAHIB et al., 1993; CAVÉ et al., 1997), tornando as plantas como a graviola (*Annona muricata* L.) e a atemóia (*Annona cherimólia* Mill.), futuras e promissoras candidatas a fármacos com utilização na inibição do crescimento de células tumorais (TORMO et al., 1999).

Jolad e colaboradores (1982) primeiramente isolaram e caracterizaram uma substância extraída das raízes da *Uvaria accuminata* Oliv. (*Annonaceae*), denominada Uvaricina, substância que teve comprovado efeito antileucêmico *in vivo* sobre a leucemia linfocítica em modelos murinos (ALALI et al., 1999; JOLAD et al., 1982). Do isolado da casca da *Annona bullata* Rich. foi obtida uma substância, com efeito inibidor sobre cultura de células de adenocarcinoma mamário humano resistente ao tratamento antineoplásico convencional (ORBELIES et al., 1997a, b).

A família das anonáceas foi relacionada com atividade inibitória sobre o complexo – I (Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina - NADH: ubiquinona oxidoreductase) da cadeia respiratória mitocondrial em mamíferos e insetos, sendo esta atividade atribuída às acetogeninas, substância majoritária encontrada nesta

família (DEGLI ESPOSTI et al., 1994; LONDERHAUSEN et al., 1991; MOTOYAMA et al., 2002; TORMO et al., 1999).

Estudos verificaram atividade antileishmaniose e antitripanosomiase em extratos da *Annona senegalensis* Pers., *Annona muricata* L., *Rollinia exsucca* A. DC., *Rollinia pittieri* Saff. e *Xylopia aromática* Lam. (OSORIO et al., 2007; SAHPAZ et al., 1994), e extratos do pericarpo da *Annona muricata* L. (JARAMILHO et al., 2000). Estes últimos achados foram confirmados pelo trabalho de Grandic e colaboradores (2004), que relataram uma atividade semelhante em compostos isolados a partir de extratos de várias plantas da família anonácea.

O grupo de Caparros-Lefebvre realizou uma série de estudos na ilha caribenha de Guadeloupe, onde relataram uma íntima ligação entre o consumo de uma planta da família das anonáceas, a *Annona muricata* L., e o aparecimento de uma síndrome parkinsoniana atípica (CAPARROS-LEFEBVRE et al., 1999, 2002). Estudos posteriores evidenciaram que uma substância presente na *A. muricata* L., a annonacina, resultou em toxicidade sobre cultura de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, indicando possível atividade tóxica *in vivo* sugerindo que esta substância poderia ser a provável causa do aparecimento da síndrome Parkinsoniana na população estudada em Guadeloupe (LANNUZEL et al., 2002, 2003, 2008). Lannuzel e colaboradores (2007, 2008) ainda verificaram uma distinção entre a doença de Parkinson e o parkinsonismo atípico presente em um grupo de pacientes desta ilha que foram expostos as neurotoxinas das Annonaceae, sendo esta síndrome uma nova e singular entidade clínica.

Associações semelhantes aos da ilha de Guadeloupe foram relatadas em pacientes em Londres, porém de origem caribenha e na Nova Caledonia (ANGIBAUD et al., 2004; CHAUDHURI et al., 2000).

Do isolado do extrato da raiz da *A. muricata* L. foi observado uma perda neuronal predominante nos núcleos da base de ratos expostos diariamente por 28 dias e ainda, foram verificados efeitos leves a moderados sobre o hipocampo, tálamo, núcleos pósterio-lateral, médio-dorsal, ventro-pósterio-lateral e ventro-pósterio-medial. Sobre o córtex cerebral houve redução em 44% dos níveis de adenosina tri-fosfato (ATP), porém não apresentando nenhuma alteração de atividade locomotora espontânea. No cerebelo foram observadas pequenas

alterações quanto ao formato das células de Purkinje e seus núcleos se mostraram mais afilados (CHAMPY et al., 2004).

1.7 *Annona coriacea* Mart.

A *Annona coriacea* Mart. é uma planta da família *Annonaceae*, distribuída pelo cerrado da região central do Brasil, onde é nativa (Fig. 3). Seu nome popular, Araticum, é dado a diferentes espécies desta mesma família. Outros nomes populares para esta planta são Marolo, Articum, Araticum-Liso (ALMEIDA et al., 1998).



Figura 3. (A) Detalhe da flor e (B) ramos da planta *A. coriacea* Mart, no cerrado goiano (Fotos tiradas e cedidas gentilmente pelo professor Dr. Luiz Carlos Cunha – Prof. Associado da Faculdade de Farmácia da UFG).

O fruto do Araticum é consumido pela população e empregado empiricamente para o tratamento de processos inflamatórios (FAGUNDES et al., 2005) e como laxante. Porém estudos realizados com esta família não têm apresentado uma correlação com este emprego popular. Acerca da utilização popular da *A. coriacea* Mart., o pó das sementes desta planta é utilizado ainda como pesticida, em especial como raticida contra espécies silvestres, para a proteção de casas nas zonas rurais (Prof. Dr. José Realino de Paula, comunicação pessoal. Professor Associado de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás).

Coelho e colaboradores (2003) verificaram que uma lecitina isolada das sementes da *A. coriacea* Mart. demonstrou atividade hemaglutinante sobre

eritrócitos humanos. Ainda, desta mesma lecitina observou-se migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos submetidos a este isolado provocando processo inflamatório (COELHO et al., 2006). Desta forma, os dados acima relatados, não esclarecem o uso popular, ao contrário, estão em desacordo com este conhecimento.

Das raízes da *A. coriacea* Mart. foi isolado a primeira acetogenina descrita com duas duplas ligações na cadeia alifática, a coriadienina. Esta substância foi testada em cultura de células de carcinoma nasofaríngeo humano, onde apresentou atividade citotóxica sobre esta cultura (SILVA et al., 1996).

Outra atividade biológica encontrada por Fagundes e colaboradores (2005), utilizando o teste do micronúcleo, demonstraram potencial mutagênico do extrato bruto etanólico das sementes de *A. coriacea* Mart. sobre eritrócitos da medula óssea de camundongos nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, com administração única por via oral.

Embora a família *Annonaceae* seja bastante estudada, poucos foram os trabalhos encontrados na literatura acerca da espécie *A. coriacea* Mart. Os artigos citados acima demonstraram que há substâncias já isoladas das sementes, apresentando atividade biológica compatíveis com as já descritas para diferentes plantas desta família. É sabido que as substâncias majoritárias desta família, as acetogeninas, estão presentes em diferentes partes destas plantas tais quais folhas, frutos, sementes e raízes.

Com o conhecimento popular da utilização desta planta, aliado aos aspectos já investigados em trabalhos anteriores, citados anteriormente, os quais demonstraram atividade tóxica relacionado às substâncias presentes na família *Annonaceae* e, na espécie *A. coriacea* Mart., justificamos assim a utilização das sementes desta planta ainda tão pouco estudada, na tentativa de observar putativas atividades do extrato etanólico bruto das sementes, em especial sobre o córtex cerebral.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Estudar possíveis efeitos tóxicos do extrato bruto etanólico das sementes de *A. coriacea* Mart. em camundongos Swiss.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial neurotóxico do extrato etanólico bruto das sementes de *A. coriacea* Mart.;
- ✓ Avaliar o potencial nefrotóxico do extrato etanólico bruto das sementes de *A. coriacea* Mart.;
- ✓ Avaliar o potencial hepatotóxico do extrato etanólico bruto das sementes de *A. coriacea* Mart.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparo do extrato bruto etanólico das sementes da *Annona coriacea* Mart.

O material botânico foi coletado na Chácara Vila Mariana, Senador Canedo - GO, Brasil (781m de altitude, 16° 40' 15,5" sul e 49° 14' 13,6" oeste), sendo identificada morfológicamente pelo professor Dr. José Realino de Paula. Uma exsicata do material foi preparada contendo caule, folhas e flor, para identificação botânica, sendo este depositado no Herbário da UFG/ICB-I sobre o número de identificação: 40004.

Os frutos foram colhidos e as sementes retiradas e dessecadas em estufa com circulação de ar a 40 °C, em seguida, trituradas em moinho de facas. Extraiu-se 100g de sementes trituradas com 500mL de álcool etílico a 70% (v/v) por maceração com agitação mecânica por 5h. Filtrou-se e repetiu-se a operação por mais duas vezes. Concentrou-se o filtrado em rota-evaporador a 40 °C e obteve-se o extrato etanólico bruto das sementes de *A. coriacea* Mart. (EBSAC), o qual foi armazenado em temperatura média de 7 °C até o momento do uso (Fig. 4).

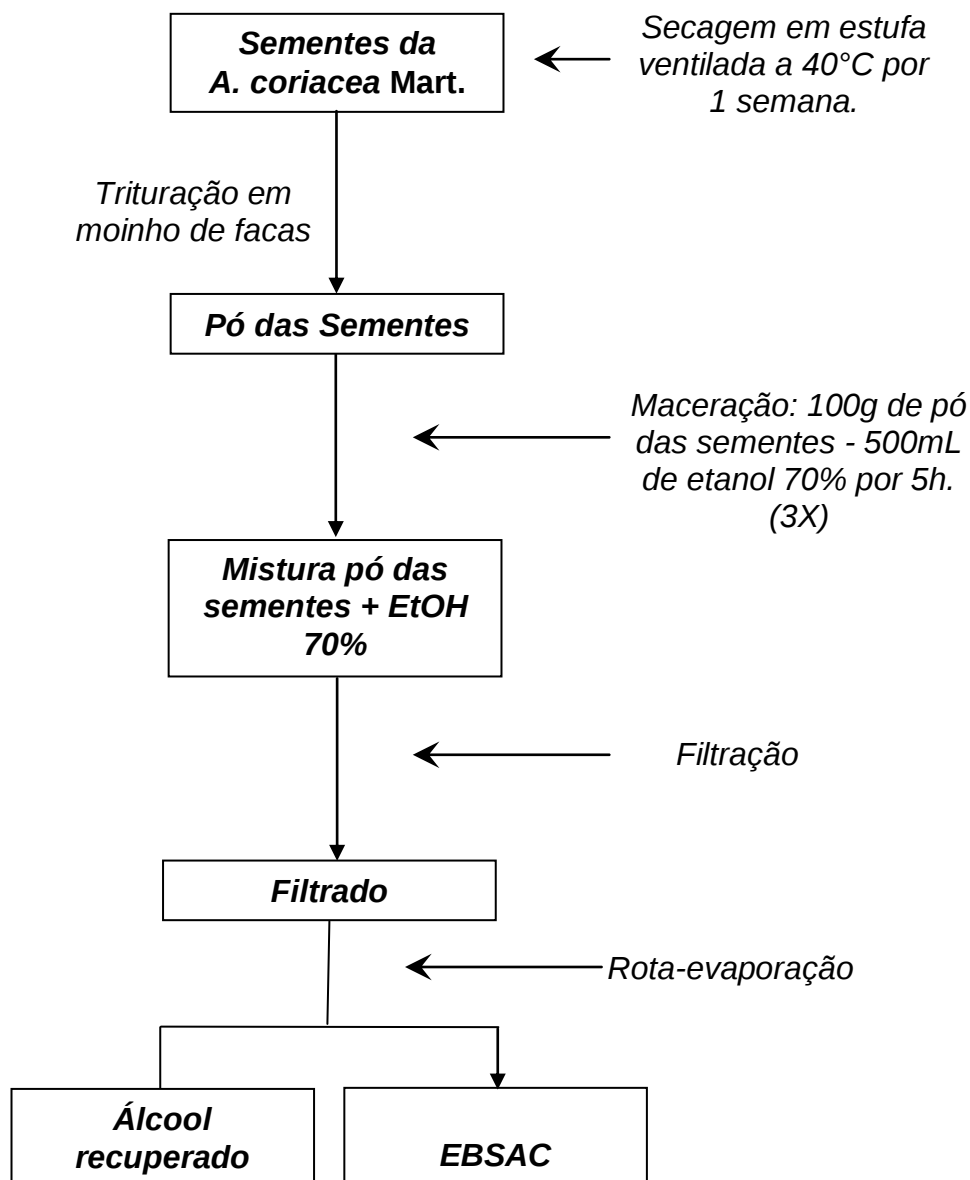


Figura 4: Fluxograma de extração do EBSAC

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 30 camundongos Swiss machos com idade entre 6 e 9 semanas, fornecidos pelo biotério da Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). Os animais foram agrupados por similaridade de peso em gaiolas plásticas transparentes, todas de mesmas dimensões em um total de 5 animais por grupo experimental (Fig. 5). As gaiolas ficaram em sala climatizada sob temperatura constante de 21 ± 2 °C, ciclo claro - escuro de 12h. A ração utilizada foi a comercial padrão e água *ad libitum*.

Para este estudo, foram seguidas as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).



Figura 5: Animais experimentais agrupados em sua devida gaiola.

3.3 Administração do EBSAC

Foi realizada administração diária por um período de 4 dias por via oral (gavagem) em diferentes concentrações do extrato (12,5; 25; 50 e 100 mg/kg), sendo administrado sempre no mesmo horário, 9:00 h. O extrato foi diluído em Tween 80 e salina estéril [1:10], obtendo-se ao final um volume total de 0,2 mL da solução, sendo os grupos divididos como demonstrado no Quadro 1.

GRUPO	Exposição (4 dias)
Controle	Sem exposição
Solvente	Exposto aos solventes do EBSAC - tween 80 + salina [1:10] – 0,2 mL
Grupo 12,5 mg/kg	Exposto a 12,5 mg/kg do EBSAC + solventes do extrato – 0,2 mL
Grupo 25 mg/kg	Exposto a 25 mg/kg do EBSAC + solventes do extrato – 0,2 mL
Grupo 50 mg/kg	Exposto a 50 mg/kg do EBSAC + solventes do extrato – 0,2 mL
Grupo 100 mg/kg	Exposto a 100 mg/kg do EBSAC + solventes do extrato – 0,2 mL

Quadro 1: Divisão dos grupos experimentais e forma de exposição.

3.4 Coleta de dados diários

Durante todos os dias de exposição ao extrato foram coletados os dados de peso dos animais, da excreta, consumo de água e alimento, sempre no mesmo horário, 08:00 h, além de observação do comportamento.

A figura 6 mostra o resumo da exposição e observações realizadas neste estudo.

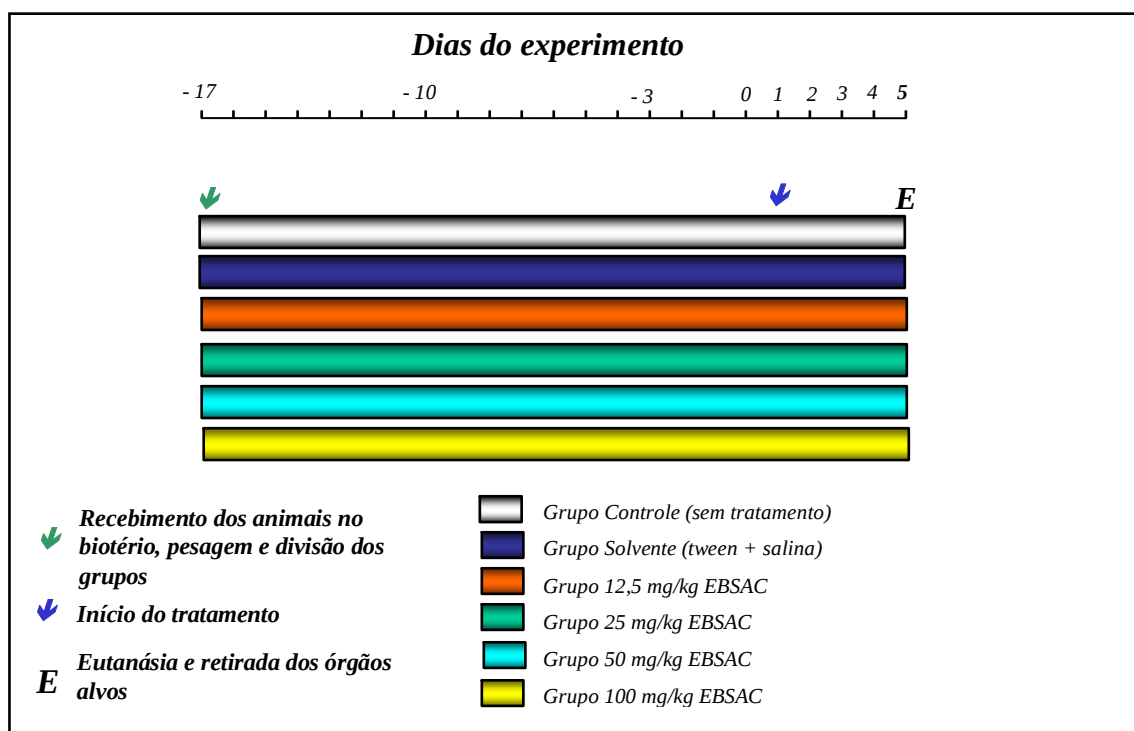


Figura 6: Protocolo experimental para avaliação do potencial tóxico do EBSAC em camundongos.

3.5 Eutanásia

Vinte e quatro horas após a última exposição ao extrato, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus órgãos alvo para este estudo foram extirpados.

3.6 Tratamento dos tecidos para coloração em hematoxilina-eosina

3.6.1 Retirada dos órgãos alvo e fixação

À medida que os animais eram eutanasiados, os órgãos de interesse foram rapidamente extirpados. Os encéfalos tiveram seccionados os hemisférios direito e esquerdo e foram imersos em solução de etanol 70% (v/v) por duas semanas, assim como os rins e fígados, para a fixação e posterior tratamento, sendo mantidos ao abrigo da luz e calor.

3.6.2 Desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina

Após a fixação os encéfalos, rins e fígados foram levados para bateria de desidratação passando por etanol 70% (v/v) por 10 min., 90% (v/v) por 20 min., e 100% (v/v) por uma hora, xilol-I e II por 20 min., seguindo então para a impregnação em parafina-I, II e III por 20 min cada (não havendo diferença na preparação das três parafinas, da mesma forma que o xilol – I e II), e por fim a inclusão em parafina nova. Obtendo ao final, blocos de parafina para corte em micrótomo.

3.7 Corte e preparo das lâminas

Os encéfalos, rins e fígados foram cortados em 6 μ m de espessura em um total de 4 lâminas com 3 cortes por tecido por animal. Os cortes então foram colocados em lâminas histológica de vidro, os quais foram armazenados em estufa a 40°C para fixação do tecido na lâmina, para posterior coloração seguindo a bateria de coloração: xilol-I e II: 5 min.; etanol 100% (v/v) e 90% (v/v): 5 min. e etanol 70% (v/v): 2min., banho rápido em água, hematoxilina: 5 min., banho rápido em água, eosina: 30 seg., banho rápido em água, seguindo assim a ordem inversa para as soluções de etanol e xilol. Após a coloração fixou-se lamínula com enthelan sobre o tecido.

3.8 Análise das lâminas

Feito através de microscópio de luz Leica DMI 4000B acoplado a uma câmera e computador para a captura das imagens e microscópio de luz Leica DM 2000 acoplado a uma câmera Canon™, modelo: PowerShot S80.

A análise morfométrica foi realizada utilizando os softwares ImageJ 1.40 e Leica Application Suite seguindo os parâmetros de análise descritos a seguir para cada órgão e região.

3.8.1 Córtex

Frequência célula/área por lobo (frontal, parietal, occipital). Fotos com aumento de 400X (câmera Canon™, modelo: PowerShot S80). Área total de 38000 μm^2 (Fig. 7).

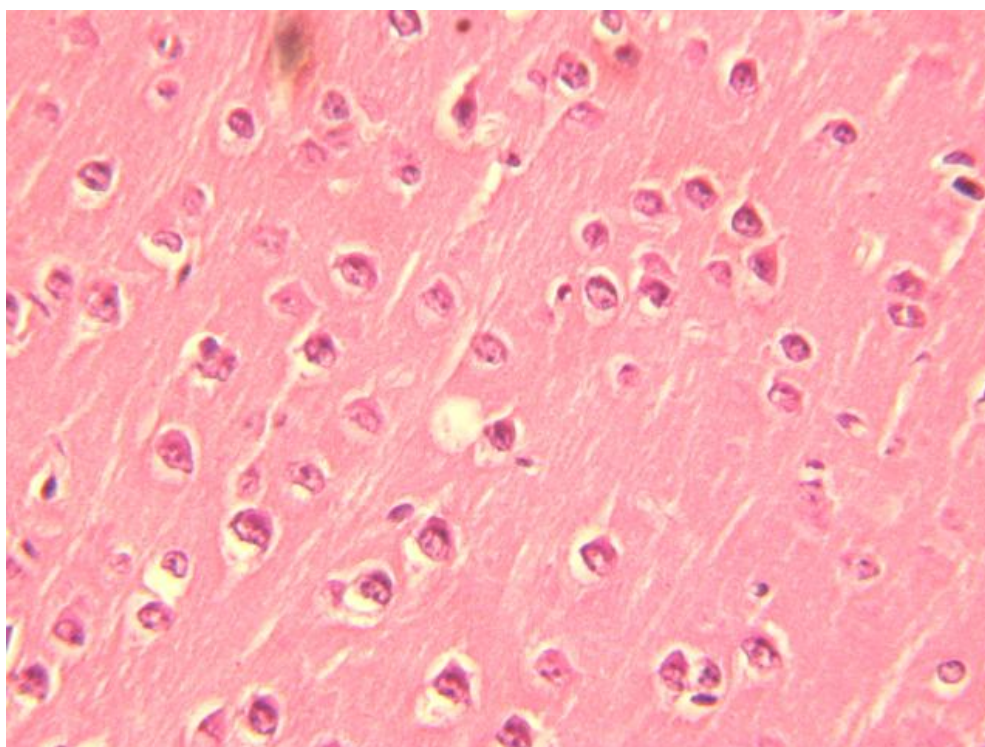


Figura 7: Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no córtex de animal do grupo solvente em aumento de 400X.

3.8.2 Mesencéfalo

Frequência célula/área. Fotos com aumento de 400X (Canon™, modelo: PowerShot S80). Área total de 38000 μm^2 (Fig. 8)

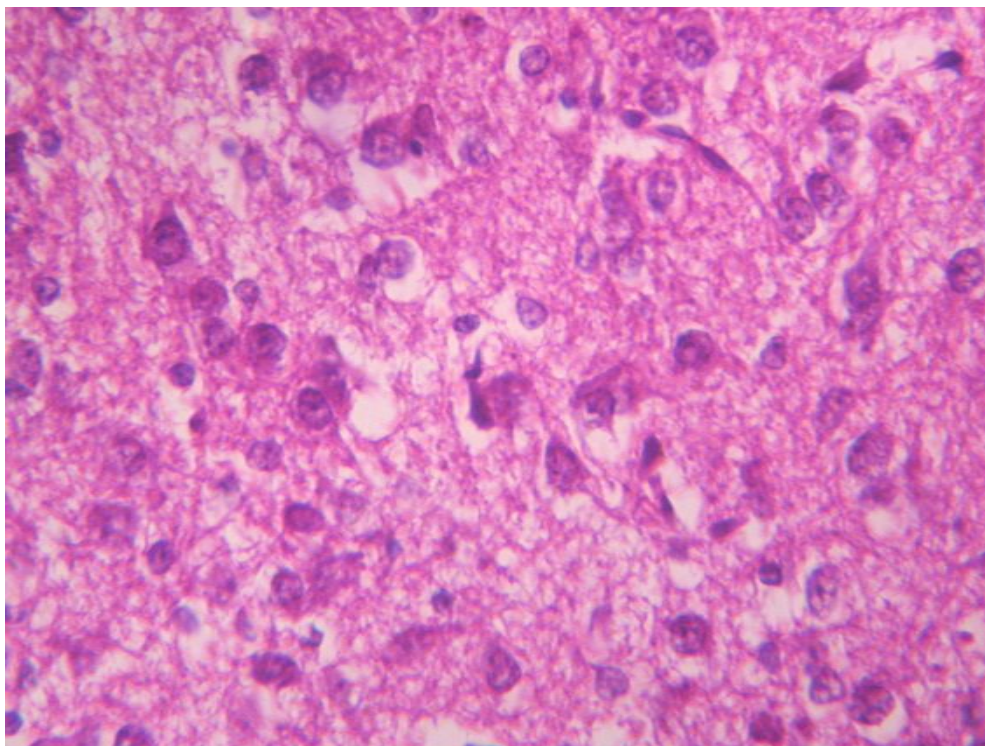


Figura 8: Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no mesencéfalo de animal do grupo solvente em aumento de 400X.

3.8.3 Cerebelo

Frequência célula/área por camada molecular e de Purkinje. Fotos com aumento de 200X (câmera Canon™, modelo: PowerShot S80). Área= 152550 μm^2 (Fig. 9).

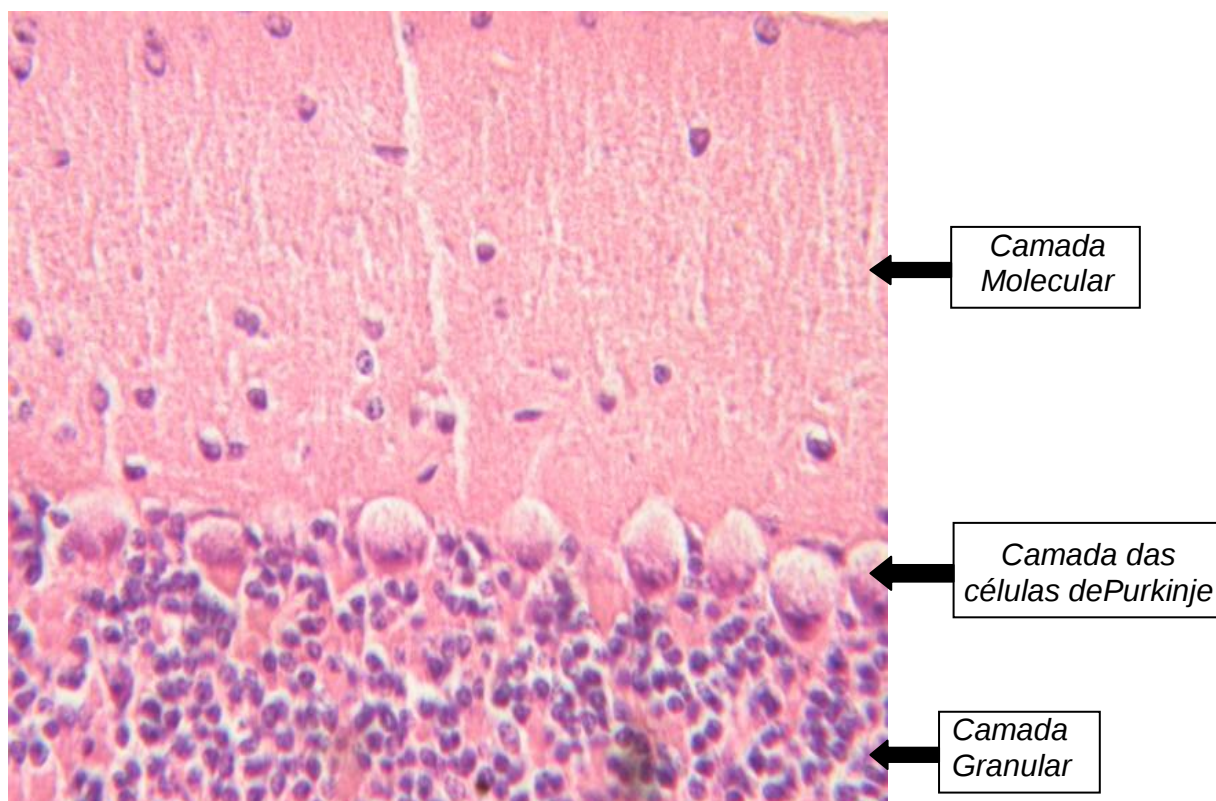


Figura 9: Exemplo de fotomicrografia para contagem de células nas camadas molecular e de células de Purkinje no cerebelo de animal do grupo solvente em aumento de 200X.

3.8.4 Bulbo olfatório

Frequência célula/área. Fotos com aumento de 400X (Canon™, modelo: PowerShot S80). Área total de 38000 μm^2 (Fig. 10).

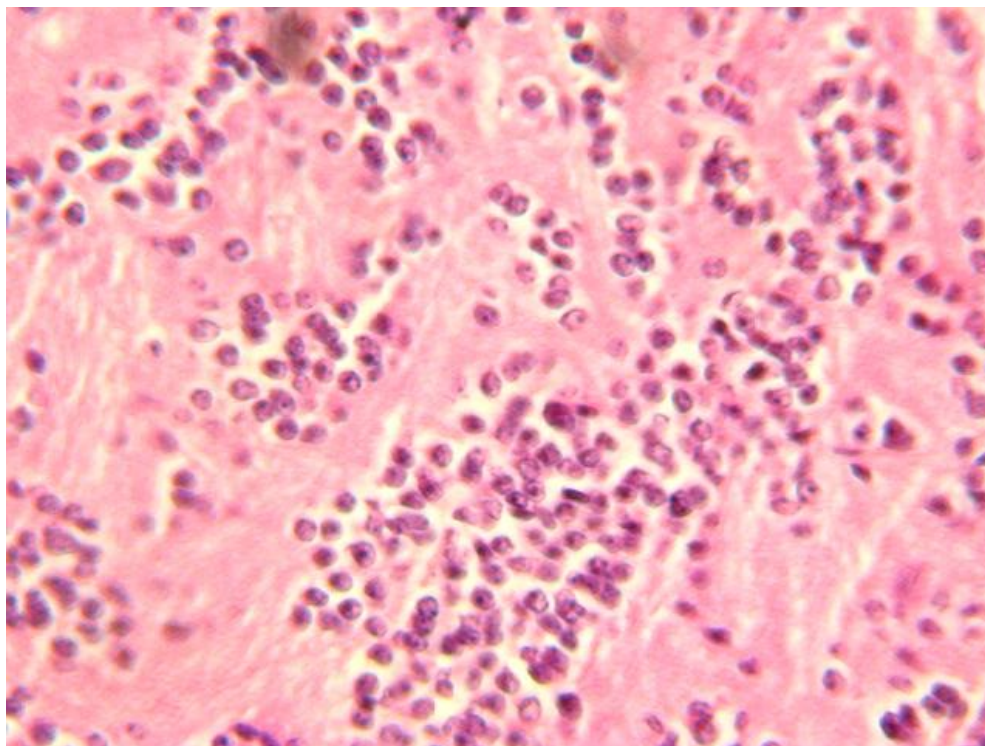


Figura 10: Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no bulbo olfatório de animal do grupo solvente em aumento de 400X.

3.8.5 Fígado

Frequência célula/área. Fotos com aumento de 1008X. Área total de 19000 μm^2 (Fig.11).

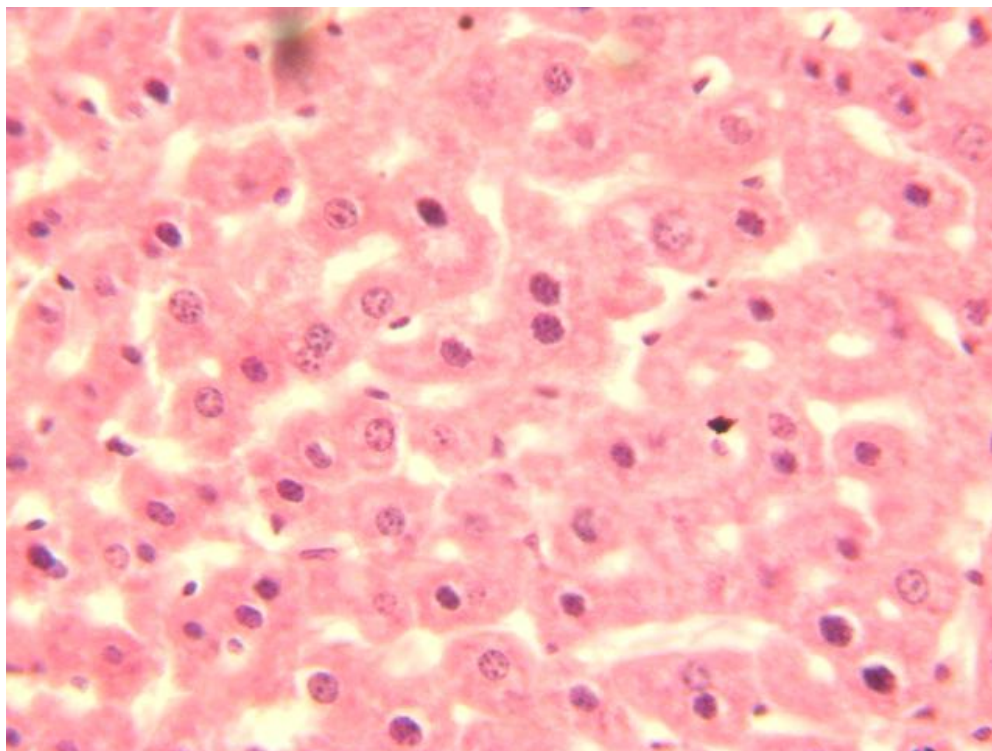


Figura 11: Exemplo de fotomicrografia para contagem de células por área no fígado de animal do grupo solvente em aumento de 1008X.

3.8.6 Rim

Diâmetro interno (entre os limites do tufo glomerular), diâmetro externo (cápsula de Bowman) e perímetro da cápsula de Bowman, calculando através da equação:

$$A = \pi ab$$

onde “ π ” é a constante de Arquimedes, “a” é o raio maior e “b” é o raio menor. Fotos com aumento de 640X. Área total de 47200 μm^2 (Fig. 12 e Fig. 13).

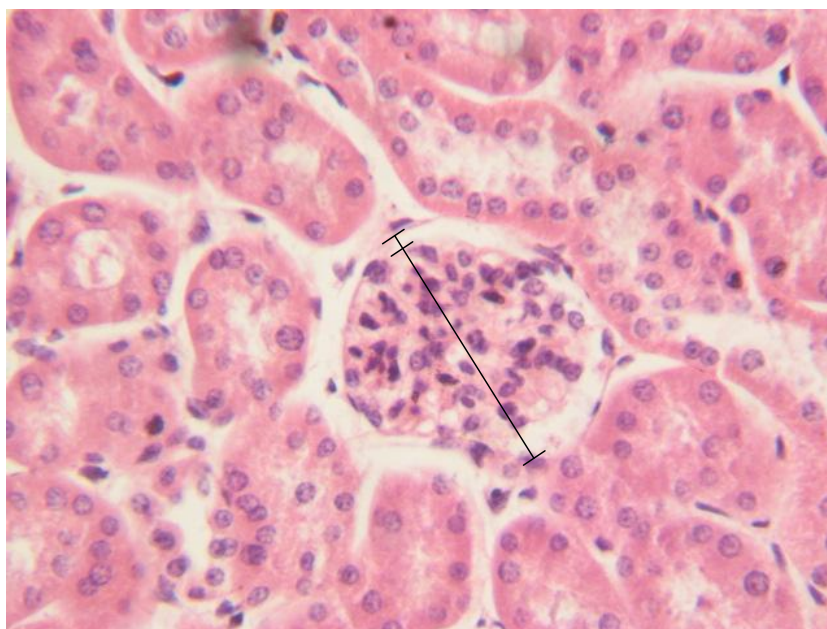


Figura 12: Exemplo de fotomicrografia para medida do diâmetro interno e externo do tufo glomerular e cápsula de Bowman do rim de animal do grupo solvente em aumento de 640X.

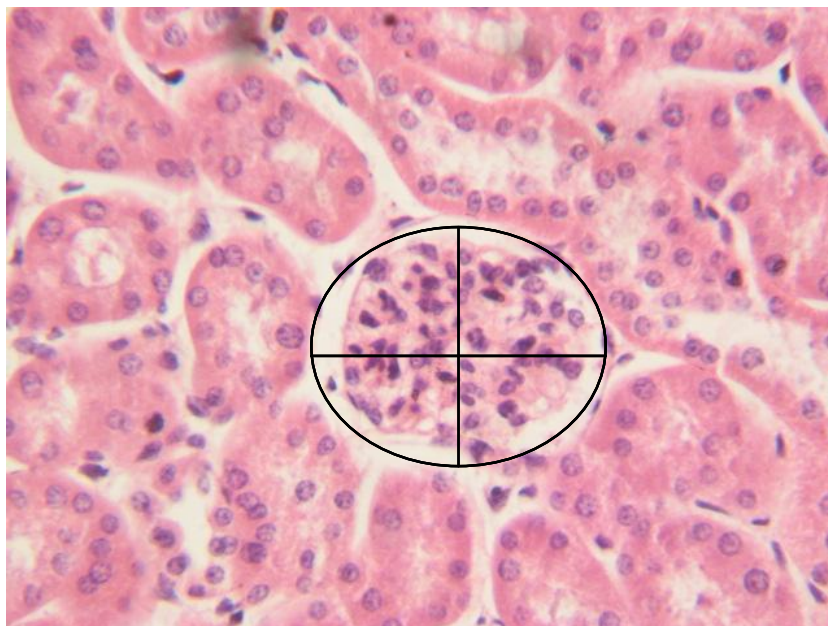


Figura 13: Exemplo de fotomicrografia para medida do perímetro da cápsula de Bowman do rim de animal do grupo solvente em aumento de 640X.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados mediante ANOVA para verificar a homogeneidade entre os grupos e o teste de Tukey determinou a rejeição desta hipótese

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos animais, consumo de água, ração e produção de excreta

Os resultados referentes ao peso dos animais submetidos à exposição oral a diferentes doses do EBSAC (12,5-100 mg/kg), nos quatro dias de investigação, estão apresentados na Tabela 1. Conforme é possível verificar, embora tenha se observado uma tendência de modificação do peso corpóreo, os animais não tiveram alteração estatística evidente (Teste ANOVA e posterior teste de Tukey) quando comparados aos grupos controle.

Tabela 1: Média do peso (g) $\pm$ D.P. dos animais (n=5) por grupo experimental por dia do tratamento (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC).

Peso (g) $\pm$ D.P. por dia de tratamento (1 ^o - 4 ^o dia)				
Grupos	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o
Controle	35,38 $\pm$ 2,58	35,60 $\pm$ 2,98	36,11 $\pm$ 3,13	36,7 $\pm$ 3,65
Solvente	37,62 $\pm$ 3,08	38,33 $\pm$ 3,04	38,44 $\pm$ 3,53	37,88 $\pm$ 2,22
12,5 mg/kg	31,08 $\pm$ 5,27	29,65 $\pm$ 4,21	30,32 $\pm$ 4,12	30,52 $\pm$ 4,10
25mg/kg	34,36 $\pm$ 7,70	33,34 $\pm$ 7,16	36,83 $\pm$ 3,42	36,00 $\pm$ 1,87
50 mg/kg	33,06 $\pm$ 1,59	33,01 $\pm$ 2,68	33,20 $\pm$ 2,52	33,10 $\pm$ 3,17
100 mg/kg	30,16 $\pm$ 6,43	28,84 $\pm$ 6,57	32,71 $\pm$ 3,06	31,86 $\pm$ 3,05

Por outro lado, através da análise diária da variação do consumo de alimento, água e produção de excreta, quando relacionados os grupos expostos e os grupos controles, foram observadas diferenças estatísticas significantes ($P < 0,001$, Teste ANOVA e posterior teste de Tukey) (Tabelas 2, 3, 4), demonstrando uma diminuição destes parâmetros para os grupos que receberam o EBSAC.

Tabela 2: Consumo de alimento (g) por grupo experimental (n=5) por dia do tratamento (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC).

Consumo de alimento (g) por dia de tratamento(1^o- 4^o dia)				
Grupos	1^o	2^o	3^o	4^o
Controle	26,65	32,46	27,97	29,72
Solvente	32,72	32,74	29,1	33,8
12,5 mg/kg	12,48*	21,94*	20*	16,1*
25mg/kg	13,42*	23,83*	15,5*	16,1*
50 mg/kg	8,92*	7,53*	9,4*	10,1*
100 mg/kg	10,46*	16,52*	13,95*	9,6*

* P<0,001 em relação aos grupos controles, Teste ANOVA e posterior teste de Tukey

Tabela 3: Consumo de água (g) por grupo experimental (n=5) por dia do tratamento (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC).

Consumo de água (mL) por dia de tratamento(1^o- 4^o dia)				
Grupos	1^o	2^o	3^o	4^o
Controle	40	44	40	48
Solvente	44	40	36	44
12,5 mg/kg	20*	32*	28*	26*
25mg/kg	18*	32*	20*	28*
50 mg/kg	20*	16*	14*	16*
100 mg/kg	18*	32*	22*	18*

* P<0,001, em relação aos grupos controles, Teste ANOVA e posterior teste de Tukey

Tabela 4: Quantidade de excreta (g) por grupo experimental (n=5) por dia do tratamento (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC).

Excretas (g) por dia de tratamento (1^o- 4^o dia)				
Grupos	1^o	2^o	3^o	4^o
Controle	30,81	22,79	19,4	22,8
Solvente	27,1	18,49	18,01	17,7
12,5 mg/kg	14,52*	13,65*	13,13*	9,34*
25mg/kg	13,8*	17,64*	1,96*	13,7*
50 mg/kg	9,56*	2,38*	4,06*	3,2*
100 mg/kg	7,96*	13,18*	10,16*	2,8*

* P<0,001, em relação aos grupos controles, Teste ANOVA e posterior teste de Tukey

4.2 Análise do córtex cerebral, mesencéfalo, cerebelo e bulbo olfatório corados pelo método de H.E.

Os resultados referentes às possíveis alterações no córtex dos animais submetidos à exposição com diferentes doses do EBSAC (12,5-100 mg/kg), nos quatro dias de investigação, estão apresentados nas Figuras 14, 15 e 16. Para o córtex cerebral foram estudados os córtices dos lobos, frontal, parietal e occipital. A análise morfométrica dos córtices mostrou que, quando comparamos os grupos expostos ao extrato com os grupos controles (não-expostos), para os três lobos, o número de células encontradas em uma mesma área foi igual, não sendo detectada diferença estatística entre os grupos. Além disso, na análise morfológica, não se observou qualquer tipo de alteração no formato das células.

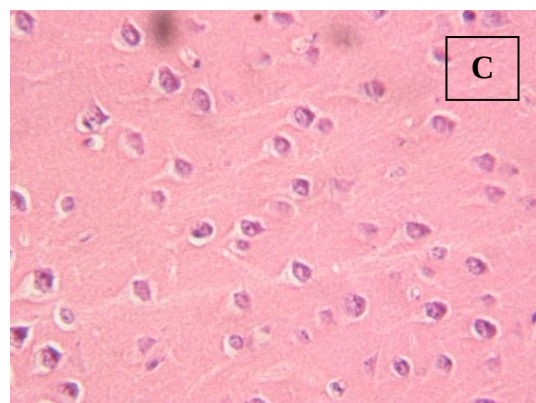
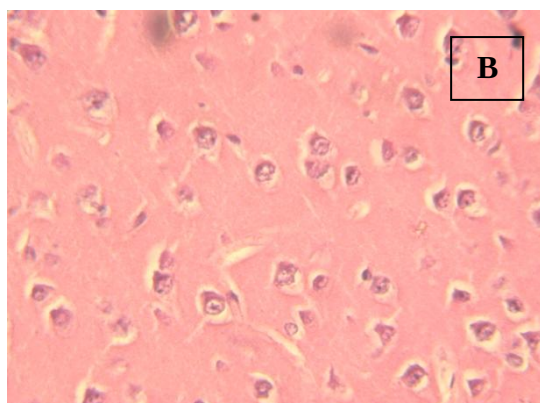
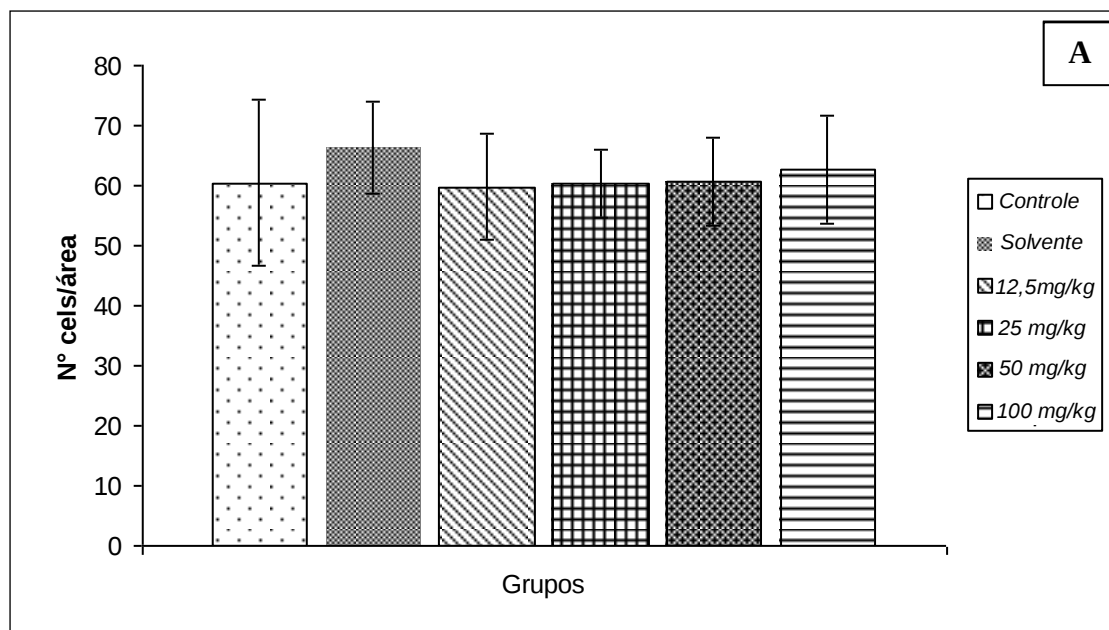


Figura 14: Freqüência de células por área ($38000 \mu\text{m}^2$) do lobo frontal (A) de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras B e C ilustram o córtex de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

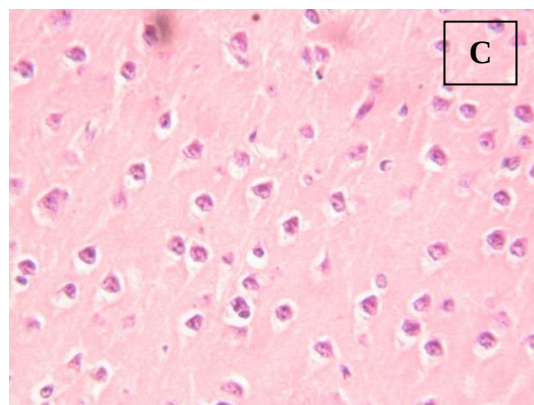
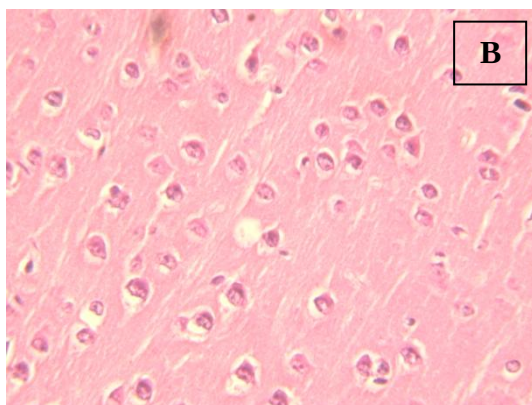
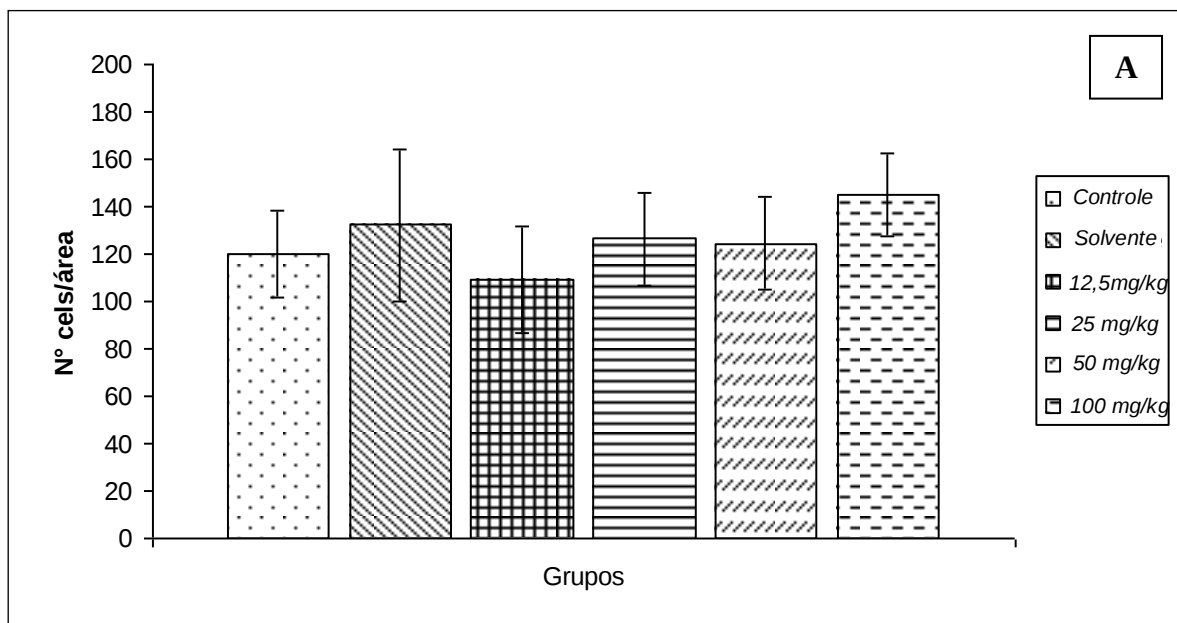


Figura 15: Frequência de células por área ($38000 \mu\text{m}^2$) do lobo parietal (A) de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras B e C ilustram o córtex de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

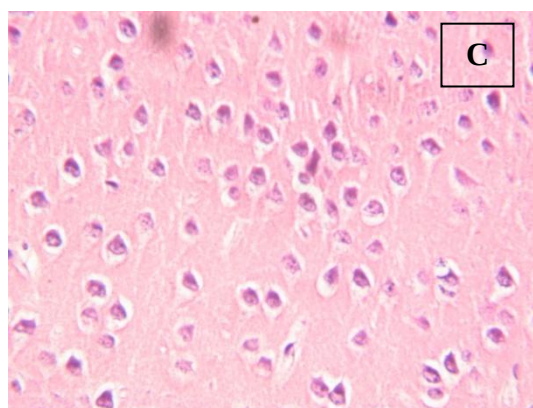
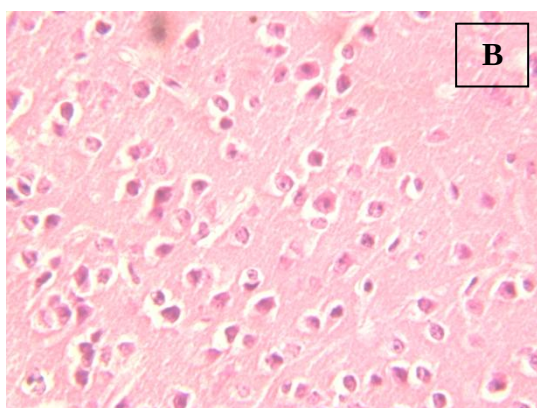
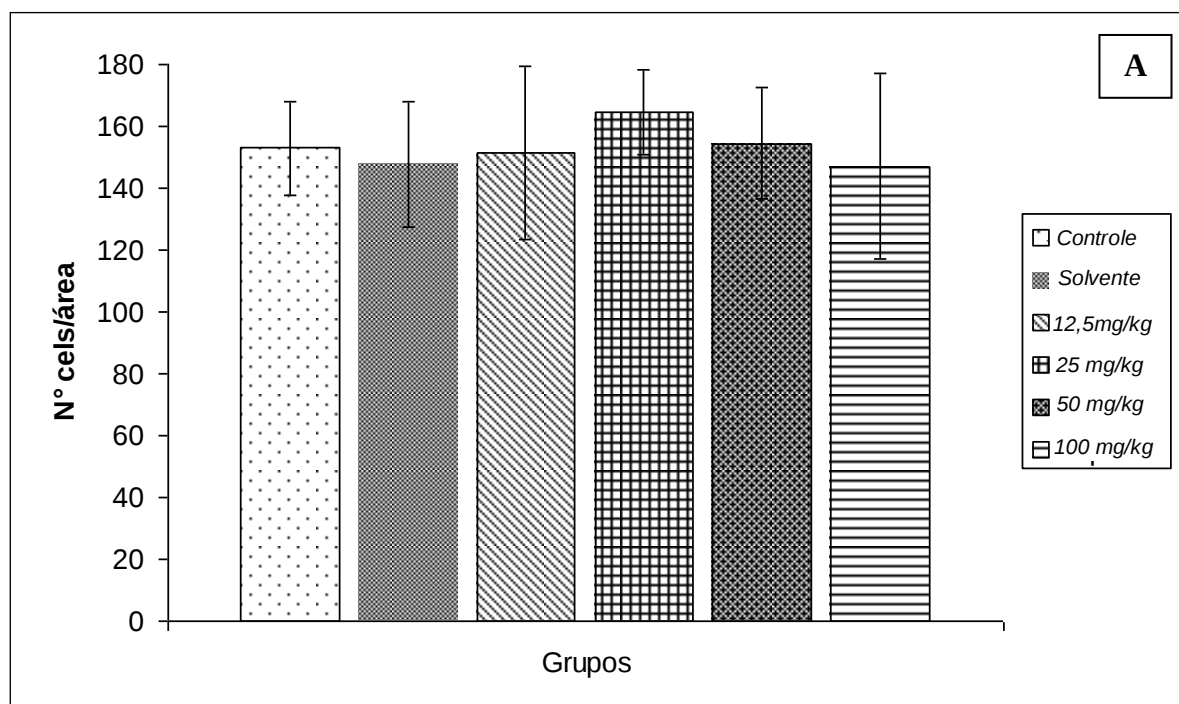


Figura 16: Frequência de células por área ($38000 \mu\text{m}^2$) do lobo occipital (A) de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras B e C ilustram o córtex de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

Já no cerebelo (Figura 17), investigamos o número de células presentes em duas camadas, à camada molecular e das células de Purkinje. Não foram observadas alterações no número de células entre os grupos expostos com o EBSAC e os grupos controles.

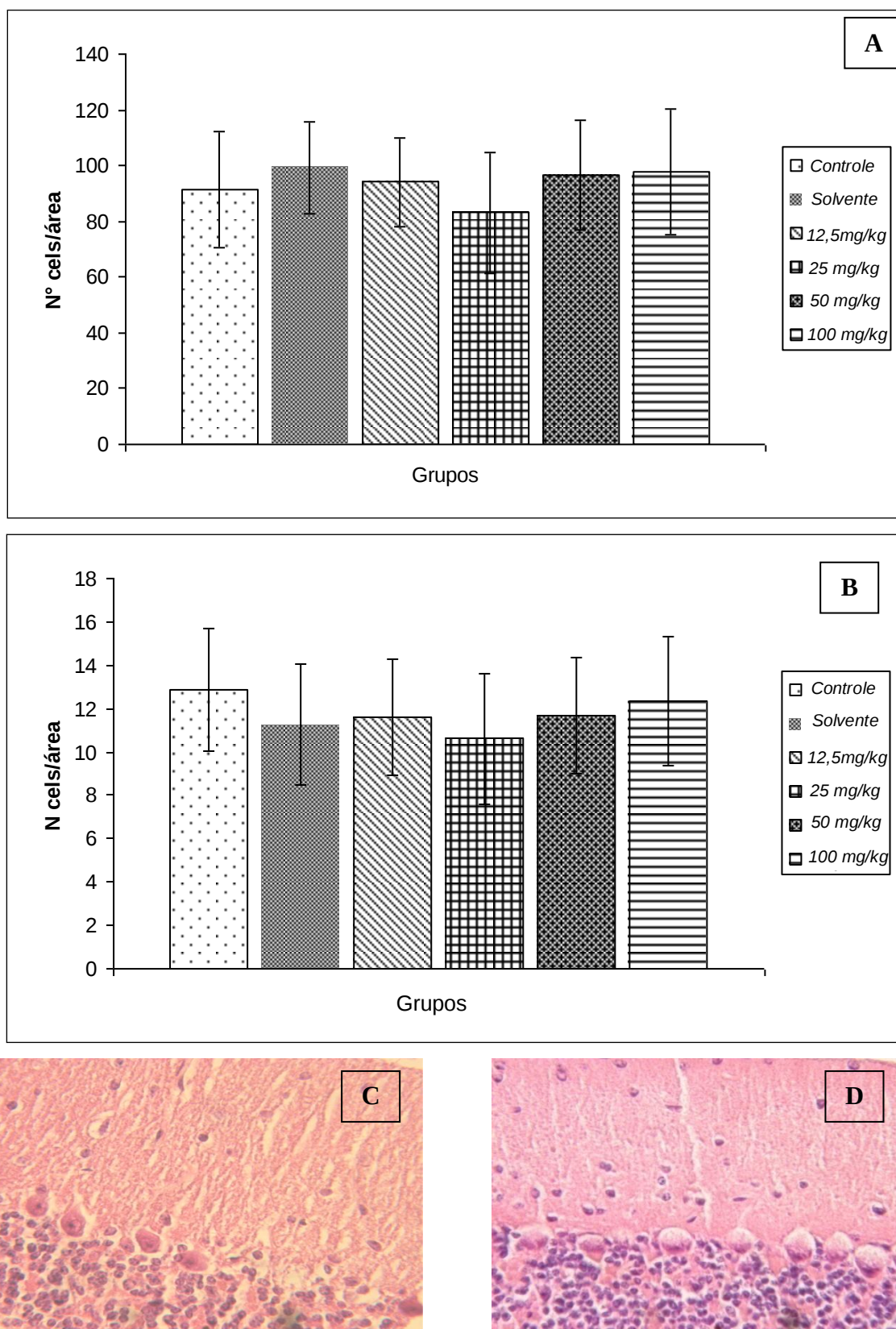


Figura 17: Frequência de células por área ($152550 \mu\text{m}^2$) da camada molecular (A) e camada das células de Purkinje (B) de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras C e D ilustram o cerebelo de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

Quanto ao mesencéfalo e bulbo olfatório, da mesma forma que nas análises anteriores, verificamos número de células por área, quando comparado os grupos expostos com os grupos controles (Fig. 18 e Fig. 19). Na análise morfológica, não se observou alterações no formato das células.

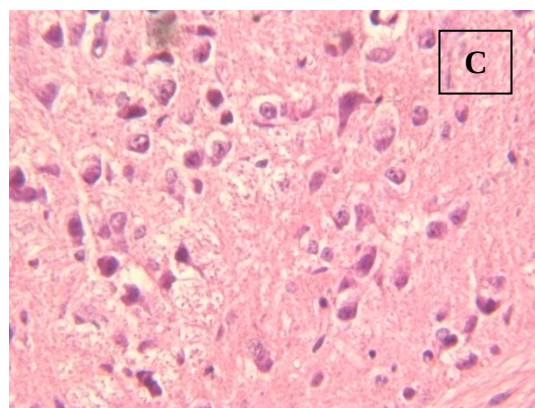
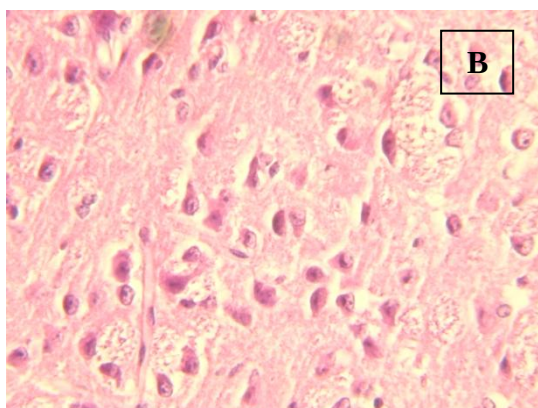
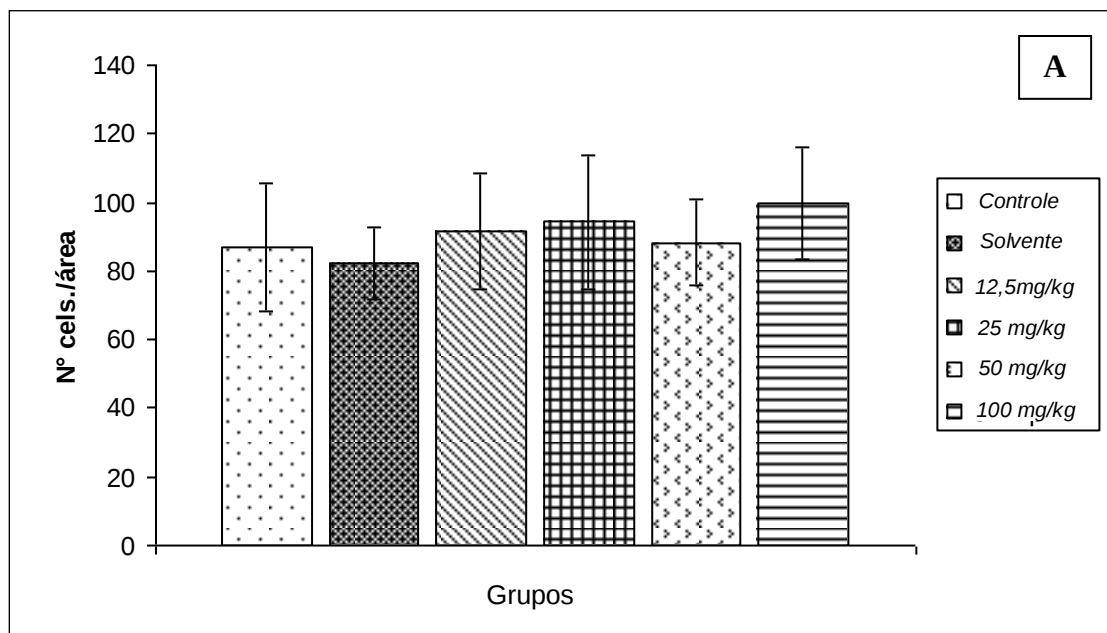


Figura 18: Frequência de células por área ($38000 \mu\text{m}^2$) do mesencéfalo de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras B e C ilustram o mesencéfalo de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

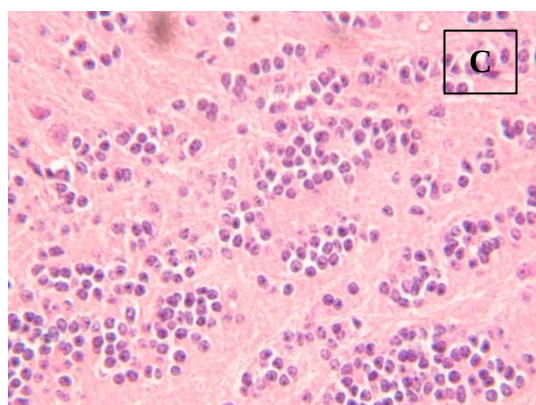
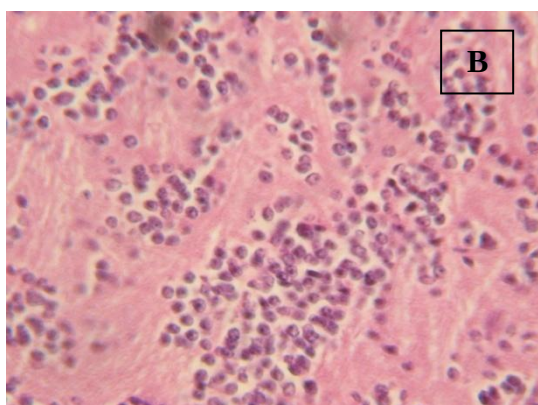
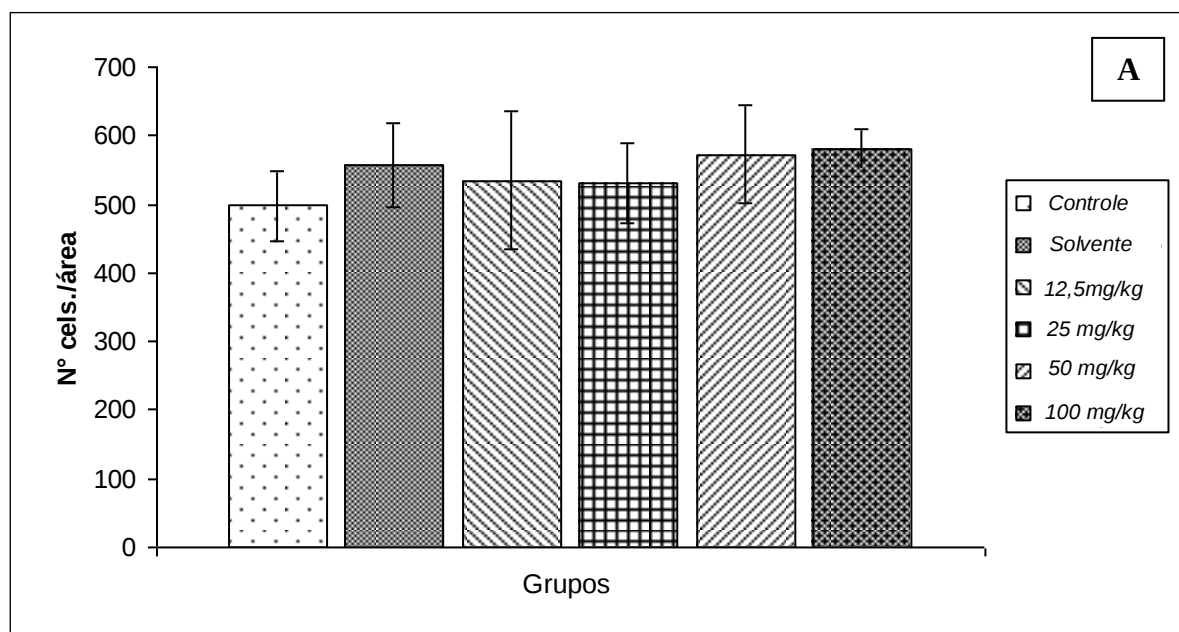


Figura 19: Frequência de células por área ($38000 \mu\text{m}^2$) do bulbo olfatório de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras B e C ilustram o bulbo olfatório de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

4.3 Análise do fígado corado pelo método de H.E.

No fígado foi quantificado o número de hepatócitos por área dos diferentes grupos experimentais. Quando comparados os grupos expostos ao EBSAC e os grupos controles, verificamos uma diminuição no número de células para os grupos tratados com o EBSAC indicando uma ação dose-dependente (Fig. 20). A contagem mostrou diferença estatística significativas utilizando ANOVA e posterior teste de Tukey para $p < 0,001$. Foi verificado ainda diferença estatística entre o grupo 12,5

mg/kg de EBSAC e os grupos 25, 50 e 100 mg/kg de EBSAC, não havendo esta diferença entre estes últimos grupos quando comparados entre si. Além desta diferença em relação a número de células, podemos observar ainda uma nítida alteração no tamanho das células, tanto citoplasma quanto núcleo, do fígado exposto quando comparado com os grupos controles (Fig. 21).

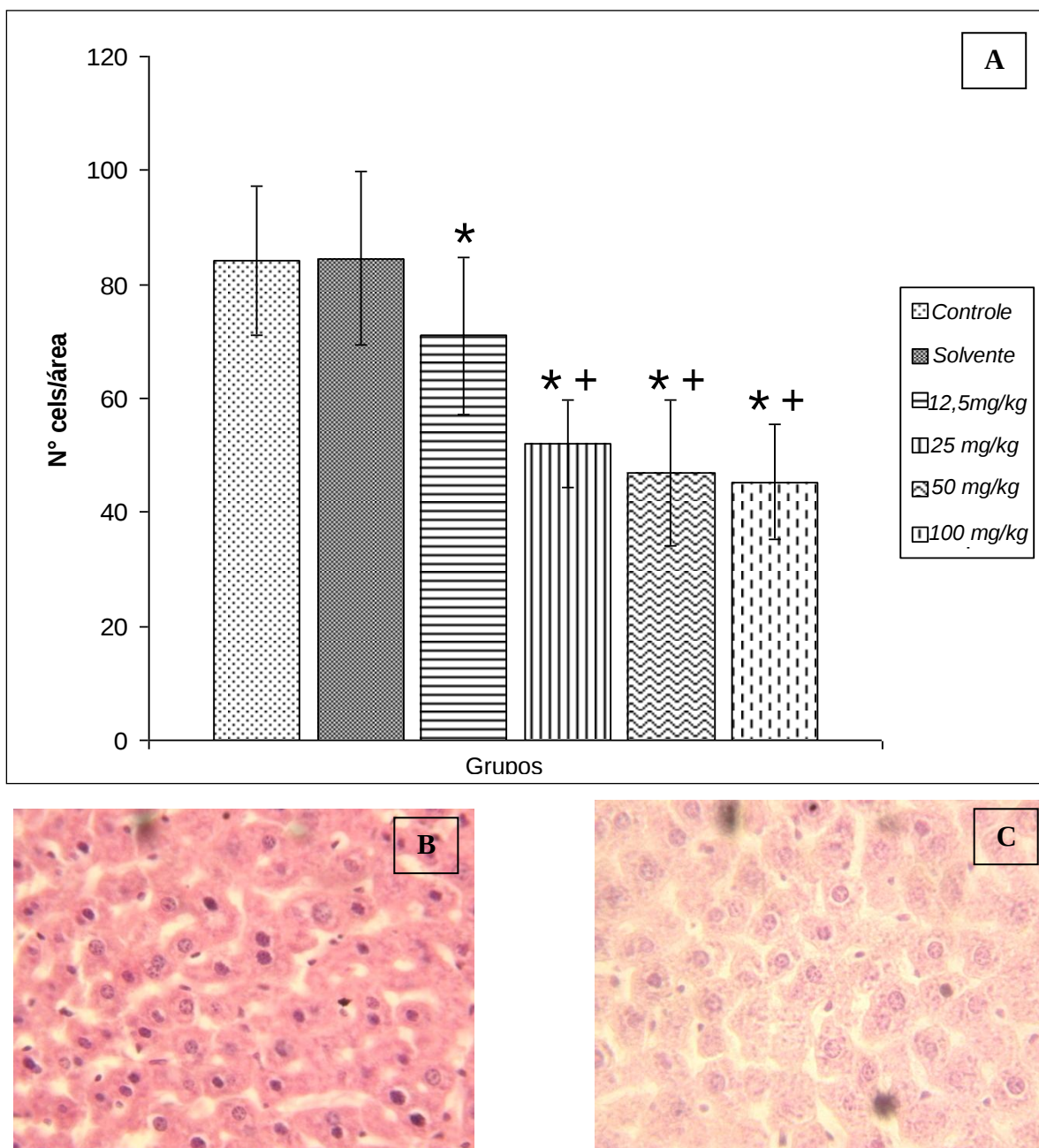


Figura 20: Frequência de células por área ($19000 \mu\text{m}^2$) do fígado de animais ($n=5$) expostos subcronicamente ao EBSAC. As colunas são a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras B e C ilustram o fígado

de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

* $P < 0,001$ comparado aos grupos controles

+ $P < 0,001$ comparado 12,5mg/kg

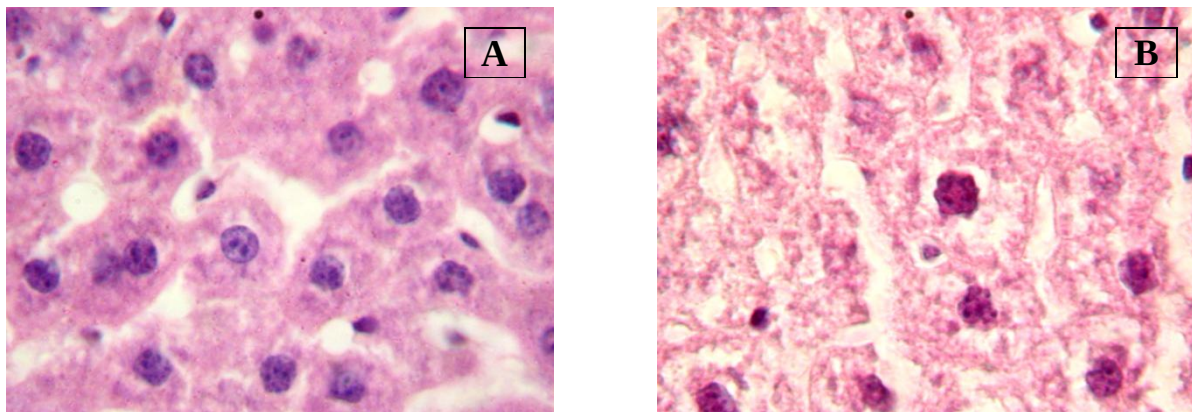


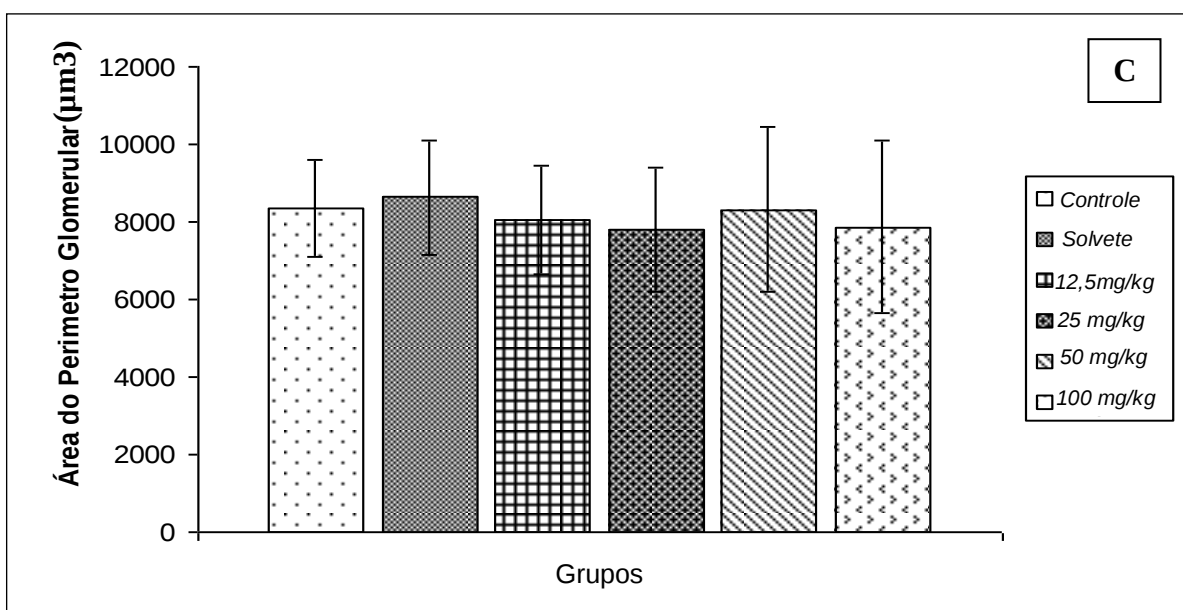
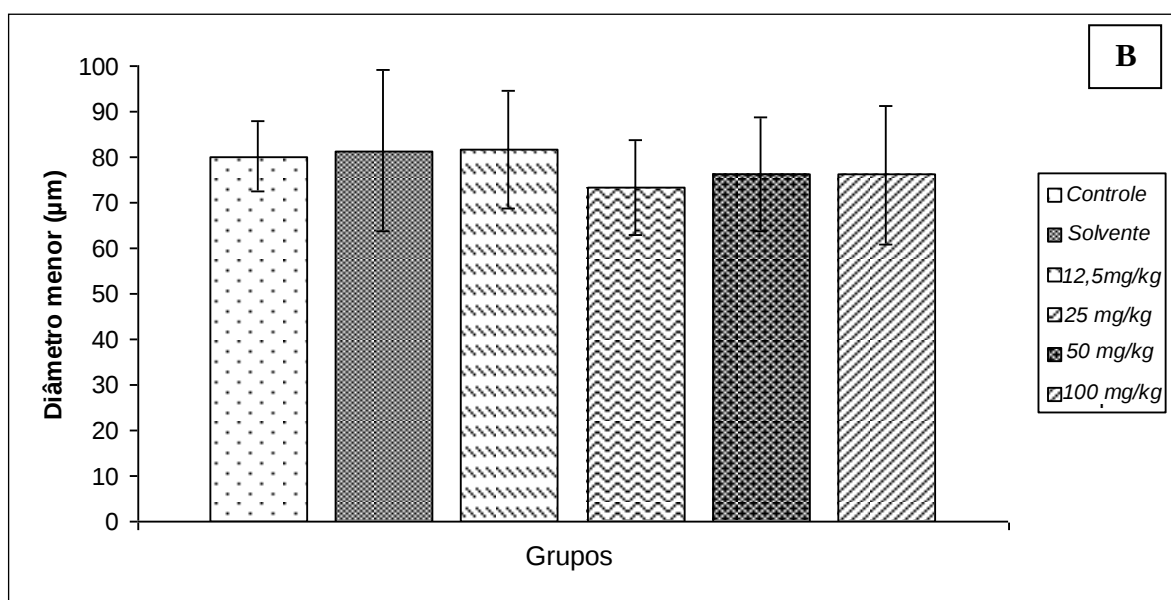
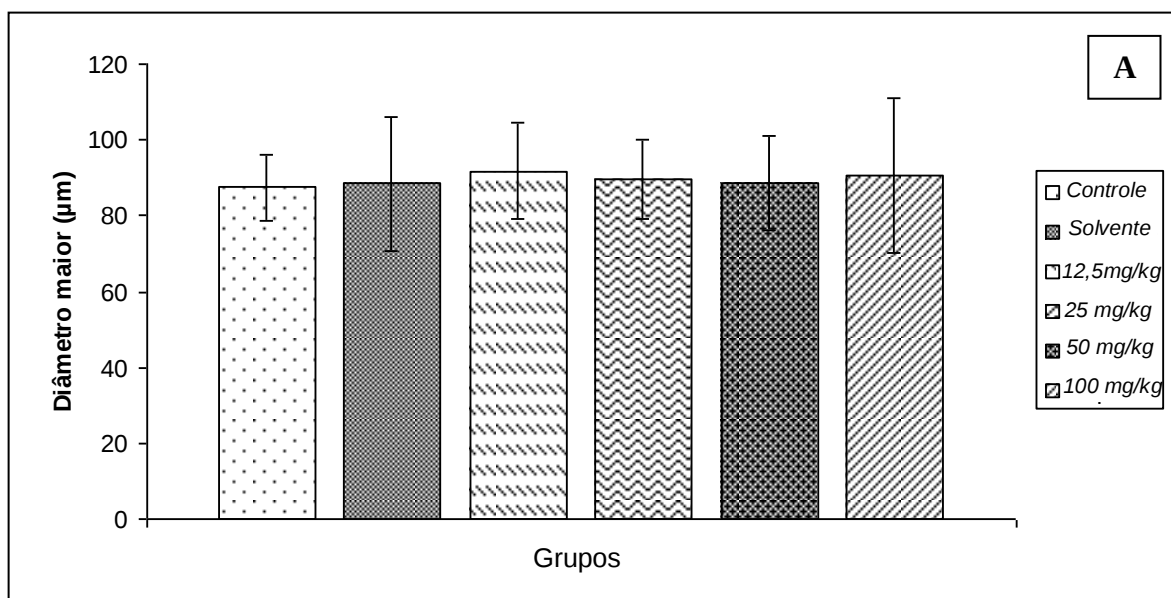
Figura 21: Diferença morfológica do núcleo e citoplasma celular de hepatócitos dos grupos controle (A) e exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg)(B), respectivamente. Aumento de 1000X.

4.4 Análise do rim corado pelo método de H.E.

Para os rins verificamos o diâmetro interno: tufo glomerular, e o diâmetro externo: cápsula de Bowman, além do perímetro desta cápsula. Não foram encontrados nenhuma alteração quanto a estes parâmetros quando comparados os grupos tratados com os grupos controles, bem como não se observou alterações na morfologia destas estruturas (Tabela 5, Fig.22).

Tabela 5: Análise das lâminas dos rins, diâmetro interno, entre os limites do tufo glomerular e diâmetro externo, entre os limites da cápsula de Bowman (μm). Cada valor corresponde a média $\pm$ D.P. de 20 lâminas (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC).

Grupos						
Diâmetro	Controle	Solvente	12,5mg/kg	25mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
(μm)						
	80,18	81,42	81,7	73,34	76,3	76,1
Menor	$\pm 7,54$	$\pm 15,38$	$\pm 13,1$	$\pm 12,24$	$\pm 12,44$	$\pm 15,3$
	87,61	88,51	91,72	89,64	88,51	90,6
Maior	$\pm 8,71$	$\pm 17,64$	$\pm 12,75$	$\pm 10,55$	$\pm 12,37$	$\pm 20,5$



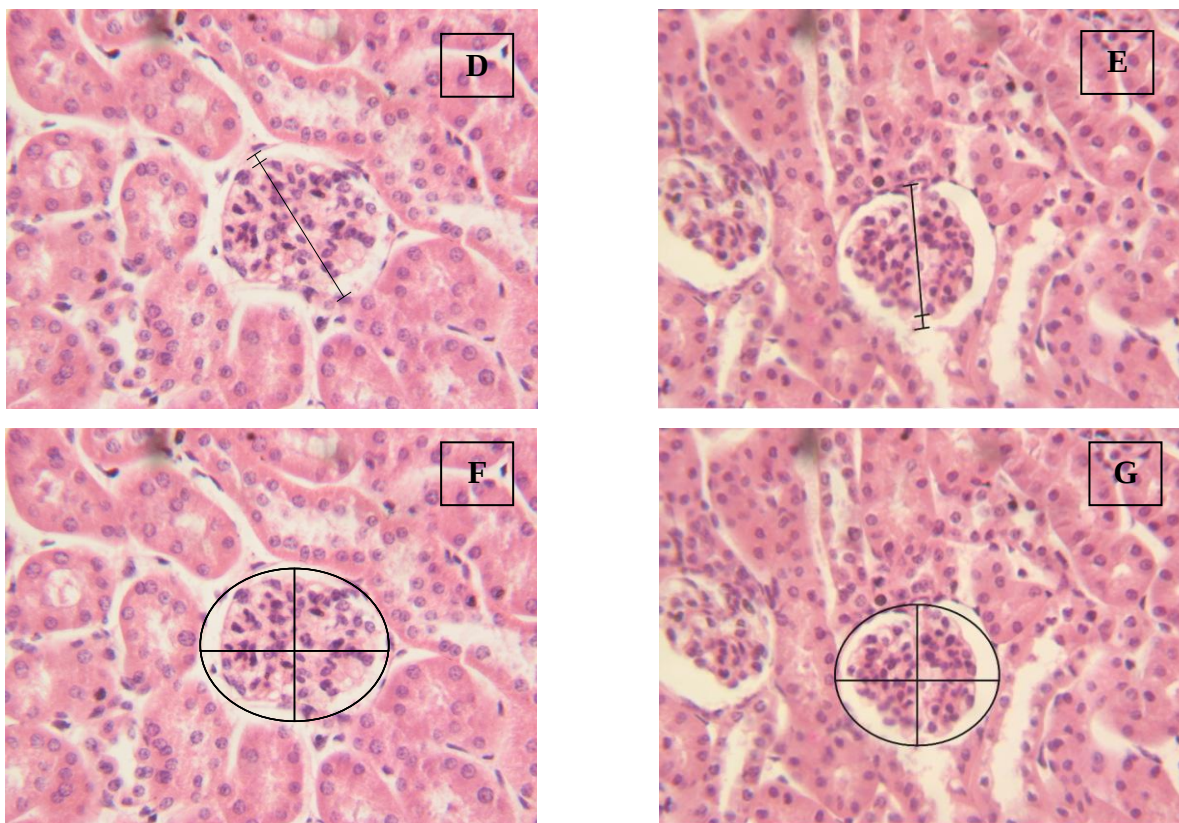


Figura 22: Diâmetro maior (μm) – cápsula de Bownan (A), diâmetro menor (μm) – tufo glomerular (B) e perímetro da cápsula de Bowman (μm^3) (C) do rim de animais ($n=5$) expostos subcranicamente ao EBSAC. As colunas são a média de 20 lâminas por grupo $\pm$ D.P. (grupo controle: sem tratamento; solvente: tratado com solventes do EBSAC; grupo 12,5 mg/kg EBSAC; 25mg/kg EBSAC; 50 mg/kg EBSAC; 100 mg/kg EBSAC). As figuras D e E ilustram diâmetro maior (μm) e menor (μm) de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente. As figuras F e G ilustram perímetro da cápsula de Bowman de animal controle e de animal exposto a maior dose usada no estudo (100mg/kg), respectivamente.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Objetivamos neste trabalho verificar putativos efeitos tóxicos da exposição subcrônica de camundongos Swiss frente ao extrato etanólico das sementes da *A. coriacea* Mart em doses diárias de 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg de peso corpóreo durante quatro dias. As investigações dos possíveis efeitos tóxicos sobre o encéfalo, fígado e rim foram realizadas por meio de técnicas histológicas aliado a análises morfométricas, bem como a análise de seu comportamento durante o período de administração do EBSAC.

O araticum é um fruto consumido pela população tanto como alimento como para fins medicinais, tendo assim grande importância assegurarmos esta utilização.

Baseado em citações que comprovam a atividade de substâncias presentes em plantas da família das anonáceas sobre o sistema neural central em várias regiões como hipocampo, tálamo, núcleos póstero-lateral, médio-dorsal, ventro-póstero-lateral e ventro-póstero-medial, além de uma alteração no formato das células de Purkinje do cerebelo e neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (CHAMPY et al., 2004; LANNUZEL et al., 2003), estudamos o efeito de diferentes doses do EBSAC sobre diferentes regiões do córtex e encéfalo de camundongos submetidos a quatro dias de exposição.

Os resultados observados para o córtex cerebral em três diferentes lobos, lobo frontal, occipital e parietal, além de regiões específicas; mesencéfalo, bulbo olfatório e cerebelo não demonstraram nenhuma alteração significativa quanto ao número de células por área e quanto a morfologia das células. É sabido que o tecido neural, e suas células, principalmente os neurônios, são bastante sensíveis a alterações bioquímicas decorrentes de intoxicações, com uma posterior alteração do aspecto morfológico (AVERSI-FERREIRA et al., 2006).

Champy e colaboradores (2004) investigaram a exposição oral à acetogeninas, por 28 dias, em camundongos. Os autores relatam uma diminuição de 44% de geração de ATP para o córtex frontal de camundongos tratados com acetogeninas, substância majoritária presente nesta família, extraída da *A. muricata* L., porém sem evidências de alteração morfológica para esta região.

Uma região em particular, o bulbo olfatório, teve grande importância para verificarmos possíveis atividades sobre o encéfalo. É sabido que as células desta

região estão em constante renovação, nos dando então uma oportunidade de discussão dos efeitos do EBSAC sobre células pós-mitóticas. Embora Coelho e colaboradores (2003) tenham detectado a presença de lecitinas, substâncias com grande potencial de induzir mitoses, nas sementes de *A. coreacea* Mart., não foi detectado evidências de efeitos mitóticos sobre células em diferenciação nesta região, não sendo assim detectado efeitos tóxicos para a região do bulbo olfatório.

O mesencéfalo apresenta grande quantidade de neurônios dopaminérgicos. Como citado anteriormente, diversos trabalhos na literatura apontam para uma possível atividade neurodegenerativa das acetogeninas, isoladas de uma planta da família *Annonaceae*, sobre uma população em uma ilha do Caribe. Esta população foi relatada por apresentar uma síndrome parkinsoniana relacionada à depleção de neurônios dopaminérgicos e alterações morfológicas do encéfalo (CHAMPY et al., 2004; LANNUZEL et al., 2003)

Já no nosso estudo, nenhum tipo de alteração em número ou formato celular foi detectado após a exposição subcrônica de camundongos ao extrato etanólico das sementes desta planta. Ademais, durante a observação destes animais por meio de avaliação etológica, nenhuma modificação comportamental foi detectada (dados não apresentados) o que pode sugerir que realmente não obtivemos atividade sobre o SNC.

Tais resultados podem ser explicados pela ausência ou baixa concentração dos ativos da planta no extrato, e conseqüentemente em locais alvo como o encéfalo, não desencadeando assim, efeito deletério detectável pelas técnicas analíticas realizadas neste estudo. Outra hipótese é a de que as concentrações alcançadas não foram suficientes para efetivar danos visíveis ao nível morfológico, não descartando a possibilidade de danos funcionais. Vale ainda, lembrar os possíveis aspectos referentes à metabolização *in vivo* das acetogeninas presentes no extrato. Um outro aspecto relevante acerca de efeitos tóxicos sobre o sistema neural é a barreira hematoencefálica. Devemos ainda considerar que as acetogeninas apresentam uma grande cadeia alifática. Por outro lado, tais substâncias podem ser metabolizadas no fígado, produzindo metabolitos mais reativos localmente, ao ponto de gerar efeito tóxico sobre este órgão diminuindo assim sua concentração ativa circulante, impossibilitando desta forma o aumento de concentração em outros órgãos susceptíveis a intoxicação dose-dependente. Neste sentido, estudos fitoquímicos do extrato etanólico das sementes da *A. coriacea* Mart.

serão necessários para verificarmos a presença ou não de acetogeninas, bem como a quantificação, ou ainda pesquisar outras substâncias bioativas, como as citadas para sua família. Ademais, se torna importante a investigação acerca dos metabólitos das acetogeninas.

Outro aspecto de grande relevância é a forma de exposição. Diante dos dados obtidos, faz-se necessário investigar em estudos futuros a exposição crônica ao EBSAC. Ainda seria pertinente investigar a atividade funcional das células dos respectivos órgãos estudados.

Uma vez que o fígado é um dos primeiros locais de acesso de uma substância em nosso organismo devido à sua grande perfusão sanguínea, os efeitos putativos do EBSAC sobre o fígado, órgão fundamental para a metabolização de substâncias, foi também investigado.

Quando se investigou o potencial hepatotóxico da exposição oral, por 4 dias ao EBSAC, observou-se que, diferente dos dados encontrados na investigação da possível neurotoxicidade, a contagem dos hepatócitos por área no fígado dos animais mostrou diferenças entre os grupos expostos e controle. Foi verificada uma diminuição do número de células hepáticas dos grupos experimentais expostos a 12,5, 25, 50 e 100mg/kg do extrato, quando comparados com os grupos controles. Além disso, observou-se ainda, diferença entre as doses, mostrando o efeito ser dose-dependente. Outro dado importante observado, foi à alteração morfológica entre os grupos controles e os grupos expostos, foi-se observado uma diferença no tamanho do núcleo e no citoplasma dos hepatócitos. Este resultado pode esclarecer a possibilidade de uma maior metabolização do EBSAC pelos hepatócitos, que conseqüentemente sofreram hipertrofia.

Um dado importante a respeito deste órgão está em observarmos uma diminuição no número de células hepáticas uma vez que este é um órgão com grande capacidade de regeneração pela alta atividade mitótica de suas células. O que nos leva a pensar em uma ação genotóxica sobre estas células, o que poderia levar a danos de replicação celular, uma vez que esta atividade já foi comprovada para este mesmo extrato quando administrado a camundongos. Fagundes e colaboradores (2005) verificaram um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados na medula óssea de camundongos expostos, por via oral, a uma única dose (50-400mg/kg) do extrato, de forma dose-dependente.

Após percorrer o organismo, as substâncias e drogas, principalmente as solúveis em água, sofrem sua eliminação através dos rins. Para este órgão, não foram encontrados, pelos parâmetros utilizados, alterações morfológicas nas células renais quando comparamos os grupos experimentais. Este dado pode indicar que a droga é metabolizada pelo fígado e inativada neste órgão uma vez que seu possível local de excreção não sofreu efeito visível neste experimento. Aliado a não visualização do efeito sobre o córtex, possivelmente temos uma droga ativa, com potencial genotóxico, como demonstrado no trabalho de Fagundes e colaboradores (2005), podendo sofrer metabolização hepática o que possivelmente diminui sua concentração circulante em níveis não nocivos para encéfalo e rins.

Outra hipótese estaria nas substâncias ativas no EBSAC serem altamente ligadas a proteínas plasmáticas, pouco solúveis em água, dificultando assim sua excreção pelos rins, não gerando assim efeitos observados através dos parâmetros adotados por este estudo.

Com a observação diária e a coleta de dados de peso corpóreo, peso de excreta, peso de alimento consumido e volume de água ingerida, conseguimos investigar outros parâmetros, que não os citados acima.

Embora tenha se observado uma tendência para redução do peso dos animais expostos ao EBSAC, não foram verificadas alterações estatisticamente significativas para o peso corpóreo dos animais quando comparados entre os grupos. Por outro lado, quando comparamos os demais parâmetros; peso de alimento consumido, volume de água ingerida e peso de excreta, em todos estes foram observadas diminuições frente à exposição ao EBSAC. Houve diminuição do consumo de alimento, da ingestão de água e da produção de excreta.

Estes dados, em conjunto com a avaliação hepática realizada neste estudo, sugerem um quadro de intoxicação hepática, sendo observado nos animais expostos à maior dose, isto pode estar associado a uma desordem metabólica causada pela diminuição da atividade hepática, possivelmente oriunda da redução do número de hepatócitos. Como consequência da diminuição da ingestão de alimento e água, verificou-se uma diminuição também da produção de excreta.

Já para constância do peso corpóreo dos animais, podemos explicá-lo baseando nosso raciocínio no período de exposição. Este período pode não ter sido suficiente para gerar uma diminuição significativa no peso corpóreo dos animais uma vez que estes estavam cada vez mais diminuindo a ingestão de ração.

Várias plantas ou fitoconstituintes de uso medicinal apresentam hepatotoxicidade (OLIVEIRA e GONÇALVES, 2006; STOPER et al., 2005). Esta hepatotoxicidade, em geral está associada à perda de peso e diminuição da alimentação.

Consumo de plantas que contenham fitoconstituintes hepatotóxicos representam um risco para a saúde humana, e agências reguladoras como a americana FDA, a britânica *British Medicines Healthcare Products Regulatory Agency*, já divulgaram diversos alertas para que a população fique atenta ao consumo destas plantas.

Alcalóides pirrolizidínicos, presente no confrei (*Symphytum officinale* L.) e mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), constituem o grupo de produtos naturais com maior potencial hepatotóxico, sendo encontrados, além das plantas citadas acima, também em uma ampla variedade de espécies vegetais, mais de 6.000, de diferentes famílias no mundo inteiro incluindo ervas medicinais e chás (ROEDER, 1995, 2000).

Ji e colaboradores (2008), investigaram os mecanismos de hepatotoxicidade de alcaloides pirrolizidínicos como a clivorine, uma substância isolada da *Ligularia hodgsonii* Hook, onde verificaram que esta substância diminui a viabilidade celular e consequentemente o número, por mecanismos apoptóticos. Estes autores demonstraram que estes alcalóides induzem hepatócitos a apoptose em camundongos, e cultura de hepatócitos humanos e da linhagem L-02. O mecanismo encontrado foi a ativação de uma protease mitocondrial envolvida no processo inicial da apoptoses, a caspase 3 e, consequentemente a caspase efetora caspase 9. Além disto, inibe o fator anti-apoptótico Bcl-xL em um período de 8 às 48h. Desta forma, os autores, demonstraram um dos mecanismos de indução de hepatotoxicidade por alcalóides pirrrolizidínicos, uma vez que este mesmo mecanismo indutor foi demonstrado para outras substâncias desta família como a senecionine, isoline e a monocrotaline (JI, 2008). Conforme mostrado em nosso estudo o EBSAC produz modificações morfológicas sugestiva de apoptose celular.

Embora os resultados deste trabalho não permitam elucidar o real mecanismo de hepatotoxicidade da *A. coriacea* Mart., ficou evidente que esta planta tem potencial hepatotóxico. Além disto, maiores estudos são necessários para avaliar alterações nas atividades funcionais de rins e encéfalo. Também são necessários

maiores estudos para o esclarecimento do perfil toxicológico desta espécie e a forma segura de exposição/consumo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais adotadas neste estudo, considerando as técnicas adotadas para a análise morfológica podemos concluir que:

- Não observamos alterações nos lobos frontal, parietal e occipital, mesencéfalo, bulbo olfatório e cerebelo, tanto no número, quanto na forma;
- Não foram verificadas atividades nefrotóxicas considerando morfometria dos diâmetros interno e externo da cápsula de Bowman e tufo glomerular, e perímetro da cápsula.
- Por outro lado, observamos uma possível atividade hepatotóxica com a diminuição da frequência de células por área do fígado, correlacionado com reduções de consumo de ração/água e produção de excretas pelos animais.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

A realização deste estudo permitiu responder questões acerca da toxicidade desta planta, porém muitas outras surgiram a partir dos dados obtidos neste trabalho, dentre elas:

- O estudo fitoquímico desta espécie para verificar a presença das acetogeninas, e quantificá-las em diferentes partes desta planta.
- Utilizar extrato bruto de diferentes partes da planta.
- Quanto à forma de exposição, expor os animais a um período de tempo superior a quatro dias.
- Utilização de outras ferramentas analíticas, a exemplo métodos bioquímicos, para elucidar o potencial tóxico desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-DONIA, M. B. **Neurotoxicology**. 1. ed. USA: Editora HealthCare, 1992.

AHAMMADSAHIB, K. I.; HOLLINGWORTH, R. M.; MCGOVERN, J. P.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Mode of action of bullatacin: A potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenina. **Life Sci**, v. 53, p.1113–1120, 1993.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J Nat Prod**, v. 62, p. 504-40, 1999.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis. Planatina**. 1. ed., Distrito Federal: Editora da Embrapa, 1998.

ANGIBAUD, G.; GAULTIER, C.; RASCOL, O. Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia. **Movement disorders**, vol. 19, n. 5, p. 603-4, 2004.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; CORRÊA, N. C. R.; MORAIS, J. O. R.; PENHA-SILVA, N. Efeitos pós-natais do etanol sobre a neurogênese neocortical em ratos Wistar. **Neurociências**, v. 2, n. 6, p. 01-06, 2005.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; PENHA-SILVA, N. Efeitos do etanol sobre a migração neuronal na formação do neocórtex cerebral. **Biosci J**, v. 21, n.1, p. 151-157, 2005.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; RODRIGUES, H. G.; NERES, A. C.; FONSECA, L. C.; PENHA-SILVA N. Estudo imunohistoquímico do bulbo olfatório de ratos Wistar submetidos à exposição pré-natal aguda com etanol. **Biosci J**, v. 22, n. 1, p. 99-105, 2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. São Paulo: LTC-Livros Técnicos e Científicos Ed S.A./Ed da Universidade de São Paulo, v.1, p. 28-33, 1978.

BÉDARD, A.; PARENT, A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Brain Res Dev**, v. 151, n. 12, p. 159-168, 2004.

BORGES, E. M.; MACHADO, M.R.F.; OLIVEIRA, F.S.; SOUZA, W.M.; DUARTE, J.M.B Aspectos morfológicos do fígado do cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*). **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, n.2, p.78-80, 2002.

BURT, A. M. **Neuroanatomia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A.; Caribbean Parkinsonism Study-Group. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **The Lancet**, vol. 354, n. 24, 1999.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; SERGEANT, N.; LEES, A.; CAMUZAT, A.; DANIEL, S.; LANNUZEL, A.; BRICE, A.; TOLOSA, E.; DELACOURTE, A.; DUYCKAERTS, C. Guadeloupe parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. **Brain**, v. 125, p. 801-811, 2002.

CAVÉ, A.; CORTES, D.; FIGADÈRE, A.; LAURENS, A.; PETTIT, G. R. Em Acetogenins from Annonaceae, p. 81; em *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, C. Ed. Springer-Verlag: Wien, 1997.

CAVINESS Jr., V.S. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. **J Comp Neur**, v. 164, n. 2, p. 247-264, 1975.

CHAMPY, P.; HÖGLINGER, G. U.; FÉGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; MICHEL, P. P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E. C.; RUBERG, M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 63–69, 2004.

CHAUDHURI, K. R.; HU, M. T. M.; BROOKS, D. J. Atypical parkinsonism in Afro-Caribbean and Indian origin immigrants to the U. K. **Mov Disord**, v. 15, p.18–23, 2000.

COELHO, M. B.; FREIRE, M. G. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. **Prot Pept Lett**, v. 10, p. 165–173, 2003.

COELHO, M. B.; SOUZA, I. A.; FREIRE, M. G. M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M. L. R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, p. 529-535, 2006.

COUET, C. E.; CREWS, C.; HANLEY, A. B. Analysis, separation and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from comfrey (*Symphytum officinale*). **Natural Toxins**, v. 4, n. 4, p. 163-167, 1996.

CROSSMAN, A. R.; NEARY, D. **Neuroanatomia**: ilustrada.3. ed. São Paulo: Editora Elsevier, 2007.

DEGLI ESPOSTI, M.; GHELLI, A. ; RATTI, M. ; CORTES, D. ; ESTORNELL, E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase. **Biochem J**, v.301, p.161–167, 1994.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Annona coriacea induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005.

FECHINE, I. M.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. F. Alcalóides isolados Hornschuchia obliqua (Annonaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 12, supl., p. 121-122, 2002.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into Neuron-Glia communication. **Science**, v. 298, p. 556-562, 2002.

FUJISAKI, S.; SUGIYAMA, A.; EGUCHI, T.; WATANABE, Y.; HIRAIWA, H.; HONMA, D.; SAITO, T.; YASUE, H. Analysis of a full-length cDNA library constructed swine olfactory bulb for elucidation of expressed genes and their transcription initiation site. **J Vet Med Sci**, v. 66, n. 1, p. 15-23, 2004.

GERBER, M. A.; THUNG, S. N. Histology of the liver. **Am J Surg Pathol**, v. 11, p. 709-22, 1987.

GRANDIC, S. R. L.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C. ; HOCQUEMILLER, R. ; LOISEAU, P. M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p.388–392, 2004.

HUNTLEY, A.; ERNST, E. A systematic review of the safety of black cohosh. **Menopause**, v. 10,p. 58–64, 2003.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M.; VELEZ, I. D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of Annona muricata pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, p. 183–6, 2000.

JI, L. ; CHEN, Y. ; LIU , T. ; WANGg, Z. Involvement of Bcl-xL degradation and mitochondrial-mediated apoptotic pathway in pyrrolizidine alkaloids-induced apoptosis in hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, n. 3, p. 393-400, 2008.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae). **J Org Chem**, v. 47, p. 3151–3, 1982.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

KANDEL, E. R.; SCHAWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

KLAASSEN, C. D. **Casarett and Dull's. Toxicology - The Basic Science of Posions**. 7. ed. USA: Editora MCGRAW-HILL, 2007.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P. P.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ABAUL, J.; HOCQUEMILLER, R.; RUBERG, M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Mov Disord**, v.17, p. 84–90, 2002.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P. P.; HOGLINGER, G. U., CHAMPY, P.; JOUSSET, A.; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; DARIOS, F.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; HIRSCH, E. C.; RUBERG, M. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience**, v.121, p. 287-296, 2003.

LANNUZEL, A.; HOGLINGER, G. U.; VERHAEGHE, S.; GIRE, L.; BELSON, S.; ESCOBAR-KHONDIKER, M.; POULLAIN, P.; OERTEL, W. H.; HIRSCH, E. C.; DUBOIS B.; RUBERG M. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes?. **Brain**, v. 130, p. 816-827, 2007.

LANNUZEL A.; MERLE, R.; MICHEL, P. P. Atypical parkinsonism in the Caribbean island of Guadeloupe: Etiological role of the mitochondrial complex I inhibitor annonacin. **Movement Disorders**, vol. 23, n. 15, p. 2122 – 2128, 2008.

LEMES, A. S.; BRACCINI, M. D. C. Descrição e análise histológica das glândulas anexas do trato digestório de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE). **Biodiversidade Pampeana**, v. 02 , p. 33-41, 2004.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

LONDERHAUSEN, M.; LEICHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H.; WEISS, H. Molecular mode of action of annonins. **Pest Sci**, v. 33, p. 427–438, 1991.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

MARIN-PADILLA, M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. **J Comp Neurol**, v. 321, n. 2, p. 223-240, 1992.

MARIN-PADILLA, M. Cajal–Retzius cells and the development of the neocortex. **Trends Neurosci**, v. 21, n.2, p. 64–71, 1998.

MASSARO, E. J. **Handbook of Neurotoxicology**. Nova York: Editora Humana Press, 2002.

MINCIULLOA, P. L.; SAIJAB, A.; PATAFIA, M.; MAROTTAA, G.; FERLAZZOA, B.; GANGEMIA, S. Muscle damage induced by black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). **Phytomedicine**, v. 13, p. 115–118, 2006.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Clinically Oriented Anatomy**. 5. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

MORI, K.; NAGAO, H.; YOSHIHARA, Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. **Science**, v. 286, p. 711-715, 1999.

MOTOYAMA, T.; YABUNAKA, H.; MIYOSHI, H. Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 12, p. 2089–2092, 2002.

NETO, M. M.; COSTA, J. A.; GARCIA-CAIRASCO, N.; NETTO, J. C.; NAKAGAWA, B.; DANTAS, M. Intoxication by star fruit (*Averrhoa carambola*) in 32 uracemic patients: treatment and outcome. **Nephrology Dial Transplant**, v. 18, n. 1, p. 120-125, 2003.

OBERLIES N. H.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Structure–Activity Relationships of Diverse Annonaceous Acetogenins against Multidrug Resistant Human Mammary Adenocarcinoma (MCF-7/Adr) Cells. **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 2102-2106. 1997a.

OBERLIES, N. H.; CROY, V. L.; HARRISON, M. L.; MCLAUGHLIN, J. L. The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 115, p. 73-79, 1997b.

OLIVEIRA, F. A.; GOLÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p.36-41, 2006.

OSORIO E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMENEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630–635, 2007.

RHODEN, E. L.; TELÖKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C. R.; LUCAS, M. L.; BELLÓ-KLEIN, A. Effects of L-arginine and L-nane on renal ischemia-reperfusion in rats. **Brazilian Journal of Urology**. v. 27, n. 1, p. 78-83, 2001.

ROEDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v.50, p. 83–98, 1995.

ROEDER, E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 55, p. 711–726, 2000.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

SAHPAZ, S.; BORIES, C. ; LOISEAU, P. M. ; CORTES, D. ; HOCQUEMILLER, R. ; LAURENS, A. ; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Med**, v. 60, p. 538–40, 1994.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**. v. 55, p. 567-573, 2000.

SILVA, E. L. M.; ROBLOT, F.; MAHUTEAU, J.; CAVE, A. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. **Nat Prod**, v. 59, p. 528-30, 1996.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutrition**, v. 3, n. 4A, p. 501-508, 2000.

SOUZA, A. G.; RODRIGUES, H. G.; SERPA-VIEIRA, C. M.; MATEUS, M. V. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo imunohistoquímico do cerebelo de ratos Wistar submetidos à exposição aguda ao etanol no 12º dia de vida intrauterina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 06-14, 2006.

SEEFF, L. B. Herbal hepatotoxicity. **Clin Liver Dis**, v. 11, p. 577–596, 2007.

SQUIRE, L. R.; BLOOM, F.; SPITZER, N. **Fundamental Neuroscience**. 3. ed. USA: Academic Press, 2008.

STOPPER, H.; SCHMITT, E.; KOBAS, K. Genotoxicity of phytoestrogens. **Mutation Research**, v. 574, p.139-55, 2005.

TILSON, H. A.; HARRY, G. J. **Neurotoxicology**. 2. ed. USA: Editora CRC Press, 1999.

TORMO, J. R.; GALLARDO, T.; ARAGON, R.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Chemico-Biological Interaction**, v. 122, p. 171–183, 1999.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

TSE, K. C.; YIP, P. S.; LAM, M. F.; CHOY, B. Y.; LI, F. K.; LUI, S. L. ; LO, W. K.; CHAM, T. M.; LAI, K. N. Star fruit intoxication in urecemic patients: cases series and review of the literature. **International Medical Journal**, v. 33, n. 7, p. 314-316, 2003.

VOOGD, J. The human cerebellum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 26, n. 4, p. 243-252, 2003.

VOOGD, J.; GLICKSTEIN, M. The anatomy of the cerebellum. **Trends in Cognitive Neurosciences**, v. 21, n. 9, p. 370-375, 1998.