

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO* DO LÁTEX E EXTRATOS DE UMA APOCYNACEAE DE USO POPULAR

Carlos Eduardo Silva Barbosa¹

RESUMO: *Secondatia densiflora* é uma apocynaceae do Cerrado com histórico de uso popular contra câncer. Propôs-se neste trabalho avaliar a toxicidade pré-clínica aguda e a atividade antitumoral da *S. densiflora* em três formulações: látex (uso tradicional) com 2000 e 5000mg/Kg/animal, extrato etanólico do lenho (2000mg/Kg/animal) e extrato etanólico do caule (2000mg/Kg/animal) (frente a células tumorais S180) em camundongos Swiss, por via oral. O Látex e o Extrato etanólico do caule mostraram-se pouco tóxico ou praticamente não tóxico nos experimentos realizados. O Extrato etanólico do lenho indicou toxicidade. Quanto aos efeitos antitumorais o único grupo que apresentou resultado significativo foi o Látex. Além da possível presença de componente químico específico, ausente nos demais extratos, esse resultado pode ser decorrente da presença de misturas complexas de substâncias químicas, o que se pode justificar pela atuação em diferentes alvos celulares.

Palavras-chave: *Secondatia densiflora*. Screening hipocrático. Toxicidade. Antitumoral. Câncer.

ABSTRACT: *Secondatia densiflora* is a apocynaceae Brazilian savana plant with a history of popular use against cancer. It was proposed in this paper to evaluate the acute preclinical toxicity and antitumor activity of *S. densiflora* in three formulations: Latex (traditional use) with 2000 and 5000mg / kg / animal, ethanol extract of the wood (2000mg / kg / animal) and ethanolic extract of the stem (2000mg / kg / animal) (S180 compared to tumor cells) in Swiss mice orally. Latex and the ethanol extract of the stem proved to be slightly toxic or practically non-toxic in the experiments. The ethanol extract of the log indicated toxicity. As for the anti-tumor effects the only group with significant result was the Latex. In addition to the possible presence of specific chemical component, absent in the other extracts, this result may be due to the presence of complex mixtures of chemicals, which can be justified by the performance in different cellular targets.

Keywords: *Secondatia densiflora*. Hippocratic screening. Toxicity. Antitumor. Cancer.

¹ Farmacêutico e licenciado em Filosofia. Mestre em Biologia Celular e Molecular e em Filosofia. Professor da Faculdade União de Goyazes/FUG. E-mail: ces.barbosa@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

A atividade biológica de plantas sobre o organismo humano não está clara em muitos casos, mas empiricamente se constata seus benefícios e assim têm sido frequentes estudos relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos associados à prevenção e ao tratamento de tumores com princípios ativos originados de plantas. Estes efeitos são inúmeras vezes reconhecidos como sinérgicos, e diversas drogas extraídas de vegetais ou sintetizadas a partir destas são utilizadas clinicamente, alguns destes inicialmente descartados devido à toxicidade e posteriormente modificados em sua estrutura química e utilizados (BRANDÃO et al., 2010; STEINMETZ & POTTER, 1991).

Diante do potencial terapêutico e da carência de informações científicas, estudos toxicológicos e farmacológicos tornam-se, então, indispensáveis a partir dos dados etnobotânicos existentes. Dentre estes estudos, os de toxicidade aguda são utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias (no mínimo) após a administração. A análise serve de base ainda para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas com doses repetidas, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação da substância (BRITO, 1994; ANVISA, 2010). O tipo mais rudimentar de teste de toxicidade é a DL₅₀ (dose letal para 50% de um grupo de animais), que foi oficialmente abolida no ano de 2002, apesar de continuar em uso em diversos países (BRITO, 1994).

Assim, propõe-se neste trabalho avaliar a toxicidade pré-clínica aguda e a atividade antitumoral da *S. densiflora* (frente a células tumorais S180) em camundongos Swiss, por via oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de *S. densiflora* foram coletadas no município de Trindade-GO, distrito de Santa Maria, e processada no Laboratório de Química de Produtos

Naturais, em parceria com o Prof. Dr. Antonio Carlos Severo Menezes, da Universidade Estadual de Goiás.

A confirmação da identificação do espécime foi feita por meio de comparações com exsicatas na Unidade de Conservação/PRPPG/UFG - Herbário UFG pelo professor Dr. Heleno Dias Ferreira e incorporado ao Herbário sob o código 14750.

1 Extrato Etanólico do Lenho e Extrato Etanólico do Caule

Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas Willey e pesado. A amostra foi transferida para Erlenmeyers e colocada em contato com o solvente para iniciar o processo de extração dos constituintes. O extrato foi obtido por meio do acréscimo de etanol P.A. (95%), submetendo a amostra ao processo de extração exaustiva. O filtrado desta extração foi recolhido e o solvente orgânico foi evaporado no Evaporador Rotativo TE-210 TECNAL sob vácuo, fornecendo o extrato bruto etanólico.

2 Látex

No momento da coleta do material o caule da planta foi cortado e o látex depositado em frascos tipo eppendorf®.

3 Animais da experimentação

O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFG segundo o protocolo de número 038/2012.

Foram utilizados camundongos da espécie Swiss provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFG (ICB/UFG).

Os animais eram adultos jovens com 6 a 8 semanas de idade e peso inicial não inferior a 20g. Os animais passaram por um período de aclimação de 7 dias antes do início dos experimentos em que se verificaram condições gerais de sanidade.

Os animais foram acondicionados em racks ventilado modelo EB275C na sala de Experimental Animal no Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas 1, andar superior da UFG, em condições ambientais controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade com ciclo claro-escuro de 12 h. Foram mantidos em regime alimentar com ração Labina® Purina® e água *ad libitum*, com privação de ração 4 horas antes quando da necessidade de inserção de cânula orogástrica (gavagem) – nos experimentos de toxicidade.

4 Teste de Toxicidade Aguda em Dose Única – Tratamento

Os testes de Toxicidade aguda em dose única foram realizados seguindo o protocolo *Guideline 423* (OECD, 2001) e os procedimentos envolvendo o manejo e cuidados dos animais baseados no *Niehs Handbook for investigators and technicians*, do *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS, 2011), Estados Unidos da América, de setembro de 2007, visando minimizar o sofrimento dos animais através da realização de todos os procedimentos que envolvam os mesmos.

Os animais foram divididos randomicamente em seis grupos ($n=3$), sendo dois grupos para cada composto testado. Em cada etapa foram utilizados três animais. A ausência ou presença de mortalidade associada ao composto dos animais tratados na etapa anterior determinou a necessidade de testes subsequentes, 24 h depois, com dose igual ou superior à anterior, conforme OEDC (2001).

A administração do látex foi realizada em dose oral única por cânula orogástrica (gavagem) para a dose (inicial) de 2000mg/Kg/animal, após a solubilização em solução fisiológica 0,9%. Após 24h, na ausência de mortalidade ou sinais de toxicidade, a dose fracionada de 5000 mg/Kg/animal foi administrada em intervalo de 1h, após a solubilização em solução fisiológica 0,9%. Os animais foram pesados pelo menos no início e no final do experimento.

A administração dos extratos etanólicos de lenho e caule foram realizadas em dose oral única por gavagem, após a solubilização em solução fisiológica 0,9%. A dose (inicial) de 2000mg/Kg, na ausência de mortalidade ou sinais de toxicidade, foi repetida após 24h. Os animais foram pesados pelo menos no início e final do

experimento e o volume administrado não excedeu 1mL/100g de peso corporal (OECD 423, 2001).

4.1 Observação dos sinais de toxicidade

Observações comportamentais foram realizadas segundo triagem toxicológica na qual se atentou para alterações na atividade motora, contorções abdominais, cauda de Straub, convulsão, defecação, frêmito vocal, força de agarrar, irritabilidade, micção, olhos (lacrimjantes, exoftálmicos), piloereção, postura (ataxia, perda de reflexos), ptose palpebral, resposta ao toque, resposta a estímulo sonoro, salivação, tremor, morte e outros comportamentos atípicos. Durante as primeiras 24h foram feitas observações em tempos variados: primeiros 15 minutos, 1h, 2h, 4h e 24h e a partir de então pelo menos a cada 24h (APÊNDICE A), até o último dia de observação (BRITO, 1994; CUNHA et al., 2009; MALONE & ROBICHAUD, 1962).

No último dia todos os animais foram anestesiados, eutanasiados e necropsiados, com observação geral dos órgãos internos. Os rins e fígado foram retirados para melhor observação macroscópica e conservados em solução de formol tamponado para eventuais testes histológicos posteriores.

5 Avaliação da Atividade Antitumoral

5.1 Grupos experimentais e formas de Tratamento

A partir do resultado do teste de toxicidade, foi calculado o consumo médio diário de água pelos camundongos e realizados os ensaios *in vivo* com diluição dos três extratos na água. Os animais foram divididos em grupos e inoculados com tumor via intraperitoneal (ip). O tratamento foi iniciado após 24 horas de inoculação das células tumorais (0,2 µL de S-180 viáveis).

Os animais foram separados em grupos (Tabela 1). O tratamento consistiu em disponibilizar a solução (1mL/L de água) *ad libitum*. O volume consumido foi calculado em mamadeira graduada

TABELA 1 - Grupos de animais para avaliação antitumoral para camundongo.

Grupos	Tratamentos
Grupo controle do Látex (n=3)	Somente tumor*
Grupo Látex (n=3)	Tumor + látex
Grupo controle dos Extratos (n=5)	Somente tumor*
Grupo Extrato etanólico do caule (n=5)	Tumor + caule
Grupo Extrato etanólico do lenho (n=5)	Tumor + lenho

* Os experimentos com látex e os extratos etanólicos foram feitos em períodos distintos, com um grupo controle para cada período.

No último dia de tratamento os animais foram anestesiados, eutanasiados e analisados macroscopicamente. Os animais foram pesados durante o tratamento, além de serem observados quanto ao comportamento durante todo o procedimento experimental.

Considerando a baixa solubilidade do extrato etanólico do caule, 240µl da substância foi colocada em tubo de centrifugação de 50mL e completado com água filtrada. A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 5 minutos, seguidos de 30 min em ultrassom (à temperatura ambiente) e mais 5 minutos no vórtex. Este procedimento foi repetido em todas as preparações para reposição da solução.

5.2 Consumo médio de água para Extrato Etanólico do Caule e do Lenho e Controle negativo

Calculou-se o consumo médio de água por um grupo de camundongos não tratados para se obter um valor aproximado para diluição dos compostos em água. Fez-se o cálculo do consumo médio de água registrando-se periodicamente em mamadeira graduada.

O consumo do extrato foi calculado a partir da observação do volume de solução de água (com concentração conhecida) consumida. Fez-se o cálculo do consumo médio das substâncias registrando-se, periodicamente, o volume de solução consumida pelo grupo de animais em uma mamadeira graduada.

5.3 Consumo médio de água para Látex

O consumo do Látex diluído em água foi calculado a partir da observação do volume de solução, com concentração conhecida, consumida. Calculou-se o consumo médio de água por grupo de camundongos nos primeiros sete dias de teste.

6 Análise Estatística

A média e o desvio padrão dos pesos foram obtidos. A diferença estatística entre os grupos e os dias foi avaliada pelo teste de ANOVA segundo dois critérios. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences, versão 20 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toxicidade - Látex 2000mg/kg e Látex 5000mg/kg

Não foi registrada morte dos animais na avaliação aguda do látex sobre camundongos Swiss nas doses de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg (OECD, 2001), no período observado. Da mesma forma, nenhuma alteração significativa em relação à triagem toxicológica (*screening* hipocrático) foi observada.

Mesmo efeitos adversos comuns às substâncias antitumorais, como alopecia, não foram constatados nesta etapa do experimento.

A Média dos pesos (\bar{X}) e desvio padrão (S) nos dias 1 e 15 dos animais tratados com látex (2000mg/Kg e 5000mg/Kg) (n=3) encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 – Média dos pesos e desvio padrão dos animais tratados com látex (n=3)

	Dia 1	Dia 15
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
Látex 2000mg/kg	28,53 ± 0,75	40,77 ± 5,68

Látex 5000mg/kg 42,33 ± 4,04 46,67 ± 10,07

Observou-se diferença significativa entre o grupo látex 2000mg/kg e o látex 5000mg/kg ($p=0,024$ ou $p<0,05$). Também se observou diferença significativa entre o peso dos animais entre o dia 1 e o dia 15 ($p= 0,047$ ou $p< 0,05$) (Figura 1).

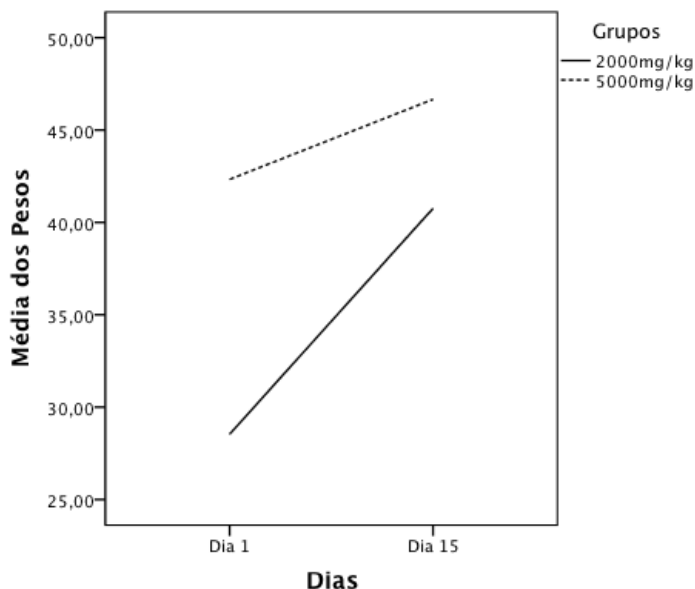


FIGURA 1 – Média dos pesos do látex 2000mg/kg e látex 5000mg/kg, nos dias 1 e 15.

No *screening* hipocrático indício de anormalidade se deu nos primeiros 15 min após a administração do látex (2000mg/kg), nos três animais, e consistiu em atritar a face com as patas dianteiras (movimento de limpar). A ausência destes e de outros sinais posteriores pode indicar *stress* ou desconforto pela inoculação do látex, resíduo faríngeo ou inserção da cânula de gavagem.

Não se observou alteração macroscópica nos órgãos em geral e particularmente no fígado e rins dos animais tratado com ambas as doses.

O tratamento dos animais com a preparação do látex (forma tradicional) não causou a morte de animais tampouco alterações clínicas no *screening* toxicológico, durante o período de observação, nos camundongos tratados, além da já relatada.

O teste-limite, de 5000mg/Kg/animal é utilizado principalmente em situações nas quais se tem informação indicativa que o material de ensaio seja não tóxico (OECD 423, item 22). Este fato, somado a ser o Látex um material desconhecido em estudos anteriores, corroborou o uso da dose limite o que não se repetiu nos experimentos seguintes, com caule e lenho.

A não observação de alterações macroscópicas na necropsia sugere que nenhum dos órgãos avaliados foi alterado, neste nível, pelo tratamento com o látex.

A inexistência de morte ou sinais de maior significância indica substância como “pouco tóxico” ou “quase não tóxico” (OECD, 2001).

A toxicidade sistêmica de uma substância pode se manifestar, também, por meio da redução nos consumos de água, alteração comportamental, apatia, má condição de pelagem e alteração da massa relativa dos órgãos. O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (GONZÁLEZ & SILVA, 2003; PIRES-JÚNIOR et al., 2012). A ausência de alterações nos parâmetros fisiológicos avaliados enfatiza a baixa toxicidade do látex.

A toxicidade da planta pode ser inerente à sua composição química, como também por influências biogeográficas, pela parte da planta utilizada para o preparo dos extratos, pelo solvente utilizado, bem como pela variedade da planta, entre outros (PIRES-JÚNIOR et al., 2012), o que justifica análises toxicológicas (e de atividade antitumoral) com outros extratos da planta.

Toxicidade - Extrato etanólico do caule 2000mg/kg

Não foi registrada morte dos animais na avaliação aguda do extrato etanólico do caule de *S. densiflora* sobre camundongos Swiss na dose de 2000, repetida 24h depois (OECD, 2001), no período observado. Nenhuma alteração significativa em relação à triagem toxicológica (*screening* hipocrático) foi observada, sendo o comportamento de ambos os grupos tratados comportamentalmente semelhantes.

Não se observou alteração macroscópica nos órgãos em geral e particularmente no fígado e rins em ambos os grupos.

O extrato etanólico do caule de *S. densiflora* não causou a morte de animais tampouco alterações clínicas no *screening* hipocrático, durante o período de observação, nos camundongos tratados. Esses dados caracterizam o extrato como “pouco tóxico” ou “quase não tóxico” (OECD, 2001).

A ausência de alterações nos parâmetros fisiológicos avaliados enfatiza a baixa toxicidade do extrato etanólico do caule avaliado.

Estes resultados permitiram concluir a relevância de testes posteriores de atividade antitumoral com o Extrato etanólico do caule.

Toxicidade - Extrato etanólico do lenho 2000mg/kg

Foi observada morte de dois dos seis animais (após nove dias do início do tratamento), na avaliação de toxicidade aguda do extrato etanólico do lenho de *S. densiflora* sobre camundongos Swiss. Os dois animais pertenciam ao mesmo grupo, tratado 24h após o primeiro (OECD, 2001). Nos animais mortos foi notada a presença de sangramento na região oral/nasal. O esôfago e a faringe (incluindo a orofaringe) encontravam-se desobstruídas, sugerindo fragilização capilar.

Não se observou alteração macroscópica nos órgãos em geral e particularmente no fígado e rins em ambos os grupos, indicando que nenhum dos órgãos avaliados foi alterado pelo tratamento com o extrato etanólico do lenho de *S. densiflora* neste nível de observação. O fígado e os rins foram guardados em formol tamponado para futuras análises microscópicas.

As mortes registradas, dias após o início do tratamento e apenas em um dos grupos pode ser decorrência de eventual variável idiossincrática, mesológica ou biológica.

Segundo os parâmetros adotados pela ANVISA (2010) para a condução de estudos não clínicos de segurança, necessários ao desenvolvimento de medicamentos, não é exigida a determinação de DL50 (dose letal 50%), podendo este ser substituído por métodos alternativos envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD. Assim, considerando não ter havido toxicidade significativa nas avaliações com látex e extrato etanólico do caule e a dosagem utilizada para o lenho superar em mais de 10 vezes a exposição clínica prevista nos animais (ANVISA, 2010), com mortalidade observada em menos de 50% do total dos animais que receberam tratamento com extrato etanólico de lenho, sendo um deles ao final do procedimento, optou-se por fazer os testes farmacológicos com os três extratos.

Apesar dos sinais clínicos de baixa toxicidade do látex e do extrato etanólico do caule, estatisticamente houve diferença significativa na média de peso dos animais entre o tratamento com o látex 2000mg/kg e o tratamento com o extrato

etanólico do caule ($p < 0,05$)); assim como o tratamento com o látex 5000mg/kg para o tratamento do extrato etanólico do caule ($p < 0,05$), e por fim uma diferença estatisticamente significativo entre o tratamento com o látex 5000mg/kg e o extrato etanólico do lenho ($p < 0,05$).

Antitumoral - Controle negativo e Látex:

O consumo de água foi medido nos primeiros sete dias de teste. Os camundongos consumiram, em media, 102mL de solução. O consumo médio foi de 0,00486mL de látex/dia/animal ou cerca de 0,1g/Kg/animal. Ressalta-se que o tratamento foi interrompido no dia 8 devido ao peso que os animais atingiram.

A Média dos pesos (\bar{X}) e desvio padrão (S) nos dias 0, 5 e 8 dos animais controle e animais tratados com látex encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 - Média dos pesos e desvio padrão dos animais controle e animais tratados com o látex.

	Dia 0	Dia 5	Dia 8
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
Controle negativo	43,80 ± 1,39	53,03 ± 3,86	57,78 ± 5,68
Látex	40,47 ± 1,47	47,27 ± 2,04	50,23 ± 3,67

Observou-se diferença significativa entre o grupo de animais controle negativo em relação ao grupo de animais tratados com o látex ($p = 0,006$ ou $p < 0,05$). Houve diferença significativa entre os dias; o dia 0 apresentou diferença significativa do dia 5 e dia 8 ($p < 0,05$) (Figura 2).

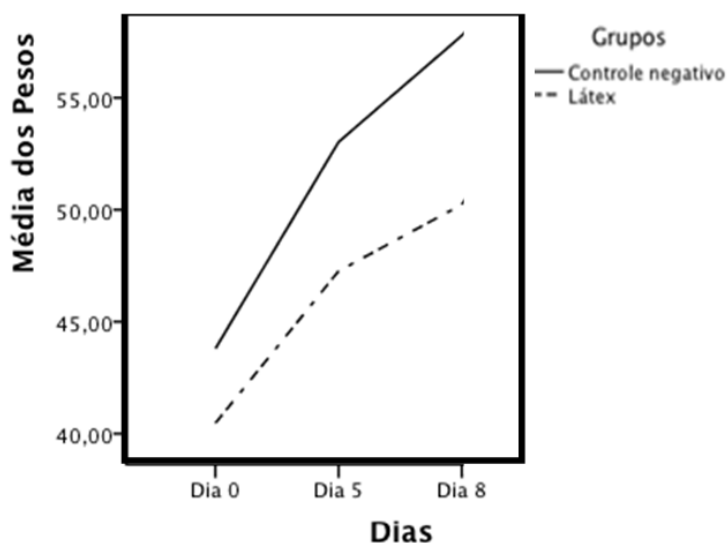


FIGURA 2 – Média dos pesos dos animais do controle negativo em relação ao grupo de animais tratados com o látex, nos dias 0, 5 e 8.

Até esta fase de estudo não foi possível determinar as razões do resultado favorável do Látex contra o tumor. Entretanto, um possível fator é a presença de alcaloides indólicos. Estes alcaloides indólicos são observados na família Apocynaceae (MARTINS, 2013), à qual pertence a planta analisada, sendo raras em outras plantas (menos de 0,1% das plantas estudadas). Observou-se, em geral, ocorrência desses compostos em famílias botânicas Loganiaceae, Rubiaceae e Apocynaceae, todas relacionadas taxonomicamente, de componentes monoterpênicos em C9 ou C10, (HESSE, 2002). Martins (2013) observou a natureza acidófila do látex, corroborando a indicação da presença de alcaloides, que constituem um grupo de substâncias alcalinas e acumulam-se nos vacúolos, particularmente em células hipodérmicas e lactíferos (FIGUEIREDO et al., 2005).

Sabe-se que o grupo de alcaloides (que são derivados do triptofano ou do seu derivado descarboxilado, triptamina) que contém o núcleo do indol ou derivados em sua estrutura consiste de compostos isolados de diversas drogas, como esporão-de-centeio (*Claviceps purpurea*), fava-de-calabar (*Physostigma venenosum* Balf. f., Fabaceae), noz-vômica (*Strychnos nux-vomica* L., Loganiaceae), fava-de-santoninácio (*Strychnos ignatii* P.J. Bergius, Loganiaceae) vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, Apocynaceae), entre outras (SBF, 2009).

Os alcaloides indóis foram popular e cientificamente descritos contra o câncer (FUJIKI et al., 1981; OLIVEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2007), o que pode

justificar o efeito observado. É relevante ainda que, tendo em vista a variação edáfica e climática do Cerrado, a constituição fitoquímica da planta pode sofrer variações especialmente quanto a concentração, a exemplo do que se observa em outras plantas de uso medicinal (SIDHU et al., 2003; YDAV et al., 2010).

Antitumoral - Controle negativo e Caule:

Os camundongos consumiram, em média, 0,00971 mL de caule/dia/animal, equivalente a 270 mL/Kg/animal/dia. No controle negativo os camundongos consumiram o equivalente a 289,11 mL/Kg/animal/dia.

A Média dos pesos (\bar{X}) e desvio padrão (S) nos dias 0, 3, 5, 9 e 15 dos animais controle e animais tratados com Extrato etanólico de caule encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 - Média dos pesos e desvio padrão dos animais controle e animais tratados com Extrato etanólico de caule.

	Dia 0		Dia 3		Dia 5		Dia 9		Dia 15	
	$\bar{X} \pm S$		$\bar{X} \pm S$		$\bar{X} \pm S$		$\bar{X} \pm S$		$\bar{X} \pm S$	
Controle	36,56	±	36,32	±	43,72	±	47,26	±	50,10	±
negativo	2,07		3,07		3,28		4,02		7,29	
Caule	35,80	±	37,50	±	41,70	±	50,32	±	43,10	±
	2,56		2,65		3,61		5,89		9,66	

Não foi observada diferença significativa entre o controle negativo e o caule ao final do tratamento ($p = 0,423$ ou $p > 0,05$) (Figura 3).

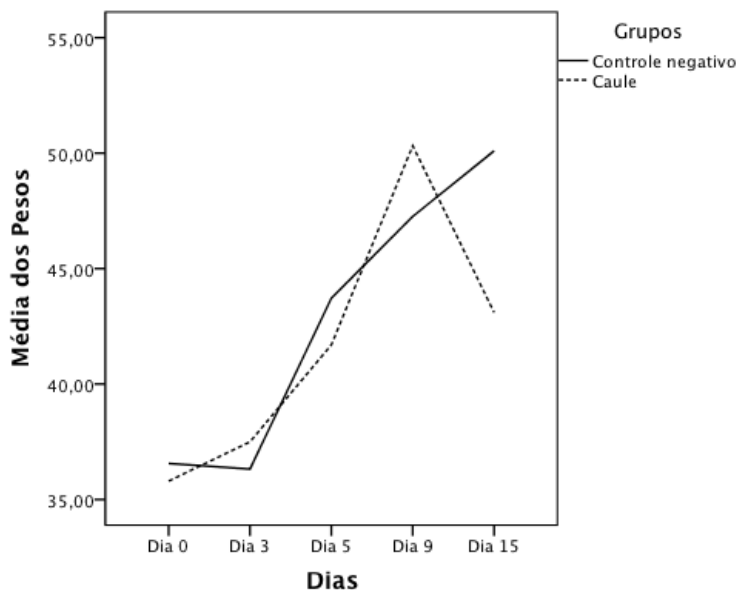


FIGURA 3 – Média dos pesos do controle negativo e caule, nos dias 0, 3, 5, 9 e 15.

De forma diversa do látex, que corresponde aos achados etnobotânicos, a ausência de resultados significativos na desaceleração do crescimento tumoral pode indicar ausência do princípio ativo ou do efeito sinérgico relacionado ao efeito do látex. Estudos fitoquímicos do extrato etanólico do caule, com identificação de estruturas moleculares podem ajudar a descartar princípios ativos que, pelo menos isoladamente, poder-se-ia supor com efeito antitumoral.

Antitumoral - Controle negativo e Lenho:

Os camundongos consumiram, em média, 0,00886mL de lenho/dia/animal o que equivale a 260 mL/Kg/animal/dia. Para o controle negativo do Extrato etanólico do lenho o consumo foi de 289,11mL/Kg/animal/dia.

A média dos pesos (\bar{X}) e desvio padrão (S) nos dias 0, 3, 5, 9 e 15 dos animais controle e animais tratados com Extrato etanólico de lenho encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 - Média dos pesos e desvio padrão dos animais controle e animais tratados com Extrato etanólico de lenho.

Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 9	Dia 15
-------	-------	-------	-------	--------

	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
Controle	36,56 ±	36,32 ±	43,72 ±	47,26 ±	50,10 ±
negativo	2,07	3,07	3,28	4,02	7,29
Lenho	34,16 ±	35,28 ±	37,66 ±	43,42 ±	54,47 ±
	2,67	2,99	3,62	5,71	10,80

Não foi observada diferença significativa entre o controle negativo e o lenho ($p=0,200$ ou $p>0,05$). Observou-se diferença significativa entre o dia 0 e os dias 5, 9 e 15 ($p<0,05$); não foi observada diferença significativa entre o dia 0 e o dia 3 ($p>0,05$) (Figura 4).

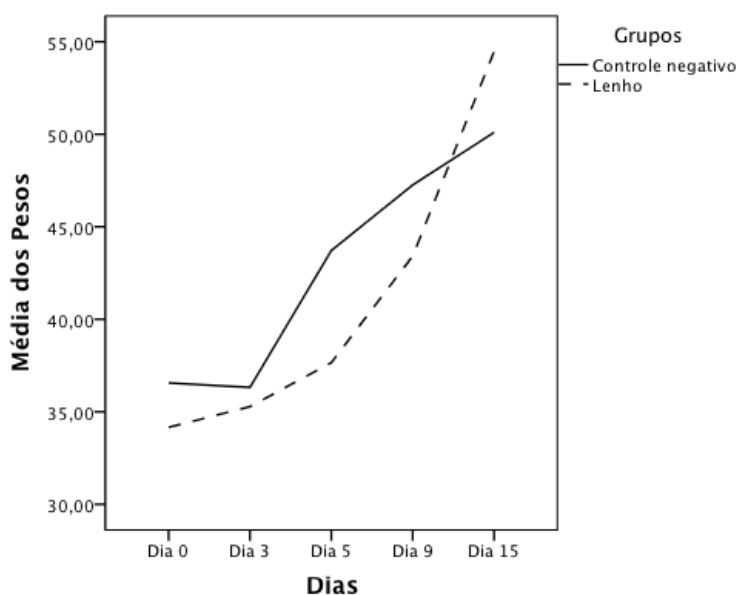


FIGURA 4 - Média dos pesos do controle negativo e lenho, nos dias 0, 3, 5, 9 e 15.

Não foi observada diferença significativa entre o controle negativo, o caule e o lenho ($p = 0,455$) (Figura 5).

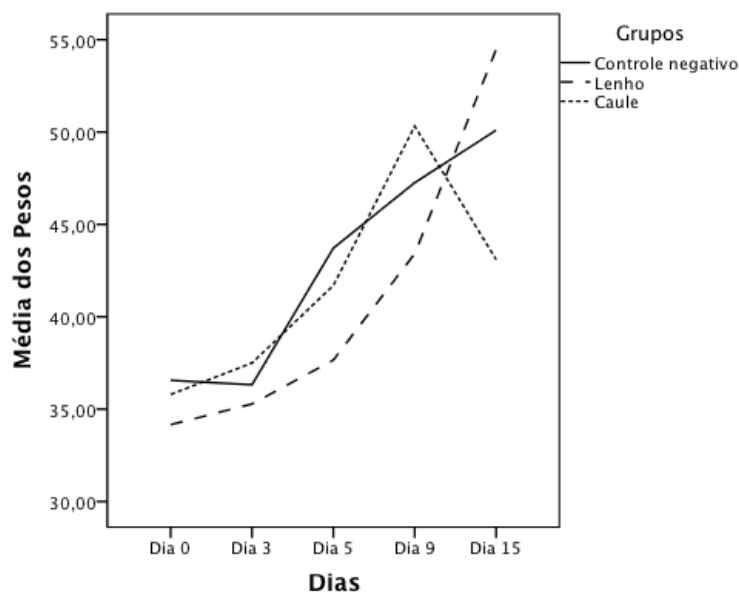


FIGURA 5 – Média dos pesos dos animais do grupo controle negativo, tratamento com estrato etanólico de caule e lenho, nos dias 0, 3, 5, 9 e 15.

Além da possível presença de componente químico específico, ausente nos demais extratos, a desaceleração do desenvolvimento tumoral observada no tratamento com látex pode ser decorrente da presença de misturas complexas de substâncias químicas, o que se pode justificar pela atuação em diferentes alvos celulares.

Concomitantemente ao estudo para este trabalho, análises fitoquímicas foram executadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Goiás (UEG) no contexto do projeto de pesquisa “Atividade Biológica de Plantas do Cerrado” (resultados não publicados). Nestes resultados não se observou presença de moléculas potencialmente ativas contra tumores. Os efeitos observados na análise toxicológica, bem como a falta de evidências significativas do efeito antitumoral recomendam a interrupção de análises baseadas neste extrato.

Para a *S. densiflora* outros estudos devem ser dirigidos para analisar os efeitos da substância sobre o corpo (processos farmacocinéticos): a relação entre a administração e o tempo (e concentração alcançadas) de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, que podem justificar a diferença dos efeitos observados, indicando possível efeito sinérgico com as substâncias constituintes do látex. O uso de compostos fitoterápicos ou concomitante de plantas pode promover interações entre fármacos e os componentes químicos presentes nas plantas

medicinais e mudanças nos seus perfis de eficácia e/ou segurança (FUGH-BERMAN, 2000). Assim, o efeito do látex pode ter-se dado por sinergia ou ação específica do látex pode ainda ser decorrente de pequena concentração da(s) molécula(s) ativa(s), frequente nas plantas (BRANDÃO, 2010), excluídas durante o processo de extração.

O látex da planta mostrou-se, assim, potencialmente terapêutico na forma tradicional de uso. Nos mesmos padrões o extrato etanólico do caule e do lenho não se mostraram favoráveis.

AGRADECIMENTOS: o autor agradece à CAPES o apoio recebido para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília: ANVISA, 2010.
- ARAÚJO-SILVA, T.M., AOYAMA, H., HAUN, M. & FERREIRA, C. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n. 4, p. 237-239, 2004.
- BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *In Vivo***. Campinas: UNICAMP, 1994
- BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, 2010.
- CUNHA, L.C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 2a, jun. 2009.
- FERREIRA, H.D. **Exsicata no 27524**: *Secundaria Densiflora* A. Dc. Herbário UFG, 2004.
- FIGUEIREDO, A.C.S. et al. **Histoquímica e Citoquímica em Plantas**: Princípios e Protocolos. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2005.
- FUGH-BERMAN, Adriane. Herb-drug interactions. **Lancet**, v. 355, p. 134-138, jan. 2000.

FUJIKI, H.; et al. Indole alkaloids: Dihydroteleocidin B, teleocidin, and lynchbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 6, p. 3872-3876, jun. 1981.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006.

HESSE, M. **Alkaloids: Nature's Curse or Blessing?** Zürich: Wiley-vch, 2002.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v. 25, p.23-53, 1962.

MARTINS, F.M. et al . Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e florais de *Secondatia densiflora* A.DC. (Apocynaceae - Apocynoideae - Odontadenieae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, 2013.

NIEHS (*Niehs Handbook for investigators and technicians*, do *National Institute of Environmental Health Scienses*). 2011. Disponível em <<http://www.niehs.nih.gov/>>. Acesso em maio 2011.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline: 423. Disponível em <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>. Acesso em maio de 2010.

OLIVEIRA, V.B. et al . Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000100015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 11 jul. 2013.

PEREIRA, M.M. et al . Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, ago. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400037&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 11 jul. 2013.

PIRES-JÚNIOR et al. Avaliação da Toxicidade aguda do Extrato Hexânico de Frutos de *Melia azedarach* (*Miliaceae*) em camundongos. **Revista Ciência Animal Brasileira**. v. 13, n. 4, 2012.

SIDHU O.P.; KUMAR V.; BEHL H. M. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.12, n. 51, p.910-915, fev. 2003.

SBF – Sociedade Brasileira de Farmacognosia. **Alcaloides indólicos**, 2009. Disponível em <http://sbfgnosia.org.br/Ensino/drogas_com_alcaloides_indolicos.html>. Acesso em 11 jul. 2013.

STEINMETZ, Kristi A., POTTER, John D. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. **Cancer Causes and Control**. v. 2, n. 6, p. 427-442. Nov. 1991.

YDAV, J.P., et al. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Fitoterapia**. v.81, n. 4, p. 223–230., jun. 2010.