



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO SOBRE A TOCIXIDADE DA *Aspidosperma*
pyrifolium (PEREIRO)**

MAÍRA CONCEIÇÃO JERONIMO DE SOUZA LIMA
Médica Veterinária

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Fevereiro – 2011

MAÍRA CONCEIÇÃO JERONIMO DE SOUZA LIMA

**ESTUDO SOBRE A TOCIXIDADE DA *Aspidosperma*
pyrifolium (PEREIRO)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto Blanco

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Fevereiro – 2011

MAÍRA CONCEIÇÃO JERONIMO DE SOUZA LIMA

**ESTUDO SOBRE A TOCIXIDADE DA *Aspidosperma
pyrifolium* (PEREIRO)**

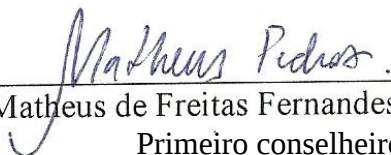
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como
parte das exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

APROVADA EM: 25/02/2011

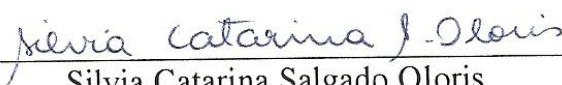
BANCA EXAMINADORA:



Benito Soto Blanco
Orientador



Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa
Primeiro conselheiro



Silvia Catarina Salgado Oloris
Segundo conselheiro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAÍRA CONCEIÇÃO JERONIMO DE SOUZA LIMA – Brasileira, nascida em Natal – RN, em 05 de abril 1983. Coursou o ensino fundamental no Instituto Brasil, o ensino médio no Instituto Federal do Rio Grande do Norte, em Natal, onde se formou em Técnica em Turismo. É graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Durante a Graduação foi bolsista do PICI e PIBIC, totalizando 5 semestres. Em 2009 foi aprovada no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA.

À Deus que foi a Quem eu sempre recorri nos momentos de angustia, dúvida e aflição. E que muitas vezes eu esquecia, seja por qualquer motivo, ou adormecia mesmo antes de dizer: obrigada pela ajuda. Mas que sempre esteve e estará no meu coração.

DEDICO

“Neste mundo, nada é mais maleável e frágil quanto a água. Contudo, ninguém, por mais poderoso que seja, resiste à sua ação (corrosão, desgaste, choque de ondas), ou pode viver sem ela. Não é bastante claro que a flexibilidade é mais eficaz que a rigidez? Poucos agem de acordo com essa convicção.”

Lao-Tsé

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em toda minha jornada, estando sempre presente quando me sentia sozinha.

A minha família, que sempre acreditou em mim e mesmo longe torcia para que tudo de melhor acontecesse. Amo vocês.

A Kleuder, meu namorado, que sempre me deu apoio e soube ser paciente quando estive ausente. Amo-te.

As minhas amigas Carla, Fabrícia, Gabriela, Geyanna, Isabella e Leíse por fazer parte da minha vida nos momentos de alegrias e tristezas. Esse ano o nosso grupo de 7 mulheres completa seu sétimo ano de convivência. Estou esperando pelos 70 anos. Não posso deixar de falar de Alice que é a nova agregada do grupo, amiga e companheira de jornada. Adoro todas vocês.

A minha eterna casinha, Bolsa – Casa 05, que sempre que podia ia pra lá matar as saudades dos bons momentos que vivi com as meninas, principalmente de D. Lindalva, uma segunda mãe pra mim. Saudades de todas.

A todos que torceram por mim e me deram forças pra chegar até aqui.

A Benito que sempre foi meu conselheiro e meu exemplo de profissional e pesquisador. Sou muito grata por tudo.

A banca examinadora pela colaboração e ajuda no aperfeiçoamento do trabalho.

ESTUDO SOBRE A TOXICIDADE DA *Aspidosperma pyrifolium* (PEREIRO)

LIMA, Máira Conceição J. de S. **Estudo sobre a toxicidade da *Aspidosperma pyrifolium* (pereiro)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – RN, 2010.

RESUMO: O presente trabalho teve por objetivo avaliar casos espontâneos de intoxicação em caprinos, toxicidade em ratos e citotoxicidade *in vitro* da *Aspidosperma pyrifolium*. Em todos os casos espontâneos estudados, a ingestão da planta e os casos de aborto ocorreram exclusivamente em caprinos. A maioria dos casos de aborto ocorreu durante a estação seca e início da estação chuvosa, e as cabras experientes eram menos afetadas do que as cabras jovens. Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar. O extrato obtido da planta *A. pyrifolium* foi administrado nas fêmeas no 15º dia de gestação ou a partir do 15º ao 17º dia de gestação, que apresentaram redução do peso fetal e fortes indícios de toxicidade materna. Ratas submetidas a injeção intraperitoneal do extrato da *A. pyrifolium* apresentaram distúrbios motores e morte; ratos machos foram mais resistentes do que as fêmeas. A administração de atropina, xilazina e diazepam não auxiliou na prevenção dos efeitos de toxicidade. A avaliação da fragilidade osmótica das células vermelhas do sangue foi realizada com o extrato da planta em diferentes concentrações. Além disso, utilizou-se larva de um dia de *Artemia salina*, que foram incubadas com diferentes concentrações do extrato. Verificou-se que o extrato de *A. pyrifolium* promoveu hemólise e foi letal para *A. salina*. Estes testes *in vitro* podem ser úteis como testes adjuntos de mais estudos com esta planta.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas tóxicas, *A. pyrifolium*, citotoxicidade *in vitro*.

STUDY ON THE TOXICITY OF *Aspidosperma pyriforme* (PEREIRO)

LIMA, Máira Conceição J. de S. **Study on the toxicity of *Aspidosperma pyriforme* (pereiro)**. 2011. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – RN, 2010.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the spontaneous cases of poisoning in goats, rats and toxicity *in vitro* cytotoxicity of *Aspidosperma pyriforme*. In all spontaneous cases studied, the plant is ingested and the abortion cases occurred exclusively in goats. Most cases of abortion occurred during the dry season and early rainy season, and experienced the goats were less affected than the young goats. We used male and female rats of Wistar strain. The extract of the plant *A. pyriforme* was administered in females at day 15 of gestation or from the 15th to the 17th day of gestation, which showed reduced fetal weight and strong evidence of maternal toxicity. Rats subjected to intraperitoneal injection of the extract of *A. pyriforme* showed motor dysfunction and death, male rats were more resistant than females. The administration of atropine, diazepam and xylazine did not help in preventing the effects of toxicity. The evaluation of osmotic fragility of red blood cells was performed with the plant extract in different concentrations. In addition, we used larvae from a day of brine shrimp, which were incubated with different concentrations of the extract. It was found that the extract of *A. pyriforme* promoted hemolysis and was lethal to *A. salina*. These *in vitro* tests may be useful as adjunct tests for further studies with this plant.

KEY WORDS: Poisonous plants, *A. pyriforme*, cytotoxicity *in vitro*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desempenho reprodutivo (média DP) de ratas grávidas tratadas por via oral com extrato de *Aspidosperma pyrifolium* em doses correspondentes a 0 (controle), 10 ou 20 g da planta / kg de peso corporal no 15º dia gestação ou 20 g/kg do 15º ao 17º dia de gestação..... pág 36

Tabela 2: Efeito hemolítico da *Aspidosperma pyrifolium* em uma concentração equivalente a 200 mg de planta/ml, em diferentes concentrações de NaCl..... pág 36

SUMÁRIO

	Página
1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1 SITUAÇÃO E DESAFIO	12
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS PLANTAS TÓXICAS.....	14
1.2.2 PLANTAS RESPONSÁVEIS POR CAUSAR DISTÚRBIOS REPRODUTIVOS EM ANIMAIS DE CRIAÇÃO	16
1.2.3 PROFILAXIA DA INTOXICAÇÃO PELO PEREIRO E OUTRAS PLANTAS TÓXICAS	18
1.2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	20
1.3 OBJETIVOS	22
1.3.1 GERAL	22
1.3.2 ESPECÍFICOS	22
1.4 REFERÊNCIAS	23
2 CAPÍTULO 2 – ESTUDO SOBRE A TOXICIDADE DA <i>Aspidosperma pyrifolium</i> (PEREIRO)	30
2.1 RESUMO	30
2.2 INTRODUÇÃO	31
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.3.1 Casos à campo	31
2.3.2 Material vegetal utilizado	32
2.3.3 Ensaios de toxicidade in vivo em ratos	32
2.3.4 Efeito hemolítico e letalidade para larvas de artemia salina	33
2.3.5 Análise estatística	34
2.4 RESULTADOS	34
2.4.1 Casos à campo	34
2.4.2 Ensaios in vivo de toxicidade em ratos	35
2.4.3 Efeito hemolítico e letalidade para larvas de artemia salina.....	35
2.5 DISCUSSÃO	37
2.6 CONCLUSÕES	40
2.7 REFERÊNCIAS	41
ANEXO	44
ANEXO 01 – ARTIGO “STUDY ON THE TOXICITY OF <i>Aspidosperma pyrifolium</i> (PEREIRO)” PUBLICADO NA REVISTA TOXICON	45

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 SITUAÇÃO E DESAFIO

As plantas tóxicas podem representar significativo impacto sobre a eficiência reprodutiva dos animais, ao promoverem efeitos indesejáveis tais como abortamentos, infertilidade e malformações. O abortamento é um efeito drástico de elevada importância reprodutiva e de fácil constatação, e as substâncias tóxicas que o induzem podem também resultar no parto de filhotes fracos quando ingeridas no final da gestação. No Brasil, as plantas tóxicas responsáveis por promover abortamentos e parto de filhotes fracos em ruminantes são *Aspidosperma pyrifolium* (MEDEIROS et al., 2004), *Ateleia glazioviana* (STOLF et al., 1994), *Tetrapteryx acutifolia*, *Tetrapteryx multiglandulosa* (TOKARNIA et al., 1989), *Stryphnodendron obovatum* (TOKARNIA et al., 1989), além de outras espécies com frequência de abortamentos mais ocasional, como *Amaranthus spinosus* (PEIXOTO et al., 2003) e as plantas cianogênicas (SOTO-BLANCO; GÓRNIK, 2004).

A *Aspidosperma pyrifolium*, da família Apocynaceae, é conhecida popularmente como pereiro, causa abortos ou nascimento de animais prematuros em caprinos (MEDEIROS et al., 2004) e provavelmente ovinos e bovinos (SILVA et al., 2006) na região semi-árida nordestina. Os caprinos abortam quando ingerem o pereiro em diferentes fases de gestação. Os abortos ocorrem principalmente durante o período seco, quando após um período sem chuvas não há mais forragem e o pereiro se mantém ainda verde, como a principal alternativa de alimentação (RIET-CORREA et al., 2006). As intoxicações também surgem após a ocorrência de chuvas durante o período seco, que fazem com que o pereiro rebrote rapidamente e seja consumido pelas cabras em gestação quando ainda há carência de forragem, ou quando cabras prenhes são colocadas em áreas com pereiro e pouca disponibilidade de forragem (RIET-CORREA et al., 2006).

Os compostos tóxicos do pereiro ainda são desconhecidos, mas a investigação fitoquímica revelou a presença de alcalóides indólicos monoterpenóide aspidofractinine, 15-demethoxypyrifoline e N-formylaspidofractine (ARAÚJO et al., 2007). O não conhecimento dos compostos tóxicos de uma planta é preocupante, pois a determinação do mecanismo de ação e do princípio tóxico são importantes para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas para a intoxicação. Uma forma potencial para a

prevenção da intoxicação pelo pereiro é o desenvolvimento de vacinas que induzam a formação de anticorpos capazes de neutralizar sua toxina. O desenvolvimento de vacinas visa reduzir as perdas produzidas por abortamentos promovidos pelo pereiro. No entanto, é necessário inicialmente que se determine a toxina responsável pelos efeitos tóxicos. O conhecimento do mecanismo de ação tóxico também pode auxiliar no desenvolvimento de medidas profiláticas e/ou terapêuticas, dependendo de qual for seu modo de atuação no organismo. Ainda, são necessárias pesquisas utilizando meios biológicos eficazes para o estudo experimental da intoxicação por essa planta.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS PLANTAS TÓXICAS

Na natureza, um grande número de espécies vegetais apresenta princípios ativos capazes de promover distúrbios em animais. No entanto, são classificadas como plantas tóxicas de interesse pecuário apenas as espécies que promovam intoxicação nos animais sob condições naturais. Neste sentido, nem todas as plantas demonstradas experimentalmente como tóxicas devem ser incluídas neste grupo por não produzirem quadros clínico-patológicos descritos sob condições naturais (TOKARNIA et al., 2000).

As razões que levam os animais a ingerir estas plantas nocivas, como a falta de pastagens adequadas e a escassez de alimentos, de modo geral, são os principais fatores responsáveis pelas intoxicações e morte dos mesmos, e devem ser determinados (ANDRADE; MATTOS, 1968). A fome é considerada a causa mais frequente de ocorrência de intoxicação por plantas, fazendo com que os animais ingiram plantas que normalmente não são acostumados, nos momentos de estiagem. Mas, as plantas mais perigosas são aquelas que o animal ingere por preferência, como ocorre com as espécies *Palicourea marcgravii*, *P. grandiflora*, *Mascagnia rigida* e *M. pubiflora*. O transporte é outro importante fator que pode levar à ocorrência de intoxicações, podendo os animais chegar da viagem com fome, e acabar ingerindo plantas que normalmente não comeriam ou o fariam em baixa quantidade. Além disto, a sede também pode contribuir para a ingestão de plantas tóxicas, pois é capaz de afetar a sensação de paladar dos animais (CHEEKE, 1998; TOKARNIA et al., 2000). Ainda, alguns herbicidas são reconhecidos por alterar a palatabilidade de plantas, e a introdução de animais em locais tratados recentemente pode levar a ocorrência de toxicose por plantas (CHEEKE, 1998; TOKARNIA et al., 2000).

No caso de algumas poucas espécies de plantas tóxicas, foi verificado que os animais podem desenvolver uma aversão, levando a não ingestão dessas plantas, como é o caso de animais criados em regiões onde se tem a planta *Baccharis coridifolia* (TOKARNIA et al., 2000).

Além disto, está bem determinado que vários fatores que podem influenciar a toxicidade de uma determinada planta, sendo eles relacionados à planta ou ao animal. Como fatores ligados à planta, podemos citar que a fase de crescimento pode influenciar de

tal forma, que existem plantas que são mais tóxicas quando estão em brotação (*Mascagnia pubiflora* e *Pseudocalymma elegans*) e outras quando estão maduras (*Baccharis coridifolia*). A parte tóxica da planta também pode variar de acordo com a espécie, existindo plantas que apresentam maior concentração do princípio tóxico no fruto (*Stryphnodendron coriaceum*), na semente e nas folhas (*Ricinus communis*) e nas folhas e frutos (*Sessea brasiliensis*). Dependendo da planta, ao passar por algum processo de armazenamento pode haver perda da sua toxicidade, como ocorre com as plantas cianogênicas (TOKARNIA et al., 2000).

Com relação aos fatores relacionados ao animal, é importante destacar que existem espécies de animais que são mais sensíveis a determinadas plantas se comparado a outras. A *Senecio brasiliensis* é pouco tóxica para ovinos e caprinos, mas causa grave intoxicação em bovinos. E, ainda, as reações tóxicas das plantas podem variar entre as espécies diferentes. Observa-se que as plantas que levam a quadros de fotossensibilização afetam mais animais despigmentados do que os pigmentado (TOKARNIA et al., 2000).

As toxinas presentes nas plantas podem influenciar diretamente na produção animal (CHEEKE, 1998), sendo capazes de promover importantes prejuízos ao agronegócio. Uma interessante forma de classificar estes prejuízos é em perdas diretas (morte, perda de peso ou redução do crescimento, distúrbios reprodutivos) e indiretas (custo médicos, construção de cercas, alterações no manejo) (JAMES et al., 1992).

Com relação aos prejuízos diretos, a mortalidade de animais promovida por plantas tóxicas é, sem dúvida alguma, o que mais chama a atenção, especialmente quando afeta uma grande porcentagem do rebanho. O número de bovinos mortos anualmente por plantas tóxicas no Brasil foi estimado, em 2001, entre 800.000 e 1.120.000 (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). Entretanto, como este número foi obtido a partir da extrapolação da mortalidade por plantas ocorrida nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, provavelmente esteja subestimado, uma vez que a taxa de mortalidade por plantas é maior nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte do que nas regiões Sul e Sudeste (TOKARNIA et al., 2000).

Diversos outros fatores contribuem diretamente para o prejuízo causado pelas plantas tóxicas, tais como a redução no ganho de peso ou mesmo a perda de peso e distúrbios reprodutivos (por exemplo, abortamentos, malformações e menor taxa de concepção) (JAMES et al., 1992; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). No entanto, é extremamente difícil fazer o cálculo exato o quanto estes outros prejuízos diretos representariam para a pecuária nacional.

Há também os prejuízos indiretos, como os gerados pela terapêutica dos animais, estabelecimento de medidas profiláticas (capina, aplicação de herbicidas, construção de cercas etc) e depreciação no valor de algumas propriedades, especialmente quando se tornam conhecidas por serem locais onde animais que são introduzidos morrem. Ainda, as plantas tóxicas podem afetar indiretamente seres humanos. Dentre estes riscos, o principal está na contaminação do alimento produzido (carne, leite ou mel) por resíduos de toxinas das plantas (JAMES et al., 1992; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). Se os prejuízos diretos já apresentam dificuldade de mensuração, se torna quase impossível mensurar os prejuízos indiretos.

1.2.2 PLANTAS RESPONSÁVEIS POR CAUSAR DISTÚRBIOS REPRODUTIVOS EM ANIMAIS DE CRIAÇÃO

Dentre os possíveis efeitos das plantas tóxicas, estão os distúrbios reprodutivos (JAMES et al., 1992). O abortamento é um efeito drástico altamente importante em toxicologia reprodutiva. Além das plantas tóxicas, uma grande quantidade de compostos tem sido considerada como abortivos para animais de produção, como medicamentos, nitratos e nitritos, monóxido de carbono, dioxinas halogenadas e compostos correlatos, praguicidas organoclorados, chumbo, selênio e toxinas microbianas (PUTNAM, 1989; MILLER, 1994; PANTER; STEGELMEIER, 2000).

No Brasil, as espécies conhecidas de plantas que causam abortamentos em animais de criação são *Aspidosperma pyrifolium*, *Ateleia glazioviana*, *Stryphnodendrum obovatum*, *Tetrapteryx* sp e *Trifolium* sp (TOKARNIA et al., 2000; RIET-CORREA et al., 2006).

Aspidosperma pyrifolium (pereiro) é um arbusto presente na caatinga, pertencente à família Apocynaceae. A ingestão das folhas desta planta por cabras prenhes é responsável pela ocorrência de abortamentos. Trata-se de uma causa significativa de abortamentos em caprinos criados em sistema extensivo na região semi-árida nordestina (RIET-CORREA et al., 2006), e esses animais abortam quando a planta é ingerida em diferentes fases de gestação. Se a planta for ingerida nos primeiros 34 dias de gestação causa mortalidade embrionária. Os abortamentos ocorrem durante o período seco, pois a *A. pyrifolium* ainda se mantém verde, sendo uma alternativa para a alimentação desses animais. Ocorre, ainda, no período de rebrota da planta, logo após a ocorrência de chuvas durante o período seco,

sendo consumida pelas cabras prenhas quando essas são colocadas em áreas com escassez de pastagem com a presença da *A. pyrifolium* (MEDEIROS *et al.*, 2004).

As intoxicações por *A. glazioviana* (Leg. Papilionoideae), *T. acutifolia* e *T. multiglandulosa* (Malpighiaceae) causam abortamentos e mortalidade perinatal em bovinos e, experimentalmente, em ovinos e caprinos. Além de abortamento e mortalidade perinatal, estas espécies causam uma forma nervosa, denominada forma letárgica, com espongiose do sistema nervoso central (*status spongiosus*) e uma cardiomiopatia crônica com mortes repentinas, sem prévias alterações clínicas ou com manifestação de edemas de declive e morte (TOKARNIA *et al.*, 1989; GAVA; BARROS, 2001; GAVA *et al.*, 2001).

A. glazioviana (timbó, maria-preta, cinamomo bravo), uma árvore encontrada principalmente na região Sul do Brasil, afeta bovinos, mas também tem sido diagnosticada como causa de abortamentos em ovinos e equinos. Em bovinos, os abortamentos ocorrem em qualquer período gestacional, geralmente entre os meses de novembro e maio; no inverno, de junho a setembro, a planta fica sem folhas. Os animais ingerem a planta quando há escassez de alimentos, principalmente em consequência de períodos de seca ou superlotação, e após transportes. A maioria dos abortamentos se deve à ingestão das folhas verdes das plantas em crescimento, mas algumas vezes podem ocorrer no período de queda das folhas, quando os animais as consomem junto com o pasto. Quando a ingestão da planta ocorre no final da gestação e em doses menores que as que causam abortamento, nascem bezerros fracos que morrem em poucos dias (GAVA; BARROS, 2001; GAVA *et al.*, 2001; GARCIA Y SANTOS *et al.*, 2004). Experimentalmente tem sido observado que precedendo o aborto pode ocorrer um estado de letargia, que perdura por 1-3 dias. Algumas vacas permanecem longos períodos em decúbito e podem apresentar algum grau de perda da visão. Em bovinos intoxicados por *A. glazioviana* descreve-se retenção de placenta e descarga sanguinolenta pela vagina (GAVA; BARROS, 2001; GAVA *et al.*, 2001). Experimentalmente, doses de 22-35 g/kg de *A. glazioviana* causam abortamento (GAVA; BARROS, 2001; GAVA *et al.*, 2001).

Tetrapteryx sp é um cipó, encontrado principalmente na região Sudeste do Brasil. As principais espécies são *Tetrapteryx acutifolia* e *T. multiglandulosa*. Em condições naturais, a intoxicação por essa planta só foi descrita na espécie bovina. Os animais normalmente ingerem a planta na época de seca, quando há brotação (SPINOSA *et al.*, 2008). *T. multiglandulosa* causou abortamento em caprinos que ingeriram diariamente 10 e 20 g/kg, abortando aos 42-73 dias e aos 17-24 após o início da ingestão, respectivamente (MELO *et al.*, 2001). Em ovelhas prenhas doses diárias de 1,5 e 3 g/kg, ministradas a partir

do 90º dia de gestação causaram abortamento entre os dias 110-134 dias de gestação. Ovelhas que receberam diariamente 1,0 e 1,5 g/kg da planta seca a partir do 120º dia de gestação pariram cordeiros com a forma neonatal da doença (RIET-CORREA, 2005). Em experimentos em ovinos com *A. glazioviana* e *T. mulglandulosa* não foram encontradas lesões na placenta (STIGGER et al., 2001; RAFFI et al., 2004; RIET-CORREA, 2005).

Desconhece-se o princípio ativo e o mecanismo de ação tóxica destas espécies citadas. No caso de *A. pyrifolium*, uma investigação fitoquímica revelou a presença dos alcalóides indólicos monoterpenóides aspidofractinina, 15-dimetoxipirifolina e N-formil-aspidofractina (ARAÚJO et al., 2007).

A *Trifolium subterraneum* (trevo subterrâneo) é representante do grupo de plantas com ação estrogênica. Essa planta tem grande importância devido à sua ampla distribuição no país, além de alto potencial estrogênico, podendo conter mais de 5% de isoflavonas, que é o principal fitoestrógeno encontrado nesse gênero. A ingestão de *T. pratense* (trevo vermelho) também vem sendo associada à ocorrência de distúrbios reprodutivos (HARAGUCHI; GÓRNIK, 2008).

1.2.3 PROFILAXIA DA INTOXICAÇÃO PELO PEREIRO E OUTRAS PLANTAS TÓXICAS

Existem algumas formas que auxiliam na profilaxia de acidentes causados devido à ingestão de plantas tóxicas. Uma delas é o desenvolvimento de aversão alimentar condicionada, onde os ruminantes podem ser treinados para evitar a ingestão de plantas tóxicas mediante um processo de aversão alimentar. Esse método já vem sendo utilizado nos Estados Unidos rotineiramente em bovinos para as plantas *Delphinium barbeyi*, *Astragalus* spp e *Oxytropis* spp. A aversão é obtida pelo tratamento com cloreto de lítio (LiCl, 200mg/kg de peso vivo) administrado por meio de um cateter ruminal ou mediante gavagem (LANE et al., 1990; RALPH; OLSEN, 1998). No Brasil, esta técnica já foi aplicada com sucesso para as plantas *M. rigida* (BARBOSA et al., 2008; PACÍFICO DA SILVA; SOTO-BLANCO, 2010) e *B. coridifolia* (ALMEIDA et al., 2009).

A aversão pode ser mantida por até dois anos, mas os animais tratados devem ser mantidos em pastejo separadamente de animais não tratados. Isso ocorre porque se os animais tratados permanecerem junto a animais não tratados e que ingerem a planta, vai haver imitação e a aversão desaparece rapidamente. Esse comportamento é conhecido por

facilitação social, sendo o fator mais importante para a utilização da aversão alimentar condicionada na profilaxia de algumas plantas tóxicas (RALPHS; OLSEN, 1998).

Outra forma de controle é a utilização de animais resistentes à planta tóxica, onde o pastejo prévio com estas espécies resistentes reduz a quantidade da mesma. Os ovinos são aproximadamente 20 vezes mais resistentes que os bovinos e os equinos à intoxicação por plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos e podem ser utilizados para o controle das mesmas (CHEEKE, 1998).

O controle biológico é um método que vem sendo bastante pesquisado, onde se utiliza inimigos biológicos incluindo insetos e outros patógenos de plantas. *Senecio jacobea* foi controlado nos EUA pela liberação de três insetos, *Tyria jacobeeae*, *Longitarsus jacobeeae* e *Pegohylemia seneciella* (COOMBS et al., 1997). Patógenos naturais como bactérias, fungos e vírus consistem em hipóteses adicionais que também podem ser implementadas nos estudos de ecologia e biologia básicas e aplicáveis em controle biológico da planta (DEBACH, 1968). Antes do uso do controle biológico, é essencial determinar o impacto das espécies controladoras sobre as espécies do meio ambiente, para se evitar qualquer possível impacto negativo.

A detoxificação microbiana no rúmen é outra forma de prevenção. A detoxificação bacteriana tem sido utilizada com sucesso no controle da intoxicação por *Leucaena leucocephala*, o que é obtido por meio de administração de bactérias degradadoras da mimosina obtidas do fluido ruminal de animais resistentes (CHEEKE, 1998). Foi verificado que ruminantes que ingerem quantidades crescentes de plantas que contêm oxalatos se tornam resistentes a estas toxinas devido à indução da detoxificação microbiana no rúmen (CRAIG & BLYTHE, 1994). Por meio de recombinação genética, foi desenvolvida uma espécie de bactéria capaz de se desenvolver no interior do rúmen que é capaz de degradar o fluoracetato, princípio tóxico presente em grande número de espécies de plantas responsáveis por morte súbita (GREGG et al., 1998).

Uma forma potencial para a prevenção da intoxicação por plantas é o desenvolvimento de vacinas que induzam a formação de anticorpos capazes de neutralizar sua toxina. De fato, já foram desenvolvidas vacinas em outros países para evitar os efeitos tóxicos de diversas plantas, tais como *Lantana camara* (STEWART et al., 1988) *Lupinus* spp infectado pelo fungo *Diaporthe toxica* (THAN et al., 1998), *Lolium rigidum* (“annual ryegrass”) infectado pela bactéria *Clavibacter toxicum* (THAN et al., 1998), *Festuca arundinacea* Schreb (“tall fescue”) infectada pelo fungo endofítico *Neotyphodium coenophialum* (FILIPOV et al., 1998), *Delphinium* spp (“larkspurs”) (LEE et al., 2003).

1.2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

A identificação do princípio ativo de uma planta tóxica é muito importante, pois propicia o desenvolvimento adequado de procedimentos terapêuticos, bem como auxilia no desenvolvimento de técnicas profiláticas (CHEEKE, 1998). Para se chegar ao princípio ativo de uma planta tóxica, no entanto, é necessária a realização de diversos estudos fitoquímicos, seguidos pela comprovação de que a(s) substância(s) isolada(s) realmente seja(m) responsável(is) pelo efeito tóxico observado a campo. Assim, para esta última etapa são necessários testes biológicos, que podem ser em modelos animais ou em testes *in vitro*. Como há pressão da sociedade para a redução no uso de animais em pesquisas, há um crescente uso de animais não sencientes e dos testes *in vitro*.

Muitos métodos de ensaios biológicos se utilizam de numerosos organismos, na maioria dos testes, tendo a necessidade de manter as culturas permanentes, dificultando a criação e manutenção destes organismos no laboratório (VERDI, 2005). Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. Neste sentido, o ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem tido crescente uso, em decorrência de seu baixo custo e fácil manipulação, podendo ainda ser desenvolvido em laboratórios clássicos de produtos naturais (VERDI, 2005; MCLAUGHLIN, 1991; FALKENBERG *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2002; RUIZ *et al.*, 2005).

A. salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em de água salgada de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais. Os ovos não eclodidos desse crustáceo são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas. Quando re-hidratados, os ovos de *A. salina* eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, favorecendo seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

O ensaio de toxicidade aguda com *A. salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg), e os cistos são facilmente encontrados no comércio e permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER *et al.*, 1982; SIQUEIRA *et al.*, 1998). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira,

podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (SIQUEIRA et al., 1998). Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90. O ensaio foi proposto inicialmente por Michael, Thompson e Abramovitz (1956), e posteriormente desenvolvido por Vanhaecke et al. (1981), bem como por Sleet e Brendel (1983), baseando-se na possibilidade de imobilizar náuplios de *A. salina* em culturas laboratoriais (CARBALLO et al., 2002). A metodologia admite variações.

Carballo et al. (2002) compararam o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e quanto à citotoxicidade em 2 linhagens de células humanas usando extratos de produtos marinhos. Segundo esses autores, os resultados apresentam uma boa correlação, sugerindo que este bioensaio seja utilizado para testar produtos naturais marinhos com potencial atividade farmacológica. O mesmo tipo de resultado foi estabelecido para extratos de plantas medicinais (MCLAUGHLIN, 1991).

É muito comum utilizar cultura de células e tecidos em pesquisa básica aplicada. Como nos estudos sobre a ação de quimioterápicos sobre a viabilidade de células cancerígenas. E ainda, testes de toxicidade de algumas substâncias também podem ser realizados em cultivo de células. Esses ensaios dão suporte, por exemplo, para o conhecimento se uma droga ou substância recém descoberta é tóxica para células de nosso organismo (GOLDBERG, 1987). Dessa forma, no teste de hemólise, utilizado principalmente em teste de irritabilidade, são avaliados os fenômenos de hemólise e desnaturação protéica, decorrentes da ação da substância teste (WOLFGANG, 1987).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos tóxicos da *Aspidosperma pyrifolium* (pereiro) em ratos e avaliar testes *in vitro* como método alternativo para futuros experimentos.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os casos espontâneos de intoxicação por *A. pyrifolium*.
- Caracterizar a toxicidade da planta em ratos.
- Investigar a citotoxicidade utilizando testes *in vitro*.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**: uma introdução à biologia molecular. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ANDRADE, S.O.; MATTOS, J.R. **Contribuição do estudo de plantas tóxicas no estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto Biológico, 1968. 101p

ARAÚJO JR., J.X., ANTHEAUME, C., TRINDADE, R.C.P., SCHMITT, M., BOURGUIGNON, J.J., SANTANA, A.E.G. **Isolation and characterization of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium***. *Phytochem. Rev.* 6, p. 183–188, 2007.

BARROW, P. Technical procedures in reproduction toxicology. **Laboratory Animal Handbooks**. Londres: DEFRA, 1990. 35p.

BERNARDI; M. M. Exposição a medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2006. p. 691-699.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. **Toxicology in vitro**. Londres: DEFRA.v. 2, p.1-6, 1988.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol** 2: p. 1-5, 2002.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants**. 2.ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

CHERNOFF, N.; ROGERS, J.M.; KAVLOCK, R.J. An overview of maternal toxicity and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. **Toxicology**, v.59, p.111-125, 1989.

CRAIG A.M.; BLYTHE L.L. Review of ruminal microbes relative to detoxification of plant toxins and environmental pollutants. In: COLEGATE S.M. ; DORLING P.R. **Plant associated toxins**. Wallingford: CAB International, 1994. p.462-467.

COOMBS E., MALLORY-SMITH L.C., BURRILL R.H., CALLIHAN R., PARKER; RADTKE H. Tansy ragwort, *Senecio jacobaea* L. **Pacific Northwest Extension Publication**, n. 175, p. 1-7, 1997.

DEBACH, P.; HAGEN, K.S. Manipulación de especies entomofagas. In: DeBACH P. (ed.) **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. Buenos Aires: Compañía Editorial Continental, 1968. Cap.15.

DIDELON, J., MAZERON, P., MULLER, S., STOLTZ, J.F. Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: Characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration. **Biorheol**, v. 37, p. 409-416, 2000.

EDGAR J.A. Treatment and prevention of livestock poisoning: where to from here?. In: Garland T. & Barr A.C. (ed.). **Toxic Plants and Other Natural Toxicants**. New York: CAB International, 1998. p.211-214.

FALKENBERG, M.; BAUMGARTEN D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Horticulturae**, v.502, p.401-404, 1999.

FILIPOV, N. M., F. N. THOMPSON, N. S. HILL, D. L. DAWE, J. A. STUEDEMANN, J. C. PRICE, and C. K. SMITH. Vaccination against ergot alkaloids and the effect of endophyte-infected fescue seedbased diets on rabbits. **Journal of Animal Science**, n.76, p.2456–2463, 1998.

GARCIA Y SANTOS, M.C.; SCHILD, A.L.; BARROS, S.S.; RIET-CORREA, F.; ELIAS, F.; RAMOS, A.T. Lesões perinatais em bovinos na intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.178-184, 2004.

GAVA, A.; BARROS, C.S.L. Field observations of *Ateleia glazioviana* poisoning in cattle in southern Brazil. **Veterinary & Human Toxicology**, v.43, p.37-41, 2001.

GAVA, A.; BARROS, C.S.L.; PILATI, C.; BARROS, S.S.; MORI, A.M. Intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.49-59, 2001.

GAVA, D; REIS, R.N.; ROCHA, T.S.; PASQUALE, E.; GAVA A. Intoxicação natural por *Ateleia glazioviana* em ovinos. Anais. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2003, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, 2003. p.60.

Goldberg, A.; Mcculley, J. P. *Alternative methods in toxicology*. 1st Ed, New York, Mary Ann Liesbert, vol.4. il. 1987.

JAMES L. F., NIELSEN D. B.; PANTER K. E. Impact of poisonous plants on the livestock industry. **Journal of Range Management**, v.45, p.3-8, 1992.

KHERA, K.S. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v.29, p.411-416, 1984.

LANE, M.A.; RALPHS, M.H.; OLSEN, J.D.; PROVENZA, F.D.; PFISTER, J.A. Conditioned taste aversion: potential for reducing cattle loss to larkspur. **Journal of Range Management**, v.43, p127-131, 1990.

LEE S. T., STEGELMEIER B. L., PANTER K. E., PFISTER J. A., GARDNER D. R., SCHOCH T. K., JAMES L. F. Evaluation of vaccination against methyllycaconitine toxicity in mice. **Journal of Animal Science**, n.81, p.232–238. 2003

MACIEL, M. A. M.;PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Quin Nova**, v. 25, p. 429-438. 2002.

MAIWORM, A.I., PRESTA, G.A., SANTOS-FILHO, S.D., PAOLI, S., GIANI, T.S., FONSECA, A.S., BERNARDO-FILHO, M. Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18. p. 42-46, 2008.

MANSON, J.M. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p.311-360.

MCLAUGHLIN, J. L. Crow gall tumours on potato disc and brine shrimp lethality: two simples bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed). **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1991.

MEDEIROS, R.M.T.; NETO, S.A.G.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; SOUSA, N.L. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.42-43, 2004. Suplemento.

MELO, M.M.; VASCONCELOS, A.C.; DANTAS, G.C.; SERAKIDES, R.; ALZAMORA FILHO, F. Experimental intoxication of pregnant goats with *Tetrapteryx multiglandulosa*

A. Juss. (Malpighiaceae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.53, p.58-65, 2001.

MÉNDEZ MC.; RIET-CORREA F. Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: RIET-CORREA F., SCHILD A.L., MÉNDEZ M.C.; LEMOS R.A.A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2001, p. 219-333.

MEYER B. N.; FERRIGNI N. R.; PUTNAM J. E.; JACOBSEN L. B.; NICHOLS D. E.; MCLAUGHLIN J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med** 45: p. 31-34, 1982.

MICHAEL A. S.; THOMPSON C. G.; ABRAMOVITZ M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science** 123: p. 464-468, 1956.

MILLER, R.B. Diagnosis of abortion. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v.10, p.439-615, 1994.

MITTUE, H.; GÓRNIK, S. L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. Barueri, SP: Manole, p. 367-414, 2008.

MORALES, M. M. Métodos Alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, vol 60, nº2, São Paulo, 2008.

MOREIRA, F.P.M., COUTINHO, V., MONTANHER, A.B.P., CARO, M.S.B., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G., MONACHE, F.D. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, p. 309-311, 2003.

NÓBREGA, R.; RIET-CORREA, F.; NÓBREGA, R.S.; CORREIA, A.P.; ARAGÃO, M.C.; TABOSA, I.M. Malformações ósseas em ovinos na região semi-árida do nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.45, 2004. Suplemento.

NÓBREGA JR, J.E.; RIET-CORREA, F.; NÓBREGA, R.S.; MEDEIROS, J.M.; VASCONCELOS, J.S.; SIMÕES, S.V.D.; TABOSA, I.M. Mortalidade perinatal em caprinos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.171-178, 2005.

PANTER, K.E.; STEGELMEIER, B.L. Reproductive toxicoses of food animals. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v.16, n.3, p.531-544, 2000.

PEIXOTO, P.V.; BRUST, L.A.C.; BRITO, M.F.; FRANÇA, T.N.; CUNHA, B.R.M.; ANDRADE, G.B. Intoxicação natural por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em ovinos no Sudeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.4, p.179-184, 2003.

PROVENZA F.D.; PFISTER J.A. & CHENEY C.D. Mechanisms of learning in diet selection with reference to phytotoxicoses in herbivores. **Journal of Range Management**, v.45, p.36-45, 1992.

PUTMAN, M.R. Toxicologic problems in food animals affecting reproduction. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v.5, p.325, 1989.

RAFFI, M.B.; BARROS, R.R.; BRAGANÇA, J.F.M.; RECH, R.R.; OLIVEIRA, F.N.; BARROS, C.S.L. The pathogenesis of reproductive failure induced in sheep by the ingestion of *Ateleia glazioviana*. **Veterinary and Human Toxicology**, v.46, p.233-238, 2004.

RALPHS M.H.; OLSEN J.D. Conditioned food aversion: a management tool to prevent livestock poisoning. In: Garland T.; Barr A.C. (ed.). **Toxic Plants and Other Natural Toxicants**. New York: CAB International, 1998. p.227-32.

RIET-CORREA, G. **Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* em ovinos**. 2005. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, 2005, São Paulo.

RIET-CORREA, G.; TERRA, F.F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F.; BARROS, S.S. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n. 43, p.91-96, 2005.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n. 25, p.38-42. 2001.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. M. **Plantas tóxicas da paraíba**, Patos: CSTR/UFCG, SEBRAE/PB, 2006. 58p.

ROGERIO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artêmia salina* e *Bioomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira Farmacogn**, v. 15, p. 98-102, 2005.

SILVA, D.M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; OLIVEIRA, O.F. Toxic plants for livestock in the western and eastern Seridó, state of Rio Grande do Norte, in the Brazilian semiarid. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.4, p.223-236, 2006.

SIQUEIRA, J.M., BOMM, M.D., PEREIRA, N.F.G., GARCEZ, W.S., BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, p. 557-559, 1998.

SLEET, R. B.; BRENDDEL, K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicol Environ Saf** 7: p. 435-446, 1983.

SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIK, S.L. **Prenatal toxicity of cyanide in goats - a model for teratological studies in ruminants**. *Theriogenology*, v.62, p.1012-1026, 2004.

SPINOSA, H.S.; GORNIK S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2008.

STEWART, C; LAMBERTON J. A; FAIRCLOUGH, R. J; and PASS, M. A. Vaccination as possible means of preventing lantana poisoning. **Australian Veterinary Journal**, v.65, p.349-352, 1988.

STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L.; LANGOHR, I.M.; BARROS, S.S. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (leg. Papilionoideae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21,n. 25, p.98-108, 2001.

STOLF, L.; GAVA, A.; VARASCHIN, M.S.; NEVES, D.S.; MONDADORI, A.J.; SCOLARI, L.S. Aborto em bovinos causado pela ingestão de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.14, n. 18, p.15-18, 1994.

THAN, K. A.; Cao Y.; MICHALEWICZ, A. EDGAR, J. A.. **Development of a vaccine against annual ryegrass toxicity.** p. 165-168. Toxic Plants and Other Natural Toxicants. T. Garland and A.C. Barr, Wallingford, Oxon: ed. CAB International. 1998.

TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J. & PEIXOTO P.V. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, 310p, 2000.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J.; CONSORTE, L.B.; GAVA, A. *Tetrapteryx* spp (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, n. , p.23-44, 1989.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; DRIEMEIER, D.; COSTA, J.B.D.; CAMARGO, A.J.R. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, p.35-38, 1998.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicol Environ Saf** 5: p. 382-387, 1981.

VERDI, L. G.; **Toxicologia**. 2005. 174 f. Tese (Doutorado) - UFSC, 2005, Florianópolis.

WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. "Validation of red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potencial of surfactants". *Molecular Toxicology*, v. 1, pp. 525-536, 1987.

2 CAPÍTULO 2 – ESTUDO SOBRE A TOXICIDADE DA *Aspidosperma pyrifolium* (PEREIRO)

2.1 RESUMO

Foram avaliados casos espontâneos de intoxicação por *Aspidosperma pyrifolium*, toxicidade em ratos e citotoxicidade *in vitro*. Em todos os casos espontâneos estudados, a ingestão da planta e os casos de abortamentos ocorreram exclusivamente em caprinos. A maioria dos casos de abortamento ocorreu durante a estação seca e início da estação chuvosa, e as cabras experientes eram menos afetadas do que as cabras jovens. Ratas da linhagem Wistar grávidas foram tratadas com o extrato da *A. pyrifolium* no 15º dia de gestação ou do 15º ao 17º dia de gestação apresentaram redução do peso fetal e fortes indícios de toxicidade materna, incluindo morte. Ratas que foram injetadas com extrato da *A. pyrifolium* por via intraperitoneal apresentaram distúrbios motores e morte; no entanto, os ratos machos foram mais resistentes do que as fêmeas. A administração dos fármacos atropina, xilazina e diazepam não preveniu os efeitos tóxicos. A avaliação da fragilidade osmótica das células vermelhas do sangue foi realizada com o extrato da planta em diferentes concentrações. Além disso, larvas *Artemia salina*, com um dia de idade, foram incubadas em diferentes concentrações do extrato. Verificou-se que o extrato de *A. pyrifolium* promoveu hemólise e foi letal para *A. salina*. Estes *in vivo* e *in vitro* podem ser úteis como ensaios biológicos para estudos com esta planta.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas tóxicas, toxicologia reprodutiva, abortamento, *A. pyrifolium*.

2.2 INTRODUÇÃO

A intoxicação por plantas frequentemente afetam a reprodução animal, levando à disfunção, incluindo o abortamento, infertilidade e teratogênese. No Brasil, as plantas tóxicas que promovem o aborto e a perda neonatal incluem *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Medeiros et al., 2004), *Ateleia glazioviana* Baill. (Stolf et al., 1994), *Tetrapteryx acutifolia* Cav., *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (TOKARNIA et al. 1989) e *Stryphnodendron obovatum* Benth. (TOKARNIA et al., 1998). Várias outras espécies, ocasionalmente, promovem abortamento, como por exemplo, *Amaranthus spinosus* L. (PEIXOTO et al., 2003) e plantas cianogênicas (SOTO-BLANCO; GORNIK, 2004). Abortamentos induzidos por *A. pyrifolium* são frequentemente observados, e esta planta é uma das espécies tóxicas mais importantes da Caatinga, uma região semi-árida do Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2006). O efeito abortivo foi demonstrado experimentalmente em caprinos (MEDEIROS et al., 2004). Os compostos tóxicos ainda não foram determinados, mas uma investigação fitoquímica da *A. pyrifolium* revelou a presença dos alcalóides indólicos monoterpenóides aspidofractina, 15-dimetoxipirifolina e N-formil-aspidofractina (ARAÚJO et al., 2007). Apesar do seu impacto econômico, o conhecimento sobre essa planta tóxica é muito limitada. Os objetivos deste estudo foram (1) descrever os casos espontâneos de intoxicação por *A. pyrifolium*, (2) caracterizar a toxicidade da planta em ratos, e (3) investigar a citotoxicidade utilizando testes *in vitro*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 CASOS Á CAMPO

Seis fazendas, três no município de Mossoró, e três no município de Angicos, no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, que tinha um histórico de abortamentos em pequenos ruminantes atribuída a *A. pyrifolium*, foram visitadas para determinar a epidemiologia da doença e para a investigação dos piquetes.

2.3.2 MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Folhas de *A. pyrifolium* foram recolhidas perto da cidade de Mossoró, RN, Nordeste do Brasil (5 1101500S 2003900W e 37) a uma altitude de 16 m acima do nível do mar. O clima na região é caracterizado como semi-árido. A temperatura média anual é de 27,4 °C, enquanto que a precipitação média anual e umidade relativa média é 674 milímetros e 68,9%, respectivamente. As folhas frescas (500 g) foram extraídas três vezes, com 100% de etanol (5,5 L) por três dias, filtrada e o solvente foi removido sob vácuo por evaporação rotativo de até 50 °C. O resíduo do etanol foi dissolvido em água destilada e filtrada. A solução aquosa do extrato etanólico foi utilizada para os ensaios realizados *in vivo* e *in vitro*.

2.3.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE IN VIVO EM RATOS

Ratos fêmeas e machos, adultos, Wistar foram obtidos com a idade de cerca de 12 semanas a partir do Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil. Foram fornecidos ração (Labina, Agribands Purina do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Para o acasalamento foram colocadas duas fêmeas com um macho. As fêmeas que mostraram evidência de acasalamento (presença de plug vaginal ou de espermatozóides no esfregaço vaginal) foram distribuídas em rotação a cada grupo de dose do extrato do pereiro, até que as 12 fêmeas foram colocadas a cada grupo de dose. O dia do acasalamento foi estabelecido como dia 0 de gestação. Durante a gestação, as fêmeas foram alojadas individualmente em gaiolas de plástico medindo 40 50 20 cm e cobertas com tampas de metal. Os animais foram mantidos a 22-24°C, com ciclo de luz/escuro de 12/12 horas.

Inicialmente, 17 ratas da linhagem Wistar foram tratadas no 15º dia de gestação com 0 (controle; 6 ratas), 0,3 (G0,3; 8 ratas) ou 1,0 (G1,0; 3 ratas) g/kg de peso vivo, sendo utilizado *A. pyrifolium* na forma solução aquosa do extrato etanólico da planta, administrado por meio de *gavage*. No dia 21 de gestação, as ratas sofreram eutanásia, e tiveram o útero removido e pesado. Posteriormente, foi realizada abertura do útero e contagem do número de pontos de implantação, filhotes vivos e mortos, corpos lúteos e pontos de reabsorção. Os filhotes e as placentas foram individualmente pesados, sendo que os filhotes foram avaliados cuidadosamente para determinação de malformações externas, incluindo ocorrência de fenda palatina. A partir da diferença entre os números de corpos

lúteos e de pontos de implantação, foi determinada a porcentagem de perda pré-implantação. Pela diferença entre os números de filhotes vivos e pontos de implantação, foi determinada a porcentagem de perda pós-implantação.

Numa segunda etapa, outras 20 ratas Wistar foram tratadas com 0 (controle; 6 ratas), 10 (G10; 6 ratas) ou 20 (G20; 4 ratas) g/kg no 15º dia de gestação ou 20 g/kg do 15º ao 17º dias de gestação (G20 - 3 d; 4 ratas) de *A. pyrifolium*, na forma solução aquosa do extrato etanólico da planta, administrado por meio de *gavage*. No 21º dia, foram realizados os mesmos procedimentos da etapa anterior.

Por último, foi utilizado o extrato etanólico, que posteriormente foi seco em evaporador rotativo, e o resíduo formado solubilizado com água destilada e filtrado. Esta solução foi administrada em grupos de três ratos machos e três fêmeas nas dosagens de 10, 20, 30 e 60 g/kg (folhas em relação ao peso vivo dos ratos), pela via intraperitoneal. Em seguida, ratas (duas por grupo) foram previamente tratadas com 2 mg/kg de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, SP, Brazil), 2 mg/kg de atropina (Atrofarma, Farmace, Barbalha, CE, Brazil) ou 10 mg/kg de diazepam (Compaz, Cristália, Itapira, SP, Brazil). Após 15 minutos, a solução aquosa do extrato etanólico foi administrado por via intraperitoneal na dose equivalente a 30 g de planta/kg. Os animais foram monitorados por 48 horas após o tratamento.

2.3.4 EFEITO HEMOLÍTICO E LETALIDADE PARA LARVAS DE ARTEMIA SALINA

A avaliação da fragilidade osmótica das células vermelhas do sangue foi realizada em uma amostra de sangue fresco coletado de uma cabra saudável, com uso de EDTA como anticoagulante. A amostra de sangue foi cuidadosamente misturada com 0,90% de solução de NaCl, e centrifugada (1500 rpm, 15 min). O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento foi repetido. Ao concentrado de células vermelhas do sangue (10 ml) foi adicionado 1,0 ml do extrato da planta em diferentes concentrações (correspondendo a 0, 25, 50, 100 e 200 mg de planta/ml em solução de NaCl 0,9%) e incubados por 60 min à temperatura ambiente, com duas repetições para cada concentração. O percentual de hemólise foi determinado pela dosagem da concentração de hemoglobina no sobrenadante, usando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) e um espectrofotômetro a 540 nm.

Posteriormente, foi preparada concentração de 200 mg de planta/ml em solução de NaCl 0,9%, misturada a diferentes concentrações de NaCl (0 a 0,9%) e incubadas com amostras de sangue. O percentual de hemólise foi determinado também pela determinação da concentração de hemoglobina.

A toxicidade do extrato de *A. pyrifolium* foi testada em *Artemia salina*. Foram utilizadas concentrações correspondentes a 10, 15, 20 e 30 mg de planta/ml, preparadas em 10 ml de solução de água no mar. Foram utilizadas 10 larvas de um dia de idade em cada teste, com três repetições para cada concentração. O número de larvas sobreviventes foi contado após 24 horas de incubação. Uma série de controle paralelo em branco foi realizada exatamente nas mesmas condições, sem o extrato de plantas. A expressão final do resultado foi a curva de mortalidade após 24 horas de exposição.

2.3.5 A ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média seguida pelo respectivo erro-padrão (SEM), e foram comparadas por meio da análise de variância (ANOVA), com separação de médias pelo método de Duncan (GraphPad Prism v.4 para Mac). O nível de significância foi estabelecido como $P < 0,05$.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 CASOS Á CAMPO

Ocorreram casos de intoxicação natural em seis fazendas na região de Mossoró e Angico, RN, Brasil. Em todas as fazendas avaliadas, a ingestão da planta e os casos de abortamento ocorreram exclusivamente em caprinos. A maioria dos casos de abortamentos ocorreu no início da estação seca e início da estação chuvosa. Não tinha havido aquisição de novos animais em duas fazendas durante os últimos três anos, e a incidência de abortos diminuiu para quase zero.

Uma fazenda apresentou casos de abortamento, e também casos de malformações em ovinos, caprinos e bovinos, caracterizada como a flexão permanente dos membros anteriores, deformidades cranianas e braquignatismo. Nesta fazenda, houve intensa exploração de madeira para construção e combustível, principalmente de espécies *Mimosa tenuiflora*, e os animais ingeriam aviadamente seus brotos. Esta planta é conhecida por

promover malformações (flexão permanente das patas dianteiras, as deformidades do crânio e braquignatismo) em ovinos, caprinos e bovinos (MEDEIROS et al, 2007; PIMENTEL et al, 2007).

2.4.2 ENSAIOS IN VIVO DE TOXICIDADE EM RATOS

A administração do extrato de *A. pyrifolium* causou a morte de ratas gestantes tratadas com 20 g/kg, um dia após a administração, sendo uma tratada com 20 g/kg por dois dias e outra tratada com a mesma dose durante três dias. No exame pós-mortem, não foram observadas alterações macroscópicas. A análise histológica não foi realizada porque os tecidos mostraram sinais de autólise.

Os dados reprodutivos obtidos no momento da secção cesárea estão resumidos na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas no número de corpos lúteos, pontos de implantação, fetos vivos e mortos e nos pesos das placentas. No entanto, o peso dos fetos foi menor ($P < 0,05$) nos grupos que receberam o extrato de *A. pyrifolium* em todas as doses avaliadas.

Após a injeção intraperitoneal do extrato vegetal, as fêmeas tratadas com 20 g/kg de extrato apresentaram paralisia das patas traseiras por uma hora, e uma das três ratas morreu. A administração de 30 e 60 g/kg foi fatal para as ratas. O extrato da planta na dose 10 g/kg não produziu nenhum sinal de intoxicação nas ratas. A administração do extrato em concentrações de até 30,0 g/kg não produziu efeitos em ratos machos, mas o tratamento com 60,0 g/kg produziu paralisia dos membros posteriores por uma hora em todos os ratos, que se recuperaram completamente após esse período. O tratamento com atropina, xilazina ou diazepam seguido administração do extrato não preveniu os sinais clínicos de intoxicação e morte das ratas.

2.4.3. EFEITO HEMOLÍTICO E LETALIDADE PARA LARVAS DE *A. SALINA*

O percentual médio de hemólise foi de 0% a 0 mg/ml, 18,1% a 25 mg/ml, 36,4% a 50 mg/ml, 66,7% a 100 mg/ml e 100% em 200mg/ml. O extrato na concentração de 200 mg/ml preparado com diferentes concentrações de NaCl (0-0,9%) apresentaram atividade hemolítica maior que o controle (Tabela 2). O extrato foi letal para 11,5% das larvas de *A. salina* em 10 mg/ml, 26,9% em 15 mg/ml, 34,6% com 20 mg/ml, e 46,2% em 30 mg/ml. Nenhuma morte foi observada no grupo no tratamento controle.

Tabela 1: Desempenho reprodutivo (média DP) de ratas grávidas tratadas por via oral com extrato de *Aspidosperma pyrifolium* em doses correspondentes a 0 (controle), 10 ou 20 g da planta / kg de peso corporal no 15º dia gestação ou 20 g/kg do 15º ao 17º dia de gestação.

	Grupo			
	Controle	10 g/kg	20 g/kg	20 g/kg por
3d				
Corpos lúteos	11,3 ± 1,75	9,67 ± 1,34	9,75 ± 0,96	8,00 ± 2,45
Pontos de implantação	10,7 ± 1,75	8,00 ± 2,19	9,00 ± 1,41	8,00 ± 2,45
Fetos vivo	10 ± 2,28	7,50 ± 1,97	6,75 ± 3,69	7,25 ± 2,22
Fetos mortos	0	0	0	0
Peso dos fetos	3,81 ± 0,30 ^a	3,02 ± 0,35 ^b	3,07 ± 0,27 ^b	2,96 ± 0,46 ^b
Peso das placentas	0,44 ± 0,06	0,45 ± 0,09	0,44 ± 0,04	0,48 ± 0,10

^{a,b} Dados para cada parâmetro seguidas por letras distintas são significativamente diferentes (P <0,05, ANOVA seguida pelo teste Bonferroni de comparações múltiplas).

Tabela 2: Efeito hemolítico da *Aspidosperma pyrifolium* em uma concentração equivalente a 200 mg de planta/ml, em diferentes concentrações de NaCl.

% NaCl	Com Extrato	Extrato
0,7	22,2	5,6
0,6	27,8	5,6
0,5	83,3	27,8
0,4	100	83,3
0,3	100	100

2.5 DISCUSSÃO

Casos naturais de abortamento induzido pela *A. pyrifolium* foram relatados por agricultores e técnicos em caprinos, ovinos e bovinos (SILVA et al., 2006), mas foi confirmado experimentalmente apenas em caprinos (MEDEIROS et al., 2004). No presente estudo, os abortamentos induzidos pela *A. pyrifolium* foram observados a campo exclusivamente em caprinos. A ocorrência desta forma de intoxicação em bovinos e ovinos ainda deve ser confirmada. A maioria dos casos que foram relatados para ocorreu no início da estação seca e início da estação chuvosa. Silva et al. (2006) também encontraram uma maior incidência de aborto durante a estação seca e no início da temporada de chuvas. Em uma fazenda, foram encontrados casos de malformações em ovinos, caprinos e bovinos. As alterações observadas foram flexão permanente dos membros anteriores, deformidades cranianas e braquignatismo, que são sinais característicos do efeito teratogênico da *M. tenuiflora* (MEDEIROS et al, 2007; PIMENTEL et al, 2007). De fato, essa fazenda apresentava grandes quantidades de *M. tenuiflora*, que eram avidamente ingeridas pelos animais. Assim, nenhuma das malformações congênicas observadas pode ser atribuída definitivamente a *A. pyrifolium*.

Uma observação interessante foi que a incidência de abortamentos foi reduzida a quase zero em duas fazendas que não haviam adquirido nenhum animal novo nos últimos anos. Essa é uma indicação de que a planta pode promover uma reação de aversão natural a sua ingestão em caprinos experientes, mas a possibilidade de desenvolvimento de resistência não deve ser excluída. É possível sugerir que a intoxicação por *A. pyrifolium* poderia ser prevenida evitando a compra de novas fêmeas, ou através da promoção de uma aversão condicionada à planta em caprinos, semelhante ao utilizado para outra planta tóxica, *Mascagnia rigida* (BARBOSA et al., 2008).

No presente trabalho, a administração de *A. pyrifolium* em ratas grávidas promoveu redução do peso fetal. Este é um efeito significativo, porque o peso fetal é um dos parâmetros mais importantes em estudos de toxicidade no desenvolvimento (MANSON, 1989). Além disso, ratas grávidas dosadas com o extrato de *A. pyrifolium* mostraram forte evidência de toxicidade materna, e foi letal para algumas delas. É sabido que a toxicidade materna é responsável por perturbações do desenvolvimento fetal, pois as interações materno-fetais são afetadas (KHERA, 1984; CHERNOFF et al 1989.). Não foi possível

determinar se a redução de peso fetal observada foi em consequência da toxicidade materna ou de uma ação direta da planta sobre o feto.

A administração intraperitoneal do extrato da *A. pyrifolium* promoveu paralisia dos membros posteriores e morte. As fêmeas foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do que os machos. Foi realizada a administração prévia de atropina, xilazina ou diazepam seguida pela administração do extrato para investigar um possível bloqueio dos efeitos tóxicos da planta, mas esses fármacos não impediram a toxicidade. Assim, seu mecanismo de ação não é simpatomimético ou agonista colinérgico (direto ou indireto), e não é revertido pela ativação de receptores GABA-érgicos. Mais estudos são necessários para determinar o mecanismo da ação tóxica, e deveriam ser feitos com compostos isolados de *A. pyrifolium*.

Testes *in vitro* de citotoxicidade foram realizados por meio de investigação de lise de eritrócitos e de letalidade em larvas de *A. salina*. A fragilidade osmótica da membrana do eritrócito é classicamente utilizada como um ensaio *in vitro* para avaliar os efeitos dos produtos químicos na membrana celular (DIDELON et al, 2000). As substâncias químicas que causam hemólise promovem danos à integridade da membrana, que podem ser devidos a efeitos diretos sobre vias de transporte de íons específicos, a indução do dano oxidativo da membrana celular, a distúrbio da estrutura da camada de lipídios e/ou a distúrbios nos processos que controlam o volume celular, levando ao edema celular (HOFFMAN, 1992; LANG et al, 1998; BOWMAN et al, 2005; MINEO E HARA, 2007; WATTS & HANDY, 2007). Neste estudo, o extrato da *A. pyrifolium* promoveu hemólise, o que é indicativo de perturbação da integridade das membranas celulares.

A *Artemia* é um dos mais conhecidos os organismos aquáticos. É um microcrustáceo da família Anostraca que vive em água salgada e é utilizado para a alimentação dos animais aquáticos (ABATZOPOULOS et al., 2002). Bioensaios toxicológico com náuplios de *Artemia* são muito úteis e são caracterizadas por baixo custo, curto tempo para obter resultados e sem necessidade de aparelhos sofisticados, o que permite sua utilização em uma ampla variedade de estudos (MIGLIORE et al, 1997; PIMENTEL MONTANHER et al, 2002; NUNES et al, 2006; OKAMURA et AL, 2009), inclusive como um modelo experimental para avaliação de teratógenos (CHUVA & BRENDDEL, 1985). Como os cistos de *Artemia* utilizados apresentam mesma idade, genótipo e condição fisiológica, a variabilidade do teste é considerada muito reduzida (PERSOONE et al., 1989). Os resultados aqui apresentados mostraram que o extrato da *A. pyrifolium* é letal para *A. salina*. Vários estudos demonstraram uma correlação positiva entre a letalidade da *Artemia salina* e citotoxicidade (MEYER et al;., 1982 al.

CARBALLO et al., 2002), exceto para os compostos metabólicos que requerem ativação (SOLIS et al., 1993). Assim, o extrato de *A. pyriforme* apresenta propriedade citotóxica.

Estudos fitoquímico da *A. pyriforme* revelaram a presença dos alcalóides indólicos monoterpenóides aspidofractinina, 15-dimetoxipirifolina e N-formil-aspidofractina (ARAÚJO et al., 2007). Vários alcalóides indólicos monoterpenóide exibem atividade citotóxica (JAGETIA et al., 2005; KATAJIMA, 2007), portanto, os alcalóides isolados provavelmente são os compostos tóxicos do *A. pyriforme*, mas isso deve ser confirmado. Os ensaios *in vivo* e *in vitro* aqui apresentados podem ser úteis como ensaios biológicos para a confirmação dos princípios tóxicos, especialmente lise de eritrócitos e letalidade em *A. salina*.

2.6 CONCLUSÕES

O tratamento de ratas prenhes com *Aspidosperma pyrifolium* foi capaz de promover efeitos teratogênicos caracterizados por redução no peso fetal. Por outro lado, o abortamento promovido por esta planta em caprinos não foi observado nos ratos. Assim, pode-se especular que os ratos apresentam sensibilidade a esta planta tóxica diferente dos caprinos.

Houve uma drástica diferença de sensibilidade entre machos e fêmeas aos efeitos do extrato etanólico de *A. pyrifolium*, onde as fêmeas se apresentaram mais sensíveis que os machos.

Os testes *in vitro* de citotoxicidade por lise em eritrócitos e letalidade em larvas de *Artemia salina* se mostraram excelentes modelos experimentais.

2.7 REFERÊNCIAS

- ABATZOPOULOS, T.J., BEARDMORE, J.A., CLEGG, J.S., SORGELOOS, P., 2002. *Artemia*: basic and applied biology. In: **Biology of Aquatic Organisms**, vol. 1. Springer, Berlin, 304 pp.
- ARAÚJO JR., J.X., ANTHERAUME, C., TRINDADE, R.C.P., SCHMITT, M., BOURGUIGNON, J.J., SANTANA, A.E.G., 2007. Isolation and characterization of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochem. Rev.** 6, 183–188.
- BARBOSA, R.R., PACÍFICO DA SILVA, I., SOTO-BLANCO, B., 2008. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. **Pesq. Vet. Bras.** 28, 571–574.
- BOWMAN, Z.S., MORROW, J.D., JOLLOW, D.J., MCMILLAN, D.C., 2005. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 314, 838–845.
- CARBALLO, J.L., HERNANDEZ-INDA, Z.L., PEREZ, P., GARCIA-GRAVALOS, M.D., 2002. A comparison between two shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.** 2 (17), 1–5.
- CHERNOFF, N., ROGERS, J.M., KAVLOCK, R.J., 1989. An overview of maternal toxicity and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. **Toxicology** 59, 111–125.
- DIDELON, J., MAZERON, P., MULLER, S., STOLTZ, J.F., 2000. Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration. **Biorheology** 37, 409–416.
- HOFFMAN, E.K., 1992. Cell swelling and volume regulation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 70, 310–313.
- JAGETIA, G.C., BALIGA, M.S., VENKATESH, P., ULLOOR, J.N., MANTENA, S.K., GENEPIRIERA, J., MATHURAM, V., 2005. Evaluation of the cytotoxic effect of monoterpene indole alkaloid echitamine in-vitro and in tumorbearing mice. **J. Pharm. Pharmacol.** 57, 1213–1219.
- KATAJIMA, M., 2007. Chemical studies on monoterpenoid indole alkaloids from medicinal plant resources *Gelsemium* and *Ophiorrhiza*. **J. Nat. Med.** 61, 14–23.
- KHERA, K.S., 1984. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology** 29, 411–416.
- LANG, F., BUSCH, G.L., RITTER, M., VOLKL, H., WALDEGGER, S., GULBINS, E., HAUSSINGER, D., 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiol. Rev.** 78, 247–306.

MANSON, J.M., 1989. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, A.W. (Ed.), **Principles and Methods of Toxicology**. Raven Press, New York, pp. 311–360.

MEDEIROS, R.M.T., NETO, S.A.G., RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., SOUSA, N.L., 2004. Mortalidade embrionaria e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. **Pesq. Vet. Bras.** 24 (Suppl.), 42–43.

MEDEIROS, R.M.T., FIGUEIREDO, A.P.M., BENÍCIO, T.M.A., DANTAS, F.P.M., RIET-CORREA, F., 2007. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. **Toxicol.** 51, 316–319.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.** 45, 31–34.

MIGLIORE, L., CIVITAREALE, C., BRAMBILLA, G., DELUPIS, G.D., 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. **Water Res.** 31, 1801–1806.

MINEO, H., HARA, H., 2007. Chemical specificity in short-chain fatty acids and their analogues in increasing osmotic fragility in rat erythrocytes in vitro. **Biochim. Biophys. Acta** 1768, 1448–1453.

NUNES, B.S., CARVALHO, F.D., GUILHERMINO, L.M., VAN STAPPEN, G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environ. Pollut.** 144, 453–462.

OKAMURA, H., KITANO, S., TOYOTA, S., HARINO, H., THOMAS, K.V., 2009. Ecotoxicity of the degradation products of triphenylborane pyridine (TPBP) antifouling agent. **Chemosphere** 74, 1275–1278.

PEIXOTO, P.V., BRUST, L.A.C., BRITO, M.F., FRANÇA, T.N., CUNHA, B.R.M., ANDRADE, G.B., 2003. Intoxicação natural por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em ovinos no Sudeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 23, 179–184.

PERSOONE, G., VAN DE VEL, A., VAN STEERTEGEM, M., DE NAYER, B., 1989. Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. **Aquat. Toxicol.** 14, 149–167.

PIMENTEL, L.A., RIET-CORREA, F., GARDNER, D., PANTER, K.E., DANTAS, A.F.M., MEDEIROS, R.M.T., MOTA, R.A., ARAÚJO, J.A.S., 2007. *Mimosa tenuiflora* as a cause of malformations in ruminants in the northeastern Brazilian semi-arid rangelands. **Vet. Pathol.** 44, 928–931.

PIMENTEL MONTANHER, A.B., PIZZOLATTI, M.G., COSTA BRIGHENTE, I.M., 2002. An application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants. **Acta Farm. Bonaerense** 21, 175–178.

SILVA, D.M., RIET-CORREA, F., MEDEIROS, R.M.T., OLIVEIRA, O.F., 2006. Toxic plants for livestock in the western and eastern Serido, state of Rio Grande do Norte, in the Brazilian semiarid. **Pesq. Vet. Bras.** 26, 223–236.

SLEET, R.B., BRENDEN, K., 1985. Homogeneous populations of *Artemia nauplii* and their potential use for in vitro testing in developmental toxicology. **Teratog. Carcinog. Mutagen.** 5, 41–54.

SOLIS, P.N., WRIGHT, C.W., ANDERSON, M.M., GUPTA, M.P., PHILLIPSON, J.D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Med.** 59, 250–252.

SOTO-BLANCO, B., GO' RNIK, S.L., 2004. Prenatal toxicity of cyanide in goats – a model for teratological studies in ruminants. **Theriogenology** 62, 1012–1026.

STOLF, L., GAVA, A., VARASCHIN, M.S., NEVES, D.S., MONDADORI, A.J., SCOLARI, L.S., 1994. Aborto em bovinos causado pela ingestão de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesq. Vet. Bras.** 14, 15–18.

TOKARNIA, C.H., BRITO, M.F., DRIEMEIER, D., COSTA, J.B.D., CAMARGO, A.J.R., 1998. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pesq. Vet. Bras.** 18, 35–38.

TOKARNIA, C.H., PEIXOTO, P.V., DO' BEREINER, J., CONSORTE, L.B., GAVA, A., 1989. *Tetrapteryx spp* (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. **Pesq. Vet. Bras.** 9, 23–44.

WATTS, T.J., HANDY, R.D., 2007. The haemolytic effect of verapamil on erythrocytes exposed to varying osmolarity. **Toxicol. In Vitro** 21, 835–839.

ANEXOS

ANEXO 01 – ARTIGO “INTOXICAÇÃO EM CAPRINOS POR *Aspidosperma pyriforme* Mart: EFEITOS BIOLÓGICOS E CITOTÓXICOS” PUBLICADO NA REVISTA *TOXICON*

Baseado no trabalho original: Estudo sobre a toxicidade da *Aspidosperma pyriforme* (pereiro).