

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE PELA TINTURA DE ERVA-DE-SANTA-MARIA (*Chenopodium ambrosioides*) EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

Sheila Nogueira Ribeiro¹, Leonardo Oliveira Trivilin¹, Adriana Maioli¹, Leonardo Sidney Knupp¹, Louisiane de Carvalho Nunes¹, Luiz Fernando Aarão Marques¹, Ingrid Ney Kramer¹, Lenir Cardoso Porfírio¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias (CCA-UFES)/ Departamento de Medicina Veterinária, Alegre/ES – Alto Universitário – s/nº. e-mail: sheilanribeiro@hotmail.com; lenircp@oi.com.br

Resumo - Camundongos da espécie *Mus musculus*, foram divididos em três grupos de 13 animais, os grupos 1 e 2 receberam, respectivamente, preparações via dérmica de 5% e 10% da tintura de erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) e o grupo controle recebeu álcool etílico 70% no mesmo volume do grupo experimento. A coleta de material para exames hematológicos e histopatológicos foi feita em 15% dos camundongos de cada caixa com 0, 18 e 28 dias. Dentre os resultados obtidos com os exames hematológicos verificou-se uma tendência à leucocitose com neutropenia nos animais tratados e no término houve tendência a eosinofilia nesses animais. Os exames histopatológicos de camundongos que receberam tintura de erva-de-santa-maria evidenciaram algumas características de intoxicação, como a degeneração hepática e degeneração renal, sendo também encontrado infiltrado mononuclear na pele. Como as alterações observadas não ocorrem unicamente em intoxicações e não foram exclusivas ao grupo experimento, conclui-se que, com as doses utilizadas, a tintura de erva-de-santa-maria não teve ação tóxica.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*, tóxica, camundongos.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

O Brasil tem uma vasta biodiversidade, conhecimento popular, ciência e tecnologia. Todos esses fatores levaram ao aumento do interesse nacional pela fitoterapia. As plantas medicinais e seus constituintes ativos são considerados recursos promissores em esquemas terapêuticos. A erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) por exemplo, é uma das plantas usadas na fitoterapia, sendo utilizada principalmente como: vermífugo, laxativo, diurético, cicatrizante e também há relatos de sua aplicação no tratamento de lesões cutâneas causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FRANÇA, 1996).

Existem vários princípios ativos na erva-de-santa-maria, sendo o ascaridol o principal causador do efeito tóxico. Cerca de 90% do ascaridol presente na erva, encontra-se nas sementes, folhas e no caule, que são as partes mais utilizadas da planta nas preparações populares (SANTOS & CORRÊA, 2006). No entanto, dependendo da forma de extração dos princípios ativos da erva-de-santa-maria e de sua administração, essa concentração altera-se, assim como seus efeitos tóxicos.

Com relação ao uso e posologia da erva-de-santa-maria, são necessárias algumas precauções, pois apesar de ser uma planta muito utilizada na medicina alternativa, em altas doses

ela pode causar efeitos colaterais como irritação na pele e mucosas, cefaléia, danos ao fígado e ao rim, colapso circulatório e até a morte (MEIRA, 2004).

Considerando os possíveis danos causados pelo uso de erva-de-santa-maria, objetivou-se a determinação da DL₅₀ da tintura desta planta, pois esta é uma medida usada para se avaliar a toxicidade de um composto químico. Este trabalho ainda visou minimizar seus efeitos colaterais através da utilização racional por meio de doses conhecidas, com o intuito de tornar seguro o seu uso para população.

Metodologia

O experimento foi realizado no Centro de Ciência Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES). Os animais para a realização desse ensaio foram camundongos da espécie *Mus musculus*, da linhagem BALB/C, provenientes do Instituto Biológico do Espírito Santo (IBES).

A preparação do pó da erva-de-santa-maria foi feita no laboratório de Fitoquímica do CCA-UFES. A planta inteira de *C. ambrosioides* foi coletada no município de Alegre-ES e seca a 40 °C em estufa. Após seca, a planta foi moída até obter-se um fino pó, que foi armazenado em recipientes de vidro âmbar. Após sete dias de imersão do pó em álcool etílico 70%, filtrou-se o mesmo em tecido de *voil*.

Assim obteve-se a tintura, que foi utilizada dentro de, no máximo, duas horas após o processo de extração.

A separação dos animais entre os seus respectivos grupos obedeceu à indicação de Larini (1997), o qual diz que para a realização de um ensaio toxicológico crônico em curto prazo são necessários no mínimo dez animais. A divisão dos animais foi feita em três grupos de 13 animais, totalizando 39 animais, que foram alojados em caixas de polipropileno forradas com maravalha. Para os grupos 1 e 2 foram testadas dosagens da tintura em diferentes concentrações, já o grupo 3 foi o controle. Todos os camundongos receberam alimentação e água *ad libitum*. Segue abaixo a descrição dos grupos.

Grupo 1 (fêmeas) – A tintura na concentração de 5% foi administrada, por via dérmica na região dorsal tricotomizada com tesoura, utilizando-se uma gaze umedecida em 1mL de tintura. A obtenção da concentração de 5% foi a partir da diluição de cinco gramas do pó da erva-de-santa-maria inteira em 100mL de álcool etílico 70%.

Grupo 2 (machos) – A tintura na concentração de 10% também foi administrada, por via dérmica, da mesma forma que o grupo 1, porém sua obtenção foi a partir da diluição de dez gramas do pó da erva-de-santa-maria inteira em 100mL de álcool etílico 70%.

Grupo 3 (machos) – Controle – Neste grupo administrou-se apenas álcool etílico 70% via dérmica, seguindo o mesmo procedimento dos grupos 1 e 2.

O período de intoxicação foi de 28 dias, classificando o trabalho como uma intoxicação crônica em curto prazo (Directiva 94/79/CE; 1994). Durante esse tempo estabeleceu-se uma conduta de coleta de sangue do plexo retro-orbital e eutanásia humanitária com éter sulfúrico para coleta do fígado, rins e região da pele que recebia aplicação diária da tintura ou álcool 70%. Esta conduta foi implementada para posterior realização dos exames hematológicos e histopatológicos, identificando possíveis alterações decorrentes do processo de intoxicação.

Após uma semana de adaptação dos camundongos ao novo ambiente, foi iniciada a conduta de coleta de material para exames em 15% dos camundongos de cada grupo, sendo o mesmo processo repetido aos 18 e aos 28 dias de experimento.

A obtenção do hematócrito foi feita pela técnica manual de microhematócrito. Na contagem diferencial de leucócitos utilizou-se o kit Panótico rápido para coloração, e microscópio de luz com objetiva de imersão (aumento de 100x) para visualização. Ambas técnicas seguiram a metodologia do laboratório de patologia do Hospital Veterinário do CCA-UFES.

Os órgãos coletados para exame histopatológico passaram por um processo de confecção das lâminas com posterior coloração pela técnica de eosina-hematoxilina. Em seguida as lâminas foram lidas em microscópio de luz, com objetiva de aumento de 10x e 20x.

Resultados

Durante o período de intoxicação crônica em curto prazo, todos os animais apresentaram um leve prurido na região dorsal, onde foi aplicada a tintura, sendo este mais intenso nos últimos dez dias de experimento.

Os gráficos a seguir demonstram as variações na contagem diferencial de leucócitos dos animais intoxicados com tintura de erva-de-santa-maria.

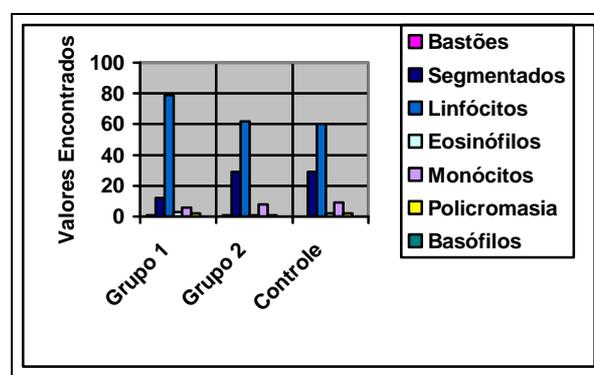


FIGURA 1 – Achados hematológicos de camundongos obtidos antes do início da intoxicação com erva-de-santa-maria.

Observando-se a figura 2 e comparando os respectivos grupos com os da figura 1, percebe-se que todos os grupos apresentaram seus valores de linfócitos aumentados.

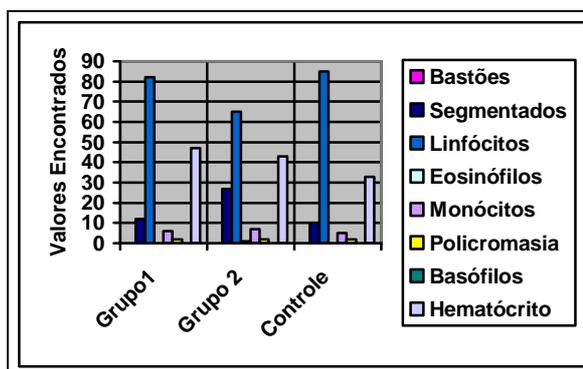


FIGURA 2 - Achados hematológicos de camundongos após 18 dias de intoxicação com erva-de-santa-maria.

A partir da visualização da figura 3, quando se compara seus valores com a figura 1 e 2, percebe-se que ocorreu um aumento de eosinófilos em todos os grupos.

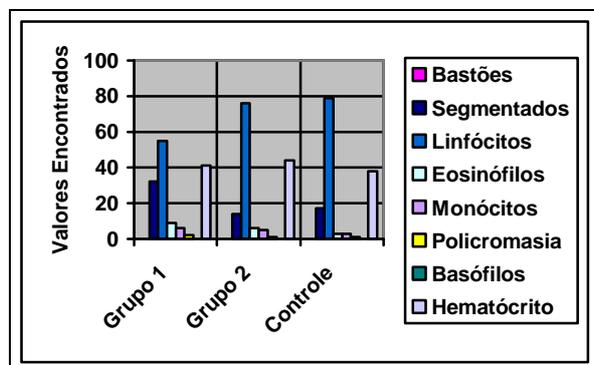


FIGURA 3 – Achados hematológicos de camundongos após 28 dias de intoxicação com erva-de-santa-maria.

Os exames histopatológicos estão com seus resultados dispostos nas tabelas 1, 2 e 3. Os grupos após uma semana de adaptação ao novo ambiente estão representados por um asterisco (*); os grupos com 18 dias de intoxicação, por dois asteriscos (**); os grupos com 28 dias de intoxicação, por três asteriscos (***)

A intensidade que foi observada cada alteração está definida como discreta (+), moderada (++), intensa (+++), ou ausente (-----).

Quanto às alterações hepáticas (Tabela 1), todos os grupos apresentaram congestão e inflamação, em diferentes intensidades e durante todo o período de intoxicação. Percebe-se, porém, que a congestão foi observada com uma intensidade maior no período final do experimento.

TABELA 1 – Alterações encontradas nas amostras de parênquima hepático de camundongos coletadas durante intoxicação com tintura de erva-de-santa-maria.

Grupos	Congestão	Infiltrado Inflamatório	Degeneração
Controle*	+	+++	+
1*	++	++	+
2*	+	+	-----
Controle**	+	++	-----
1**	+	++	-----
2**	++	+	++
Controle***	++	+	-----
1***	++	+	+
2***	++	+	+

O resultado histopatológico do tecido renal demonstrado na tabela 2 revelou a existência de congestão em todos os grupos. Porém a

degeneração tubular só apresentou-se em cinco grupos, incluindo o grupo controle e o grupo 1 antes do início da intoxicação.

TABELA 2 – Alterações encontradas nas amostras de parênquima renal de camundongos coletadas durante intoxicação com tintura de erva-de-santa-maria.

Grupos	Congestão	Degeneração tubular	Líquido no espaço de Bowman
Controle*	++	-----	++
1*	++	+	-----
2*	+	-----	-----
Controle**	+	-----	-----
1**	+	+	-----
2**	+	-----	-----
Controle***	+++	+	-----
1***	++	-----	-----
2***	+++	-----	-----

As alterações na pele observadas estão descritas na tabela 3.

TABELA 3 – Alterações encontradas nas amostras de pele de camundongos coletadas durante intoxicação com tintura de erva-de-santa-maria.

Grupos	Hemorragia derme superficial	Infiltrado mononuclear	Congestão derme superficial
Controle*	+	-----	+
1*	-----	+	-----
2*	-----	-----	-----
Controle**	-----	-----	-----
1**	+	++	-----
2**	++	+	-----
Controle***	-----	-----	-----
1***	+	-----	-----
2***	+	+	-----

Discussão

A visualização de prurido nos camundongos intoxicados com tintura de erva-de-santa-maria pode ser justificada pela presença de álcool etílico na solução, pois alcoois são irritantes à pele (PAGNONCELLI, *et al*; 2006). Porém não há relatos do álcool etílico causar qualquer tipo de irritação dérmica, quando na concentração de 70:30, sendo, inclusive, autorizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) seu uso como antisséptico tópico.

Os resultados hematológicos obtidos foram comparados com os valores de normalidade citados por Quesenberry, *et al.* (1997), demonstrados na tabela 4.

TABELA 4 – Parâmetros hematológicos de normalidade para camundongos referenciados por Quesenberry et.al (1997).

Parâmetros	Camundongo
Ht (%)	37 – 46
Neutrófilos segmentados (%)	10 – 40
Linfócitos (%)	55 – 95
Eosinófilos (%)	0 – 4
Monócitos (%)	0,1 – 3,5
Basófilos (%)	0,03

Como se pode notar a partir da observação da figura 1 e 2, todos os grupos apresentaram valores dentro da normalidade, exceto com relação ao número de monócitos, que foi acima do normal de acordo com os valores apresentados na tabela 4; já na figura 3 observa-se que apenas o grupo 1 não manteve a monocitose. A presença de monocitose, mesmo antes do início da intoxicação, e a permanência dos valores hematológicos dentro dos padrões normais comprovam que o ensaio toxicológico não interferiu nos mesmos.

De acordo com Coelho (2002) e Thomson (1983), algumas alterações podem estar relacionadas a processos isquêmicos/toxêmicos, a septicemia ou hipóxia, dentre elas a congestão e a degeneração celular. A congestão hepática, especificamente, também pode ocorrer em casos de metamorfose gordurosa e hiperemia passiva crônica do fígado. Com relação à presença de infiltrado inflamatório no parênquima hepático, esta alteração pode desenvolver devido à uma hepatite tóxica, mas também existe a causa viral. Portanto essas alterações podem não ter relação com a intoxicação por tintura de erva-de-santa-maria.

A degeneração tubular foi encontrada em apenas três amostras, uma delas do grupo controle (Tabela 2), sendo possivelmente causada por fatores individuais. A congestão observada em todos os grupos também indica não ser uma reação à tintura de erva-de-santa-maria.

Na pele, antes da aplicação da tintura de *C. ambrosioides* foi feita uma tricotomia. Neste procedimento, por vezes, ocorrem escoriações justificando, portanto, a presença de hemorragia superficial e dermatite em alguns camundongos.

Conclusão

A DL₅₀ não foi encontrada neste ensaio toxicológico, sendo necessário a realização de maiores estudos para tal, porém os exames histopatológicos de camundongos que receberam tintura de erva-de-santa-maria evidenciaram degeneração hepática, renal e dermatite crônica inespecífica na pele, o que pode

sugerir quadro de intoxicação. No entanto, as alterações observadas nos animais não ocorrem unicamente em casos de intoxicações e não foram exclusivas ao grupo experimento, concluindo-se que, com as doses utilizadas, a tintura de erva-de-santa-maria não teve ação tóxica.

Referências

- COELHO, H. E. **Patologia veterinária**. Barueri: Ed. Manole, p. 89-91, 144-149, 160-166, 172-175, 2002.
- Directiva 94/79/CE; **Jornal Oficial nºL354**, p.65; 1994.
- FRANÇA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, p.229-232, 1996.
- LARINI, L. **Toxicologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed Manole, p. 302, 1997.
- MEIRA, L. R. S. **Plantas medicinais**. Disponível em: <http://www.geocities.yahoo.com.br/luizmeira/fito.htm>. Acesso em 12 jul. 2007.
- PAGNONCELLI, R. M.; OSHIMA, H. M. S.; DOCKHORN, D. M. C.; MEYER, K. R. M.; MELLO, A. I. S. de. **Manual de Biossegurança dos Ambulatórios da Faculdade de Odontologia da PUCRS**. 2. ed., 2006. Disponível em: <http://www.pucrs.br>. Acesso em 12 jul. 2007.
- QUESENBERRY, K. E.; CARPENTER, J. W. **Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery**. 2. ed, St. Louis: Saunders, p. 290-291, 1997.
- SANTOS, S. G.; CORRÊA, R. X. Diversidade genética de *Chenopodium ambrosioides* da região cacauieira da Bahia com base em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.41, n. 1, Brasília, 2006.
- THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 16-22, 96-107, 1983.