

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
MESTRADO EM FISILOGIA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA
PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO
DA *Mentha crispera***

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

RECIFE
2003

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA
PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO
DA *Mentha crisperi***

Dissertação submetida ao Curso de Pós graduação em Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Fisiologia.

Orientador:
Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-Orientador:
Prof. Dr. Parviz Afiatpour

RECIFE
2003

DIMECH, Gustavo Santiago

Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto da *Mentha crispera* / Gustavo Santiago Dimech. Recife, UFPE, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2003.

x, 84p., il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2003.

1.*Mentha crispera*. 2.toxicologia, 3. Reprodução, 4. Pré clínica – Tese. I. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia.II. Título.

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA
DO EXTRATO BRUTO DA *Mentha crisper***

Aprovado em 07 de fevereiro de 2003

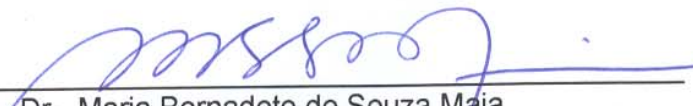
BANCA EXAMNINADORA



Prof. Dr. Raul Manhães de Castro



Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou



Prof.ª Dr.ª Maria Bernadete de Souza Maia



Prof.ª Dr.ª Carmen de Castro Chaves

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; se não tivesse “amor” nada seria.

Coríntios 13-3

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Aos meus pais, Salvador e Nágela, pelo apoio e incentivo minha vida profissional e em todos os momentos na vida pessoal.

Ao meu orientador e amigo Almir Gonçalves Wanderley, que mais do que qualquer outra pessoa esteve presente em todas as alegrias e dificuldades durante a realização do mestrado.

Ao meu co-orientador Prof. Parviz Afiatpour, pela orientação, auxílio e disponibilidade de seu laboratório para realização dos experimentos.

As Professoras Liriane Evêncio e Rosa Santiago do departamento de Histologia e aos estagiários Reginaldo, Humberto e Luciano, que tornaram possíveis a análise Histológica.

Ao Laboratório Hebron, pela disponibilização do extrato da *Mentha crispata* que tornou possível a realização da tese.

As professoras Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim e Cláudia Sampaio de Andrade Lima, que são responsáveis pelo meu ingresso na pesquisa científica, e nunca deixaram de prestar um valioso incentivo na minha vida acadêmica.

Ao Professor Haroudo Sátiro Xavier, do Laboratório de Farmacognosia pela colaboração e a Karina Perrelli Randau pelo auxílio desde os tempos da graduação sendo a grande incentivadora para o ingresso no mestrado em fisiologia.

Aos professores Maria do Carmo de Araújo Fraga e Mario Sette pelas sugestões e colaborações durante todo o período de realização do Mestrado

A Professora Miracy Muniz do departamento de Ciências Farmacêuticas pela doação reagentes que tornaram possíveis o prosseguimento dos trabalhos.

Ao Professor Carlos Peres da Costa pela grande colaboração na revisão do manuscrito em inglês.

Ao professor Vicente Alexandre Alves e Família pela grande colaboração durante a fase inicial de minha dissertação.

Aos todos os professores e colegas do departamento de Fisiologia e farmacologia;

A família Perrelli Randau, pelo incentivo e amizade que me foi dispensado durante a realização desta dissertação

Aos técnicos Severino (in memoriam) e Rejane por sempre estarem dispostos a ajudar durante todo o período da dissertação, e a todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos Amigos Alfredo, João Eudes, DUDA, Junior ceará, Adriana, Thiago, Erick, Carol e a todos os amigos do departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio e incentivo.

A Alba Tatiana Serafim do Nascimento que deu o apoio e carinho na hora certa, para a conclusão desta dissertação

A Enrik Barbosa de Almeida, mais que um amigo, um irmão presente em todos os momentos dando sempre apoio e incentivo.

LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
I INTRODUÇÃO.....	01
1.1 TOXICOLOGIA GERAL	01
1.1.1 ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO – REPRODUÇÃO E TERATOGENESE.....	01
1.2 DROGA E EMBRIÃO.....	05
1.3 TESTES TOXICOLÓGICOS.....	06
1.3.1 ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	07
1.3.2 ESTUDOS DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA.....	07
1.4 USO DE PLANTAS ATUALMENTE.....	08
1.5 ESTUDOS SOBRE O GÊNERO <i>MENTHA</i>	10
1.5.1 BOTÂNICO.....	10
1.5.2 QUÍMICO.....	12
1.5.3 FARMACOLÓGICO.....	13
1.5.4 TOXICOLÓGICO.....	16
1.6 MATERIAL BOTÂNICO	17
II OBJETIVO.....	18
2.1 GERAL.....	18
2.2 ESPECÍFICO.....	18
III MATERIAIS E MÉTODO.....	19
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	19
3.2. ANIMAIS.....	19
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	19
3.3.1 OBSERVAÇÕES GERAIS	19
3.3.2 TOXICIDADE AGUDA.....	20
3.3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTORA DE RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	20
3.3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS PRENHAS.....	21
3.3.4.1 TRATAMENTO DURANTE O PERÍODO GESTAÇÃO.....	21
3.3.4.2 TRATAMENTO COM EB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO.....	21
3.3.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE O PESO DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS.....	22
3.3.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	22
3.3.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE ÓRGÃOS.....	23
3.3.7.1 CORAÇÃO.....	25

3.3.7.2	RINS.....	26
3.3.7.3	CÉREBRO.....	26
3.3.7.4	GENITÁLIA ACESSÓRIA.....	26
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3.9	REAGENTES.....	27
IV	RESULTADOS.....	28
4.1	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	28
4.1.1	OBSERVAÇÕES GERAIS.....	28
4.1.2	TOXICIDADE AGUDA.....	28
4.1.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTORA DE RATAS.....	29
4.1.3.1	FÊMEA TRATADA COM EXTRATO BRUTO X MACHO NÃO TRATADO.....	29
4.1.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO SUB AGUDO DO EB SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS PRENHAS.....	33
4.1.4.1	TRATAMENTO DURANTE O PERÍODO GESTAÇÃO.....	33
4.1.4.2	TRATAMENTO COM EB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO.....	35
4.1.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EB SOBRE A FERTILIDADE DE RATOS.....	37
4.1.6	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE O PESO DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS.....	40
4.1.7	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	43
4.1.8	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS ÓRGÃOS.	47
4.1.8.1	CORAÇÃO.....	47
4.1.8.1.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	47
4.1.8.1.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	49
4.1.8.2	RINS.....	50
4.1.8.2.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	50
4.1.8.2.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	52
4.1.8.3	CÉREBRO.....	53
4.1.8.3.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	53
4.1.8.3.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	57
4.1.8.4	TESTÍCULOS E TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	57
4.1.8.4.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	57
4.1.8.5	OVÁRIOS E TUBA UTERINA.....	61
4.1.8.5.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	61
V	DISCUSSÃO.....	65
VI	CONCLUSÃO.....	74
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
VIII	APÊNDICE.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA I	Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: fêmea tratada (EB, 0,5g/kg/30dias, v.o.) x macho não tratado.....	31
TABELA II	Variáveis e reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: fêmea tratada (EB, 1,0g/kg/30dias, v.o.) x macho não tratado.....	32
TABELA III	Parâmetros reprodutivos de ratas tratadas durante a gestação (cerca de 22 dias) com EB 0,5g/kg/dia, v.o.....	34
TABELA IV	Valores de implantação e índice de reabsorção após administração do EB de <i>Mentha crispera</i> (0,5g/kg, v.o.) nos grupos controle e tratado durante as fases de fecundação (2º ao 7º dia), embriogênica (8º ao 14º dia) e fase fetal (15º ao 21º dia).....	36
TABELA V	Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: macho tratado (EB, 0,5g/kg/30dias,v.o.) x fêmea não tratada.....	38
TABELA VI	Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: macho tratado (EB, 1,0g/kg/30dias,v.o.) x fêmea não tratada.	39
TABELA VII	Valores dos pesos de órgãos (mg)/100g de peso do animal, após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com 1,0g/kg de EB pela via oral respectivamente em ratos de ambos os sexos.....	42
TABELA VIII	Valores dos parâmetros bioquímicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de <i>Mentha crispera</i> pela via oral em ratos machos adultos.....	43
TABELA IX	Valores dos parâmetros bioquímicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de <i>Mentha crispera</i> pela via oral em ratas adultas.....	44
TABELA X	Valores dos parâmetros hematológicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB (1,0g/kg) pela via oral em ratos machos adultos.....	45
TABELA XI	Valores dos parâmetros hematológicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB (1,0g/kg) pela via oral em ratos fêmeas adultas.....	46
TABELA XII	Critérios utilizados pela comunidade Européia na classificação de toxicidade.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Valores dos pesos corporais após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de <i>Mentha crispera</i> pela via oral em ratos fêmeas (A) e machos (B) adultos.....	41
FIGURA 2	Fotomicrografia de corte histológico transversal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	47
FIGURA 3	Fotomicrografia de corte transversal do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	48
FIGURA 4	Fotomicrografia de corte longitudinal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	48
FIGURA 5	Média da morfometria de fibras musculares do miocárdio de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	49
FIGURA 6	Fotomicrografia de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento prolongado com o EB (1,0g/kg, v.o, por 30 dias).....	50
FIGURA 7	Fotomicrografia de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	51
FIGURA 8	Resultados da morfometria da região cortical do rim de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	52
FIGURA 9	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	55
FIGURA 10	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	55
FIGURA 11	Fotomicrografias do córtex cerebral de ratos submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	56
FIGURA 12	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	56
FIGURA 13	Resultados da morfometria do córtex cerebral de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	57
FIGURA 14	Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	58

FIGURA 15 Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	58
FIGURA 16 Fotomicrografia do túbulo seminífero de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	59
FIGURA 17 Fotomicrografia do epidídimo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	60
FIGURA 18 Fotomicrografia do epidídimo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	60
FIGURA 19 Fotomicrografia do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	61
FIGURA 20 Fotomicrografia da região cortical do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	62
FIGURA 21 Fotomicrografia da região cortical do ovário da rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	62
FIGURA 22 Fotomicrografia dos corpos lúteos da rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	63
FIGURA 23 Fotomicrografia da tuba uterina com suas estruturas características de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	64

RESUMO

Neste trabalho procuramos avaliar a segurança no uso do extrato bruto (EB) da *Mentha crispera*, único ingrediente ativo do Giamebil Plus®. Para tal, foram realizados estudos de toxicologia pré-clínica. O EB administrado em camundongos e ratos por via oral (0,1 a 2,0g/kg) não produziu alterações comportamentais em ambas as espécies, contudo, por via i.p. mostrou-se tóxico provocando a morte em camundongos e ratos respectivamente de 100 e 80% dos animais após 48h de observação. Em ratos, os valores estimados da DL₅₀ (g/kg) de 24 horas por via i.p. foram 1,04 (0,98-1,09) e 0,63 (0,57-0,70) respectivamente para machos e fêmeas. Por via oral, não foi possível estimar a DL₅₀, pois não observamos mortes, até 4,0g/kg. Nos estudos de fertilidade em ratos de ambos os sexos, o tratamento com EB (0,5 e 1,0g/kg, v.o.), durante 30 dias antes do acasalamento não induziu alterações nos parâmetros: relação prole/mãe; índices de fertilidade (relação de ratas prenhas por acasaladas); gestação (percentagem de fêmeas prenhas com fetos vivos); viabilidade (percentagem de sobrevivida após quatro dias); lactação (percentagem de sobrevivida após 28 dias) e o peso dos filhotes no 1º e 28º dia e proporção macho e fêmea. Da mesma forma, pela avaliação dos mesmos parâmetros anteriores, o tratamento, durante o período de gestação (cerca de 22 dias), não produziu alterações no desenvolvimento embrionário como também no período pós-natal. Em outro Protocolo, o tratamento com EB (0,5g/kg, v.o.) nas fases de fecundação (1º ao 7º dia), embriogênica (8º ao 14º dia) e fetal (15º ao 21º dia) não modificou o número de implantes e reabsorvições em relação ao grupo controle. Não foram observadas alterações nos pesos úmidos e na morfologia macroscópica do coração, fígado, baço, rim, cérebro, pulmão, glândula adrenal, ducto deferente, testículo, ovário e útero, após a administração prolongada por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o.). Como também não ocorreram alterações na análise da microscopia e morfometria do coração, rim, córtex cerebral e genitálias acessórias. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos após tratamento com EB (1,0g/kg, v.o.) por 30 dias, não foram alterados. O conjunto dos resultados permite concluir que o EB da *Mentha crispera* apresenta baixa toxicidade por via oral e não produz efeitos tóxicos sobre a reprodução em ratos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the crude extract (CE) of *Mentha crispata*, the only active ingredient of Giamebil Plus® in pre-clinical toxicological studies. When EB was administered in mice and rats by the oral route (0,1 to 2,0g/kg) it did not produce behavioral changes in the two species, however it was administered intraperitoneally (i.p.) it showed itself to be toxic producing death in 100% of mice and 80% of rats after 48 hours of observation. In rats, the estimated values for DL₅₀ (g/kg) for 24h by i.p. were 1,04 (0,98-1.09) and 0,63(0,57-0,70) respectively for males and females. It was not possible to estimate the DL₅₀ for the oral route because no death were accounted for doses up to 4,0g/kg. In the fertility studies with rats of both sexes, treatment with CE (0,5 and 1,0g/kg orally) during 30 days before mating did not induce significant changes in the mother/offspring relation; in the fertility index (relation between pregnant and mated rats); in gestation (percentage of pregnant females with live fetus), in viability (percentage of survival after 28 days) and in the weight of the litters on the 1st and 28th day and in the proportion of male to female. In the same way in the rats the evaluation of the aforesaid parameters, the treatment during the gestation period (approximately 21days) did not produce changes in the embryonic as well as the period after birth. In another protocol, treatment with EB (0.5g/kg orally) in the fecundation (1st to 7th day), embryogenic (8th to 14th day) and fetal (15th to 21st day) did not changes were observed in the wet weights and in the macroscopic morphology of heart, liver, spleen, kidney, brain, lung, adrenal gland, duct, testicles, ovary and uterus, after administration that lasted 30 days with EB (1.0g/kg, v.o). Neither change were noticed in the microscopy of and morphology of heart, kidney, cerebral cortex and genital organs. No changes in biochemical and hematological parameters were observed after Treatment with EB (1,0/kg orally). The results lead us to conclude that *mentha crispata* presents low toxicity when used by the oral route does not produce any toxic effects on reproduction