

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
***Operculina alata* (Ham.) Urban**

Eduardo da Silva Gonçalves

RECIFE
2003

Eduardo da Silva Gonçalves

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Operculina alata* (Ham.) Urban

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-Orientador:
Prof. Dr. Parviz Afiatpour

RECIFE
2003

“Mas eu não quero me encontrar com gente louca”, observou Alice.

“Você não pode evitar isso”. Replicou o gato.

“Todos nós aqui somos loucos. Eu sou louco. Você é louca”.

“Como sabe que eu sou louca?”, indagou Alice.

“Deve ser”, disse o gato, “ou não teria vindo aqui”.

Lewis Carrol

“Alice no País das Maravilhas”

Agradecimentos

A Deus

Aos meus pais, Luiz Carlos Gonçalves e Maria da Silva Gonçalves, por todo o investimento e incentivos durante minha vida.

Aos meus irmãos Cacá e Erika.

Ao meu professor, orientador e amigo, Almir Gonçalves Wanderley, por me mostrar caminhos a escolher na pesquisa.

A Jamile Maciel Castro de Barros, por toda a compreensão e carinho.

A Enrik Barbosa de Almeida, pelo incentivo e apoio em horas decisivas.

A Gustavo Santiago Dimech, pela boa vontade e solicitude em seus atos.

A Erick Ramo da Silva, Irla Maria Vidal e Rejane por todo o auxílio e cumplicidade no dia a dia do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Compostos Bioativos.

Ao professor Haroldo Sátiro Xavier, pelo auxílio na elucidação de dúvidas.

Ao professor Parviz Afiatpour e a professora Maria do Carmo de Araújo Fraga pela orientação, auxílio e disponibilidade de seu laboratório para realização dos experimentos.

A Pesqueira, minha terra natal, pelas suas paisagens, seu clima, seu carnaval e pelos incentivos pouco ortodoxos de seu povo.

A Maria de Zé Preto, pelo apoio constante com os gestos mais simples.

A Luiz Paulino de Oliveira Júnior (*in memoriam*), por todas as nossas conversas e frases oportunas que, em momentos difíceis, me fizeram enxergar a vida de maneira mais simples.

ÍNDICE

	LISTA DE TABELAS.....	III
	LISTA DE FIGURAS.....	V
	RESUMO.....	VI
	ABSTRACT.....	VII
I	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	TOXICOLOGIA	1
1.2.1	TOXICOLOGIA AGUDA.....	1
1.2.2	TOXICOLOGIA.SUBCRÔNICA.....	2
1.3	REPRODUÇÃO E TERATOGENESE.....	2
1.4	DROGAS NA GESTAÇÃO.....	4
1.5	DROGA E O EMBRIÃO.....	5
1.6	BOTÂNICA.....	6
1.7	FITOQUÍMICA.....	7
1.8	FARMACOLOGIA.....	7
II	OBJETIVO.....	9
2.1	GERAL.....	9
2.2	ESPECÍFICO.....	9
III	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	10
3.2	ANIMAIS.....	10
3.3	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	10
3.3.1	OBSERVAÇÕES GERAIS.....	10
3.3.2	TOXICIDADE AGUDA.....	11
3.3.3	TRÂNSITO INTESTINAL.....	11
3.3.4	TRATAMENTO.COM EHAJB DURANTE O PERÍODO DA GESTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PROLE.....	11
3.3.5	VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS DA PROLE.....	12
3.3.6	TRATAMENTO COM EHAJB DURANTE A FASE EMBRIONÁRIA DA GESTAÇÃO..	13
3.3.7	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATOS.....	13
3.3.8	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	13
3.3.9	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A MASSA CORPORAL DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS.....	14
3.3.10	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS.....	14
3.3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
3.3.12	REAGENTES.....	16
IV	RESULTADOS.....	17

4.1	PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS	17
4.1.1	OBSERVAÇÕES GERAIS.....	17
4.1.2	TOXICIDADE AGUDA.....	17
4.1.3	TRÂNSITO INTESTINAL.....	17
4.1.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB NO PERÍODO DA GESTAÇÃO..	18
4.1.5	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB NO PERÍODO DA GESTAÇÃO SOBRE VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NA PROLE.....	21
4.1.6	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB NA FASE EMBRIONÁRIA DA GESTAÇÃO.....	22
4.1.7	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE A PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATOS.....	24
4.1.8	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	26
4.1.9	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	33
4.1.10	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE A MASSA CORPORAL DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS	41
4.1.11	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS.....	43
4.1.11.1	CORAÇÃO.....	43
4.1.11.2	CÉREBRO.....	44
4.1.11.3	FÍGADO.....	47
4.1.11.4	PULMÃO.....	49
4.1.11.5	RINS.....	50
4.1.11.6	OVÁRIO.....	51
4.1.11.7	TESTÍCULO.....	53
V	DISCUSSÃO.....	55
VI	CONCLUSÃO.....	63
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
VIII	ARTIGO.....	69
IX	APÊNDICE.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA I	Valores das massas corporais no início e ao final do período de prenhez de ratas, após tratamento por via oral com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) e água (grupo controle) durante 22 dias consecutivos.....	19
TABELA II	Parâmetros reprodutivos de ratas após tratamento por via oral com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) ou água (controle) durante 21-22 dias consecutivos.....	20
TABELA III	Efeito da administração oral do EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre o reflexo postural da prole de ratas tratadas durante o período da prenhez.....	21
TABELA IV	Efeito da administração oral do EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre o dia de abertura dos olhos, dia de andar adulto e ambulação da prole de ratas tratadas durante o período da prenhez.....	21
TABELA V	Efeito da administração oral do EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento na fase embriogênica (7º ao 14º dia) da prenhez.....	23
TABELA VI	Efeito do tratamento por via oral com EHAJB (25 a 625mg/kg) por 30 dias consecutivos sobre as variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).....	25
TABELA VII	Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos.....	27
TABELA VIII	Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos.....	28
TABELA IX	Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos.....	29
TABELA X	Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.....	30
TABELA XI	Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.....	31
TABELA XII	Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.....	32
TABELA XIII	Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos.....	35
TABELA XIV	Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos.....	36
TABELA XV	Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB	

	(25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos.....	37
TABELA XVI	Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas.....	38
TABELA XVII	Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultos.....	39
TABELA XVIII	Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultos.....	40
TABELA XIX	Efeito da administração oral por 90 dias de EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre a evolução da massa corporal de ratos de ambos os sexos.....	41
TABELA XX	Efeito da administração oral por 90 dias de EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre a massa dos órgãos (g/100g de animal) de ratos de ambos os sexos.....	42
TABELA XXI	Crítérios utilizados pela Comunidade Européia na classificação de toxicidade.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Efeito do EHAJB (62,5; 125, 250 e 500mg/kg) no trânsito intestinal de camundongos.....	18
FIGURA 2	Fotomicrografia de corte longitudinal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento por 30 dias com água destilada.....	43
FIGURA 3	Fotomicrografia de corte longitudinal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (25mg/kg, v.o).....	44
FIGURA 4	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias.....	46
FIGURA 5	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625mg/Kg, v.o.).....	47
FIGURA 6	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias.....	47
FIGURA 7	Fotomicrografia do fígado de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias.....	48
FIGURA 8	Fotomicrografia do fígado de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625m/kg, v.o).....	48
FIGURA 9	Fotomicrografia do pulmão.de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625m/kg, v.o).....	49
FIGURA 10	Fotomicrografia do pulmão de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625m/kg, v.o).....	50
FIGURA 11	Fotomicrografia do rim de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias.....	50
FIGURA 12	Fotomicrografia do rim de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (125m/kg, v.o).....	51
FIGURA 13	Fotomicrografia do ovário de rata controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias.....	52
FIGURA 14	Fotomicrografia do ovário de rata submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625m/kg, v.o).....	52
FIGURA 15	Fotomicrografia do testículo de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias.....	53
FIGURA 16	Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (125m/kg, v.o).....	54

RESUMO

A *Operculina alata* conhecida popularmente como Jalapa-do-Brasil, pertence à família das Convolvulaceae. Possui propriedades laxantes e catárticas. Apesar da sua ampla comercialização (Aguardente alemã®) na forma de extrato hidroalcoólico (EHA) existem raros estudos sobre sua segurança no uso. Para tal, foram realizados em ratos de ambos os sexos, ensaios de toxicidade aguda (DL₅₀) e avaliado o efeito da administração do EHA sobre a fertilidade (durante o período de gestação, desenvolvimento da prole, fase embriogênica da gestação e performance reprodutiva) e parâmetros bioquímico, hematológico e morfologia dos principais tecidos. Nossos resultados mostram que por via oral até 5,0g/kg o EHA não produziu morte. O tratamento durante a gestação com EHA (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) não alterou as variáveis reprodutivas: número de prole/mãe, índice de fertilidade (n° de ratas prenhas/n° de ratas acasaladas), índice de gestação (% de fêmeas prenhas com todos os fetos vivos), índice de viabilidade (% de sobrevivida após 4 dias), índice de lactação (% de sobrevivida após o 21° dia de nascimento/n° de nascimentos), massa corporal no 1° e 30° dia de vida, assim como, não modificou o perfil de comportamento da prole em relação ao grupo controle. O tratamento com EHA na fase embriogênica da prenhez, não alterou de forma significativa a massa corporal dos fetos em relação ao grupo controle. Na performance reprodutiva, o tratamento dos ratos por 30 dias com EHA, não modificou a massa corporal e dos principais órgãos, assim como, não alterou de forma significativa as variáveis reprodutivas descritas acima. O desenvolvimento (1° ao 30° dia) da massa corporal da prole não foi inibido. Os perfis bioquímico e hematológico após o tratamento crônico com EHA se mantiveram dentro dos valores de referência para a espécie, com pequenas variações pontuais. De forma similar, a análise histológica não revelou alteração celular, a exceção do pulmão, onde foi observado pequeno infiltrado inflamatório. O conjunto dos resultados sugere que o EHA de Jalapa-do-Brasil apresenta baixa toxicidade por via oral, não modifica a capacidade reprodutiva dos ratos de ambos os sexos. Não altera de forma significativa o desenvolvimento e comportamento pós-natal da progênie, assim como, os parâmetros bioquímicos e hematológicos e a morfologia dos tecidos.

ABSTRACT

The *Operculina alata* popularly known as Jalapa-do-Brasil, belongs to the family of Convolvulaceae. It possesses laxative and cathartic properties. In spite of its wide commercialization (Aguardente alemã®) in the form of hydroalcoholic extracts (HAE) there is little information available in the literature regarding its safety. For such reason, HAE of roots was studied on rats of both sexes, for acute toxicity (LD₅₀), appraised the effect on fertility (during the gestation period, development of the offspring, embryogenic phase of gestation and reproductive performance), biochemical, hematological parameters and finally the morphology of the main tissues. Our results demonstrate that oral administration of up to 5,0g/kg of HAE did not have lethal effect. The treatment of animals during the gestation period with HAE (25, 125 and 625mg/kg, p.o.) did not alter the reproductive variables: mother/offspring relation, fertility index (relation between pregnant and mated rats), gestation (percentage of pregnant females with live fetus), viability (percentage of survival after 4th days), lactation (percentage of survival after the 21th day of births/number of births), weight in the 1st and 30th day of animals life span, as well as, it did not modify the profile of behavior of the offspring in relation to the comparing control group. The treatment with HAE in the embryogenic phase of the pregnancy, did not affect significantly the corporal mass of the fetuses in relation to the control group, nor in the reproductive performance, the treatment of the rats for 30 days with HAE, modify the weight of the main organs, as well as, the reproductive variables described above, significantly. With daily administration of HAE, the development (1st to the 30th day) of the corporal mass of the offspring was not inhibited. The biochemical and hematological profiles after the chronic treatment with HAE stayed inside of the reference values for the species, with insignificant variations. In a similar way, the histological analysis did not reveal any cellular alteration, with the exception of the lung, where a small infiltrated inflammation was observed. Our results suggest that oral administration of HAE of Jalapa-do-Brasil presents low toxicity, it does not modify the reproductive capacity of the rats of both sexes. It does not alter significantly the development and after birth behavior of offsprings, as well as, the biochemical, hematological parameters and the morphology of the tissues.

I. INTRODUÇÃO:

1.1. TOXICOLOGIA

Toda a substância pode ser considerada como um agente tóxico em potencial, levando-se em consideração fatores de exposição como dose administrada ou absorvida, o tempo e a frequência de exposição (doses únicas ou múltiplas), via de administração (oral, inalatória, dérmica, parenteral). Em contrapartida estas substâncias podem ser usadas de forma segura mantendo-se as condições de exposição abaixo dos níveis de tolerância (CASTRO, J.A., 1993).

A capacidade de uma substância de causar dano grave ao organismo, ou, até mesmo a morte, é considerada como sua toxicidade. Isto ocorre apenas quando há uma interação do agente químico com o organismo implicando em efeitos ao nível tecidual e celular (DRAIZE, J.H., *et al.*, 1994).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), muito dos efeitos farmacológicos e tóxicos de drogas observados em animais podem ter elevado valor de aplicação na espécie humana, sendo explicado o largo uso de testes tanto no campo farmacológico quanto no toxicológico com o propósito de se determinar tanto a eficácia quanto segurança do uso destas drogas (WHO., 1978).

Os testes toxicológicos permitem estabelecer possíveis efeitos das substâncias em humanos que possam ser expostos a elas. Estes testes são feitos utilizando-se animais de laboratório em condições previamente estabelecidas (DELLA – ROSA, H.V., *et al.*, 1991).

1.2.1. TOXICIDADE AGUDA

Estudos de toxicidade aguda são feitos em curto espaço de tempo, permitindo caracterizar a relação dose-resposta, que tem como objetivo estimar um valor para um parâmetro conhecido como DL_{50} . Este representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em metade do número da população de animais em estudo, sendo útil para caracterizar a toxicidade relativa de uma substância (FOWLER, J.S.L.N. e RUTTY, D.A., 1983).

Estes estudos são feitos administrando-se dose única ou doses múltiplas dentro de um período de 24 horas. A via oral é indicada, mas outras vias de

administração podem ser escolhidas, levando-se em consideração o tipo de exposição humana a determinados agentes químicos (FOWLER, J.S.L.N. e RUTTY, D.A., 1983).

1.2.2. TOXICIDADE SUBCRÔNICA

Os principais objetivos dos testes de toxicidade subcrônica são o de estabelecer os níveis nos quais não mais se observam efeitos tóxicos, identificar, caracterizar os órgãos afetados e a severidade após exposições repetidas. Examina-se também, após o tratamento, se encontrados efeitos tóxicos, se foram em consequência do acúmulo ou não de substâncias no organismo (FAUSTMAN, E.M., *et al.*, 1994).

Para estes testes são utilizados apenas animais saudáveis, onde a via de administração preferencial é a oral e o tempo de tratamento pode ser de 21 a 60 dias. Os parâmetros observados diariamente durante o tratamento são modificações no consumo da ração, no peso dos animais, na cor e textura dos pêlos, alterações respiratórias e circulatórias, anormalidades motoras e de comportamento e aumentos macroscópicos de massas de tecidos (BARNES, D.G. e DOURSON, M., 1998).

Os animais são sacrificados ao término dos testes, onde órgãos e sangue são retirados para avaliações anátomo-patológica, bioquímica e hematológica. Estes parâmetros servem não apenas para caracterizar a relação dose-resposta, mas também a escolha de doses nos estudos de exposição crônica (BARNES, D.G. e DOURSON, M., 1998).

1.3. REPRODUÇÃO E TERATOGENESE

Estudos de desenvolvimento – reprodução e teratogênese – relacionados com o uso de drogas até 1962 não recebiam a devida importância pelos farmacologistas e toxicologistas, e não havia preocupação com os possíveis efeitos teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos de drogas usadas na fase de gestação. Após esta data, devido à tragédia, em decorrência do uso da talidomida, pesquisas tornaram-se rotina no estudo da segurança dos medicamentos (CLARK, D.O., 1993).

O estudo dos efeitos adversos no organismo em desenvolvimento, ocorrendo a qualquer hora durante a vida do organismo, que é resultado da exposição a agentes químicos ou físicos antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até a puberdade, é denominado como toxicologia do desenvolvimento (SCHWERTZ, B.A., et al., 1991).

As drogas podem interferir nos diversos processos de reprodução, não só causando malformações e matando o embrião, como também, bloqueando a gametogênese e evitando a fertilização. Os estudos das ações das drogas sobre as diversas fases do processo reprodutor visam identificar os efeitos sobre a fertilidade, o transporte e a implantação do ovo no útero, a embriogênese e a organogênese, o parto, o recém-nascido, a lactação, o desmame e o cuidado da mãe com a prole, anormalidades pós-natais, comportamento sexual, os ciclos estral e menstrual, ritmos de concepção e funções placentária e uterina (SCHWERTZ, B.A., *et al.*, 1991).

O período teratogênico maior situa-se na embriogênese, período este que, em ratos, está compreendido do 7º ao 15º dia de gestação. É neste período que se observa diferenciação sexual e organogênese. É possível também que o desenvolvimento no período pós-natal possa ser alterado em termos estruturais e metabólicos por compostos administrados no período pré-natal. Malformações podem ser causadas pela ação direta da droga sobre o feto, ou, secundariamente, através da ação sobre o organismo (MENEGOLA, E., *et al.*, 1998).

O período pré-natal caracteriza-se por intensa histogênese e citodiferenciação dos órgãos já formados sendo uma fase altamente vulnerável para o desenvolvimento microestrutural do cérebro e do sistema imunológico. Drogas administradas no período perinatal, no tratamento da gravidez de risco ou de neonatos de risco podem levar a mudanças no processo de desenvolvimento e iniciar desordens na rede neural e na comunicação celular. Estas alterações podem não ser evidentes no nascimento, mas servem de base para vários defeitos funcionais de competência neuro-psico-imunológica as quais se tornariam gradualmente evidentes durante o amadurecimento e na idade adulta (BENESOVÁ, O., 1995).

1.4. DROGAS NA GESTAÇÃO

Na gravidez e lactação a segurança quanto ao uso de drogas deve ser levada ao extremo. A transferência de drogas, através da placenta e leite é potencialmente deletéria para o embrião, feto ou lactente. Certas drogas, como os folatos e primaquina, podem penetrar na circulação fetal. A quinina em grandes doses pode provocar aborto. A pirimetamina em pequenas doses parece ser segura na gravidez, mas em doses elevadas tem risco potencial de lesão fetal teratogênica (BEDRAN., J.N., 1988).

A resposta do agente teratogênico é amplamente dependente do genótipo do embrião. A cortisona quando administrada em camundongos e ratos durante o período de prenhez pode causar 100% de palatosquese (fissura no palato) na prole de camundongos e nenhum defeito em ratos. A talidomida que induz malformações tão drásticas no homem, coelhos e macacos, não apresenta os mesmos efeitos quando administradas em camundongos e ratos. A resposta ao agente teratogênico pode levar a respostas diferentes para o lado do conceito no que diz respeito à frequência ou mesmo a anomalia produzida (GAYLOR, D.W. e CHEN. J.J., 1993; OGA, S., 1996).

Em relação à sensibilidade a agentes teratogênicos o período de gestação pode ser dividido em três estágios. O primeiro estágio compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto, chama-se também de período do “tudo ou nada”. Neste período que na espécie humana vai até o 17º dia de gestação e no rato, coelho e camundongo até o 5º dia, aproximadamente, encontra-se o embrião com células totipotentes, em divisão, sem que haja acréscimo citoplasmático. E é nesse período que, dependendo do número de células atingidas pelo agente teratogênico, ocorre ou a reposição de células atingidas por normais e como produto final da exposição em indivíduo normal ou se atingindo em grande número de células, a embriofetalidade (GAYLOR, D.W. e CHEN. J.J., 1993; OGA, S., 1996).

Após implantação o embrião inicia uma fase delicada, com intensa proliferação celular, movimento e deslocamento de massa celular e complicados sistemas de interação núcleo/citoplasma e intercelulares. Inicia-se então o chamado período organogênico, fase mais suscetível à ação de agentes teratogênicos e único período teratogênico da gestação. A sensibilidade do

organismo varia dependendo da espécie e, dentro da mesma espécie, encontra-se diferenças conforme o agente teratogênico. O tipo de malformação depende ainda da fase evolutiva do embrião e da afinidade do agente químico pelo tecido embrionário, sendo que para cada espécie existem períodos diferentes de sensibilidade (GAYLOR, D.W. e CHEN. J.J., 1993; OGA, S., 1996).

Cessado o período embrionário tem-se início o período fetal, caracterizado pela diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e aparelhos, além de um considerável crescimento ponderal do concepto. Agentes teratogênicos, administrados à mãe neste período de gestação não leva ao aparecimento de malformações, mas podem indubitavelmente interferir com processos de proliferação celular que resultam em alterações funcionais de importantes sistemas, tais como: sistema nervoso central, imunológico ou endócrino, além de causar retardo geral do desenvolvimento (GAYLOR, D.W. e CHEN. J.J., 1993; OGA, S., 1996).

1.5. DROGA E O EMBRIÃO

A droga após ser administrada é incorporada à circulação materna para só depois se difundir na circulação do embrião. Fatores como, a natureza da substância, a dose usada, condição de troca entre a mãe e o concepto, são de grande relevância. A placenta, que se encontra entre estes dois, atua intermediando essas trocas, ativa ou passivamente, como um órgão regulador. As substâncias que passam ficam armazenadas no concepto (GANAPATHY, V., *et al.*, 1999).

A placenta atua como uma barreira que tem tanto a capacidade de restringir como de facilitar a passagem de drogas para a circulação fetal. As drogas que têm a capacidade de atravessá-la têm as características semelhantes as que atravessam a barreira hematoencefálica, são substâncias lipofílicas, não polares e tamanho inferior a 1000Å (ADLER, T., 1994).

Na fase de ovulação o blastocisto tem de atravessar as trompas até chegar ao útero, ambos preenchidos por suas respectivas secreções. Drogas como o fenobarbital, o Δ^9 tetrahydrocannabinol e a fenitoína, por exemplo, têm a capacidade de alterar a composição destas secreções dificultando o transcurso do blastocisto (ADLER, T., 1994).

Após implantação do blastocisto no útero (nidação) sua nutrição passa a ser chamada de histiotrófica, onde a participação da circulação materna é modesta, mas os efeitos de drogas já difundidas nesta circulação são mais acentuados, pois, estas atingem diretamente os tecidos ovulares por meio de mecanismos como pinocitose, difusão facilitada, difusão simples, transporte ativo ou fissuras. Substâncias conhecidas, como por exemplo, isoniazida, cafeína, tiopental, DDT e nicotina, podem ser encontradas em concentrações duas vezes maiores no blastocisto do que na circulação materna (ADLER, T., 1994).

A barreira placentária tem também uma função metabólica, comparada a do fígado, onde muitas drogas são metabolizadas ao nível do trofoblasto. Reações de oxidação aromática são realizadas na placenta (ADLER, T., 1994).

O estudo da transferência placentária de substâncias estranhas tem como finalidade caracterizar os efeitos que estas possam exercer no feto. Por exemplo, a teratogenicidade da talidomida dá-se devido a metabólitos de natureza polar produzidos pela sua metabolização na placenta, estes que atravessam esta barreira alcançando o feto (ADLER, T., 1994).

1.6. BOTÂNICA

A *Operculina sp.* é uma planta pertencente à família Convolvulaceae, que é composta por 51 gêneros e 1800 espécies com distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Fazem parte desta família as espécies do gênero *Ipomoea*, que produzem a conhecida raiz tuberosa batata doce (JOLY., 1975).

A Jalapa é encontrada em regiões compreendida entre as Antilhas e o Brasil, além de regiões temperadas dos Andes Mexicanos entre 1500 e 2000 metros de altitude, em regiões lamacentas e de solo profundo. O principal centro de comércio deste vegetal era feito na cidade mexicana de Jalapa, de onde originou sua sinonímia mais conhecida. Na Europa é encontrada em algumas regiões, porém as condições climáticas são desfavoráveis (PLANCHON., 1937).

No Brasil é encontrada em vários estados recebendo assim diversos sinônimos populares, dentre os mais citados na literatura estão: Jalapa-do-Brasil, Batata-de-Purga (alusão a uma de suas utilizações populares, como laxante), Ipu (Minas Gerais), Purga de Amaro Leite (Goiás), Briônia da América, Jalapa de São Paulo, Escamonéia da América, Xalapa (PLANCHON., 1937).

A *Operculina alata Urban* é uma planta trepadeira de caule quadrangular, avermelhado e glabro. Folhas longo pecioladas, inteiras, grandes, glabras, de lobos agudos. Flores de corolas amarelas infundibulares, auxiliares, solitárias. Cápsula com sementes escuras e duras. São espécies silvestres, porém podem ser facilmente cultivadas, plantando-se suas sementes ou o tubérculo (BRAGA, R., 1976).

1.7 FITOQUÍMICA

Este vegetal produz uma resina que atua como um mecanismo de defesa contra insetos parasitas que devoram o amido dos seus tubérculos. Na constituição química da resina extraída com álcool encontra-se constituintes orgânicos e inorgânicos, podendo-se dividida-la em duas frações principais, uma solúvel em éter, chamada de jalapina, e outra não solúvel, a convolvulina (SHELLARD., 1958).

A raiz da Jalapa em rodela, secas à sombra, a resina, a fécula, chamada de goma de batata, ainda mais as sementes, torrefatas e em infusão, também são aplicadas na hidropsia, sífilis e como preventivo de todas as doenças do aparelho digestivo. As mães sertanejas costumam dar diariamente as crianças uma pitada de goma de batata no leite, na papa ou no chá, no período da dentição, para evitar as diarreias e erupção da pele. As raízes de batata de purga constituem o mais poderoso catártico usado pela população rural (BRAGA, R., 1976).

Análises fitoquímicas descrevem a presença de saponinas, amido, sistosterina-glicosídeo conhecida como ipuranol, fistosterina, mucilagem, manitol, ácido palmítico, málico e caféico, substâncias oleosas, odorantes e resinosas numa quantidade de 15 a 18%, esta composta por 80% de convolvulina e 20% de jalapina. (TESKE, M. e TRENTTINI, A.M.M., 1997).

1.8. FARMACOLOGIA

A Jalapa-do-Brasil exerce sua ação purgativa no intestino delgado aumentando o peristaltismo e facilitando a evacuação, podendo ser classificada como um laxante estimulante drástico. Esta ação é devido ao elevado teor de resina presente no tubérculo. Esta resina tem na sua constituição glicosídeos, os

quais na presença da bile hidrolisam-se em açúcar e aglicona liberando o ácido graxo livre correspondente. Os ácidos graxos livres irritam a mucosa intestinal, aumentando o peristaltismo e facilitando a evacuação (TESKE, M. e TRENTTINI, A.M.M., 1997).

A eliminação acentuada de água devido à irritação intestinal pode levar a desidratação rapidamente, podendo ser um efeito favorável no caso de edemas (COSTA., 2000).

Os laxativos estimulantes são classificados em três grupos: (1) antraquinônicos, semelhantes aos da Sena (*Cassia angustifolia*), Aloe (*Aloe Vera*, *Aloe berbadensis*, *Aloe vulgaris*, *Aloe humilis*) e dantron; (2) derivados polifenóis, semelhante ao da fenolftaleína, bisacol, picossulfato de sódio e (3) uma miscelânea de componentes, como no óleo de rícino, glicerol e docusato de sódio ou cálcio (BRIEJER, M.R., *et al*, 1999).

A Sena possui derivados do antraceno (ex: emodina) em combinação com açúcares formando glicosídeos. A droga passa de modo inalterado para o cólon, onde as bactérias hidrolisam a ligação glicosídica, liberando os derivados do antraceno livre, que são absorvidos e exercem efeitos estimulantes diretos sobre o plexo mioentérico, resultando em atividade da musculatura lisa (defecação) (SPILLER, R., 1990).

Um dos ácidos esterificados com glicerol presente no óleo de rícino é o ácido ricinoléico, que é um análogo hidroxilado do ácido oléico. O ácido ricinoléico age sobre a mucosa intestinal permitindo o movimento do intestino delgado em direção a luz intestinal (REYNOLDS, J. C., 1990).

Os laxantes antraquinônicos incluem os glicosídeos de derivados de 1,8 – diidroxiantraquinona (dantron) que além de ser encontrado na Sene e no Aloe, também é encontrado na Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana*) (MORI., *et al.*, 1985).

As preparações que contêm dantron foram retiradas do mercado por causa da sua associação com o surgimento de tumores hepáticos e intestinais em animais experimentais (MORI., *et al.*, 1986).

Os glicosídeos de origem natural embora possam diferir neste aspecto seu uso crônico não é recomendado (DUFOUR, P. e GENDRE, P., 1988).

Embora o mecanismo de ação farmacológico da resina da Jalapa-do-Brasil esteja classificado como laxante irritante, até então não há estudos

conclusivos que classifiquem as substâncias constituintes dos grupos químicos encontrados em algumas triagens fitoquímicas. Estudos posteriores de identificação destes componentes podem dar o suporte fitoquímico para a farmacologia classificar, segundo BRIEJER, M.R., *et al*, 1999, em que grupo a resina da Jalapa-do-Brasil pode se enquadrar.

Comercialmente, a Jalapa-do-Brasil (Aguardente alemã®) é explorada na forma de tintura por sua atividade laxante através do laboratório SOBRAL-PI. Como revelado na introdução, existe uma profunda carência de estudos farmacológicos e toxicológicos em relação a *Operculina alata*, apesar da sua ampla comercialização como fitoterápico. Nesse sentido, pareceu-nos atraente avaliar sua possível atividade tóxica, na forma de extrato hidroalcoólico (EHA), seguindo as diretrizes básicas das normas para estudo (Portarias 116/1996 e 17/2000) da toxicidade e eficácia de produtos fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

II - OBJETIVO

2.1- Geral

Avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico da Jalapa do Brasil (*Operculina alata*).

2.2 - Específico

Estimar o valor de DL₅₀ em ratos por via oral, após administração do extrato hidroalcoólico da Jalapa do Brasil (EHAJB).

Investigar o efeito da administração prolongada do EHAJB durante o período da gestação em ratas e desenvolvimento da prole.

Estudar o efeito da administração sub-crônica do EHAJB sobre a performance reprodutiva de ratos e desenvolvimento da prole.

Avaliar o efeito da administração crônica do EHAJB sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos.

Avaliar o efeito da administração prolongada do EHAJB sobre a morfologia dos tecidos.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – MATERIAL BOTÂNICO

O material utilizado foi fornecido pelo Laboratório SOBRAL ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos do Depto. de Ciências Farmacêuticas da UFPE. Esse foi classificado e identificado pelo Herbário Dárdano de Andrade Lima, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), sob o número 58836. Os fragmentos do tubérculo da Jalapa foram selecionados, limpos e macerados a 10% com solução extratora hidroalcoólica a 40% por sete dias. Ao final desse período o extrato fluido foi filtrado, concentrado em rota-evaporador e determinado o teor de resina. Nos experimentos descritos a seguir os teores de resina dosados variaram entre 11,5 a 21,9%.

O extrato foi armazenado em geladeira (-4°C) e dividido em pequenas alíquotas para uso nos procedimentos experimentais. Quando necessário o material foi diluído em água destilada.

3.2 – ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus entre 3-5 e 2-4 meses de idade respectivamente para machos e fêmeas e camundongos (*Mus musculus*) adultos de ambos os sexos, criados no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos em condições controle de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (22-25°C).

3.3- PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1- OBSERVAÇÕES GERAIS

Os efeitos gerais do EHAJB nas doses de 0,1 a 2,0g/kg por v.o. foram observados em ratos e camundongos de ambos os sexos. Os animais foram distribuídos em grupos de 6-8 animais privados de ração por 12 horas, na qual,

os grupos controles receberam água destilada no maior volume. Após a administração, os animais foram observados atenciosamente por 3h, numa superfície plana e cercada e em seguida foram transferidos para suas respectivas gaiolas e observados a intervalos regulares por 96 horas. Efeitos tais como: movimentos estereotipados, deambulação, depressão, diarreia, frequência respiratória, entre outros, foram observados e anotados segundo a tabela de MALONE (1977), vide anexo.

3.3.2 - TOXICIDADE AGUDA.

O EHAJB foi administrado em doses crescentes (0,625; 1,25; 2,5 e 5,0g/kg) por v.o. em ratos de ambos os sexos (n=10/grupo) privados de ração por 12 horas. A mortalidade em cada grupo foi observada por até 14 dias e o valor da DL₅₀ foi estimado segundo o método de MILLER, L.C., e TAINTER, M.L. (1944).

3.3.3 – TRÂNSITO INTESTINAL

Seis grupos de camundongos (n= 7-10 por grupo), mantidos em jejum por 12 horas antes da administração foram tratados por via oral com EHAJB (62,5; 125, 250 e 500mg/Kg) e salina 0,9% (controle) e por via subcutânea com fisostigmina (1µg/kg). Após 60 minutos do tratamento, foi administrado por via oral a todos os animais uma suspensão de carvão ativado (10%, 0,1mL/10g) e 30 minutos depois, os animais foram sacrificados por anestesia etérea profunda. Em seguida, o estômago e o intestino delgado foram removidos e determinados o comprimento total do intestino (da região gastropilórica até a junção ileocecal) e a distância percorrida pelo carvão do piloro à última porção do intestino que continha pelo menos de 1cm contínuo de carvão (STICKNEY, J.C. e NORTHUP, D.W. 1959). Os resultados foram expressos em percentagem do percurso do marcador em função do comprimento total do intestino (100%).

3.3.4 - TRATAMENTO COM EHAJB DURANTE O PERÍODO DA GESTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PROLE.

Quatro grupos de ratas (adultas e virgens), foram submetidos ao acasalamento na proporção 1:2 ou 1:3 macho/fêmea e em seguida tratadas por via oral com água destilada (controle, n=16) e EHAJB 25, 125 e 625mg/kg (n=13) a partir da confirmação da presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, por microscopia óptica (1º dia de gestação) até a gestação a termo (PAUMGARTTEN, F.J. *et al.*, 1998). Durante o tratamento diário foram observados a atividade geral dos animais e determinados o consumo de ração, água e peso dos animais no início e ao final da gestação. Após o nascimento da prole foram determinadas as variáveis reprodutivas: número de prole/mãe, índice de fertilidade (nº de ratas prenhas/nº de ratas acasaladas), índice de gestação (% de fêmeas prenhas com fetos vivos), índice de viabilidade (% de sobrevivida após 4 dias), índice de lactação (% de sobrevivida após o 21º dia de nascimento/nº de nascimentos), peso corporal no 1º e 30º dia, atividade geral da prole e observados aspectos macroscópicos externos, (ELBETIEHA, A. *et al.*, 1998), os quais, foram comparados com o grupo controle.

3.3.5 – VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS DA PROLE

Após o nascimento, um terço da prole foi avaliada nos grupos controle e tratado nas variáveis: reflexo postural, obtidos no 1º e 7º dia de vida da prole, o filhote foi colocado sobre uma superfície plana em decúbito dorsal e medido em segundos o reflexo de endireitamento, dia de abertura dos olhos, a partir do 7º dia do nascimento, os olhos dos filhotes foram observados diariamente, sendo a abertura determinada pelo deslocamento parcial da fissura palpebral em pelo menos um olho, dia de andar adulto, foi considerado andar adulto quando o filhote ambulava sem arrastar as patas traseiras e sem encostar o ventre no chão e finalmente ambulação, realizada no 20º dia, utilizando-se de um quadrado delimitado medindo 30 x 30cm dividido em nove espaços iguais, o filhote foi colocado na divisão central e por dois minutos, contava-se o número de quadrados invadidos (CARLINI, E.A. *et al.*, 1988). Foi considerada invasão do quadrado, a colocação de, pelo menos, três patas sobre a área do quadrado. As variáveis determinadas foram utilizadas para verificar possíveis ações deletérias sobre o desenvolvimento comportamental e/ou neurológico da prole.

3.3.6 – TRATAMENTO COM EHAJB DURANTE A FASE EMBRIONÁRIA DA GESTAÇÃO

Após a confirmação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal por microscopia ótica, quatro grupos de ratas (n=7-10/grupo) foram tratados por via oral respectivamente com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) e água (controle) durante a fase II ou embrionária correspondendo do 7º ao 14º dia de gestação (ALMEIDA, E.R. et al., 2000). No 19º dia de prenhez, as ratas foram sacrificadas por inalação excessiva de éter e após laparotomia, determinado os números de implante e reabsorção e observado a presença ou não de malformação fetal.

3.3.7 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATOS

Quatro grupos (n=6/grupo) de ratos foram tratados respectivamente com EHAJB 25, 125 e 625mg/kg e água destilada (controle) durante 30 dias consecutivos. Em seguida, acasalados com fêmeas (n=15/grupo) virgens, na proporção 1:2 ou 1:3 até o sucesso da cópula (presença de espermatozóides no esfregaço vaginal). No período, a massa corporal foi registrada a cada semana, assim como, a atividade geral dos animais. Após o nascimento da prole, foram determinadas as mesmas variáveis reprodutivas descritas no item 3.3.4.

3.3.8 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS

Oitenta animais correspondendo a quatro grupos de ambos os sexos (n=10/grupo) foram tratados durante 90 dias consecutivos pela v.o. com EHAJB 25, 125 e 625mg/kg ou água destilada (controle). A cada 30 dias procedeu-se à coleta de sangue (cerca de 2,5mL) por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, nos animais anestesiados com éter. A coleta foi obtida com os animais privados de ração por 12h. Em seguida, o sangue foi processado

para determinação do hemograma (analisador de células hematológicas Coulter STKS) e os parâmetros bioquímicos: glicose (plasma): enzimático colorimétrico; creatinina (soro): cinética enzimática; transaminases (soro): cinética enzimática; colesterol total (soro): enz. colest. oxidase/peroxidase; triglicerídeos (soro): GPO-PAP – enzimático colorimétrico; fosfatase alcalina (soro): cinético enzimático; bilirrubinas (soro): Mallou-Evelyn e proteínas totais e frações (soro): biureto/VBC, através do aparelho Dimension (Date Behring) (COELHO, M.G.P., *et al.*, 2001).

3.3.9- INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A MASSA CORPORAL DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS

A partir do experimento anterior, no final dos 90 dias de tratamento, quatro grupos (n=9/grupo) de ratos de ambos os sexos foram sacrificados por anestesia com éter e os órgãos: coração, fígado, baço, rim, pulmão, glândula adrenal, ducto deferente e testículo foram identificados, removidos e determinado sua massa úmida em balança analítica (VIJAYALAKSHMI, T., *et al.*, 2000).

3.3.10 - INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS.

Foram utilizados 48 ratos, subdivididos nos grupos: controle macho (n=6) e fêmea (n=6) e tratado por via oral com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) macho (n=6) e fêmea (n=6) durante 30 dias consecutivos. Ao final desse período, os animais foram anestesiados com éter e perfundidos (inicialmente, com solução de NaCl em tampão fosfato de sódio a 0,05M e, em seguida, com solução fixadora de formaldeído a 10%, em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4) através de catéter inserido no ventrículo esquerdo. Após a perfusão, os tecidos foram cuidadosamente retirados e imersos em líquidos de Bouin (obtido a partir do ácido pícrico saturado, formol puro e ácido acético glacial) utilizando-se 10x o volume e fixados “*in totum*” durante 48 horas, à temperatura ambiente. Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina (LISON, L., 1960; MICHALANY, J., 1980) conforme o que segue descrito abaixo:

DESIDRATAÇÃO: álcool etílico em ordem crescente

álcool a 70% - de um dia para o outro (até 24h) – renovado 3 vezes

álcool absoluto (100%) I – 1 hora e 30 minutos

álcool absoluto (100%) II – 1 hora e 30 minutos

DIAFANIZAÇÃO: Dois banhos de xilol de 1 hora cada

xilol I – 1h e xilol II – 1h

IMPREGNAÇÃO: Parafina líquida – estufa a 57- 60° C – dois banhos de 1 hora cada. Parafina I – 1h e Parafina II – 1h.

INCLUSÃO: Foi realizada inclusão em parafina a temperatura ambiente de um dia para outro.

Com o material incluso em parafina, foram obtidos cortes com espessura de aproximadamente 7µm, em um micrótomo Leica RM 2025, utilizando-se navalhas descartáveis da marca Jung. Após a microtomia, as preparações foram colocadas rapidamente em banho-maria para estiramento dos cortes, e foi obtida a pescagem com uma lâmina de vidro, limpa e besuntada com albumina. Logo após a pescagem, procedeu-se à secagem do material em estufa com temperatura em torno de 37°C, durante 24 horas. A seguir, as preparações foram desparafinadas e hidratadas para serem submetidas à coloração pelo método H.E. (LISON, L., 1960).

DESPARAFINAR: Dois banhos de xilol

xilol I - 5 min e xilol II - 5 min

HIDRATAÇÃO: Álcool etílico em ordem crescente, até chegar na água

álcool absoluto (100%) - 3 min

álcool a 90% - 3 min, álcool a 70% - 2 min e água corrente – 10 min

COLORAÇÃO:

hematoxilina - 1 min, água corrente - 10 min e eosina - 3 min

A seguir as preparações sofreram nova desidratação e diafanização para montagem em Bálsamo do Canadá.

DESIDRATAÇÃO:

álcool a 70% - 2 min, álcool a 90% - 2 min, álcool absoluto (100%) - 2 min e álcool absoluto (100%) - 2 min

DIAFANIZAÇÃO: Dois banhos de xilol

xilol I - 2 min e xilol II - 2 min

MONTAGEM DA LÂMINA:

Meio de montagem: Bálsamo do Canadá

Secagem da lâmina: Estufa a 60°C durante 24 horas

Nas lâminas coradas e montadas foram observados e fotografados vários campos em microscópio Zeiss, com objetivas de 5x, 10x, 20x, e 40x.

3.3.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão das médias, exceto para a DL₅₀. As diferenças entre os grupos foram analisadas, através do programa Primer versão 1.0 da McGraw-Hill (1998). Foram usados os testes de comparação de proporções (índices de fertilidade, gestação, viabilidade e lactação), Qui-quadrado (índice de reabsorção) e Análise de Variância, seguido por Newman-Keuls (relação prole/mãe, massa, valores de bioquímica, hematologia). O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5%.

3.3.12 - REAGENTES

Álcool etílico, P.A., ácido pícrico, xilol - Merck, acético glacial P.A. - Vetec, coulter clenz, isoton, scater pak - Coulter, eosina, hematoxilina - Sigma, éter etílico, formaldeído puro, cloreto de sódio, fosfato diácido de sódio - Reagen e Kits bioquímica - Dade Behring.

IV RESULTADOS

4.1 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1.1 - OBSERVAÇÕES GERAIS

A administração do EHAJB (0,1 a 2,0g/kg) por via oral em ratos não promoveu nenhuma alteração na atividade geral dos animais em relação ao grupo controle que recebeu água. Não houve registro de nenhuma morte.

4.1.2 - TOXICIDADE AGUDA

Via Oral: O EHAJB nas doses de 0,625 a 5,0g/kg não produziu morte em ratos de ambos os sexos por um período de até 14 dias de observação, dessa forma não foi possível estimar o valor de DL₅₀.

Os resultados obtidos a partir de observações gerais e toxicidade aguda apontam inicialmente que o EHAJB possui baixa toxicidade por via oral.

4.1.3. – TRÂNSITO INTESTINAL

Na figura 1, como pode ser visto, excetuando-se o grupo que recebeu menor dose do extrato, todos os demais produziram aumento significativo, na velocidade do trânsito intestinal em relação ao grupo controle.

No grupo controle (salina 0,9%) o deslocamento da suspensão de carvão foi de $74,1 \pm 2,2\%$ (n=10), nos grupos tratados com EHAJB (62,5; 125, 250 e 500mg/kg) as distâncias percorridas foram respectivamente de $74,1 \pm 3,4\%$ (n=7); $89,5 \pm 1,4\%$ (n=7); $88,6 \pm 4,2$ (n=7) e $89,1 \pm 3,3\%$ (n=7) e no grupo fisostigmina (1µg/kg) $91,2 \pm 2,1$ (n=10).

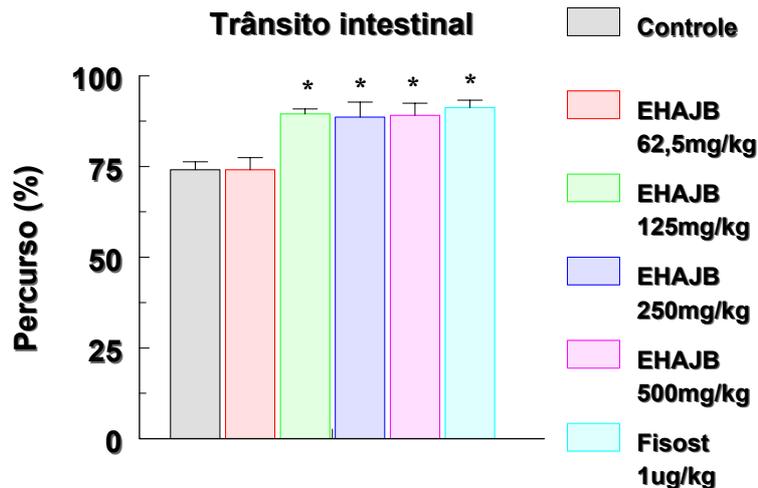


FIGURA 1: Efeito do EHAJB (62,5; 125, 250 e 500mg/kg) no trânsito intestinal de camundongos.

As linhas verticais representam um e.p.m. para 7-10 animais.

* indica estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.1.4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB NO PERÍODO DA GESTAÇÃO

Na tabela I estão expressos as massas no início e ao final do período de gestação.

Nos grupos que receberam EHAJB (25, 125 e 625mg/kg), o aumento de massa corporal ao final do período de gestação foi respectivamente de 22,6; 24,4 e 26,3%, o qual, não foi significativamente diferente do grupo controle 28,4%.

TABELA I: Valores das massas corporais no início e ao final do período de prenhez de ratas, após tratamento por via oral com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) e água (grupo controle) durante 22 dias consecutivos.

Gestação	Início	Final	Δ final - inicial
Controle	208,3 ± 5,4g	267,4 ± 7,4g	59,1g
EHAJB (25mg/kg)	213,4 ± 4,9g	261,6 ± 9,1g	48,2g
EHAJB (125mg/kg)	218,2 ± 6,0g	271,4 ± 7,8g	53,2g
EHAJB (625mg/kg)	203,7 ± 6,5g	257,3 ± 8,4g	53,6g

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de respectivamente 16, 11, 11 e 13 animais.

Na tabela II vê-se que os parâmetros de reprodução não diferiram estatisticamente do grupo controle.

A atividade geral dos grupos durante o período de gestação não foi modificada. No grupo controle, decorrido o período de gestação as 16 ratas fecundaram 138 filhotes ou cerca de 8,6 filhotes por rata. Ao final do quarto dia de vida registramos 9 mortes.

No grupo tratado com EHAJB 25mg/kg, a duração da gestação, foi similar à observada com o grupo controle. As 11 ratas geraram 89 filhotes ou cerca de 8,1 filhotes por rata. Ao final do quarto dia de vida registramos 11 mortes.

No grupo tratado com EHAJB 125mg/kg, a duração da gestação, não foi estatisticamente diferente do que à observada com o grupo controle. As 11 ratas procriaram 88 filhotes ou cerca de 8,0 filhotes por rata. Ao final do quarto dia de vida registramos 10 mortes.

No grupo tratado com EHAJB 625mg/kg, a duração da gestação, foi semelhante à observada com o grupo controle. As 13 ratas fecundaram 111 filhotes ou cerca de 8,5 filhotes por rata. Ao final do quarto dia de vida registramos 13 mortes.

A análise da prole dos grupos controle e tratado não mostraram à presença de natimorto e malformação ou alteração macroscópica externa.

TABELA II: Variáveis reprodutivas de ratas após tratamento por via oral com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) ou água (controle) durante 21-22 dias consecutivos.

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS	CONTROL E	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Duração da gestação (dias)	22,4 ± 0,2	21,1 ± 0,9	22,7 ± 0,8	21,2 ± 0,6
Prole/Mãe	8,6 ± 0,6	8,1 ± 1,1	8,0 ± 1,0	8,5 ± 0,9
Índice de Fertilidade (ratas prenhas/ratas acasaladas)	100%	84,6%	84,6%	100%
Índice de Gestação (% de fêmeas prenhas com todos os fetos vivos)	100%	100%	100%	100%
Índice de Viabilidade (% de sobrevivência após 4 dias)	93,5%	87,7%	88,6%	88,3%
Índice de Lactação (% sobrevivência no 21ºd/nº de nascimento)	93,5%	87,7%	88,6%	88,3%
Peso corporal 1º dia	6,4 ± 0,1	6,5 ± 0,3	6,4 ± 0,3	6,45 ± 0,3
Peso corporal 30º dia	91,2 ± 7,0	98,1 ± 3,1	98,8 ± 4,0	103,1 ± 9,2

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de respectivamente 16, 11, 11 e 13 animais.

4.1.5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB NO PERÍODO DA GESTAÇÃO SOBRE VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NA PROLE

Nas tabelas abaixo, pode-se verificar que não houve diferenças estatísticas na recuperação do reflexo postural, dia de abertura dos olhos e dia de andar adulto, assim como, na ambulação da prole entre os grupos controle e tratado.

TABELA III: Efeito da administração oral do EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre o reflexo postural da prole de ratas tratadas durante o período da prenhez.

	1º dia	7º dia
Controle	13,7 ± 3,2 seg	2,2 ± 0,5 seg
EHAJB (25mg/kg)	14,5 ± 2,9 seg	2,6 ± 0,3 seg
EHAJB (125mg/kg)	15,4 ± 2,7 seg	1,7 ± 0,4 seg
EHAJB (625mg/kg)	12,8 ± 3,0 seg	2,1 ± 0,3 seg

Os valores mostram as médias ± e.p.m. de respectivamente 46, 30, 30 e 37 filhotes.

TABELA IV: Efeito da administração oral do EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre o dia de abertura dos olhos, dia de andar adulto e ambulação da prole de ratas tratadas durante o período da prenhez.

	Dia de abertura dos olhos	Dia de andar adulto	Ambulação
Controle	14,7 ± 0,4 dia	14,3 ± 0,2 dia	23,0 ± 4,5
EHAJB (25mg/kg)	15,3 ± 0,3 dia	14,7 ± 0,3 dia	19,8 ± 3,2
EHAJB (125mg/kg)	15,7 ± 0,4 dia	14,0 ± 0,2 dia	22,5 ± 2,8
EHAJB (625mg/kg)	14,9 ± 0,2 dia	15,3 ± 0,4 dia	21,5 ± 3,6

Os valores mostram as médias ± e.p.m. de respectivamente 46, 30, 30 e 37 filhotes.

4.1.6 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB NA FASE EMBRIONÁRIA DA GESTAÇÃO.

Como pode ser observado na tabela V, o tratamento com EHAJB não alterou de forma estatisticamente significativa as variáveis reprodutivas analisadas em relação ao grupo controle.

Nossos dados mostram que nos grupos tratados com EHAJB (25; 125 e 625mg/kg) o ganho de massa corporal até o 20º dia de prenhez foram respectivamente de 46,20; 43,41 e 51,33% os quais, não foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle 40,96%.

A atividade geral, assim como, o consumo de água e alimento das fêmeas não foi modificado pelo tratamento.

Após laparotomia realizada antes da gestação a termo, não observamos entre os grupos a presença de natimortos, assim como, ao exame macroscópico externo nenhuma malformação foi detectada.

Não houve diferença estatística (qui-quadrado) no índice de reabsorção entre os grupos controle e tratado.

TABELA V: Efeito da administração oral do EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento na fase embriogênica (7^o ao 14^o dia) da prenhez.

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS	CONTROLE	EHAJB (25mg/kg)	EHAJB (125mg/kg)	EHAJB (625mg/kg)
Massa das mães (Δ final – inicial, g)	79,9 \pm 6,7	92,0 \pm 9,9	81,0 \pm 12,1	101,7 \pm 9,6
Número de fetos vivos	154	101	83	103
Número de fetos mortos	0	0	0	0
Relação feto/mãe	9,6 \pm 0,7	11,2 \pm 0,6	11,9 \pm 0,8	10,3 \pm 0,4
Massa dos fetos (g)	3,5 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	3,6 \pm 0,3
Massa das placentas (g)	0,54 \pm 0,04	0,46 \pm 0,01	0,47 \pm 0,01	0,51 \pm 0,03
Número de implantação	154	101	83	103
Número de reabsorção	11	3	4	3
Índice de reabsorção (%)	7,1	3,0	4,8	2,9

O número de ratas usadas foram respectivamente 16, 9, 7 e 10 ratas.

Massa das mães: diferença de massa corporal no início e ao final do período de prenhez.

Índice de reabsorção = número de reabsorções x 100/número de implantes

4.1.7. - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE A PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATOS

A tabela VI mostra que as variáveis reprodutivas não foram significativamente diferente do grupo controle.

O tratamento dos ratos com EHAJB 25; 125 e 625mg/kg durante 30 dias consecutivos não modificaram sua atividade geral, consumo de água, alimento e temperatura corporal em relação ao grupo controle. O ganho de massa corporal ao final do tratamento, respectivamente 21,2; 19,2 e 18,7% não foram estatisticamente diferente do obtido com o grupo controle 20,3%.

Nas fêmeas acasaladas não observamos alteração na atividade comportamental, consumo de alimento, água e temperatura corporal. A diferença de massa corporal (final – início) na prenhez, para o EHAJB 25, 125 e 625mg/kg foram respectivamente $61,4 \pm 5,8g$; $56,2 \pm 6,0g$; $52,9 \pm 7,7g$, as quais, não foi estatisticamente diferente do controle $55,2 \pm 9,3g$. De forma similar, não observamos diferença estatística na duração da gestação para o EHAJB $21,9 \pm 0,7$ dia; $22,3 \pm 0,4$ dia; $22,5 \pm 0,6$ dia em relação ao grupo controle $21,1 \pm 0,5$ dia.

No grupo controle, 15 ratas geraram um total de 151 filhotes vivos ou cerca de 10 filhotes por rata. Não observamos nascimento de nenhum natimorto na prole. A análise macroscópica externa da prole não mostrou nenhuma malformação.

Nos grupos tratados com EHAJB 25, 125 e 625mg/kg, as ratas procriaram respectivamente 106, 136 e 123 filhotes vivos ou cerca de 8,8, 12,4 e 9,5 filhote por rata. Não registramos a presença de nenhum natimorto na prole. A análise macroscópica externa dos filhotes também não revelou nenhuma malformação. Durante o período de desenvolvimento (1º ao 21º dia) também não detectamos nenhuma morte na prole. A massa corporal determinada no período, não foi estatisticamente diferente da observada com o grupo controle.

TABELA VI: Efeito do tratamento por via oral com EHAJB (25 a 625mg/kg) por 30 dias consecutivos sobre as variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos do grupo tratado (macho tratado x fêmea não tratada) e grupo controle (macho e fêmea não tratados).

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS	CONTROL	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
	E			
Prole/Mãe	10,1 ± 0,8	8,8 ± 0,8	12,4 ± 1,0	9,5 ± 0,9
Índice de Fertilidade (ratas prenhas/ratas acasaladas)	15/15 (100%)	12/15 (80%)	11/15 (73,3%)	13/15 (86%)
Índice de Gestação (% de fêmeas prenhas com todos os fetos vivos)	100%	100%	100%	100%
Índice de Viabilidade (% de sobrevivida após 4 dias)	100%	100%	100%	100%
Índice de Lactação (% sobrevivida no 21ºd/nº de nascimento)	100%	100%	100%	100%
Peso corporal 1º dia	6,1 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,2 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Peso corporal 4º dia	9,0 ± 0,2	9,2 ± 0,5	8,9 ± 0,2	9,2 ± 0,3
Peso corporal 7º dia	13,9 ± 0,6	14,8 ± 1,2	12,8 ± 0,5	14,4 ± 0,6
Peso corporal 14º dia	25,6 ± 0,9	26,6 ± 1,3	25,8 ± 1,0	29,1 ± 0,5
Peso corporal 21º dia	47,5 ± 1,7	43,3 ± 2,	45,0 ± 1,3	46,3 ± 1,6

Os valores representam as médias \pm erro padrão das médias de respectivamente 15, 12, 11 e 13 animais.

4.1.8.- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.

As tabelas VII, VIII e IX mostram que o tratamento prolongado com EHAJB nos ratos machos não modificou o perfil bioquímico, todos os parâmetros mantiveram-se dentro da faixa de referência, exceto, no tratamento por 60 dias na dose 625mg/kg, onde os valores de triglicerídeos e proteínas totais, respectivamente aumentaram de forma significativa cerca de 26,3 e 9,9% em relação ao grupo controle. Também durante o tratamento por 60 dias, nas três doses usadas a relação albumina/globulina reduziu de forma significativa em torno de 67% em relação ao controle.

A tabela X mostra que as fêmeas que receberam EHAJB também se mantiveram dentro da faixa de referência, contudo, no tratamento por 30 dias observamos aumento significativo nos valores de ALT e fosfatase alcalina para a menor dose em respectivamente 41 e 42% e glicose para as doses 125 e 625mg/kg respectivamente 31 e 27% do valor controle.

Nas tabelas XI e XII mostram que o tratamento por 60 dias a glicose aumentou de forma significativa em todas as doses em respectivamente 24, 42 e 35% e fosfatase alcalina em 34% e por 90 dias em 30% do valor controle.

TABELA VII: Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose ^s (mg/dL)	62,4 ± 3,7	72,0 ± 4,3	67,3 ± 2,9	77,4 ± 4,7
Uréia ^s (mg/dL)	38,7 ± 1,7	40,2 ± 2,6	37,4 ± 3,7	44,5 ± 2,5
Creatinina ^s (mg/dL)	0,40 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,02
Aspartato-aminotransferase ^s (U/L)	150,7 ± 11,2	135,7 ± 7,6	141,9 ± 5,8	120,3 ± 5,4
Alanina-aminotransferase ^s (U/L)	66,0 ± 3,3	60,7 ± 5,0	64,3 ± 4,8	62,3 ± 4,5
Colesterol total ^s (mg/Dl)	62,4 ± 2,3	68,3 ± 7,9	61,8 ± 6,7	59,3 ± 11,1
Triglicerídeos ^s (mg/dL)	91,8 ± 7,4	64,7 ± 2,8	75,6 ± 4,6	70,5 ± 13,8
Fosfatase alcalina ^s (U/L)	135,7 ± 10,7	94,5 ± 8,1	112,9 ± 9,6	114,0 ± 12,7
Bilirrubina total ^s (mg/dL)	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,06	0,40 ± 0,02
Bilirrubina direta ^s (mg/dL)	0,20 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Bilirrubina indireta ^s (mg/dL)	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,03
Proteínas totais ^s (g/dL)	7,0 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,2
Albumina ^s (g/dL)	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Globulina ^s (g/dL)	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,1
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,02

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

(^s) indica soro.

Aspartato-aminotransferase = transaminase glutâmico-oxalacética (TGO).

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).

TABELA VIII: Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	65,1 ± 4,0	57,1 ± 14,2	68,5 ± 9,7	82,0 ± 3,0
Uréia (mg/dL)	41,2 ± 3,2	43,9 ± 6,0	34,9 ± 4,8	34,9 ± 0,9
Creatinina (mg/Dl)	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,06	0,30 ± 0,04	0,40 ± 0,05
Aspartato-aminotransferase (U/L)	165,4 ± 9,0	126,6 ± 11,6	152,6 ± 8,7	124,12 ± 16,2
Alanina-aminotransferase (U/L)	58,7 ± 4,2	54,3 ± 4,2	54,1 ± 6,4	52,75 ± 6,64
Colesterol total (mg/dL)	58,5 ± 3,7	61,1 ± 1,9	60,3 ± 4,3	70,52 ± 3,13
Triglicerídeos (mg/dL)	94,6 ± 7,9	76,3 ± 7,1	86,1 ± 6,4	119,5 ± 8,2*
Fosfatase alcalina (U/L)	118,3 ± 5,0	107,3 ± 5,4	116,0 ± 6,5	110,0 ± 5,7
Bilirrubina total (mg/dL)	0,30 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,02
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	7,1 ± 0,1	7,3 ± 0,2	7,2 ± 0,1	7,8 ± 0,1*
Albumina (g/dL)	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1
Globulina (g/dL)	5,6 ± 0,1	4,2 ± 1,0	5,2 ± 0,7	6,4 ± 0,1
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,01	0,20 ± 0,04*	0,20 ± 0,02*	0,20 ± 0*

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).

TABELA IX: Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	66,2 ± 4,2	57,9 ± 5,5	63,3 ± 1,8	65,2 ± 5,2
Uréia (mg/dL)	38,1 ± 2,0	42,0 ± 3,0	41,6 ± 1,4	41,4 ± 1,0
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,50 ± 0,04
Aspartato-aminotransferase (U/L)	185,2 ± 10,7	153,7 ± 8,8	175,4 ± 10,8	161,5 ± 7,4
Alanina-aminotransferase (U/L)	63,1 ± 2,9	63,4 ± 2,6	61,4 ± 2,4	62,2 ± 2,8
Colesterol total (mg/dL)	61,1 ± 2,3	64,3 ± 3,4	60,5 ± 1,8	56,9 ± 2,5
Triglicerídeos (mg/dL)	100,4 ± 6,5	93,7 ± 6,4	97,6 ± 6,8	103,6 ± 8,6
Fosfatase alcalina (U/L)	113,4 ± 8,8	126,1 ± 9,9	110,5 ± 2,5	127,3 ± 13,1
Bilirrubina total (mg/dL)	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,06	0,40 ± 0,06
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,03
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,04
Proteínas totais (g/dL)	7,2 ± 0,1	7,6 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,6 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Globulina (g/dL)	6,0 ± 0,2	6,2 ± 0,2	5,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1
Relação Albumina/Globulina	0,2 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,20 ± 0

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

TABELA X: Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	69,1 ± 1,1	62,4 ± 5,1	90,6 ± 5,6*	87,9 ± 2,6*
Uréia (mg/dL)	41,4 ± 2,3	33,6 ± 4,2	41,4 ± 1,6	38,4 ± 6,1
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,2	0,60 ± 0,1	0,40 ± 0,1
Aspartato-aminotransferase (U/L)	177,8 ± 13,2	178,4 ± 9,9	170,4 ± 9,3	174,7 ± 9,2
Alanina-aminotransferase (U/L)	45,1 ± 3,0	63,4 ± 4,4*	45,4 ± 2,5	57,1 ± 3,8
Colesterol total (mg/dL)	68,6 ± 5,4	51,6 ± 7,3	63,0 ± 7,1	49,7 ± 8,2
Triglicerídeos (mg/dL)	81,8 ± 11,4	63,6 ± 8,5	81,7 ± 6,1	86,1 ± 8,5
Fosfatase alcalina (U/L)	57,7 ± 3,9	68,4 ± 7,3	66,0 ± 5,4	82,1 ± 4,4*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,30 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,20 ± 0,07
BBilirrubina direta (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,10 ± 0,03
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,3	7,6 ± 0,2	7,4 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Globulina (g/dL)	5,9 ± 0,1	5,0 ± 1,1	6,2 ± 0,2	5,0 ± 0,8
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,03

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).

TABELA XI: Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	54,2 ± 4,4	67,2 ± 4,0*	77,2 ± 4,9*	73,2 ± 3,5*
Uréia (mg/dL)	38,6 ± 3,2	35,4 ± 4,6	37,3 ± 1,8	38,7 ± 5,1
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,1	0,50 ± 0,2	0,60 ± 0,1	0,40 ± 0,2
Aspartato-aminotransferase (U/L)	153,2 ± 8,4	161,4 ± 6,1	165,3 ± 6,4	169,3 ± 6,3
Alanina-aminotransferase (U/L)	49,3 ± 3,6	60,2 ± 3,9	48,3 ± 3,9	54,3 ± 3,9
Colesterol total (mg/dL)	64,2 ± 4,3	60,1 ± 6,2	65,1 ± 6,2	63,2 ± 7,1
Triglicerídeos (mg/dL)	89,2 ± 7,4	70,6 ± 5,2	72,2 ± 4,2	87,2 ± 3,8
Fosfatase alcalina (U/L)	63,2 ± 5,4	53,2 ± 8,0	61,2 ± 4,4	84,7 ± 6,3*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	7,1 ± 0,2	7,6 ± 0,6	7,1 ± 0,2	7,2 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Globulina (g/dL)	5,3 ± 0,2	6,1 ± 0,2	5,6 ± 0,8	5,5 ± 0,8
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,04

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).

TABELA XII: Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	73,8 ± 3,2	70,8 ± 2,8	69,2 ± 3,9	69,1 ± 4,1
Uréia (mg/dL)	40,3 ± 2,8	39,9 ± 3,1	40,4 ± 2,4	40,1 ± 3,5
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,2
Aspartato-aminotransferase (U/L)	161,4 ± 7,4	173,1 ± 5,2	177,8 ± 7,9	178,4 ± 8,1
Alanina-aminotransferase (U/L)	51,4 ± 4,2	59,1 ± 4,1	52,4 ± 6,1	60,1 ± 5,1
Colesterol total (mg/dL)	67,7 ± 3,8	63,2 ± 2,3	67,7 ± 3,4	65,2 ± 6,0
Triglicerídeos (mg/dL)	94,1 ± 6,1	69,7 ± 8,2	77,2 ± 6,1	91,6 ± 5,2
Fosfatase alcalina (U/L)	69,7 ± 6,1	62,1 ± 4,8	67,8 ± 5,2	90,4 ± 5,6*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,02
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Proteínas totais (g/dL)	6,9 ± 0,2	7,7 ± 0,9	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Globulina (g/dL)	5,2 ± 0,2	5,9 ± 0,1	5,5 ± 0,6	5,8 ± 0,6
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,30 ± 0,06

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).

4.1.9.- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.

Na tabela XIII o mostra que o perfil hematológico dos machos não foi modificado pelo tratamento com EHA, exceto em 30 dias, nas doses de 25 e 625mg/kg onde registramos uma diminuição significativa do VCM em torno de 7% e no valor de leucócitos, para a maior dose, aumento de 49% em relação ao grupo controle.

Já na tabela XIV, em 60 dias de tratamento, não observamos nenhuma alteração, enquanto que em 90 dias constatamos alteração apenas na contagem diferencial (tabela XV).

Nas tabelas XVI e XVII, para as fêmeas, o perfil hematológico manteve-se inalterado, a exceção da contagem diferencial de linfócitos atípicos, monócitos e bastonetes.

TABELA XIII: Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,7 \pm 0,1	8,2 \pm 0,2	7,8 \pm 0,2	7,9 \pm 0,2
Hemoglobina (g/Dl)	15,4 \pm 0,1	15,6 \pm 0,3	15,0 \pm 0,2	14,9 \pm 0,3
Hematócrito (%)	43,1 \pm 0,4	42,6 \pm 0,9	43,0 \pm 1,8	41,4 \pm 1,1
VCM (fL)	56,1 \pm 0,7	52,0 \pm 0,3*	54,9 \pm 1,3	52,1 \pm 1,0*
HCM (pg)	20,1 \pm 0,3	19,1 \pm 0,2	19,2 \pm 0,6	18,8 \pm 0,4
CHCM (g/dL)	35,8 \pm 0,2	36,8 \pm 0,2	34,9 \pm 0,2	36,0 \pm 0,2
RDW (%)	14,4 \pm 0,5	14,6 \pm 0,5	15,2 \pm 0,8	14,9 \pm 0,6
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	900,5 \pm 36,7	970,3 \pm 24,2	912,4 \pm 41,8	982,3 \pm 14,4
VPM (fL)	5,6 \pm 0,1	5,1 \pm 0,02	5,2 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,9 \pm 0,9	7,9 \pm 0,6	8,0 \pm 0,4	10,3 \pm 0,7*
Bastonetes (%)	0,20 \pm 0,1	0	0	0,30 \pm 0,3
Neutrófilos (%)	18,3 \pm 2,8	21,0 \pm 5,3	23,5 \pm 1,8	23,0 \pm 0,9
Eosinófilos (%)	0,50 \pm 0,2	1,0 \pm 0,5	0,60 \pm 0,1	2,0 \pm 0,8
Basófilos (%)	0,30 \pm 0,1	0	0	1,3 \pm 0,7
Linfócitos típicos (%)	74,5 \pm 2,8	76,0 \pm 5,7	72,4 \pm 2,2	64,3 \pm 1,5
Linfócitos atípicos (%)	2,1 \pm 0,4	0	0,50 \pm 0,2	2,7 \pm 1,4
Monócitos (%)	4,3 \pm 0,5	2,0 \pm 0	2,8 \pm 0,8	6,3 \pm 1,4

Os valores representam as médias \pm e.p.m. de 9-10 animais. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias, VPM: Volume Plaquetário Médio.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA XIV: Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^{-6}/\mu\text{L}$)	8,0 ± 0,2	7,9 ± 0,1	7,4 ± 0,2	7,3 ± 0,4
Hemoglobina (g/dL)	15,4 ± 0,2	15,4 ± 0,2	14,8 ± 0,3	14,0 ± 0,7
Hematócrito (%)	44,7 ± 2,2	41,7 ± 0,5	39,1 ± 0,8	38,6 ± 1,6
VCM (fL)	55,5 ± 1,2	52,7 ± 0,2	52,9 ± 0,9	53,4 ± 0,9
HCM (pg)	19,2 ± 0,5	19,6 ± 0,1	20,0 ± 0,4	19,5 ± 0,7
CHCM (g/dL)	34,5 ± 0,3	37,0 ± 0,2	37,7 ± 0,1	36,4 ± 1,2
RDW (%)	16,2 ± 0,9	14,0 ± 0,3	16,0 ± 0,9	14,9 ± 0,6
Plaquetas ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	947,5 ± 18,4	852,0 ± 14,0	935,0 ± 22,2	889,3 ± 53,4
VPM (fL)	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1
Leucócitos ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	7,5 ± 0,9	7,5 ± 2,1	8,0 ± 0,6	6,5 ± 0,9
Bastonetes (%)	0	0,10 ± 0,1	0,10 ± 0,1	0
Neutrófilos (%)	18,2 ± 2,2	22,4 ± 2,2	19,3 ± 1,3	18,3 ± 1,4
Eosinófilos (%)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,5	0,60 ± 0,3	1,5 ± 0,5
Basófilos (%)	0	0,10 ± 0,1	0	0,30 ± 0,2
Linfócitos típicos (%)	76,4 ± 5,6	71,7 ± 1,9	77,1 ± 1,1	75,8 ± 1,2
Linfócitos atípicos (%)	0	1,1 ± 0,3	0,40 ± 0,2	0,80 ± 0,3
Monócitos (%)	4,4 ± 0,8	3,4 ± 1,1	2,5 ± 0,4	3,3 ± 0,6

Os valores representam as médias ± erro padrão de 10 animais.

TABELA XV: Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^{-6}/\mu\text{L}$)	8,0 ± 0,2	8,9 ± 0,1	8,4 ± 0,3	7,9 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	15,6 ± 0,3	16,5 ± 0,1	15,8 ± 0,3	14,8 ± 0,3
Hematócrito (%)	44,7 ± 0,8	46,6 ± 0,2	44,4 ± 0,8	41,9 ± 0,8
VCM (fL)	56,0 ± 0,7	52,5 ± 1,2	53,3 ± 1,3	53,0 ± 0,6
HCM (pg)	19,6 ± 0,2	18,5 ± 0,2	19,0 ± 0,4	18,8 ± 0,2
CHCM (g/dL)	34,9 ± 0,2	35,3 ± 0,1	35,5 ± 0,2	35,4 ± 0,1
RDW (%)	16,8 ± 1,0	14,5 ± 0,3	17,6 ± 2,7	18,0 ± 2,1
Plaquetas ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	927,3 ± 22,3	858,9 ± 25,7	871,6 ± 36,4	825,5 ± 90,0
VPM (fL)	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,4	5,4 ± 0,4	5,3 ± 0,1
Leucócitos ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	8,2 ± 0,8	10,4 ± 0,9	9,0 ± 0,4	8,7 ± 0,4
Bastonetes (%)	0	0	0,10 ± 0,1	0,20 ± 0,1
Neutrófilos (%)	19,4 ± 1,9	29,9 ± 2,8*	24,6 ± 2,4	19,4 ± 1,3
Eosinófilos (%)	1,0 ± 0	0,60 ± 0,2*	0,30 ± 0,2*	0,40 ± 0,2*
Basófilos (%)	0,20 ± 0,2	0	0	0
Linfócitos típicos (%)	77,4 ± 2,9	67,7 ± 3,1*	73,8 ± 2,6	78,1 ± 1,0
Linfócitos atípicos (%)	0	1,9 ± 0,5	0	0,30 ± 0,1
Monócitos (%)	1,9 ± 0,8	0,90 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1

Os valores representam as médias ± erro padrão de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA XVI: Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^{-6}/\mu\text{L}$)	7,6 \pm 0,1	7,6 \pm 0,1	7,4 \pm 0,2	7,3 \pm 0,1
Hemoglobina (g/dL)	14,8 \pm 0,2	15,1 \pm 0,4	14,4 \pm 0,4	14,4 \pm 0,1
Hematócrito (%)	41,2 \pm 0,8	41,5 \pm 1,0	39,5 \pm 1,3	38,8 \pm 0,3
VCM (fL)	54,0 \pm 0,6	54,8 \pm 0,9	53,1 \pm 0,5	52,8 \pm 0,4
HCM (pg)	19,4 \pm 0,2	19,9 \pm 0,3	19,4 \pm 0,3	19,6 \pm 0,1
CHCM (g/dL)	35,9 \pm 0,3	36,3 \pm 0,1	36,5 \pm 0,6	37,0 \pm 0,2
RDW (%)	13,1 \pm 0,2	12,9 \pm 0,5	13,5 \pm 0,4	13,4 \pm 0,2
Plaquetas ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	933,9 \pm 27,6	904,0 \pm 32,6	846,7 \pm 43,6	897,0 \pm 37,1
VPM (fL)	5,6 \pm 0,06	5,5 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1
Leucócitos ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	6,7 \pm 0,2	6,6 \pm 0,6	6,5 \pm 0,5	7,6 \pm 0,8
Bastonetes (%)	0	0	0	0,10 \pm 0,1
Neutrófilos (%)	22,3 \pm 2,2	22,2 \pm 3,2	24,3 \pm 1,6	21,4 \pm 1,9
Eosinófilos (%)	1,6 \pm 0,4	1,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,6	0,80 \pm 0,2
Basófilos (%)	0,20 \pm 0,1	0,30 \pm 0,2	1,1 \pm 0,5	0,40 \pm 0,2
Linfócitos típicos (%)	67,4 \pm 1,9	72,5 \pm 3,3	63,7 \pm 1,3	72,5 \pm 1,8
Linfócitos atípicos (%)	1,9 \pm 0,4	2,2 \pm 1,0	6,1 \pm 1,2*	2,0 \pm 0,6
Monócitos (%)	6,6 \pm 0,6	1,8 \pm 0,2*	3,3 \pm 1,2*	2,9 \pm 0,8*

Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 animais.* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA XVII: Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^{-6}/\mu\text{L}$)	7,5 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2	7,4 \pm 0,4	7,2 \pm 0,2
Hemoglobina (g/dL)	14,2 \pm 0,3	14,5 \pm 0,6	14,2 \pm 0,3	13,9 \pm 0,6
Hematócrito (%)	40,2 \pm 0,9	40,8 \pm 1,2	40,2 \pm 0,8	37,3 \pm 0,4
VCM (fL)	53,8 \pm 0,6	56,2 \pm 0,9	54,2 \pm 0,6	51,8 \pm 0,5
HCM (pg)	19,0 \pm 0,2	19,9 \pm 0,6	19,2 \pm 0,3	19,3 \pm 0,1
CHCM (g/dL)	35,6 \pm 0,3	35,7 \pm 0,2	35,3 \pm 0,5	37,2 \pm 0,3
RDW (%)	13,0 \pm 0,3	13,0 \pm 0,4	12,8 \pm 0,4	13,0 \pm 0,3
Plaquetas ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	870,2 \pm 38,3	912,0 \pm 27,5	912,4 \pm 53,3	932,4 \pm 73,2
VPM (fL)	5,4 \pm 0,04	5,3 \pm 0,2	5,7 \pm 0,04	5,7 \pm 0,05
Leucócitos ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	6,5 \pm 0,3	6,3 \pm 0,5	6,2 \pm 0,6	6,8 \pm 0,8
Bastonetes (%)	0	0	0,20 \pm 0,1	0,40 \pm 0,1*
Neutrófilos (%)	20,6 \pm 3,2	20,1 \pm 6,2	18,2 \pm 1,4	25,4 \pm 2,9
Eosinófilos (%)	0	0,80 \pm 0,4	0	0,60 \pm 0,1
Basófilos (%)	0	0	0	0
Linfócitos típicos (%)	72,3 \pm 2,9	69,4 \pm 2,8	78,1 \pm 5,2	68,2 \pm 2,2
Linfócitos atípicos (%)	1,7 \pm 0,4	2,6 \pm 1,0	2,3 \pm 0,9	3,7 \pm 0,7
Monócitos (%)	5,3 \pm 0,6	5,6 \pm 1,7	1,2 \pm 0,9*	1,6 \pm 0,9*

Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA XVIII: Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^{-6}/\mu\text{L}$)	7,6 \pm 0,2	7,1 \pm 0,4	7,6 \pm 0,2	6,9 \pm 0,2
Hemoglobina (g/dL)	14,5 \pm 0,3	14,2 \pm 0,2	14,5 \pm 0,5	13,6 \pm 0,5
Hematócrito (%)	40,9 \pm 0,8	39,4 \pm 1,0	40,2 \pm 0,9	37,6 \pm 0,6
VCM (fL)	54,0 \pm 0,4	55,5 \pm 0,7	52,7 \pm 0,8	54,2 \pm 0,7
HCM (pg)	19,1 \pm 0,2	20,0 \pm 0,3	19,0 \pm 0,3	19,5 \pm 0,7
CHCM (g/dL)	35,2 \pm 0,3	36,0 \pm 0,2	36,1 \pm 0,4	36,0 \pm 0,2
RDW (%)	14,3 \pm 0,3	13,4 \pm 0,6	13,0 \pm 0,3	12,7 \pm 0,3
Plaquetas ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	902,4 \pm 51,1	897,4 \pm 41,3	904,7 \pm 28,5	941,1 \pm 33,3
VPM (fL)	5,3 \pm 0,1	5,4 \pm 0,2	5,4 \pm 0,1	5,6 \pm 0,04
Leucócitos ($10^{-3}/\mu\text{L}$)	7,0 \pm 0,2	6,9 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2	7,1 \pm 0,3
Bastonetes (%)	0	0	0	0,6 \pm 0,2
Neutrófilos (%)	23,6 \pm 2,9	18,5 \pm 3,5	17,3 \pm 3,1	30,3 \pm 3,2
Eosinófilos (%)	0,60 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	0	1,0 \pm 0,2
Basófilos (%)	0	0,60 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,1
Linfócitos típicos (%)	71,6 \pm 5,6	66,1 \pm 3,7	79,8 \pm 8,0	57,2 \pm 1,8
Linfócitos atípicos (%)	0,50 \pm 0,6	4,8 \pm 2,1	3,1 \pm 0,6	5,3 \pm 0,6
Monócitos (%)	3,7 \pm 1,0	6,8 \pm 1,2	2,8 \pm 0,8	5,3 \pm 0,7

Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 animais.

4.1.10.- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EHAJB SOBRE A MASSA CORPORAL DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS

A partir da tabela XIX, observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas na evolução da massa corporal do grupo tratado, respectivamente nos machos (52,4; 56,5 e 50,3%) e fêmeas (35,1; 34,8 e 33,7%) em relação aos grupos controle (macho 50,1% e fêmea 33,8%). Da mesma forma na tabela XX observa-se que não houve diferenças estatísticas na massa úmida dos órgãos.

TABELA XIX: Efeito da administração oral por 90 dias de EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre a evolução da massa corporal de ratos de ambos os sexos.

Machos	1º dia	30º dia	60º dia	90º dia
Controle	220,4 ± 7,1	264,5 ± 6,7	305,0 ± 5,7	330,8 ± 6,7
EHAJB (25mg/kg)	218,5 ± 6,3	268,9 ± 5,4	301,0 ± 6,2	332,9 ± 7,3
EHAJB (125mg/kg)	208,2 ± 5,4	259,0 ± 4,7	289,8 ± 6,1	325,8 ± 6,8
EHAJB (625mg/kg)	213,1 ± 4,2	260,2 ± 5,1	298,5 ± 7,3	320,3 ± 7,5
Fêmeas	1º dia	30º dia	60º dia	90º dia
Controle	185,2 ± 4,7	208,2 ± 6,2	221,5 ± 5,2	247,8 ± 6,1
EHAJB (25mg/kg)	192,5 ± 5,6	214,8 ± 7,4	228,1 ± 6,7	260,0 ± 4,4
EHAJB (125mg/kg)	203,1 ± 7,1	229,7 ± 5,8	237,4 ± 7,2	273,7 ± 5,7
EHAJB (625mg/kg)	210,4 ± 6,6	232,9 ± 6,6	246,3 ± 7,5	281,3 ± 6,9

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de 9 animais por grupo.

TABELA XX: Efeito da administração oral por 90 dias de EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre a massa dos órgãos (g/100g de animal) de ratos de ambos os sexos.

Machos	Controle	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Coração	0,38 ± 0,06	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,05	0,32 ± 0,02
Fígado	3,51 ± 0,18	3,08 ± 0,15	3,27 ± 0,14	3,02 ± 0,10
Baço	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,05	0,18 ± 0,05
Rim	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Cérebro	0,41 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Pulmão	0,52 ± 0,02	0,48 ± 0,34	0,50 ± 0,02	0,52 ± 0,01
Adrenal	0,007 ± 0,0006	0,006 ± 0,0004	0,007 ± 0,0004	0,007 ± 0,0004
Testículo	0,45 ± 0,02	0,38 ± 0,08	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,05
D. deferente	0,05 ± 0,06	0,04 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Fêmeas	Controle	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Coração	0,33 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,02
Fígado	3,38 ± 0,21	3,42 ± 0,30	3,28 ± 0,18	3,35 ± 0,41
Baço	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,03
Rim	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,03
Cérebro	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,07	0,32 ± 0,04	0,38 ± 0,05
Pulmão	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,02
Adrenal	0,005 ± 0,0004	0,006 ± 0,0003	0,006 ± 0,0003	0,005 ± 0,0002
Ovário	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,40 ± 0,06	0,41 ± 0,04
Útero	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,07	0,40 ± 0,06	0,39 ± 0,08

Obs: Os valores representam as médias ± e.p.m. de 9 animais por grupo.
 Não foi observada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos.

4.1.11.- EFEITO DO TRATAMENTO COM EHAJB SOBRE A MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS.

4.1.11.1. CORAÇÃO

Em nosso estudo, observamos que em cortes transversais de fibras musculares do miocárdio de ratos, após tratamento durante 30 dias com EHA, apresentaram-se com morfologia normal em relação ao grupo controle.

Observamos circunferência normal; núcleos localizados centralmente, levemente eucromático; o citoplasma é acidófilo com miofibrilas também seccionadas transversalmente. Em cortes longitudinais, os núcleos localizados centralmente mostram-se bem ovalados em discos intercalares e apresenta-se com disposição normal (figura 2).

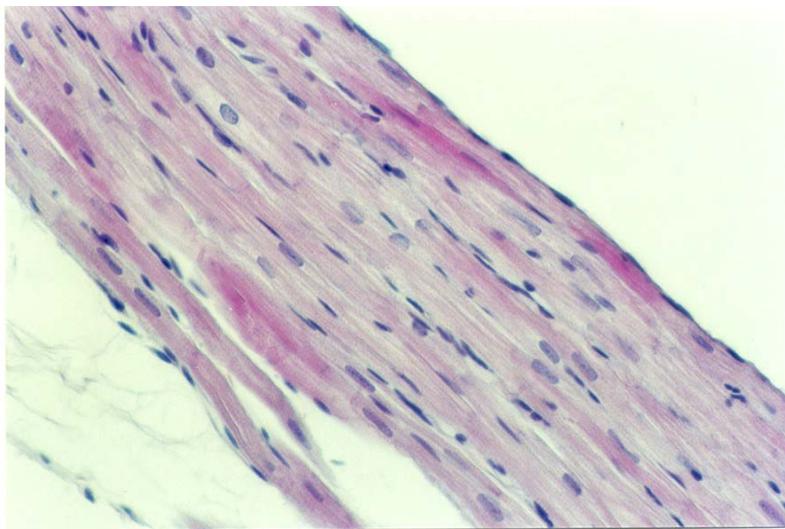


FIGURA 2: Fotomicrografia de corte longitudinal do miocárdio de rato controle onde administrou-se água v.o. 30 dias. Visualizar as fibras musculares, bem como a posição dos núcleos localizados centralmente nas células (N). Fibroblastos (F) - (coloração HE, aumento \pm 430x).

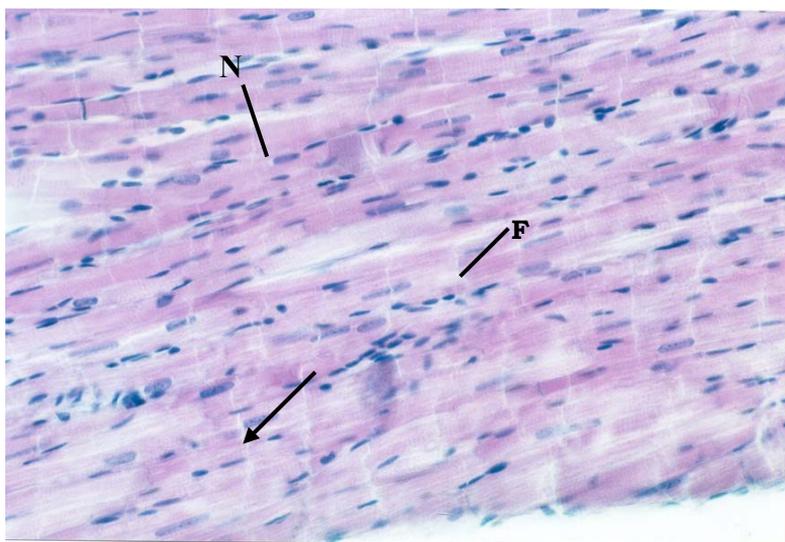


FIGURA 3: Fotomicrografia de corte longitudinal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (25mg/kg, v.o). Observar núcleos localizados centralmente (N) e discos intercalares (seta). Fibroblastos (F) - (coloração HE, aumento \pm 430x).

4.1.11.2. CÉREBRO

Foram analisadas secções transversais dos hemisférios cerebrais de rato em várias regiões, as quais se apresentaram subdivididas estruturalmente em uma região cortical mais escura e uma região medular mais clara.

A porção cortical apresentou-se subdividida em seis camadas, que da superfície em direção à camada medular mostrou as seguintes características:

A primeira camada mostrou poucos corpos celulares de neurônios, os quais aparecem mais alongados e correm paralelamente à superfície do córtex cerebral. Outros núcleos menores mais arredondados e heterocromáticos aparecem entre os corpos celulares de neurônios e evidenciam características de células neurogliais. Entre os núcleos basófilos desta camada aparece uma região mais acidófila, rica em fibras amielínicas e prolongamentos de células nervosas e gliais.

A segunda camada apresenta uma maior condensação de corpos celulares. Estas células são pequenas e apresentaram formato piramidal ou estrelado. Quando piramidais, o vértice da pirâmide comumente é voltado para a superfície cortical. Quando estreladas, o corpo celular apresenta varias projeções citoplasmáticas que partem radialmente para todos os lados. Entretanto, nesta

camada, as células ainda são pequenas. Entre os corpos celulares, um neurópilo acidófilo, constituído por prolongamentos dendríticos e fibras nervosas dispersas está presente.

A terceira camada apresenta corpos celulares de células piramidais, porém maiores que os da segunda camada. Células neurogliais pequenas estão presentes. Substância intercelular acidófila, rica em fibras e prolongamentos dendríticos separam estas células.

Na quarta camada, ocorre também a presença de células estreladas na mesma forma como na segunda camada, porém todas estão mais densamente agrupadas; o neurópilo é menos extenso.

Na quinta camada, aparecem células piramidais muito grandes, maiores que nas camadas descritas anteriormente. Também são observadas células poligonais e estreladas menores em número que as piramidais.

Na sexta camada, ocorre a presença de corpos celulares com variadas formas. Encontramos células piramidais, fusiformes, estreladas e globosas. Células gliais menores se confundem entre as mesmas. Uma substância intercelular rica em fibras nervosas e prolongamentos celulares separam as células, ao mesmo tempo que se associa adjacientemente com a substância branca. Células neurogliais estão dispersas tanto na substância branca quanto na cinzenta, e apresentam uma variação em tamanho, forma e densidade de coloração nuclear.

Abaixo da região cortical, uma outra região rica em axônios mielínicos caracteriza substância branca. Na mesma encontramos células pequenas, de núcleo ora arredondado, ora achatado, dispersos. Estas células são características de elementos neurogliais, não sendo observado halo citoplasmático ao redor do núcleo das mesmas.

Periféricamente, envolvendo todo o córtex cerebral, uma camada de tecido conjuntivo frouxo é evidente e está intimamente associada ao tecido nervoso. Apresenta arteríolas de pequeno porte e capilares que mergulham em direção ao conjuntivo que invade o interior da massa nervosa formando pequenos septos.

Estas características morfológicas foram observadas tanto nos grupos tratados (machos e fêmeas) indistintamente, como no grupo controle.

Portanto, não encontramos diferenças morfológicas na disposição, no tamanho, densidade, nem na forma das células. Assim sendo, utilizamos uma única descrição morfológica para todos os grupos.

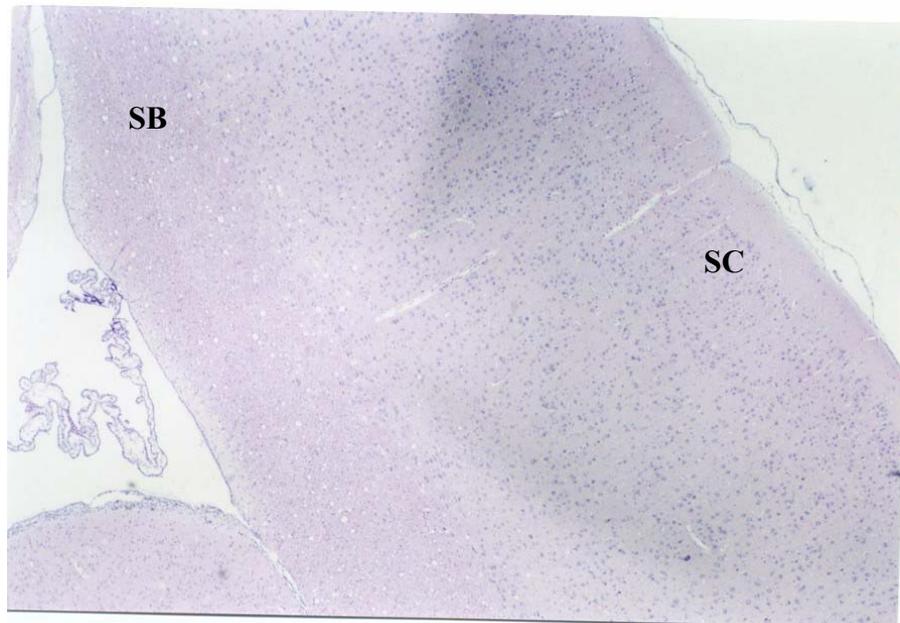


Figura 4: Fotomicrografia do córtex cerebral de rato controle, onde administraram-se água v.o. por 30 dias. Observar parte da substância cinzenta (SC) e parte da substância branca (SB) – (coloração HE, aumento $\pm 43x$).

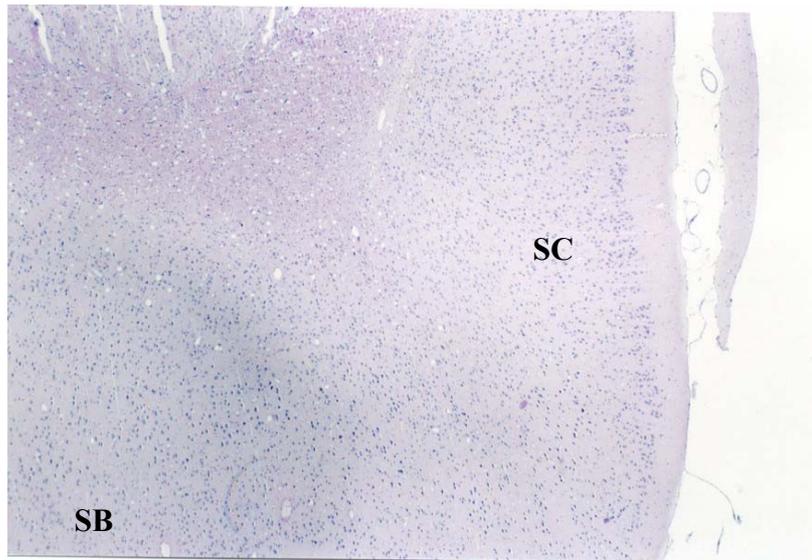


Figura 5: Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625mg/kg, v.o). Observar parte da substância cinzenta (SC) e parte da substância branca (SB) - (coloração HE, aumento \pm 43x).

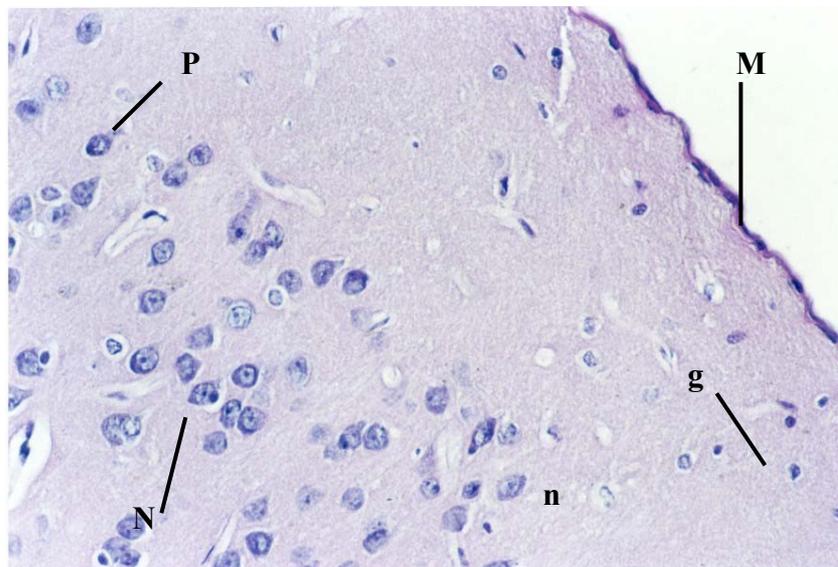


Figura 6: Fotomicrografia do córtex cerebral de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias. Neurônios globosos (N), células gliais (g), neutrópilo (n), células nervosas piramidais (P) e porção da meninge (M) são evidentes - (coloração HE, aumento \pm 430x).

4.1.11.3. FÍGADO:

O parênquima hepático apresenta células de tamanho normal dispostas em traves codornais com núcleo central de aspecto eucromático. Disposição vascular de distribuição homogênea contendo células de Kupffer de forma e distribuição semelhante ao controle (figura 7).

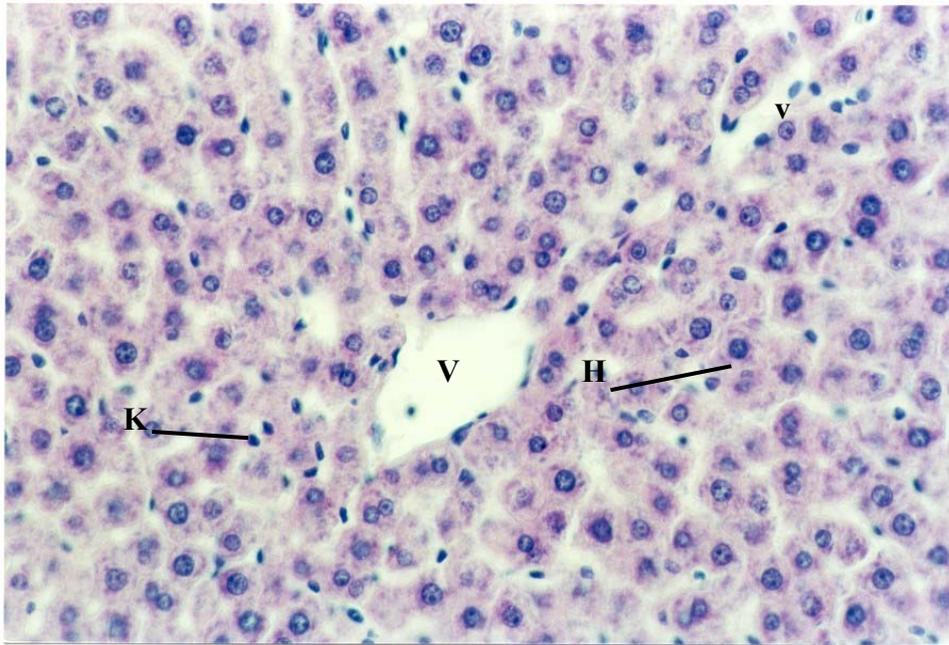


Figura 7: Fotomicrografia do fígado de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias. Observar os hepatócitos (H), as células de Kupffer (K), os vasos capilares (v) e a veia centro lobular (V). (coloração HE, aumento $\pm 430x$).

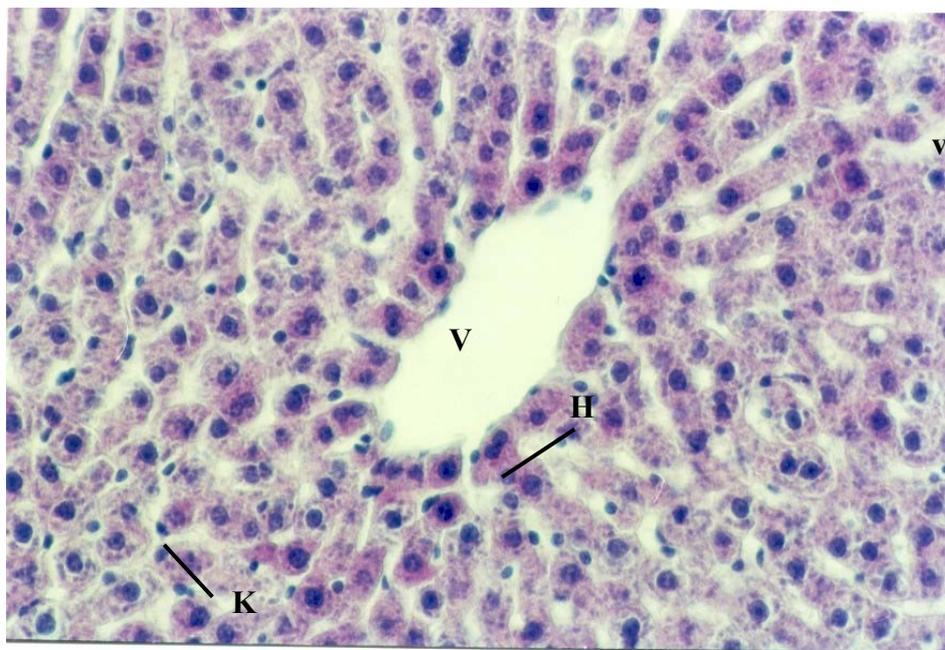


Figura 8: Fotomicrografia do fígado de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625mg/kg, v.o). Observar os hepatócitos (H), as células de Kupffer (K), os vasos capilares (v) e a veia centro lobular (V) - (coloração HE, aumento $\pm 430x$).

4.1.11.4. PULMÃO:

Bronquíolos apresentam epitélio celular simples com algumas células caliciformes.

Lâmina própria com tecido conjuntivo fibroelástico camada muscular lisa. O epitélio apresenta-se contínuo e a circunferência normal.

Bronquíolos terminais e respiratórios apresentam estrutura normal com epitélio cúbico simples, lâmina própria delgada com músculo liso contendo uma camada de fibras anelares.

Foi observada a presença de pequeno infiltrado inflamatório contendo linfócitos, plasmócitos, macrófagos e alguns polimorfonucleares.

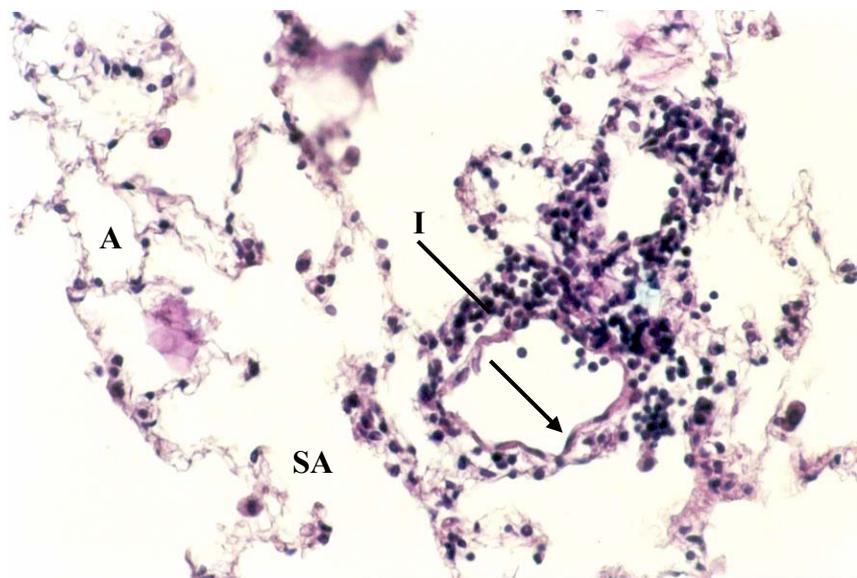


Figura 9: Fotomicrografia do pulmão de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625mg/kg, v.o). Notar a presença de bronquíolos respiratórios com pequena quantidade de infiltrado inflamatório (I). Porém o epitélio encontra-se intacto (seta), sacos alveolares (SA), alvéolos pulmonares. (coloração HE, aumento $\pm 430x$).

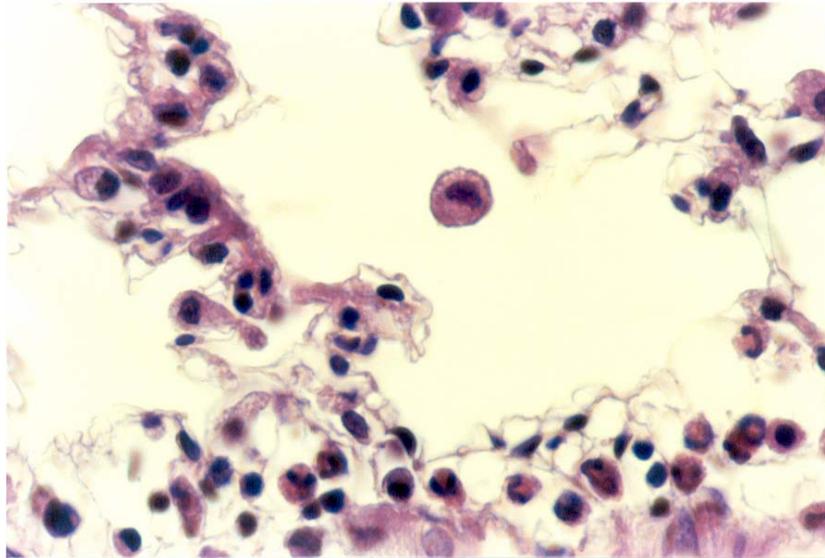


Figura 10: Fotomicrografia do pulmão de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (625mg/kg, v.o). Visualiza-se em maior aumento infiltrado inflamatório contendo linfócitos, plasmócitos, macrófagos e alguns polimorfonucleares. (coloração HE, aumento $\pm 1170x$).

4.1.11.5.- RINS:

Nosso estudo demonstrou que a região cortical do rim de ratos submetidos a tratamento por 30 dias com EHA (25; 125 e 625mg/kg), apresentam glomérulos e túbulos contorcidos distais com concentração e disposição celular normal semelhante ao controle (figura 11).

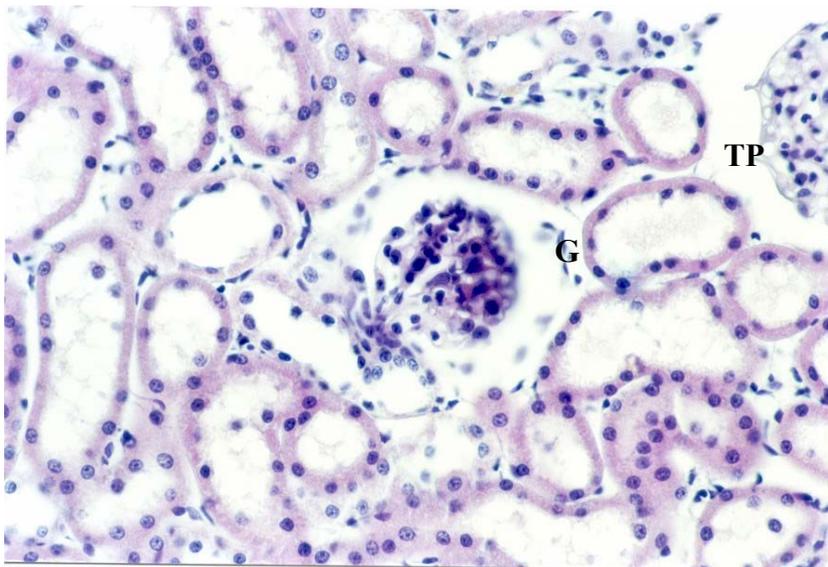
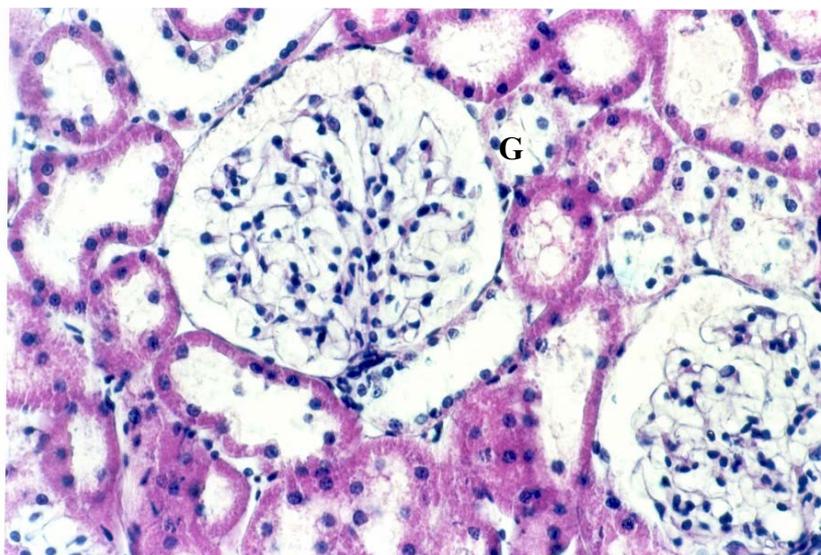


Figura 11: Fotomicrografia de corte transversal da região cortical de rim de rato controle, onde administrou-se água v.o. por 30 dias. Note a disposição normal de glomérulos (G) e tubos contorcidos proximais (TP) - (coloração HE, aumento \pm 430x).



TP

G

Figura 12: Fotomicrografia de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (125m/kg, v.o). Notar a disposição normal de glomérulos (G) e tubos contorcidos proximais (TP) - (coloração HE, aumento \pm 430x).

4.1.11.6- OVÁRIO:

Ovário apresentando região medular com numerosos vasos sanguíneos e regular quantidade de tecido conjuntivo frouxo morfológicamente normal.

Na região medular cortical evidenciam-se folículos em diversos estágios de amadurecimento com estruturas normais, bem como o corpo lúteo (Figura 9).

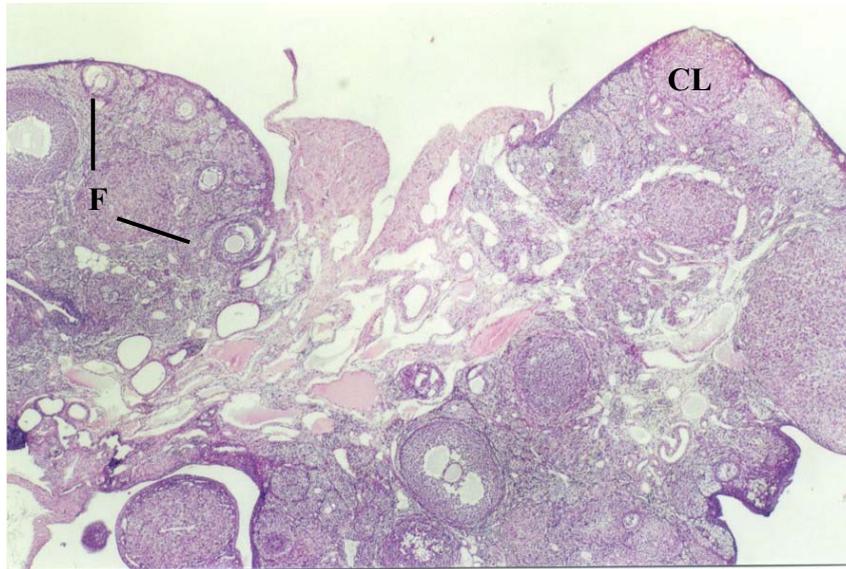


Figura 13: Fotomicrografia do ovário de rata controle, onde administrou-se água v.o. por 30 dias. Observar folículos (F), em diversos estágios de amadurecimento e corpo lúteo (CL) - (coloração HE, aumento \pm 43x).



Figura 14: Fotomicrografia da região cortical do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EHAJB (625mg/kg, v.o). Folículo maduro com aspecto morfológico normal (Fm) - (coloração HE, aumento \pm 107x).

4.1.11.7.- TESTÍCULO

O testículo apresentou, no espaço intersticial, as células de Leydig de forma arredondada ou poligonal com núcleo central e citoplasma acidófilo.

O tecido germinativo apresenta-se com sua diversidade característica, podendo-se visualizar as espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides.

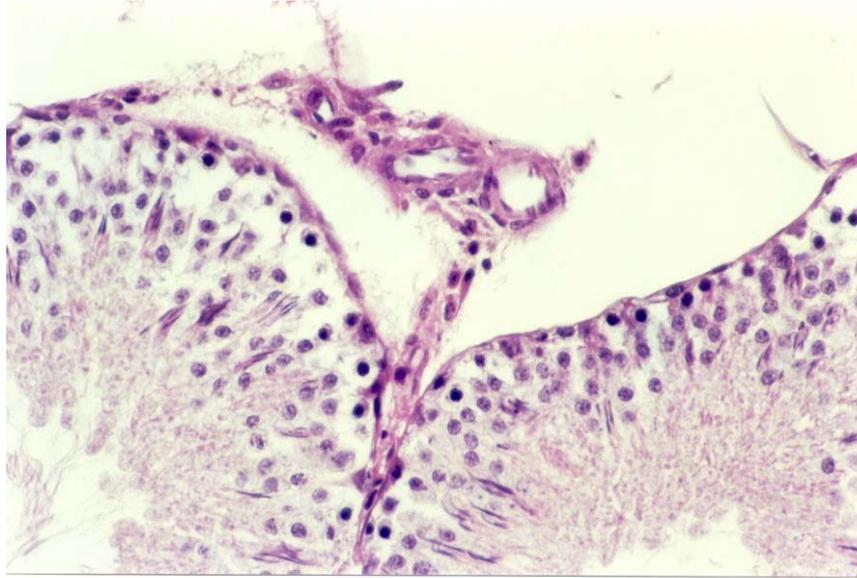


Figura 15: Fotomicrografia do testículo de rato controle onde administrou-se água v.o. por 30 dias. Notar a presença de túbulos seminíferos seccionados transversalmente (TS) e o tecido intersticial. (coloração HE, aumento $\pm 430x$).

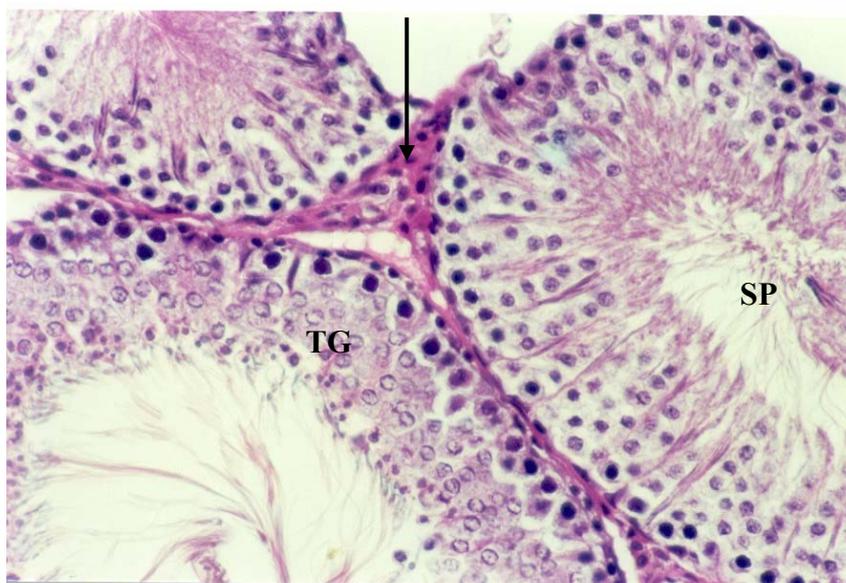


Figura 16: - Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento por 30 dias com EHAJB (125mg/kg, v.o). Observar porções de três túbulos seminíferos com tecido germinativo (TG), espermatozóides na região central (SP) e células de Leydig em tecido conjuntivo frouxo (seta) - (coloração HE, ampliação \pm 430x).

V. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o extrato hidroalcoólico de Jalapa-do-Brasil, principal componente ativo do medicamento Aguardente alemã[®] é um fitoterápico seguro, possui baixa toxicidade por via oral e não interfere no processo de reprodução em ratos.

A partir do estudo de observação geral, podemos supor que até 2g/kg por via oral não houve mudança no padrão de atividade dos animais em relação ao grupo controle.

Na estimativa da DL₅₀, o padrão de resposta confirmou os resultados obtidos anteriormente na atividade geral, ou seja, por via oral não houve morte até 5,0g/kg em ratos de ambos os sexos. Esses dados sugerem, a princípio, que o extrato apresenta, segundo a classificação de toxicidade adotada pela Comunidade Européia (BARROS, S.B.M. e DAVINO, S.C., 2003) (tabela XXI), baixíssima toxicidade por via oral, uma vez que, foi utilizada uma dose cerca de

200 vezes maior que a dose empregada na terapêutica e não foi observada toxicidade.

Tabela XXI: critérios utilizados pela Comunidade Européia na classificação de toxicidade.

Categoria	DL₅₀ oral para ratos (mg/kg peso corpóreo)
Muito tóxico	Menor que 25
Tóxico	De 25 a 200
Nocivo	De 200 a 2000

Apesar de não ter estimado o valor de DL₅₀ por via oral, tínhamos uma relativa segurança que o extrato apresentava baixa toxicidade. Partimos então para comprovação do seu efeito laxante através do trânsito intestinal. Como esperado, o EHAJB aumentou o percurso do marcador em todas as doses usadas, exceto na menor dose, confirmando a ação laxante do extrato.

Nos estudos de toxicidade a seguir, procuramos trabalhar com 3 doses, a menor, 25mg/kg foi calculada como sendo a dose terapêutica e 125 e 625mg/kg representando respectivamente 5 e 25 vezes a dose usada como laxante.

Na tabela I mostramos que o tratamento com extrato não alterou a evolução ponderal da massa corporal durante o período de prenhez que engloba, as três diferentes fases: pré-implantação, organogênese e crescimento. Ao final do período de gestação (22 dias), as doses do extrato 25, 125 e 625mg/kg, representavam respectivamente um aumento ao redor de 22, 110 e 550 vezes a empregada na posologia da Aguardente alemã®.

Na Tabela II pode-se constatar que a administração do extrato também não modificou o índice de fertilidade dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Esse índice reflete a capacidade das fêmeas serem fecundadas. O extrato, possivelmente, não interferiu significativamente nos processos hormonais que levam à ovulação, como também, sugere que não induziu alterações funcionais nos ovários. Esses dados são reforçados visto que a média

de filhotes por mãe e o tempo de gestação também não se encontraram significativamente alterada em relação ao grupo controle, indicando, com isso que, além das fêmeas manterem a capacidade de serem fecundadas, apresentam também um número normal de filhotes e duração de prenhez que, segundo (HARKNESS, J.E. e WAGNER, J.E. 1993), varia respectivamente entre 6 e 12 filhotes e 21 a 23 dias.

Uma das causas mais comuns da esterilidade feminina é a ausência de ovulação, que pode ocorrer devido a hipossecreção dos hormônios hipofisários ou por anormalidades ovarianas (GARLAND, T. e CARTIER, P.A., 1994).

O índice de gestação que indica a relação de fêmeas prenhas com fetos vivos reflete também a capacidade das fêmeas fecundadas levarem a prenhez a termo, sem ocorrência de alterações fetais, que possam ser incompatíveis com a gestação e que levem à interrupção da prenhez. Nossos resultados mostram que os grupos controle e tratado foram iguais a 100%. Esse valor nos fornece um indicativo que o uso do extrato não produziu alterações estruturais ou metabólicas durante a gestação em ambos, mãe e embrião, como fertilização de gametas geneticamente anormais, anomalias na fertilização, irregularidades na divisão do embrião que possam levar à inviabilidade no progresso da procriação ou a ocorrência de partos prematuros (BEDRAN, J.N., 1988). Desta forma podemos sugerir que o extrato não atinge, pelo menos, um número considerável de células, que possa induzir embriofetividade.

O índice de viabilidade mostra o percentual de sobrevivência da prole até o quarto dia de nascimento, ou seja, indica alterações morfofuncionais (alterações estruturais ou metabólicas no feto), as quais seriam incompatíveis com a vida e levariam à morte prematura dos recém-nascidos. Nossos dados (Tabela II) mostram que não houve diferença estatística entre os grupos: tratado e controle, embora tivéssemos observado uma presença relativamente alta de filhotes mortos após o quarto dia de vida. Possivelmente esse fato deve-se a condições ambientais do biotério, dificuldade amamentação da prole, etc.

Algumas malformações induzem a morte nos primeiros dias de vida, outras não provocam a morte logo após o nascimento, mas por também comprometerem o funcionamento do organismo leva depois de um período maior

de tempo ao óbito do recém-nascido. Esses tipos de malformações são observados através da avaliação do índice de lactação, onde expressa a porcentagem de sobrevivência da prole no 21º dia em relação ao número de animais nascidos.

Os índices de viabilidade e lactação não foram significativamente diferentes entre os grupos tratados e o grupo controle, o que sugere que o extrato, neste caso, não provoca malformações fetais durante toda a gestação e nem interfere, a princípio, no processo de lactação (Tabela II). Esses resultados foram reforçados, observando-se a não existência de alterações nos aspectos macroscópicos gerais externos como polidactilia, evisceração fetal, exoftalmia, palatosquese, entre outras.

As médias das massas corporais dos filhotes no 1º e no 30º dia dos grupos tratado e controle, também não foram significativamente diferentes entre si, o que indica que o tratamento não leva ao nascimento de filhotes com baixo peso e não interfere no desenvolvimento da prole até a fase de desmame que se dá no 21º dia de vida.

Segundo HARKNESS, S.E. e WAGNER, J.E. (1993), a massa corporal de um filhote ao nascer se situa entre 5 e 6g. Cabe salientar que, em alguns dos nossos resultados, esses valores flutuaram um pouco acima dessa faixa, principalmente pela dificuldade em pesar imediatamente após o nascimento.

Em outro passo, procuramos avaliar um possível efeito tóxico do extrato ao nível comportamental ou neurológico. Através dos indicadores usados (Tabelas III e IV) no trabalho não constatamos nenhuma diferença no desenvolvimento comportamental e/ou neurológico entre os grupos controle e tratado.

O tratamento durante a segunda fase de gestação (7º ao 14º dia) englobou o estágio da gestação onde acontece diferenciação celular, a organogênese.

O estágio de organogênese é a fase mais susceptível à ação de agentes teratogênicos. Nesta fase, podem ocorrer as malformações provocadas por esses agentes. O tipo de malformação depende da fase evolutiva do embrião e da afinidade do composto pelo tecido embrionário, assim, nesta fase, foi avaliada a capacidade do extrato induzir malformações fetais que fossem incompatíveis com

a gestação. Pode-se inferir que o extrato, administrado do 7° ao 14° dia de gestação, não apresentou efeitos tóxicos. Esses dados são mostrados na Tabela V, visto que a massa corporal das mães durante a prenhez, a média de filhotes por mãe, índice de reabsorção, entre outros, também não se encontraram significativamente alterados em relação ao grupo controle, indicando com isso que, além das fêmeas manterem a capacidade de serem fecundadas, apresentam também um número normal de filhotes que, segundo HARKNESS, S.E. e WAGNER, J.E., (1993), varia entre 6 e 12 filhotes (vide, Apêndice).

O ambiente intra-uterino adverso leva geralmente ao retardo do crescimento fetal. As anomalias congênitas associadas ao tamanho fetal diminuído e ao nascimento se constituem em um grande grupo nos quais pode-se citar basicamente: anomalias cromossômicas, erros inatos do metabolismo, baixa estatura primordial (RAMOS, J.L.A., 1986). Para avaliarmos se o extrato poderia induzir malformações que pudessem comprometer o desenvolvimento normal do feto foram calculadas as médias de peso dos grupos tratados com o respectivo controle, na qual, não observamos diferença significativa (Tabela V).

Nos experimentos de performance reprodutiva dos ratos machos, realizou-se o mesmo protocolo que o utilizado para a avaliação da fertilidade em fêmeas. Observamos que não houve alteração significativa entre os grupos controle e tratado na massa corporal das fêmeas, assim como, na duração da gestação.

Os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao respectivo grupo controle em relação ao índice de fertilidade (Tabela VI). Esse índice na avaliação da fertilidade do macho, reflete a capacidade do mesmo fecundar a fêmea. Com esse resultado, pode-se sugerir inicialmente que o extrato não interfere na maturação e na viabilidade do espermatozóide.

Na observação do índice de gestação (Tabela VI), pode-se observar que não ocorreram diferenças significativas em relação ao grupo controle, o que nos dá um indicativo de que o extrato não induziu no espermatozóide alterações estruturais ou metabólicas que provocassem, secundariamente no embrião alterações que culminassem em natimortos durante a gestação.

Analisando-se os índices de viabilidade e lactação (Tabela VI), também não observamos diferenças dos índices entre os grupos tratados e o controle.

A massa corporal da prole foi acompanhada durante seu desenvolvimento e também não foram significativamente diferentes entre os grupos tratados e o controle (Tabela VI). Observamos também que não ocorreram alterações nos aspectos macroscópicos gerais externos.

O conjunto dos dados apresentados demonstra inicialmente que o EHAJB não apresenta toxicidade reprodutiva e não interfere com o desenvolvimento da prole.

Em relação aos perfis bioquímico e hematológico, uma das dificuldades encontradas é obter dados da literatura referente aos valores de referência de ratos, uma vez que está bem estabelecido (NEPTUN, D. A. et al., 1986; HARKENESS, S.E. e WAGNER, J.E., 1993) que os animais de experimentação exibem variações na dependência de fatores ambientais, alimentação, condições do biotério, entre outras. Em nosso trabalho, comparamos os resultados com os valores estabelecidos por HARKENESS, S.E. e WAGNER, J.E. (1993) veja no apêndice.

Os níveis de glicose, os quais poderiam ser indicativos, caso existissem, de alterações hepáticas (hipoglicemia) e pancreáticas (hiperglicemia) e os níveis de creatinina que é um derivado do metabolismo protéico não se alteraram. Estes se encontram reduzidos nos casos de atrofia muscular e elevados em estados febris.

As atividades séricas das transaminases (ALT – AST) são de grande importância para o diagnóstico de distúrbios hepatobiliares, assim como os níveis de bilirrubina total, direta, e indireta (NOGUEIRA, D. M., 1990). Nossos resultados apontam que o extrato não apresenta efeito hepatotóxico. Os níveis normais de AST também são um indicativo da ausência de lesões no miocárdio e de pericardite ativa.

Os níveis protéicos totais e suas frações, também permaneceram sem modificações significativas, esses resultados nos dão o indicativo de que não há presença de hepatopatia, que levaria a uma diminuição dos níveis de proteínas total por redução na produção, como também podemos descartar, a princípio,

presença de doenças renais que levassem à perda protéica excessiva. Entretanto, permanece a ser estabelecido a razão da inversão albumina/globulina.

Na análise das frações lipídicas do sangue foram avaliados colesterol total e triglicerídeos. Variações fisiológicas da colesterolemia estão relacionadas com a dieta, idade e com o sexo. Alterações patológicas podem se dar devido à presença de alterações no pâncreas (icterícia obstrutiva), fígado (lesões hepáticas) e em alguns tipos de doenças renais. Variações na lipidemia (nível de triglicerídeos no soro) podem ocorrer fisiologicamente, após as refeições e, patologicamente na síndrome nefrótica, pancreatite e na cirrose hepática.

Em nosso estudo, os níveis de uréia não foram significativamente alterados, o que nos dá um indicativo que não há comprometimento renal.

A determinação quantitativa da creatinina é utilizada para se avaliar a função renal, com os níveis de creatinina no sangue, temos uma idéia da depuração renal deste metabólito protéico e podemos avaliar a função renal. Em nossos resultados, a excreção renal de creatinina nos grupos tratados não sofreu alteração significativa em relação ao grupo controle.

Quanto ao perfil hematológico, observamos que estes não se encontraram significativamente alterados em relação ao grupo controle. Esses parâmetros são úteis no diagnóstico de várias doenças. O número total de eritrócitos, por exemplo, pode ser alterado por variações fisiológicas, nas anemias, onde os níveis de hemoglobina (Hb) estão reduzidos e nas policitemias determinadas pela hipóxia, doenças cardíacas e pulmonares crônicas.

O hematócrito (Ht) é útil para indicar alteração no nível de leucócitos, hemácias, plaquetas e plasma. Este parâmetro se altera em casos de desidratação, policitemias, anemias, descompensação cardíaca, entre outros.

O volume corpuscular médio (VCM) nos dá a informação da presença ou ausência de anemias e as classifica morfologicamente (normocítica, microcítica ou macrocítica). A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) é classificada no caso da presença de anemias, quanto ao conteúdo hemoglobínico (normocrômica ou hipocrômica). Os resultados do hemograma são um indicativo de que o extrato não interfere na hematopoese nem na fisiologia normal dos

eritrócitos, pois não observamos diferenças significativas nos índices eritrocitários do grupo controle em relação aos grupos tratados.

Os leucócitos podem sofrer variações numéricas causadas pelo uso de medicamentos ou substâncias tóxicas. As formas mais graves de leucopenia (diminuição do número total de leucócitos) apresentam quadros característicos na anemia aplástica, leucemias aleucêmicas e granulocitopenia (CARVALHO, W.F, 1983). Medicamentos e intoxicações também podem levar a leucocitoses, como no caso do uso da antipirina, pirogalol, digital, terebintina (YOUNG, G.A.R. e VINCENT, P.C., 1980). Não ocorreram diferenças significativas no número de leucócitos totais, nem no número das linhagens dos leucócitos, sendo isto um indicativo de que o EHA não tem ação tóxica sobre a medula óssea. Podemos afirmar que o extrato não interferiu com os perfis bioquímicos e hematológicos. As diferenças estatísticas encontradas foram pontuais e interpretamos inicialmente como sem relevância clínica.

No passo seguinte procuramos verificar a influência do tratamento crônico por 90 dias sobre a massa corporal e dos principais tecidos. Observamos que a evolução da massa corporal em ambos os sexos foram similares a obtida com o grupo controle, da mesma forma, a massa dos tecidos não foi alterada, reforçando em princípio a ausência de toxicidade do extrato.

E, por fim procedeu-se a análise microscópica de alguns órgãos com o objetivo de obter um estudo mais conclusivo acerca de supostas alterações histológicas que possam ser causadas pelo uso prolongado do extrato.

A administração subaguda do extrato em ratos de ambos os sexos não levou a alterações morfológicas no coração, rins, fígado e córtex cerebral. Não ocorreram também alterações nos órgãos reprodutivos de ratos machos (testículos) e fêmeas (ovários). Ocorreu a presença de pequeno infiltrado inflamatório no pulmão de rato tratado com a dose de 625mg/Kg. Este infiltrado possivelmente se deu por pequena infiltração de extrato nas vias aéreas devido ao procedimento de gavagem.

Esses resultados reforçam nossos estudos bioquímicos e hematológicos que demonstraram que o extrato não altera esses parâmetros.

VI CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apontam na direção de que o EHA de *Operculina alata*, popularmente conhecida como Jalapa-do-Brasil, possui baixa toxicidade por via oral e não interfere na fertilidade, gestação, desenvolvimento embrionário, performance reprodutiva, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos e na morfologia dos órgãos nas doses usadas.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, T, The return of thalidomide. **Sci. News** 146: 424-425, 1994.

ALMEIDA, E.R., MELO, A. M., XAVIER H., Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and Boldine in rats. **Phytother. Res**, v.14 (2), mar, p.99-102, 2000.

BARNES D.G., DOURSON, M., Reference dose (RfD); Description and use in health risk assessments. Reg. **Toxicol Pharmacol** v.8: p.471-486, 1988.

BARROS, S.B.M. DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. (In: Oga, S. Fundamentos de Toxicologia, 2ª ed. São Paulo, Editora Atheneu, p.58-76, 2003.

BEDRAN, J.N., **O uso de drogas na gravidez e lactação**, Ed. Guanabara S.A., Rio de Janeiro, 1988.

BENESOVÁ, O. Drug treatment in Perinatal Period and Risk of Functional Teratogenicity. EUROTOX'95, **Toxicol. Lett. Sup.** 1/78 1-88, p. 3, 1995.

BRAGA, R.: **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**, 3º edição comemorativa ao II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais, coleção mossoroense – volume XLII, Mossoró, Rio Grande do Norte, 1976.

BRIEJER, M.R.; SCHUURKES, J.AJ. and SARNA, S.K. idiopatic constipation: too few stools and too little knowledge. **TIPS** (vol. 20). – January 1999.

CASTRO J.A. toxicologia básica mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. **Acta Bioq Clin Latinoamericana**, v.2: p.197-206, 1993.

CARLINI, E.A.; MACAUBAS, C.I.P.; OLIVEIRA, M.G.M.; BARBOSA, V.P. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira Santa” e outras). CEME, Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais , 1988. p. 49-66.

CARVALHO, W.F., **Técnicas médicas de hematologia e Imuno-hematologia**. 3ª. Edição, 1983, Ed. Cooperativa editora e de cultura médica Ltda. Belo Horizonte, Brasil

CLARK, D.O., Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. **Toxicol Methods**. v.3: p.223-251, 1993.

COELHO, M.G.P., MARQUES, P.R., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., NETO, J.F.N., SABINO, K.C.C., Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seed in mice with collagen-induced arthritis. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 77: p.159-165, 2001.

COSTA, A.F., **Farmacognosia**, 3º ed, v.3, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2000.

DELLA-ROSA, H.V.; SIQUEIRA, M.E.P.B. FERNICOLA, N.A.G.G. , **Monitorização Biológica da Exposição Humana e Agentes Químicos**, Fundacentro, S.Paulo, 1991 67p.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.82: p.337-90, 1944.

DUFOUR, P., GENDRE, P. Long – term mucosal alterations by sennosides and related compounds. **Pharmacology**, 1988, 36, Suppl. 1, 194 – 202.

ELBETIEHA, A., AL-HAMOOD M.H., ALKOFAHI, A. BATAINEH, Reproductive toxicology potentials of *Salvia fruticosa* (Labiatae) in rats. **J. Ethnopharmacology**, v.61: p.67-74, 1998.

FAUSTMAN E.M., ALLEN B.C., KAVLOCK, R.J., KIMEL, C.A. : Dose-response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundam. Appl. Toxicol.** V.23: 478-486, 1994.

FOWLER, J.S.L.N. RUTTY, D.A., Methodological aspects of acute toxicity testing particularly LD50 determinations present use in development of new drugs. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.52: p.20-30, 1983.

FRITZ, H. GIESE, K., Evaluation of the teratogenic potential of chemicals in the rat. **Pharmacology**, v.40: p.1-28, 1990.

GANAPATHY, V., PRASAD, P.D., GANAPATHY, M.E., LEIBACH, H.F., Drugs of abuse and placental transport, **Adv. Drug Deliver Ver.**, v.1: p.99-110, 1999.

GARLAND, T., CARTER, P.A., Evolutionary physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, v.56: p.579, 1994.

GAYLOR, D.W., CHEN, J.J., Dose-response models for developmental malformations. **Teratology**, v.47: p.291-7, 1993.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos roedores**. 3ª ed. São Paulo, Livraria Roca. Brasil. 1993.

JOLY, A.B., **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**, 2 ed., editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.

LISON, L – **Histochemie et cytochemie animales**. Paris, Gauthiers – Villars, 842p. 1960.

MALONE, R. A. Pharmacological approach to natural products screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, ed. By H. Warner and P. Wolf. P. 24 – 53, Springer – Verlag, Berlin, 1977.

MENEGOLA, E., BROCCIA, M.L., PRATI, M., GIAVINI, E., Postcoital antifertility activity of aminoalcohols, **Reprod. Toxicol.**, v.12 (3): p.371-374, 1998.

MICHALANY, J., **Técnica em anatomia patológica**. E.P.U. 1980.

MILLER, L.C., TAINTER, M.L., Estimation of the ED₅₀ and error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 57, 1944, p. 261-264.

MORI, H.; SUGIE, S.; NIWA, K.; TAKAHASHI, M.; KAWAIAIK, K. Induction of intestinal tumours in rats by chrysazin. **Br. J. Cancer**, 1985, 52, 781 – 783.

MORI, H.; SUGIE, S.; NIWA, K.; YASHIMI, N.; TANAKA, T.; HIRANO, I. Carcinogenicity of chrysazin in large intestine and liver of mice. **Jpn. J Cancer Res.**, 1986, 77, 871 – 876.

NEPTUN, D.A.; SMITH, C.N. IRONS, R. D. Effect of sampling site and collection method paramtrs in Fisher -344rats. **Fund. Appl. Toxicol.** v7: p.658-663, 1986.

NOGUEIRA, D.M., STRUFALDI, M., HIRATA, M.H., ABDALLA, D.S.P., HIRATA, R.D.C., **Métodos de Bioquímica Clínica Técnica e interpretação**, Ed. Pancast, 1990, São Paulo, Brasil.

OGA, S., **Fundamentos de toxicologia**, Atheneu editora de São Paulo, p. 89-90, 1996.

PAUMGARTTEN, F.J.R., CARVALHO, R.R., MADI, K., CHAHOUD, I., Study of the effects of β -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31(7): 955-965, 1998.

PLANCHON, L.; BRETIN, P.: **Présis de Médicale, Librairie Maloine**, Paris, 1937.

SCHWETZ B.A., MORRISSEY R.E., WELSCH, F., KAVLOCK, R.J. In vitro teratology. **Environ Health Perspect** v.94: p.265-268, 1991.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria no 116/96. Normas para estudo da toxicidade de produtos naturais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de agosto de 1996.

RAMOS, J.L.A., LEONE, C.R., **O recém nascido de baixo peso**, Monografias Médicas, série “Pediatria” . Volume XXVII, São Paulo, Editora Sarvier, 1986, Brasil.

REYNOLDS J C: Prokinetic agents: a key in the future of gastroenterology, *Gastroenterol Clin North Am* 18: 437 – 457, 1989.

SHELLARD, E.J. The Chemistry of some convolvulaceous resins. I Vera Cruz Jalap. Chelsea. Coll.Sci. e Technol. London. **Plant Med.** 9, 102-16. 1958.

SPILLER, R. Management of constipation. Part 2: when fibre fails. In: Controversies in therapeutics. **Br Med J** 300: 1064 – 1065, 1990.

STICKNEY, J.C.; NORTHUP, D.W. 1959. In: Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais. Lapa, A.J.; Souccar, C.; Lima-Landman, M.T.R. e De Lima, T.C.M. CYTED/RIVAPLAMED, 2001 p.51-59.

TESK, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de Fitoterapia**. Paraná: Herbarium, 3ª edição, p. 190 – 191, 1997.

VIJAYALAKSHMI, T., MUTHULAKSHMI, V., SACHDANANDAM P., Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacol.**, v69: p.9-15, 2000.

WHO – **principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals**. Parte I EHC 6, 1978.

YOUNG, G.A.R.; VINCENT, P.C., Drug-induced Agranulocytosis. **Clin. Haematol.** v.9: p.483, 1980.

Avaliação toxicológica do extrato hidroalcoólico (EHA) do tubérculo de *Operculina alata* (Ham.) Urban

Gonçalves, E.S., Aguiar, F.J., Silva, E.J.R., Dimech, G.S., ¹Fraga, M.C.C.A., ¹Afiatpour, P., ¹Wanderley, A. G.

¹Depto. de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, s/n CEP: 50.670-901, Recife-PE, Brasil.

Resumo

Operculina alata (Ham.) Urban conhecida popularmente como Jalapa-do-Brasil, pertence à família das Convolvulaceae. Possui propriedades laxantes e catárticas. Apesar da sua ampla comercialização (Aguardente alemã®) na forma de extrato hidroalcoólico (EHA) existem poucos estudos sobre a segurança em seu uso. Com o propósito de acrescentar dados à segurança deste extrato foram realizados em ratas estudos de toxicidade aguda (DL₅₀) e crônica (influência na massa corpórea e principais órgãos e determinação dos parâmetros bioquímico e hematológico) por via oral. Nossos resultados demonstram que o EHA até 5,0g/kg não causou morte no ensaio de toxicidade aguda e não houve variação significativa na massa corpórea nem dos principais órgãos. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos após o tratamento crônico com EHA se mantiveram dentro dos valores de referência para a espécie, com variações pontuais. Em conclusão, nossos resultados mostram que a administração oral do EHA de Jalapa do Brasil possui baixa toxicidade e não modifica os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Abstract

Operculina alata (Ham.) Urban known popularly as Jalapa-from-Brazil, belongs to the family of Convolvulaceae. It possesses laxatives and cathartic properties. In spite of its wide commercialization (Aguardente alemã®) in the form of hidroalcoholic extracts (HAE) there is little information available in the literature regarding its safety. With the purpose of increasing data the safety of this extract they were accomplished in female rats studies of acute toxicity (LD50) and chronic (influence in the body mass and main organs and determination of the biochemical and haematological parameters) by oral administration. Our results demonstrate that oral administration of up to 5,0g/kg of HAE did not have lethal effect and there was not significant variation in the corporal mass nor of the tissues. The biochemical e hematological profiles after chronic treatment with HAE stayed inside of the reference values for the species, with insignificant variations. In conclusion, our results suggest that oral administration of HAE of Jalapa-do-Brasil presents low toxicity it does not modify the biochemical e hematological parameters.

Keywords: *Operculina alata* (Ham.) Urban; acute and chronic toxicity.

1. Introdução

A *Operculina alata* (Ham.) Urban, pertence à família das Convolvulaceae sendo conhecida popularmente como jalapa-do-brasil, batata de purga, jalapa verdadeira, etc (PLANCHON., 1937). Análises fitoquímicas descrevem a presença de saponinas, amido, sistosterina-glicosídeo conhecida como ipuranol, fístosterina, mucilagem, manitol, ácido palmítico, málico e caféico, substâncias oleosas, odorantes e resinosas numa quantidade de 15 a 18%, esta composta por 80% de convolvulina e 20% de jalapina. (TESKE, M. e TRENTTINI, A.M.M., 1997). Comercialmente o EHA de jalapa-do-brasil (aguardente alemã®) é explorado pelo laboratório Sobral (PI) por possuir atividade laxante. Apesar de sua ampla utilização existem raros estudos sobre a segurança em seu uso. Afim de acrescentar dados a segurança deste extrato realizamos ensaios de toxicidade aguda (DL₅₀) e crônica.

2. Metodologia

2.1. Animais

Foram utilizados ratas Wistar fêmeas, *Rattus norvegicus* variação albinus entre 2-4 meses de idade, criadas no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos em condições controles de iluminação 12h (ciclo claro/escuro) e temperatura (22-25 °C).

2.2. Material botânico

O material utilizado foi fornecido pelo Laboratório SOBRAL ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos do Depto. de Ciências

Farmacêuticas da UFPE. Esse foi classificado e identificado pelo Herbário Dárdano de Andrade Lima, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), depositado sob o número 58836.

2.3. Preparação do extrato

Os fragmentos do tubérculo da Jalapa foram selecionados, limpos e macerados a 10% com solução extratora hidroalcoólica a 40% por sete dias. Ao final desse período o extrato fluido foi filtrado, concentrado em rota- evaporador e determinado o teor de resina. Nos experimentos descritos a seguir os teores de resina dosados variaram entre 11,5 a 21,9%. O extrato foi armazenado em geladeira (-4°C) e dividido em pequenas alíquotas para uso nos procedimentos experimentais. Quando necessário o material foi diluído em água destilada.

2.4. Determinação da DL₅₀

O extrato hidroalcoólico da Jalapa do Brasil (EHAJB) foi administrado em doses crescentes (0,625; 1,25; 2,5 e 5,0g/kg) por via oral (n=10/grupo) privados de ração por 12 horas. A mortalidade em cada grupo foi observada por até 14 dias e o valor da DL₅₀ foi estimado segundo o método de MILLER, L.C., e TAINTER, M.L. (1944).

2.5. Influência do tratamento com EHA sobre a massa corporal das ratas adultas e dos principais órgãos

A cada 30 dias foi determinada a massa corpórea das ratas. No final dos 90 dias de tratamento, quatro grupos (n=9/grupo) de ratas foram sacrificadas por anestesia com éter e os órgãos: coração, fígado, baço, rim, pulmão, glândula adrenal, ovário e útero foram

identificados, removidos e determinado sua massa úmida em balança analítica (VIJAYALAKSHMI, T., *et al.*, 2000).

2.6. Avaliação crônica dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

2.6.1. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos

Quarenta animais correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratados durante 90 dias consecutivos por via oral com EHA 25, 125 e 625mg/kg (grupo tratado) ou água destilada (grupo controle). A cada 30 dias procedeu-se a coleta de sangue (cerca de 2,5mL) por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, os animais foram anestesiados com éter. A coleta foi obtida com os animais privados de ração anteriormente por 12h.

O sangue coletado foi acondicionado em tubo de hemólise sem anticoagulante. Após 1 hora o sangue foi separado por centrifugação (3500 rpm por 10 minutos) e mantido a -4 °C até o seu uso. Os padrões analisados foram: glicose (soro): enzimático colorimétrico; uréia; creatinina (soro): cinética enzimática; transaminases (soro): cinética enzimática; colesterol total (soro): enz. colest. oxidase/peroxidase; triglicerídeos (soro): GPO-PAP – enzimático colorimétrico; fosfatase alcalina (soro): cinético enzimático; bilirrubina total, direta e indireta (soro): Mallou-Evelyn e proteínas totais e frações (soro): biureto/VBC, através do aparelho Dimension (Date Behring) (COELHO, M.G.P., *et al.*, 2001).

2.6.2. Avaliação dos parâmetros hematológicos

O sangue coletado (cerca de 2,5 mL) foi acondicionado em tubo de hemólise contendo cerca de 50 µL de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante e posteriormente processado para determinação do hemograma (analisador de células hematológicas Coulter STKS) (COELHO, M.G.P., *et al.*, 2001).

3.0. Resultados

3.1. Avaliação da toxicidade aguda e determinação da Dose Letal (DL₅₀)

Nossos resultados mostram que por via oral até 5,0g/kg o EHA não alterou o padrão de comportamento dos animais e não produziu morte. Inviabilizando assim, a determinação da DL₅₀.

3.2 Efeito da administração oral do EHA sobre a massa corporal das ratas adultas e dos principais órgãos

Na tabela I observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas na evolução da massa corporal do grupo tratado de fêmeas respectivamente EHAJB 25, 125 e 625mg/kg (35,1; 34,8 e 33,7%) em relação ao grupo controle (33,8%). Da mesma forma na tabela II observa-se que não houve diferenças estatísticas na massa úmida dos tecidos: coração, fígado, baço, rim, cérebro, pulmão, adrenal, ovário e útero.

Tabela I: Efeito da administração oral por 90 dias de EHAJB (25, 125 e 625mg/kg) sobre a evolução da massa corporal de ratas.

Fêmeas	1º dia	30º dia	60º dia	90º dia
Controle	185,2 ± 4,7	208,2 ± 6,2	221,5 ± 5,2	247,8 ± 6,1
EHAJB	192,5 ± 5,6	214,8 ± 7,4	228,1 ± 6,7	260,0 ± 4,4

(25mg/kg) EHAJB	203,1 ± 7,1	229,7 ± 5,8	237,4 ± 7,2	273,7 ± 5,7
(125mg/kg) EHAJB	210,4 ± 6,6	232,9 ± 6,6	246,3 ± 7,5	281,3 ± 6,9

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de 9 animais por grupo.

(25, 125 e 625mg/kg) sobre a massa dos órgãos (g/100g de animal) de ratas.

Tabela II: Efeito da administração oral por 90 dias de EHAJB

Fêmeas	Controle	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Coração	0,33 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,02
Fígado	3,38 ± 0,21	3,42 ± 0,30	3,28 ± 0,18	3,35 ± 0,41
Baço	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,03
Rim	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,03
Cérebro	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,07	0,32 ± 0,04	0,38 ± 0,05
Pulmão	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,02
Adrenal	0,005 ± 0,0004	0,006 ± 0,0003	0,006 ± 0,0003	0,005 ± 0,0002
Ovário	0,44 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,40 ± 0,06	0,41 ± 0,04
Útero	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,07	0,40 ± 0,06	0,39 ± 0,08

Obs: Os valores representam as médias ± e.p.m. de 9 animais por grupo.
Não foi observada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos.

3.3. *Parâmetros bioquímicos*

No tratamento por 30 dias nas fêmeas (tabela III) observamos aumento significativo nos valores de ALT e fosfatase alcalina para a menor dose em respectivamente 41 e 42% e glicose para as doses 125 e 625mg/kg respectivamente 31 e 27% do valor controle.

As tabelas IV e V mostram que o tratamento por 60 dias aumentou a glicose de forma significativa em todas as doses em

respectivamente 24, 42 e 35% e fosfatase alcalina em 34% e por 90 dias em 30% do valor controle.

3.4. *exame hematológico*

Nas tabelas VI e VII o perfil hematológico manteve-se inalterado, a exceção da contagem diferencial de linfócitos atípicos, monócitos e bastonetes.

TABELA III: Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	69,1 ± 1,1	62,4 ± 5,1	90,6 ± 5,6*	87,9 ± 2,6*
Uréia (mg/dL)	41,4 ± 2,3	33,6 ± 4,2	41,4 ± 1,6	38,4 ± 6,1
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,2	0,60 ± 0,1	0,40 ± 0,1
Aspartato-aminotransferase (U/L)	177,8 ± 13,2	178,4 ± 9,9	170,4 ± 9,3	174,7 ± 9,2
Alanina-aminotransferase (U/L)	45,1 ± 3,0	63,4 ± 4,4*	45,4 ± 2,5	57,1 ± 3,8
Colesterol total (mg/dL)	68,6 ± 5,4	51,6 ± 7,3	63,0 ± 7,1	49,7 ± 8,2
Triglicerídeos (mg/dL)	81,8 ± 11,4	63,6 ± 8,5	81,7 ± 6,1	86,1 ± 8,5
Fosfatase alcalina (U/L)	57,7 ± 3,9	68,4 ± 7,3	66,0 ± 5,4	82,1 ± 4,4*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,30 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,20 ± 0,07
BBilirrubina direta (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,10 ± 0,03
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,3	7,6 ± 0,2	7,4 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Globulina (g/dL)	5,9 ± 0,1	5,0 ± 1,1	6,2 ± 0,2	5,0 ± 0,8
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,03

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA IV: Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	54,2 ± 4,4	67,2 ± 4,0*	77,2 ± 4,9*	73,2 ± 3,5*
Uréia (mg/dL)	38,6 ± 3,2	35,4 ± 4,6	37,3 ± 1,8	38,7 ± 5,1
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,1	0,50 ± 0,2	0,60 ± 0,1	0,40 ± 0,2
Aspartato-aminotransferase (U/L)	153,2 ± 8,4	161,4 ± 6,1	165,3 ± 6,4	169,3 ± 6,3
Alanina-aminotransferase (U/L)	49,3 ± 3,6	60,2 ± 3,9	48,3 ± 3,9	54,3 ± 3,9
Colesterol total (mg/dL)	64,2 ± 4,3	60,1 ± 6,2	65,1 ± 6,2	63,2 ± 7,1
Triglicerídeos (mg/dL)	89,2 ± 7,4	70,6 ± 5,2	72,2 ± 4,2	87,2 ± 3,8
Fosfatase alcalina (U/L)	63,2 ± 5,4	53,2 ± 8,0	61,2 ± 4,4	84,7 ± 6,3*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	7,1 ± 0,2	7,6 ± 0,6	7,1 ± 0,2	7,2 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Globulina (g/dL)	5,3 ± 0,2	6,1 ± 0,2	5,6 ± 0,8	5,5 ± 0,8
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,04

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* **Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).**

TABELA V: Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Glicose (mg/dL)	73,8 ± 3,2	70,8 ± 2,8	69,2 ± 3,9	69,1 ± 4,1
Uréia (mg/dL)	40,3 ± 2,8	39,9 ± 3,1	40,4 ± 2,4	40,1 ± 3,5
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,2
Aspartato-aminotransferase (U/L)	161,4 ± 7,4	173,1 ± 5,2	177,8 ± 7,9	178,4 ± 8,1
Alanina-aminotransferase (U/L)	51,4 ± 4,2	59,1 ± 4,1	52,4 ± 6,1	60,1 ± 5,1
Colesterol total (mg/dL)	67,7 ± 3,8	63,2 ± 2,3	67,7 ± 3,4	65,2 ± 6,0
Triglicerídeos (mg/dL)	94,1 ± 6,1	69,7 ± 8,2	77,2 ± 6,1	91,6 ± 5,2
Fosfatase alcalina (U/L)	69,7 ± 6,1	62,1 ± 4,8	67,8 ± 5,2	90,4 ± 5,6*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,02
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Proteínas totais (g/dL)	6,9 ± 0,2	7,7 ± 0,9	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,2
Albumina (g/dL)	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Globulina (g/dL)	5,2 ± 0,2	5,9 ± 0,1	5,5 ± 0,6	5,8 ± 0,6
Relação Albumina/Globulina	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,30 ± 0,06

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

* **Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).**

TABELA VI: Efeito do tratamento por 30 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,2	7,3 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	14,8 ± 0,2	15,1 ± 0,4	14,4 ± 0,4	14,4 ± 0,1
Hematócrito (%)	41,2 ± 0,8	41,5 ± 1,0	39,5 ± 1,3	38,8 ± 0,3
VCM (fL)	54,0 ± 0,6	54,8 ± 0,9	53,1 ± 0,5	52,8 ± 0,4
HCM (pg)	19,4 ± 0,2	19,9 ± 0,3	19,4 ± 0,3	19,6 ± 0,1
CHCM (g/dL)	35,9 ± 0,3	36,3 ± 0,1	36,5 ± 0,6	37,0 ± 0,2
RDW (%)	13,1 ± 0,2	12,9 ± 0,5	13,5 ± 0,4	13,4 ± 0,2
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	933,9 ± 27,6	904,0 ± 32,6	846,7 ± 43,6	897,0 ± 37,1
VPM (fL)	5,6 ± 0,06	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,7 ± 0,2	6,6 ± 0,6	6,5 ± 0,5	7,6 ± 0,8
Bastonetes (%)	0	0	0	0,10 ± 0,1
Neutrófilos (%)	22,3 ± 2,2	22,2 ± 3,2	24,3 ± 1,6	21,4 ± 1,9
Eosinófilos (%)	1,6 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,6	0,80 ± 0,2
Basófilos (%)	0,20 ± 0,1	0,30 ± 0,2	1,1 ± 0,5	0,40 ± 0,2
Linfócitos típicos (%)	67,4 ± 1,9	72,5 ± 3,3	63,7 ± 1,3	72,5 ± 1,8
Linfócitos atípicos (%)	1,9 ± 0,4	2,2 ± 1,0	6,1 ± 1,2*	2,0 ± 0,6
Monócitos (%)	6,6 ± 0,6	1,8 ± 0,2*	3,3 ± 1,2*	2,9 ± 0,8*

Os valores representam as médias ± erro padrão de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA VII: Efeito do tratamento por 60 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultos.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,5 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2	7,4 \pm 0,4	7,2 \pm 0,2
Hemoglobina (g/dL)	14,2 \pm 0,3	14,5 \pm 0,6	14,2 \pm 0,3	13,9 \pm 0,6
Hematócrito (%)	40,2 \pm 0,9	40,8 \pm 1,2	40,2 \pm 0,8	37,3 \pm 0,4
VCM (fL)	53,8 \pm 0,6	56,2 \pm 0,9	54,2 \pm 0,6	51,8 \pm 0,5
HCM (pg)	19,0 \pm 0,2	19,9 \pm 0,6	19,2 \pm 0,3	19,3 \pm 0,1
CHCM (g/dL)	35,6 \pm 0,3	35,7 \pm 0,2	35,3 \pm 0,5	37,2 \pm 0,3
RDW (%)	13,0 \pm 0,3	13,0 \pm 0,4	12,8 \pm 0,4	13,0 \pm 0,3
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	870,2 \pm 38,3	912,0 \pm 27,5	912,4 \pm 53,3	932,4 \pm 73,2
VPM (fL)	5,4 \pm 0,04	5,3 \pm 0,2	5,7 \pm 0,04	5,7 \pm 0,05
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,5 \pm 0,3	6,3 \pm 0,5	6,2 \pm 0,6	6,8 \pm 0,8
Bastonetes (%)	0	0	0,20 \pm 0,1	0,40 \pm 0,1*
Neutrófilos (%)	20,6 \pm 3,2	20,1 \pm 6,2	18,2 \pm 1,4	25,4 \pm 2,9
Eosinófilos (%)	0	0,80 \pm 0,4	0	0,60 \pm 0,1
Basófilos (%)	0	0	0	0
Linfócitos típicos (%)	72,3 \pm 2,9	69,4 \pm 2,8	78,1 \pm 5,2	68,2 \pm 2,2
Linfócitos atípicos (%)	1,7 \pm 0,4	2,6 \pm 1,0	2,3 \pm 0,9	3,7 \pm 0,7
Monócitos (%)	5,3 \pm 0,6	5,6 \pm 1,7	1,2 \pm 0,9*	1,6 \pm 0,9*

Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 animais.

* Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

TABELA VIII: Efeito do tratamento por 90 dias consecutivos com EHAJB (25, 125 e 625mg/kg, v.o.) de Jalapa do Brasil sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas.

PARAMÊTROS	CONTROLE	EHAJB 25mg/kg	EHAJB 125mg/kg	EHAJB 625mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,6 \pm 0,2	7,1 \pm 0,4	7,6 \pm 0,2	6,9 \pm 0,2
Hemoglobina (g/dL)	14,5 \pm 0,3	14,2 \pm 0,2	14,5 \pm 0,5	13,6 \pm 0,5
Hematócrito (%)	40,9 \pm 0,8	39,4 \pm 1,0	40,2 \pm 0,9	37,6 \pm 0,6
VCM (fL)	54,0 \pm 0,4	55,5 \pm 0,7	52,7 \pm 0,8	54,2 \pm 0,7
HCM (pg)	19,1 \pm 0,2	20,0 \pm 0,3	19,0 \pm 0,3	19,5 \pm 0,7
CHCM (g/dL)	35,2 \pm 0,3	36,0 \pm 0,2	36,1 \pm 0,4	36,0 \pm 0,2
RDW (%)	14,3 \pm 0,3	13,4 \pm 0,6	13,0 \pm 0,3	12,7 \pm 0,3
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	902,4 \pm 51,1	897,4 \pm 41,3	904,7 \pm 28,5	941,1 \pm 33,3
VPM (fL)	5,3 \pm 0,1	5,4 \pm 0,2	5,4 \pm 0,1	5,6 \pm 0,04
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,0 \pm 0,2	6,9 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2	7,1 \pm 0,3
Bastonetes (%)	0	0	0	0,6 \pm 0,2
Neutrófilos (%)	23,6 \pm 2,9	18,5 \pm 3,5	17,3 \pm 3,1	30,3 \pm 3,2
Eosinófilos (%)	0,60 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	0	1,0 \pm 0,2
Basófilos (%)	0	0,60 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,1
Linfócitos típicos (%)	71,6 \pm 5,6	66,1 \pm 3,7	79,8 \pm 8,0	57,2 \pm 1,8
Linfócitos atípicos (%)	0,50 \pm 0,6	4,8 \pm 2,1	3,1 \pm 0,6	5,3 \pm 0,6
Monócitos (%)	3,7 \pm 1,0	6,8 \pm 1,2	2,8 \pm 0,8	5,3 \pm 0,7

Os valores representam as médias \pm erro padrão de 10 animais.

4.0. Discussão

Na estimativa da DL₅₀, por via oral não houve morte até 5,0g/kg em ratas. Este dado sugere, a princípio, que o EHAJB apresenta, segundo a classificação de toxicidade adotada pela Comunidade Européia (BARROS, S.B.M. e DAVINO, S.C., 2003) baixíssima toxicidade por via oral.

Na influência do tratamento crônico por 90 dias sobre a massa corporal e dos principais tecidos. Observamos que à evolução da massa corporal dos grupos tratados foram similares a obtida com o grupo controle, da mesma forma, a massa dos tecidos não foi alterada, reforçando em princípio a ausência de toxicidade do extrato.

Em relação aos perfis bioquímicos e hematológicos, uma das dificuldades encontradas é obter dados da literatura referente aos valores de referência de ratos, uma vez que está bem estabelecido (NEPTUN, D. A. *et al.*, 1986; HARKENESS, S.E. e WAGNER, J.E., 1993) que os animais de experimentação exibem variações na dependência de fatores ambientais, alimentação, condições do biotério, entre outras. Em nosso trabalho, comparamos os resultados com os valores estabelecidos por HARKENESS, S.E. e WAGNER, J.E. (1993).

Os níveis de glicose, os quais poderiam ser indicativos, caso existissem, de alterações hepáticas (hipoglicemia) e pancreáticas (hiperglicemia) e os níveis de creatinina, que é um derivado do metabolismo protéico, não se alteraram. Estes se encontram reduzidos nos casos de atrofia muscular e elevados em estados febris.

As atividades séricas das transaminases (ALT – AST) são de grande importância para o diagnóstico de distúrbios hepatobiliares, assim como os níveis de bilirrubina total, direta, e indireta (NOGUEIRA, D. M., 1990). Nossos

resultados apontam que o extrato não apresenta efeito hepatotóxico. Os níveis normais de AST também são um indicativo da ausência de lesões no miocárdio e de pericardite ativa.

Os níveis protéicos totais e suas frações, também permaneceram sem modificações significativas, esses resultados nos dão o indicativo de que não há presença de hepatopatia, que levaria a uma diminuição dos níveis de proteínas total por redução na produção, como também podemos descartar, a princípio, presença de doenças renais que levassem à perda protéica excessiva. Entretanto, permanece a ser estabelecido a razão da inversão albumina/globulina.

Na análise das frações lipídicas do sangue foram avaliados colesterol total e triglicerídeos. Variações fisiológicas da colesterolemia estão relacionadas com a dieta, idade e com o sexo. Alterações patológicas podem se dar devido à presença de alterações no pâncreas (icterícia obstrutiva), fígado (lesões hepáticas) e em alguns tipos de doenças renais. Variações na lipidemia (nível de triglicerídeos no soro) podem ocorrer fisiologicamente, após as refeições e, patologicamente na síndrome nefrótica, pancreatite e na cirrose hepática.

Em nosso estudo, os níveis de uréia não foram significativamente alterados, o que nos dá um indicativo que não há comprometimento renal.

A determinação quantitativa da creatinina é utilizada para se avaliar a função renal, com os níveis de creatinina no sangue, temos uma idéia da depuração renal deste metabólito protéico e podemos avaliar a função renal. Em nossos resultados, a excreção renal de creatinina, nos grupos tratados, não sofreu alteração significativa em relação ao grupo controle.

Quanto ao perfil hematológico, observamos que estes não se encontraram significativamente alterados em relação ao grupo controle. Esses parâmetros são úteis no diagnóstico de várias doenças. O número

total de eritrócitos, por exemplo, pode ser alterado por variações fisiológicas, nas anemias, onde os níveis de hemoglobina (Hb) estão reduzidos e nas policitemias determinadas pela hipóxia, doenças cardíacas e pulmonares crônicas.

O hematócrito (Ht) é útil para indicar alteração no nível de leucócitos, hemácias, plaquetas e plasma. Este parâmetro se altera em casos de desidratação, policitemias, anemias, descompensação cardíaca, entre outros.

O volume corpuscular médio (VCM) nos dá a informação da presença ou ausência de anemias e as classifica morfologicamente (normocítica, microcítica ou macrocítica). A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) é classificada no caso da presença de anemias, quanto ao conteúdo hemoglobínico (normocrômica ou hipocrômica). Os resultados do hemograma são um indicativo de que o extrato não interfere na hematopoese nem na fisiologia normal dos eritrócitos, pois não observamos diferenças significativas nos índices eritrocitários do grupo controle em relação aos grupos tratados.

Os leucócitos podem sofrer variações numéricas causadas pelo uso de medicamentos ou substâncias tóxicas. As formas mais graves de leucopenia (diminuição do número total de leucócitos) apresentam quadros característicos na anemia aplástica, leucemias aleucêmicas e granulocitopenia (CARVALHO, W.F, 1983). Medicamentos e intoxicações também podem levar a leucocitoses, como no caso do uso da antipirina, pirogalol, digital, terebintina (YOUNG, G.A.R. e VINCENT, P.C., 1980). Não ocorreram diferenças significativas no número de leucócitos totais, nem no número das linhagens dos leucócitos, sendo isto um indicativo de que o EHA não tem ação tóxica sobre a medula óssea. Podemos afirmar que o extrato não interferiu com os perfis bioquímicos e hematológicos. As diferenças estatísticas encontradas foram

pontuais e interpretamos inicialmente como sem relevância clínica.

Referências

CARVALHO, W.F. Técnicas médicas de hematologia e Imuno-hematologia. 3^a. Edição, 1983, Ed. Cooperativa editora e de cultura médica Ltda. Belo Horizonte, Brasil.

COELHO, M.G.P., MARQUES, P.R., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., NETO, J.F.N., SABINO, K.C.C. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seed in mice with collagen-induced arthritis. Journal Ethnopharmacol., v. 77: p.159-165, 2001.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. Biologia e clínica de coelhos roedores. 3^a ed. São Paulo, Livraria Roca. Brasil. 1993.

MILLER, L.C., TAINTER, M.L., Estimation of the ED₅₀ and error by means of logarithmic probit graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 57, 1944, p. 261-264.

NEPTUN, D.A.; SMITH, C.N. IRONS, R. D. Effect of sampling site and collection method parametrs in Fisher -344rats. Fund. Appl. Toxicol. v7: p.658-663, 1986.

NOGUEIRA, D.M., STRUFALDI, M., HIRATA, M.H., ABDALLA, D.S.P., HIRATA, R.D.C., Métodos de Bioquímica Clínica Técnica e interpretação, Ed. Pancast, 1990, São Paulo, Brasil.

PLANCHON, L.; BRETIN, P.: Préis de Médicale, Librairie Maloine, Paris, 1937.

TESK, M.; TRENTINI, A. M. M. Compêndio de Fitoterapia. Paraná: Herbarium, 3^o.edição, p. 190 – 191, 1997.

VIJAYALAKSHMI, T.,
MUTHULAKSHMI, V.,

SACHDANANDAM P., Toxic studies on biochemical parameters carrier out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. Journal of Ethnopharmacol., v69: p.9-15, 2000.

YOUNG, G.A.R.; VINCENT, P.C., Drug-induced Agranulocytosis. Clin. Haematol. v.9: p.483, 1980.

