

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROETANOLICO
DAS RAÍZES DE *Jacaranda decurrens* EM RATOS
MACHOS**

JOYCE ALENCAR SANTOS

**DOURADOS MS
2011**

JOYCE ALENCAR SANTOS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROETANOLICO
DAS RAÍZES DE *Jacaranda decurrens* EM RATOS
MACHOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal da Grande Dourados – Faculdade
de Ciências da Saúde, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Arielle Cristina
Arena

Co-orientadora: Profa. Dra. Cândida
Aparecida Leite Kassuya

**DOURADOS MS
2011**

Agradecimentos

A Deus, autor da vida, pela capacidade de adquirir conhecimento, pela sabedoria para lidar com os desafios e adversidades próprios desse caminho que me propus a seguir, a Ele toda honra e glória;

A Profa. Dra. Arielle Cristina Arena pela confiança, incentivo, amizade e valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, fazendo-se presente em cada uma das etapas desta pesquisa, deste modo, minha admiração e respeito tornam-se crescentes. Dedico a você minha sincera gradidão;

A Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya por transmitir seu conhecimento com dedicação, demonstrando sempre a importância e seriedade do estudo e o amor a pesquisa;

A Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira, pelo auxílio na coleta do material vegetal, *J. decurrens*;

A Profa. Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso pela ajuda na manipulação do extrato e análises fitoquímicas;

Aos meus amigos de laboratório que nunca mediram esforços em me auxiliar nos procedimentos com os animais: Aline Arruda, Magaiver Andrade, Katia Wolff Cordeiro, Antônio Novaes, Edina Kassuya, Juliane Coelho, Aline Lima;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação profissional;

Aos professores que prontamente aceitaram o convite de participar da

minha banca de qualificação e de defesa: Profa. Dra. Karine de Cássia Freitas, Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros e a Profa. Dra. Maria Luiza Fascinelli.

Aos técnicos da UFGD pelo auxílio durante o experimento;

Aos animais experimentais deste projeto, os ratos, que deram as suas vidas para realização deste trabalho;

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra foram importantes para a realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos;

Dedicatória

Dedico este trabalho....

À meu Deus que sempre foi fiel em suas promessas, que me concede a coragem, força e sabedoria necessária para seguir em frente;

Aos meus queridos pais Cicero Santos e Lurdes Alencar de Almeida Santos que sempre acreditaram em mim, e que me deram todo suporte para que chegasse até aqui, vocês sempre serão meu alicerce;

Ao meu noivo Luiz Radai pelo cuidado incondicional, que sempre estive ao meu lado me apoiando em meus sonhos, obrigado pelo seu grande amor;

Sumário

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Plantas Medicinais	03
2.2 <i>Jacaranda decurrens</i>	04
2.3 Avaliações Toxicológicas	06
2.4 Toxicidade Sistêmica	08
2.5 Toxicidade Reprodutiva	10
2.5.1 <i>Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino</i>	11
2.6 Inflamação	14
2.6.1 <i>Carragenina</i>	15
2.6.2 <i>Fisiologia do edema de pata</i>	16
2.6.3 <i>Mieloperoxidase</i>	16
2.6.4 <i>Dexametasona</i>	17
3 OBJETIVOS	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
6 ARTIGO 1 – “Avaliação da toxicidade subaguda e reprodutiva em ratos machos adultos expostos ao extrato hidroetanólico das raízes de <i>Jacaranda decurrens</i>.”	30
Resumo	32
Introdução	33
Material e Métodos	34
1 Material Botânico	34
2. Preparação do Extrato Hidroetanólico de <i>J. decurrens</i>	34
3. Animais	35
4. Avaliação da Toxicidade Subaguda e Reprodutiva	35
4.1 <i>Contagem de células germinativas no testículo e epidídimo</i>	36
4.2 <i>Morfologia dos espermatozóides</i>	37

Análise Estatística	37
Resultados	37
Tabela 1. Peso relativo de órgãos de animais expostos ao tratamento subagudo com EJD.	38
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados após tratamento subagudo com EJD.	39
Tabela 3. Parâmetros espermáticos avaliados após exposição a diferentes doses de EJD, durante 28 dias.	39
Discussão	40
Agradecimentos	41
Referências Bibliográficas	41
6 ARTIGO 2 - Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades anti-inflamatórias do extrato hidroetanólico das raízes de <i>Jacaranda decurrens</i> em ratos machos adultos.”	47
Resumo	49
Introdução	50
Material e Métodos	51
1 Material Botânico	51
2. Preparação do extrato hidroetanólico de <i>J. decurrens</i>	52
3. Animais	52
4. Avaliações de Toxicidade Aguda	53
5 Teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos	53
5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória	53
5.2 Determinação de mieloperoxidase (MPO)	54
6 Análise Estatística	54
Resultados	54
<i>Toxicidade Aguda</i>	52
Tabela 1. Peso corporal absoluto e peso relativo de órgãos de animais expostos ao tratamento agudo com EJD.	55
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados após tratamento subagudo com EJD.	55
<i>Atividade anti-inflamatória por carragenina e determinação de MPO</i>	56

Figura 1. Gráfico do edema de pata, gerado por carragenina	57
Discussão	53
Agradecimentos	55
Referências Bibliográficas	55

RESUMO

Jacaranda decurrens subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Bignoniaceae) é uma espécie conhecida popularmente por “caroba”, “carobinha” ou “carobinha-do-campo”. É uma planta medicinal muito utilizada pela população para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo doenças inflamatórias. No entanto, são escassas na literatura informações sobre avaliações toxicológicas desta espécie, após exposição aguda e subaguda, bem como, comprovação científica de seus efeitos anti-inflamatórios. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos, após exposição aguda e subaguda, assim como o potencial anti-inflamatório do extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens* (EJD) em ratos machos adultos. Para os testes de toxicidade aguda, ratos machos foram tratados oralmente (gavage) com 0; 500; 1000 e 2000 mg/kg de massa corporal de EJD. O comportamento geral, efeitos adversos e mortalidade foram observados durante 14 dias. Nos testes de toxicidade subaguda e reprodutiva, os animais foram tratados oralmente com 0; 250; 500 e 1000 mg/kg/dia de massa corporal de EJD durante 28 dias. Para a avaliação de efeitos anti-inflamatórios gerados por carragenina, os animais foram tratados oralmente com 0; 100 e 300 mg/kg de EJD e dexametasona. Uma hora depois, os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) em uma pata traseira, sendo o volume final de 50 µL/pata e na pata contra lateral o mesmo volume de salina estéril foi injetada, a qual foi utilizado como controle. A espessura do edema de pata foi medido utilizando um micrômetro digital, 30 min antes de qualquer tratamento e em momentos diferentes (0,5; 1; 2 e 4 h) após a injeção de carragenina. Seis horas após a injeção de carragenina intraplantar, as patas foram removidas e processadas para avaliação da atividade de mieloperoxidase. **A atividade enzimática foi determinada pela medição da densidade óptica (630 nm) e expressa como OD por mg de tecido.** *J. decurrens* não provocou alterações comportamentais ou morte no tratamento agudo, demonstrando que a DL50 é superior a 2000 mg/kg. O tratamento subagudo com o EJD não ocasionou efeitos adversos no ganho de peso corporal, consumo de água e ração e nos perfis hematológicos e bioquímicos. Adicionalmente, não houve alterações nos aspectos macroscópicos ou microscópicos do fígado e rim, indicando ausência de toxicidade sistêmica nas doses testadas. Da mesma forma, o extrato não provocou toxicidade reprodutiva após exposição subaguda, visto que a produção espermática, o número de espermatozoides no epidídimo e a morfologia espermática foram normais. A

administração oral de EJD, nas doses de 100 e 300 mg/kg, reduziu o desenvolvimento do edema de pata, sendo que, na dose de 300 mg/kg, esta redução foi semelhante a provocada pela dexametasona (1mg/kg). Também pode-se observar uma diminuição significativa na atividade da enzima mieloperoxidase. Concluiu-se que o extrato das raízes de *J. decurrens*, neste modelo experimental, não é tóxico para ratos machos Wistar. Além disso, o extrato apresentou propriedades anti-inflamatórias, sendo estas propriedades provavelmente devido a presença de constituintes bioativos como o ácido ursólico.

Palavras-chaves: Plantas medicinais; *Jacaranda decurrens*; toxicidade aguda; toxicidade reprodutiva; inflamação; edema de pata; mieloperoxidase

ABSTRACT

Jacaranda decurrens subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Bignoniaceae) is a species known popularly as "caroba", "carobinha" or "carobinha-do-campo". It is a medicinal plant widely used by the population for the treatment of various diseases, including inflammatory diseases. However, there is scarce literature on toxicological information on this species, after acute and subacute exposure, as well as scientific evidence of their antiinflammatory effects. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible toxic effects after acute and subacute exposure, as well as the anti-inflammatory potential of the extract hydroethanolic of the roots of a *J. decurrens* (EJD) in adult male rats. For acute toxicity tests of EJD, was evaluated by giving it orally to adult male rats at single doses of 0, 500, 1000, and 2000 mg/kg body. The general behavior adverse effects and mortality were observed for 14 days. In tests of subacute toxicity and reproductive animals were treated orally with 0, 250, 500 and 1000 mg/kg/day body weight of EJD for 28 days. To evaluate the anti-inflammatory effect produced by carrageenan animals after 12 h fasting were treated with 0, 100 and 300 mg/kg of EJD and dexamethasone. An hour later the animals received an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) in a hind leg, and the final volume of 50 µL/paw and contralateral paw the same volume of sterile saline, which was used as control. The thickness of the paw edema was measured using a digital micrometer, 30 min before any treatment and at different times (0.5, 1, 2 and 4 h) after injection of carrageenan. Six hours after intraplantar injection of carrageenan, paws were removed and processed for assessment of myeloperoxidase activity, which was determined by measuring the optical density (630 nm) and expressed as OD per mg protein. No mortality or signs of toxicity were observed in the study. *J. decurrens* did not cause behavioral changes or death, in the acute treatment, demonstrating that the DL50 is greater than 2000 mg/kg. Subacute treatment with the extract of *J. decurrens* did not cause adverse effects on body weight gain, feed and water consumption and haematological and biochemical profiles. Additionally, there were no changes in macroscopic or microscopic liver and kidney, indicating absence of systemic toxicity at the doses tested. Similarly, the extract did not cause reproductive toxicity after subacute exposure, as sperm production, number of sperm in the epididymis and morphology were normal. Oral administration of EJD, at doses of 100 and 300 mg/kg, reduced the development of paw edema, and at a dose of 300 mg/kg, this reduction was similar to that caused by dexamethasone (1

mg/kg). You can also observe a significant decrease enzyme activity mieloperoxidase. It was concluded that the extract of the roots of *J. decurrens* in this experimental model, is not toxic to male Wistar rats. In addition, the extract showed anti-inflammatory properties, these properties are probably due to the presence of bioactive constituents such as ursolic acid.

Keywords: Medicinal plants; *Jacaranda decurrens*; acute toxicity; reproductive toxicity; inflammation; paw edema; myeloperoxidase.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais extraídos de plantas exercem um papel importante no processo de descoberta de fármacos, seja como modelos estruturais para a síntese de moléculas novas ou pelas suas propriedades farmacológicas. Desde a Antiguidade, o homem já utilizava as plantas, tanto para proteção quanto para cura e alimentação (Kirby, 1996; Pinto *et al.*, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 65 a 80% da população mundial, principalmente de países em desenvolvimento, recorrem ao uso das plantas como tratamento alternativo. Isso ocorre devido à falta de acesso aos medicamentos industrializados, que possuem alto custo, e também por acreditarem no mito de que tudo que é natural é inócuo, não oferecendo riscos à saúde (Akerele, 1993; Ernst, 2004).

Na Europa, a fitoterapia já faz parte da medicina alopática, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em várias literaturas (Pinto *et al.*, 2002). No Brasil, a utilização de fitoterápicos está, em sua maioria, fundamentado no uso popular, havendo poucas espécies descritas na Farmacopéia Brasileira (Yunes *et al.*, 2001).

Dos poucos estudos clínicos existentes, alguns revelaram efeitos adversos em espécies vegetais, sendo necessários estudos toxicológicos para comprovar sua segurança (Ministério da Saúde, 2006). Atualmente, agências reguladoras, como a ANVISA, vêm estabelecendo normas para a utilização de fitoterápicos, estipulando prazos para que a indústria farmacêutica apresente dados da eficácia e segurança destes medicamentos (ANVISA, 2010). Assim, não basta o conhecimento popular da planta medicinal, aspectos toxicológicos são fundamentais para que a população possa utilizar os medicamentos naturais de forma segura e eficaz (Simões, *et al.*, 2004; Silva, 2006).

Jacaranda decurrens subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença, popularmente conhecida como “carobinha”, é uma planta encontrada com grande abundância na região de Mato Grosso do Sul e, de acordo com informações populares, o chá de suas raízes é utilizado como cicatrizante de feridas uterinas e ovarianas, assim como para doenças inflamatórias e alergias (Sangalli *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2003).

Embora sejam amplamente utilizadas pela população, os efeitos gerados pelo

consumo das raízes de *J. decurrens* são desconhecidos, sendo necessário estudos para avaliar os possíveis efeitos tóxicos e o efeito anti-inflamatório relatado pela população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Desde a antiguidade, plantas com propriedades terapêuticas são utilizadas como uma alternativa para o tratamento e prevenção de uma variedade de enfermidades. Mesmo em décadas recentes, com os grandes avanços observados no mercado farmacêutico, as plantas ainda contribuem de maneira significativa na saúde mundial (Calixto, 2000; Calixto, 2005)

A OMS destaca que boa parte da população mundial, principalmente de países em desenvolvimento, recorre ao uso das plantas como tratamento alternativo, devido ao alto custo de medicamentos industrializados e, também, por acreditarem no mito de que tudo que é “natural” não oferece riscos à saúde (Akerele, 1993; Ernst, 2004). Em estudo realizado em Belo Horizonte, 60% da população relatou que não acredita que plantas medicinais provocam efeitos tóxicos e ainda usam frases como “é natural, não tem química”, “se bem não fizer, mal não faz”, “tudo sem efeito colateral, não é igual ao da Farmácia”, “não tem contra-indicação”, “é bom porque posso tomar quantas vezes eu quiser” (Oliveira e Gonçalves, 2006).

Porém o uso e conhecimento popular não são suficientes para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Estima-se que até 15% de um total de 250.000 espécies de plantas superiores tenham sido sistematicamente investigadas para a presença de compostos bioativos (Cragg e Newman, 1999), o que demonstra a importância de ser dada continuidade a esses estudos, comprovando a segurança, ou seja, a avaliação da relação risco/benefício através de estudos farmacológicos, farmacodinâmicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos de medicamentos (Capasso *et al.*, 2000; Zatta, 2009).

As plantas medicinais estão amplamente distribuídas em diversas áreas, sobretudo nos países tropicais (Calixto, 2000; Di Stasi *et al.*, 2002). No Brasil, as espécies utilizadas são principalmente nativas, sendo obtidas de forma extrativista e seus princípios ativos são desconhecidos, já que muito pouco se sabe do ponto de vista farmacológico e toxicológico (Nunes *et al.*, 2003).

A região Centro-Oeste é bastante conhecida por sua extensa flora e fauna e

pelas culturas populares presentes, que englobam diferentes origens étnicas e que são usuárias destes recursos naturais. Conseqüentemente, a aquisição e o uso de plantas medicinais é uma prática comum nas cidades dessa região. Campo Grande, Capital do Mato Grosso do Sul, é um exemplo claro dessa prática (Nunes *et al.*, 2003).

2.2 *Jacaranda decurrens*

A espécie *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Figura 1), pertence a família Bignoniaceae (Dicotyledonae) da ordem Lamiales e subclasse Euasteridae. Esta planta, conhecida popularmente como “carobinha-do-campo”, “carobinha” ou “caroba”, é uma subespécie endêmica do cerrado (Bertoni *et al.*, 2010). Popularmente, tanto as raízes quanto as folhas são utilizadas por infusão com água ou vinho, conhecidas como “garrafada”, e apresentam propriedades antirreumáticas, antisifilíticas, anti-inflamatórias, entre outras (Maroni *et al.*, 2006).

Os constituintes químicos reconhecidos na família Bignoniaceae são as naftoquinonas, do tipo lapachol e seus derivados (α -lapachone e β -lapachone), glicosídeos iridóides, alcalóides, flavonas, triterpenos, polifenóis, taninos e óleos de sementes (Hegnauer, 1989).



Figura 1. Flor da espécie *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata*.

As investigações atuais concentram-se em compreender o modo de ação da β -lapachone. Este composto tem um efeito potencial na terapia contra o cancro, não somente por sua ação citotóxica (por exemplo, contra o câncer de mama, pulmão, cólon, próstata e pâncreas), mas também como um agente radiosensibilizante que inibe o reparo de DNA em células defeituosas, após a irradiação, induzindo a apoptose e a prevenção da carcinogênese (Krishnan e Bastow, 2001; Bentle *et al.*, 2006; Bey *et al.*, 2007).

Estudos farmacológicos revelaram que a espécie *J. caucana*, da mesma família que *J. decurrens*, possui propriedades antitumorais, citotóxicas, anti-helmínticas e anti-hipertensivas (Ogura *et al.*, 1977; Weniger *et al.*, 2001; Nicasio e Meckes, 2005). Jacaranona foi demonstrada ser o composto responsável pela atividade citotóxica e antitumoral desta planta (Ogura *et al.*, 1977).

Já as espécies de *J. decurrens* apresentam propriedades farmacológicas como antioxidante (Carvalho *et al.*, 2009), antimicrobiana (Zatta, 2009), antitumoral (Ogura *et al.*, 1977), antiviral, hepatoprotetora e imunorreguladora (Varanda *et al.*, 1992; Subbaramaiah *et al.*, 2000). Estudos sugerem que composto responsável por estas atividades é o ácido ursólico, porém outros compostos podem estar relacionados (Varanda *et al.*, 1992; Subbaramaiah *et al.*, 2000; Zatta, 2009; Carvalho *et al.*, 2009).

Análises realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) evidenciaram a presença dos triterpenos, ácido ursólico, oleanólico e flavonóides glicosilados em frações do extrato das folhas de *J. decurrens* (Carvalho *et al.*, 2009). Em testes realizados com as folhas de *J. decurrens*, foi constatada a presença de flavonóides heterosídeos, saponinas e cumarinas (Zatta, 2009), podendo esses compostos apresentar atividades anti-inflamatória, antifúngica, espermicida, expectorante, vasodilatadora e diurética (Subbaramaiah *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2009).

Segundo estudo realizado por Dalla Vecchia (2009), envolvendo a molécula do ácido oleanólico e ácido ursólico (Figura 2), pode-se observar que o esqueleto oleanano, é necessário para a atividade citotóxica, porém o esqueleto ursano é mais potente do que o aleanano, por possui um grupamento doador de ligação de hidrogênio na posição 3 ou na posição 28 que potencializa a atividade citotóxica.

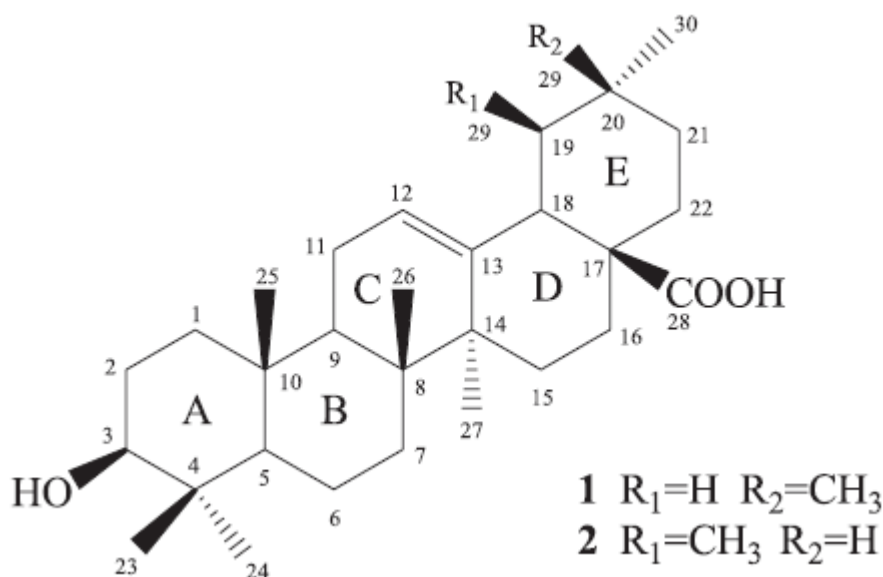


Figura 2. Estrutura química do ácido oleanólico (1) e ácido ursólico (2).

Os mecanismos de ação envolvidos nessa atividade antitumoral estão relacionados com inibição de enzimas metabólicas do DNA, indução da apoptose, interferência com o gene p53, vias de sinalização PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-cinase) e MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) e interferência com o fator de transcrição NF-κB (fator nuclear-kappa B) (Dalla Vecchia, 2009).

Em estudos realizados por Arena e colaboradores (2011) evidenciou que o extrato aquoso das raízes de *J. decurrens*, administrado em ratas prenhes e lactantes, provoca alterações no início do desenvolvimento reprodutivo dos descendentes machos, como antecipação da idade de descida testicular e redução no peso absoluto e relativo do testículo e epidídimo dos animais com 60 dias de idade, indicando uma toxicidade do extrato nesta fase do desenvolvimento reprodutivo. Assim, torna-se importante realizar avaliações toxicológicas em outras fases da vida, e utilizando períodos prolongados de exposição ao extrato.

2.3 Avaliações Toxicológicas

Com o crescimento do interesse das indústrias farmacêuticas multinacionais na comercialização de plantas medicinais, estudos para avaliar a segurança terapêutica, eficácia e benefícios desses produtos também têm aumentado nos últimos anos (Calixto, 2005). Entretanto, poucas plantas selecionadas para uso medicamentoso têm sido avaliadas. Assim, a extensa diversidade de plantas medicinais consumidas pela

população, sem experimentos científicos comprobatórios, torna-se um fato preocupante.

A fim de garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país e fortalecer a distribuição do mesmo pelo SUS (Sistema Único de Saúde), o Ministério da Saúde implantou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabelece diretrizes para desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como o fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos e o uso sustentável da biodiversidade brasileira (Ministério da Saúde, 2006).

Para que uma planta medicinal seja utilizada de maneira segura pela população, uma série de testes toxicológicos devem ser realizados. A ANVISA propôs um roteiro para os estudos toxicológicos de fitoterápicos, publicado em 03 de março de 2010: GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE SEGURANÇA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS. Este guia contém os parâmetros mínimos para realização de toxicologia pré-clínica evidenciando a necessidade de melhoria da qualidade técnica dos fitoterápicos (ANVISA, 2010).

Os estudos de um novo medicamento fitoterápico seguem etapas bastante distintas, que se diferenciam basicamente pelo sujeito da experimentação. A primeira delas, a etapa botânica, está relacionada à identificação do material de estudo. A etapa farmacêutica está relacionada ao preparo da forma farmacêutica para administração, com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade durante os testes pré-clínicos e clínicos. A etapa de ensaios biológicos pré-clínicos relaciona-se aos ensaios farmacológicos e toxicológicos em animais de laboratório, a fim de determinar experimentalmente o grau de segurança. O objetivo dos testes pré-clínicos é de mostrar a eficácia de material, pois sem ela não há razão para o estudo. A etapa clínica é a executada na espécie humana, apenas se existirem indicações seguras de que os benefícios do uso medicinal do novo produto superam os riscos de uma possível ação tóxica (ANVISA, 2010).

Os testes mais utilizados são os de toxicidade aguda, subaguda e crônica. O estudo da toxicidade aguda tem por finalidade identificar efeitos gerados a partir de uma única exposição ou múltiplas exposições em um período de 24 horas, como é o caso das intoxicações acidentais. Já os testes por tempo prolongado (subagudo e crônico) têm a finalidade de descobrir efeitos qualitativos ou quantitativos diferentes produzidos pelo maior tempo de exposição ao produto e, também, medir a latência para instalação dos efeitos tóxicos e o acúmulo do produto no organismo (Simões *et al.*, 2004).

Qualquer substância pode apresentar característica tóxica, depende apenas da concentração, via de administração ou exposição e a frequência desse contato (Simões *et al.*, 2004; Silva, 2006; Sowemimo *et al.*, 2007). Para validar essas informações, várias análises toxicológicas já foram realizadas em plantas de uso medicinal, e muitas destas análises revelaram a presença de efeitos tóxicos em diversas espécies vegetais (Ikegami *et al.*, 2003; Buenz *et al.*, 2007; Mabeku *et al.*, 2007; Sowemimo *et al.*, 2007). Como exemplo, pode-se citar o caso da *Aloe vera L.* (babosa) que apesar da ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica e antivirótica, também pode apresentar ação nefrotóxica em doses altas (Matos, 2000). O *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. (quebra-pedra) também pode ser considerado tóxico em altas doses, devido a presença dos alcalóides pirrolizidínicos (Matos, 2000).

2.4 Toxicidade Sistêmica

Existem algumas organizações que preconizam diretrizes em relação aos testes toxicológicos, estes então podem ser divididos em relação ao tempo de exposição do agente estudado, sendo subdividido em exposição de dose única ou doses repetidas. Nos testes de toxicidade são avaliados parâmetros comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos (OECD, 1996; 2008; ANVISA, 2010).

Alguns dos sinais de intoxicação sistêmica aparente são a redução da massa corporal dos animais experimentais, diminuição do consumo de água e ração e alterações comportamentais (Jahn e Gunzel, 1997; Rauber *et al.*, 2006). Essas alterações podem estar diretamente relacionadas à influência de substâncias em órgãos como fígado, rim e outros.

O fígado é um órgão muito suscetível a agressões químicas que podem resultar em processos inflamatórios ou necrosantes. O grau da lesão hepática provocada por injúria química ou biológica pode variar, podendo levar a alterações leves das enzimas hepáticas, sem desenvolvimento de sintomas clínicos, até casos mais graves de insuficiência hepática aguda ou crônica (Rauber *et al.*, 2006).

Em fase inicial, a lesão hepática pode ser detectada a partir do aumento dos níveis de enzimas hepáticas no sangue. Esse aumento pode ser ocasionado devido a necrose celular ou aumento da permeabilidade celular. Algumas enzimas podem ser utilizadas como indicadoras de lesão hepática, são elas: aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), *gama*-glutamilttransferase (δ -GT) e fosfatase

alcalina (ALP) (González *et al.*, 2006; Rauber *et al.*, 2006; Brandt *et al.*, 2009).

Alterações hepáticas podem ser evidenciadas pelo aumento de ALT e AST. Porém a enzima AST também pode ser encontrada no miocárdio, músculo esquelético, rim e cérebro, podendo indicar lesão nesses tecidos, quando o valor de ALT está normal. A persistência de altos níveis de AST pode indicar dano tecidual irreversível (O'farrell *et al.*, 1995; Ely *et al.*, 2000). A enzima δ -GT apresenta grande atividade nos rins e no fígado, porém no plasma é encontrada somente a de origem hepática, pois a renal é eliminada na urina.

A avaliação da nefrotoxicidade induzida quimicamente deve incluir urinálise, sorologia bioquímica e a histopatologia, para fornecer um perfil razoável dos efeitos funcionais e morfológicos de um composto sobre o rim. O aumento de proteínas na urina pode ser indicativo de um aumento na permeabilidade do glomérulo, uma vez que as proteínas não passam no filtro renal, no entanto, o consumo de ração com elevado teor de proteínas deve ser considerado. A excreção de proteínas de alto peso molecular, como albumina, é sugestiva de lesão glomerular, enquanto a excreção de proteínas de baixo peso molecular sugere lesão no túbulo proximal (Klaassen, 2007).

A creatinina pode auxiliar na avaliação da filtração glomerular, pois é normalmente filtrada pelo glomérulo. O aumento das concentrações séricas sugere uma diminuição na filtração glomerular, todavia o aumento deste metabólito no sangue não reflete necessariamente uma lesão renal induzida por um composto químico, mas podem ser secundários a desidratação, hipovolemia ou catabolismo de proteínas (Klaassen, 2007).

A diminuição da filtração glomerular, de forma geral, leva ao aumento das concentrações plasmáticas de creatinina e uréia. Em ratos, níveis plasmáticos alterados para uréia não são bons indicativos de lesão renal, mas alterações na creatinina podem ser um indicador confiável para avaliar a lesão, pois seu nível sérico não é influenciado pela dieta, idade ou sexo (González *et al.*, 2006).

2.5 Toxicidade Reprodutiva

A capacidade de reproduzir é um fenômeno essencial para a manutenção dos genes ao longo das gerações. Entretanto, tal processo pode sofrer alterações em decorrência de variações no meio ambiente e exposição a algumas substâncias. A compreensão de como o meio pode interferir de forma positiva ou deletéria na fertilidade torna-se essencial para a manutenção da capacidade reprodutiva, assim, estudos de toxicidade reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmeas, devem ser considerados como parte do processo de avaliação da segurança das plantas medicinais, o qual complementa os estudos toxicológicos sistêmicos (Dalsenter *et al.*, 2004).

Estudos revelam que muitos animais já foram afetados por substâncias denominadas de desreguladores endócrinos. Entre as repercussões, figuram a disfunção da tireóide em aves e peixes; a diminuição da fertilidade em aves, peixes, crustáceos e mamíferos; a diminuição do sucesso da incubação em aves, peixes e tartarugas; graves deformidades de nascimento em aves, peixes e tartarugas; anormalidades metabólicas em aves, peixes e mamíferos; entre outras (Wang *et al.*, 1987; Iyaniwura, 1989; Kligerman *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1995; Caldas e Souza, 2000; Andersen *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2002; Stevenson *et al.*, 2011).

Anormalidades relacionadas ao sistema reprodutivo em seres humanos também foram observadas, tais como, aumento do número de casos de criptorquidia, hipospádia, abortos, redução da libido, prejuízos na produção espermática, impotência, assim como maior incidência de tumores de testículo e próstata (Baker, 2001; Sultan *et al.*, 2001; Garry *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que algumas plantas medicinais podem ocasionar alterações no sistema reprodutor masculino, sendo caracterizado por alterações celulares principalmente nos testículos e epidídimo, que levam a diminuição na produção e no número de espermatozoides, redução dos níveis de testosterona e alterações na morfologia espermática, resultando em efeitos antiespermatogênico e antifertilidade (Gupta *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2007; Yunianto *et al.*, 2010). Entretanto, pesquisas *in vivo* e *in vitro* revelam que algumas plantas medicinais podem restabelecer o quadro de infertilidade do sistema reprodutor masculino (El-Ashmawy *et al.*, 2007; Kenjale *et al.*, 2008; Chakraborty e Verma, 2009; Chan *et al.*, 2009).

Para compreendermos melhor como uma substância pode afetar o sistema reprodutor masculino, é interessante entender sua fisiologia.

2.5.1 Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino da maioria dos mamíferos é composto por testículos, epidídimo, ducto deferente e glândulas sexuais e órgão copulador (Figura 3).

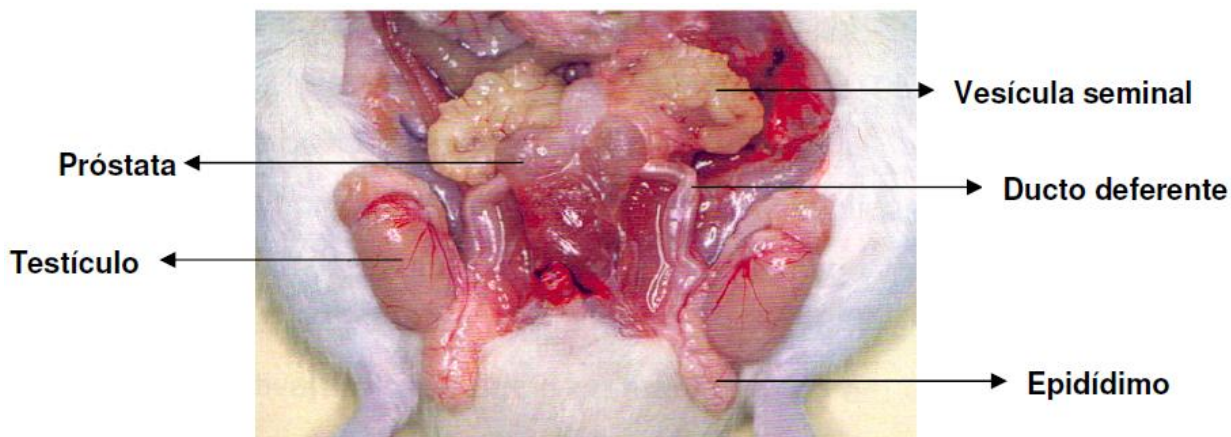


Figura 3. Órgãos reprodutores de rato macho Wistar.

Os testículos podem ser divididos anatomicamente e funcionalmente em duas partes: túbulos seminíferos e tecido intersticial, responsáveis pela espermatogênese e pela esteroidogênese, respectivamente (Rodríguez e Favaretto, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos por tecido peritubular e epitélio seminífero composto por células de Sertoli que são principalmente responsáveis pela proteção e nutrição as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermátides, em animais adultos). O tecido intersticial localizado entre os túbulos seminíferos, constituído por tecido conjuntivo frouxo no qual é ricamente vascularizado e com células de Leydig, responsáveis pela produção de andrógenos, principalmente testosterona a qual pode ser posteriormente convertida em uma variedade de outros esteróides (Clermont, 1972; Junqueira e Carneiro, 2000; Gartner e Hiatt, 2007). A função testicular é regulada por uma série de relações entre o hipotálamo, a hipófise, os hormônios testiculares e o compartimento germinativo.

O epidídimo, um túbulo único altamente enovelado, pode ser dividido em três partes morfológicas, sendo elas: cabeça (segmento proximal), corpo e cauda. Estas porções podem ser diferenciadas pela altura do epitélio e a distribuição e quantidade dos tipos celulares. Seu epitélio pseudoestratificado ciliado possui seis tipos celulares: basais, principais, estreitas, halos, claras e apicais (Herme e Robaire, 2002). A cabeça e o corpo são responsáveis pela maturação (motilidade e capacidade de reconhecimento e

penetração pela zona pelúcida do oócito) e na cauda ocorre o armazenamento dos espermatozóides (Jones, 1999; Junqueira e Carneiro, 2000; Gartner e Hiatt, 2007).

Já as glândulas anexas constituídas por próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral auxiliam na formação do fluído seminal, que garante energia para a mobilidade, proteção e estabilidade ao espermatozóide em relação a fatores externos como o pH ácido (Gupta *et al.*, 2006; Reboredo *et al.*, 2007; Boareto *et al.*, 2008).

A vesícula seminal consiste de um ducto único muito dilatado e enovelado. Este ducto é revestido por um epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por células epiteliais secretoras e células basais. A camada muscular lisa que reveste o órgão é constituída por duas lâminas: uma interna, de fibras circulares, e outra externa, de fibras longitudinais. A luz é ocupada pelo produto de secreção, de aspecto hialino (Hayward *et al.*, 1996a; 1996b).

A próstata é formada por um conjunto de glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática. O epitélio é colunar simples formado por células secretoras, basais e neuroendócrinas. Ela é envolta por uma cápsula fibroelástica rica em músculo liso, que envia septos para o interior da glândula. No homem, este órgão é compacto (alobular) apresentando três zonas: central, periférica e de transição. No rato, a próstata é dividida em quatro pares de lóbulos definidos como próstata anterior, dorsal, ventral e lateral (Roy-Burman *et al.*, 2004).

Os produtos de secreção da vesícula seminal e próstata contribuem para a nutrição e suporte dos espermatozóides fora do trato genital masculino. As funções destas glândulas são dependentes de estímulo androgênico como a testosterona, que atua diretamente nos órgãos sexuais acessórios masculinos (Mann, 1974).

Contudo, este sistema é muito sensível à ação de fatores nocivos, pois sua exposição a determinados agentes tóxicos podem interferir na maturação sexual, na produção e no transporte de gametas, no ciclo espermatogênico, no comportamento sexual e/ou na fertilidade. Plantas têm sido associadas a alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Ernst, 2004; Capasso *et al.*, 2000). Neste contexto, a toxicidade do sistema reprodutor geralmente é determinada a partir da avaliação dos efeitos produzidos no eixo hipotálamo-hipófise, no funcionamento das gônadas, no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias (Ferreira e Medeiros, 2000; Gupta *et al.*, 2006; Reboredo *et al.*, 2007; Boareto *et al.*, 2008).

O comprometimento da função reprodutiva de seres humanos e de espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos, pois muitos fatores

podem interferir nos componentes e na função reprodutiva e ocasionar infertilidade e outras alterações funcionais e estruturais. Doenças, fatores psicológicos, estresse, variações hormonais e exposição a substâncias químicas são alguns dos fatores que contribuem para o surgimento de distúrbios no sistema reprodutor masculino (Neubert, 1997). Atualmente, há evidências de que a quantidade e a qualidade espermática em homens e outros animais tem diminuído (Jégou *et al.*, 1999; Paumgarten, 2003; Bila e Dezotti, 2007), em paralelo com o aumento de problemas no trato reprodutor masculino, tais como câncer testicular, criptorquidia e hispospádia.

Tem sido demonstrado que várias plantas medicinais podem afetar a produção espermática e/ou o número de espermatozoides no epidídimo, comprometendo a fertilidade de animais expostos (Mazaro *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2008). Estudo realizado com o extrato aquoso de *Chromolaena odoratum*, nas doses de 250 e 500 mg/kg, demonstrou possuir atividade antiandrogênica, pois reduziu o número de espermatozoides em ratos machos expostos oralmente durante 14 dias (Yakubu *et al.*, 2007). O extrato de *Zingiber officinale Roscoe* (gengibre) também provocou alterações nos testículos e epidídimo após uma única dose de 2000mg/kg em ratos (Rong *et al.*, 2009).

Atualmente, uma especial atenção tem sido dada a químicos ambientais que podem desregular a função endócrina, atuando como estrógenos (Sharpe, 1994; Toppari *et al.*, 1996). Os fitoestrógenos são substâncias presentes nas plantas que podem mimetizar a ação de hormônios naturais do organismo, interferindo com o sistema endócrino e acarretando diversos prejuízos para o trato reprodutor masculino. Várias plantas já foram identificadas contendo compostos que atuam como fitoestrógenos, como por exemplo a isoflavona encontrada no grão de soja, brotos de alfafa, sementes de linhaça e trevo vermelho (U.S. EPA, 1997; Clapauch *et al.*, 2002).

Mesmo possuindo importantes atividades biológicas, poucos estudos avaliaram os possíveis efeitos tóxicos de *J. decurrens*. A avaliação da toxicidade aguda ao extrato etanólico de *J. decurrens*, demonstrou que as folhas apresentam baixa toxicidade aguda em ratos Wistar fêmeas (Zatta, 2009). Por outro lado, estudos realizados em nosso laboratório, utilizando o extrato aquoso das raízes de *J. decurrens* durante o período gestacional e lactacional, verificou-se uma alteração no desenvolvimento inicial do sistema reprodutor da prole masculina (Arena *et al.*, 2011). Assim, em virtude desses resultados, torna-se importante avaliar se distúrbios reprodutivos ocorreriam também após exposição subaguda (durante 28 dias) a esse extrato, o qual é indiscriminadamente

utilizado pela população.

2.6 Inflamação

O processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um mecanismo complexo que não pode ser atribuído a um único fator, por isso possui capacidade de manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, podendo ser físico (uma queimadura ou trauma), biológico (microorganismo) ou químico (substância cáustica) (Sharon, 2000; Silva, 2006).

A inflamação pode ser classificada com relação ao tempo de duração em: aguda e crônica. A inflamação é caracterizada por febre, dor, rubor e edema, sendo esses definidos como sinais primários da inflamação, enquanto a fase crônica é caracterizada pela proliferação celular (Sharon, 2000).

Quando o tecido é lesado, observa-se a liberação de substâncias vasoativas, conseqüentemente, ocorre um aumento no fluxo e diminuição da velocidade sanguínea local e aumento na permeabilidade dos capilares, contribuindo para os sinais de calor e vermelhidão. Em seguida ocorre a ativação de células endoteliais e dos leucócitos circulantes, que passarão a expressar moléculas de adesão, permitindo a migração transendotelial dos leucócitos com extravasamento de líquido para os tecidos, resultando em edema e dor (Silva, 2006).

Essas alterações são iniciadas pelas citocinas (interleucinas - IL) produzidas pelos macrófagos ativados. Inicialmente ocorre a liberação de mediadores inflamatórios importantes na produção da dor na inflamação, como a IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α), prostaglandinas (PG), histamina, leucotrienos, serotonina, adenosina e substância P. A bradicinina é responsável pela liberação de PG, citocinas (IL-1 e TNF- α) e radicais livres, e também estimula e sensibiliza os neurônios sensoriais e simpáticos pós-ganglionares, influenciando no calibre do vaso, provocando um aumento na permeabilidade vascular, que permite a exsudação de líquido contendo componentes das cascatas de enzimas para o espaço extravascular, a degranulação dos mastócitos, liberando histamina e outros mediadores inflamatórios, produz dor pelo estímulo direto dos nociceptores sensibilizados pelas PG e citocinas. A hiperalgesia produzida pela bradicinina é mediada pelo TNF- α , que estimula a liberação das citocinas IL-1 e IL-8 (Silva, 2006; Rang, *et al.* 2007).

A partir da esterificação dos fosfolípidos das membranas celulares é liberado

o ácido araquidônico, que pode ser metabolizado através de duas vias enzimáticas: a via das cicloxigenases (COX) que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (TX), e a via das lipoxigenases responsável pela síntese dos leucotrienos, lipoxinas e outros compostos (Silva, 2006).

A via da COX possui duas isoformas principais, COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima que atua como regulador homeostático no organismo, sendo responsável pela produção de PG envolvidas na citoproteção gástrica, na agregação plaquetária, na auto-regulação do fluxo sanguíneo renal e no início do parto, estando presente na maioria das células. A COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, e é responsável pela produção dos mediadores prostanóides da inflamação, porém suas funções não estão totalmente esclarecidas, como é o caso de COX-2 presente no sistema nervoso central. Ambas as enzimas podem formar PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α}, e TXA₂ (Rang, *et al.*, 2007).

2.6.1 Carragenina

Na década de 60, a carragenina (Cg) passou a ser muito utilizada experimentalmente, principalmente por sua habilidade em induzir uma reação inflamatória aguda (Di Rosa *et al.*, 1972). Apesar da falta de conhecimento da patogenia dessa reação, muitos compostos anti-inflamatórios foram desenvolvidos baseados nesse ensaio.

A principal fonte de carragenina é a alga *Chondrus crispus*, também conhecida como *Irish Moss*, encontrada em Carrageen (Waterford, Irlanda), onde cresce abundantemente. Posteriormente, material de composição semelhante e propriedades similares foi isolado de outras algas, tais como *Gigartina stellata*, *Rhodomenia palmata* e outras (Di Rosa *et al.*, 1972).

A carragenina extraída da *Chondrus crispus* é um polissacarídeo sulfatado que pode ser separado em dois compostos. Uma fração transforma-se em gel sob a ação do íon potássio e é designada como K, e a outra que é insensível ao potássio, foi chamada de lambda (λ). As frações K e λ representam, respectivamente, 40% e 60% do extrato não fracionado (Di Rosa *et al.*, 1972).

O uso da carragenina como irritante para induzir a formação de edema na pata de rato foi introduzido por Winter e colaboradores (1962). Logo em seguida, o efeito da indometacina foi ensaiado com a utilização desse procedimento, o qual, com pequenas

modificações, tornou-se um dos métodos mais populares como teste para avaliação de drogas e terapias anti-inflamatórias. Classicamente, a primeira fase (1-2h) do edema de pata induzido por carragenina é caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a segunda fase (3-4h) tem sido correlacionada com a elevada produção de prostaglandinas (Di Rosa *et al.*, 1971). A infiltração local de neutrófilos também contribui para a resposta inflamatória nesse modelo (Di Rosa *et al.*, 1972),

2.6.2 Fisiologia do edema de pata

O movimento de fluidos dentro e fora da microcirculação é regulado pelo equilíbrio entre a pressão hidrostática intravascular, que tende a forçar a saída do fluido dos vasos, e pelo efeito oposto da pressão osmótica exercido pelas proteínas plasmáticas, que tendem a reter o fluido dentro dos vasos, fenômeno conhecido como lei de Starling. Porém, durante a resposta inflamatória aguda, ocorre aumento da pressão hidrostática na microcirculação e passagem dos fluidos através dos pequenos vasos, tornando-os mais permeáveis às proteínas plasmáticas. Quando tais proteínas deixam os vasos e entram no interstício, a pressão osmótica aumenta e provoca a saída de mais fluido para o interstício, originando o edema e aumentando a viscosidade sanguínea, que tende a desacelerar o fluxo (estase sanguínea). A estase sanguínea favorece a adesão leucocitária, e forma, assim, o exsudato inflamatório, principal característica da resposta inflamatória aguda (Michel e Curry, 1999).

2.6.3 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO), uma hemeproteína abundante em neutrófilos e monócitos, é localizada nos grânulos azurófilos primários desses leucócitos e é secretada no meio extracelular e no compartimento fagolisossomal após ativação do fagócito por uma variedade de estímulos, sendo eficiente na morte de microrganismos (Buchmann *et al.*, 2002; Wieslander *et al.*, 2011). Por apresentar essas características, tem sido utilizada para a quantificação da MPO tecidual, como marcador inflamatório (Wieslander *et al.*, 2011).

Seu mecanismo de ação envolve a reação de sua forma férrica com H_2O_2 (peróxido de oxigênio), levando a formação da MPO-I através da transferência de dois elétrons (Abu-Soud e Hazem, 2000). A MPO I pode oxidar íons Cl^- formando o ácido

hipocloroso, promovendo assim danos tissulares. Este poderoso oxidante reage com duplas ligações de lipídios, ocasionando uma peroxidação lipídica, o que leva ao aumento da permeabilidade de membranas celulares. (Halliwell e Gutteridge, 1993; Sgarbi *et. al.*, 2006;). Recentemente verificou-se, com grande repercussão na comunidade científica mundial, o fato de que o nível sérico da MPO mostrou ser o melhor biomarcador preditivo de acidentes cardiovasculares, inclusive quando o nível de troponina sérica está dentro do valor normal (Askari *et. al.*, 2003; Melanson e Green, 2006; Lewandowski, 2006). Estes achados reforçam a importância dessa enzima na gênese de processos inflamatórios crônicos. Talvez um dos melhores exemplos disso seja o envolvimento desse oxidante na aterogênese. De fato, é largamente conhecida e aceita a hipótese da modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) na origem e progressão do processo aterosclerótico. A MPO é uma enzima chave neste processo, onde através da geração de ácido hipocloroso pode iniciar processos oxidativos como a geração da 3-clorotirosina, que tem sido reportada como uma característica do envolvimento da MPO em processos patológicos. A presença deste aminoácido oxidado já foi detectada em LDL isolada em lesões ateroscleróticas em humanos (SHAO *et. al.*, 2006).

2.6.4 Dexametasona

A dexametasona é um glicocorticóide que possui um amplo espectro de ação, sendo um potente anti-inflamatório e imunossupressor, uma vez que seu efeito leva a inibição da produção de várias citocinas. É cerca de vinte e cinco a trinta vezes mais potente que seu análogo natural, o cortisol. Seus efeitos são mediados em sua maioria por receptores celulares de glicocorticóides que são amplamente distribuídos (Parfitt *et al.*, 1999).

A molécula deste fármaco (Figura 4) apresenta grupos que são essenciais para suas características, como a presença de hidroxila na posição C11 e C17 (círculo 4 da Figura 4) é a responsável pela atividade glicocorticóide. Diferente de outros análogos, este fármaco apresenta propriedades mineralocorticóides reduzidas por possuir o grupo metil na posição C16 (círculo 3 da Figura 4), e é aproximadamente trinta vezes mais potente que seu análogo natural, o cortisol, sendo o fluor na posição C9 (círculo 2 da Figura 4) o responsável pelo aumento da potência. Assim sendo, a dexametasona é um glicocorticóide muito potente, com fraca atividade mineralocorticóide (Silva, 2006).

Os efeitos da dexametasona são mediados em sua maioria por receptores celulares de glicocorticóides que são amplamente distribuídos (Silva, 2006). Ela age sobre vasos sanguíneos, diversos mediadores, precursores e tipos celulares inflamatórios e tem atividade marcante sobre o sistema imunológico (Rang, *et al.*, 2007).

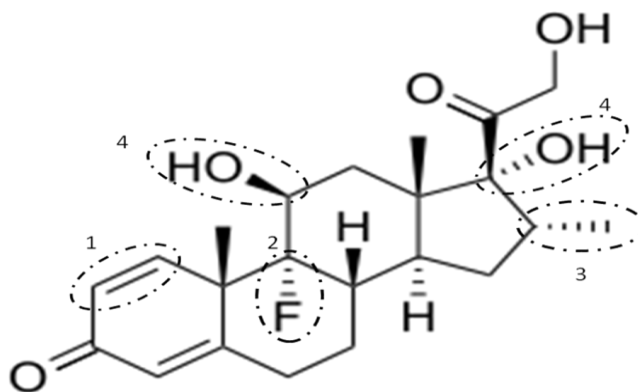


Figura 4. Estrutura molecular da dexametasona, com marcação nos grupos essenciais à atividade anti-inflamatória dos glicocorticóides. (Silva, 2006)

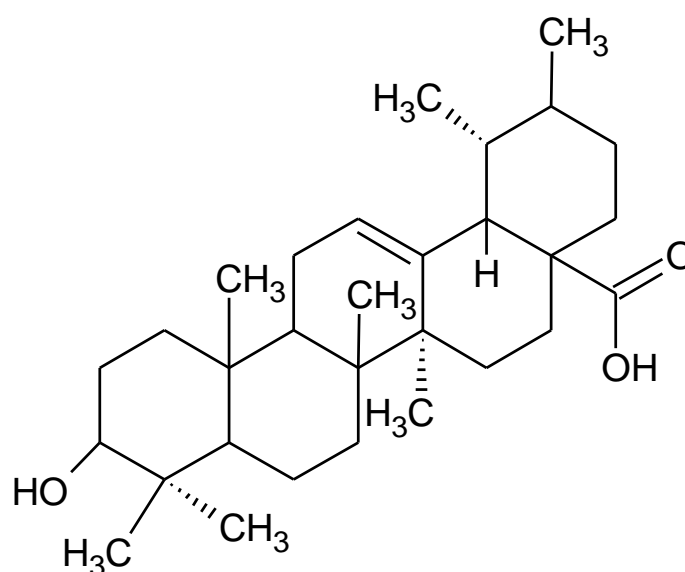


Figura 5. Estrutura do ácido ursólico (Subbaramaiah et al. 2000).

Por ser amplamente utilizada pela população para o combate de doenças inflamatórias e apresentar em sua composição o ácido ursólico (Figura 5) que é semelhante a dexametasona torna-se importante a realização de estudos científicos que comprovem as possíveis propriedades anti-inflamatórias do extrato de *J. decurrens*.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar os possíveis efeitos tóxicos (sistêmicos e reprodutivos) e atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das raízes de *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* (carobinha) em ratos machos adultos, após exposição aguda e subaguda.

Objetivos Específicos

- Verificar a toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroetanólico de *J. decurrens* em ratos machos adultos, através de análise bioquímica, hematológica e histopatológica de rins e pulmão;
- Avaliar a toxicidade reprodutiva, após exposição subaguda ao extrato de *J. decurrens* em ratos machos adultos, através da análise de pesos de órgãos reprodutores, contagem de células germinativas, análise morfológica de espermatozóides e análise histopatológica do testículo e epidídimo.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens*, através da indução do edema de pata por carragenina.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 390-5, 1993.

ANDERSEN, H. R. *et al.* Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* [S.I.], v. 179, n. 1, p. 1-12, Feb 15 2002.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos v. 1, p. 37, 2010.

ARENA, A. C. *et al.* Maternal exposure to aqueous extract of *Jacaranda decurrens*: Effects on reproductive system in male rats. *Pharmaceutical Biology* [S.I.], v. 0, p.1-6, 2011.

ASKARI, A. T; *et. al.* Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med*, v. 197, p. 615-624, 2003.

BAKER, V. A. Endocrine disruptors--testing strategies to assess human hazard. *Toxicol In Vitro* [S.I.], v. 15, n. 4-5, p. 413-9, Aug-Oct 2001.

BENTLE, M. S. *et al.* New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. *J Mol Histol* [S.I.], v. 37, n. 5-7, p. 203-18, Sep 2006.

BERTONI, B. W. *et al.* Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. *Genet Mol Biol* [S.I.], v. 33, n. 3, p. 532-8, Jul 2010.

BEY, E. A. *et al.* An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 104, n. 28, p. 11832-7, Jul 10 2007.

- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova* [S.I.], v. 30, p. 651-666, 2007.
- BOARETO, A. C. *et al.* Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. *Reprod Toxicol* [S.I.], v. 25, n. 2, p. 239-46, Feb 2008.
- BRANDT, A. P. *et al.* Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 19, p. 388-393, 2009.
- BUCHMANN, R. *et al.* Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. *J Dent Res* [S.I.], v. 81, n. 10, p. 716-21, Oct 2002.
- BUENZ, E. J. *et al.* Cytotoxic properties of *Diospyros sechellarum* extract. *J Toxicol Sci* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 487-93, Dec 2007.
- CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de Saúde Pública* [S.I.], v. 34, p. 529-537, 2000.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 33, n. 2, p. 179-89, Feb 2000.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 100, n. 1-2, p. 131-4, Aug 22 2005.
- CAPASSO, R. *et al.* Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* [S.I.], v. 71 Suppl 1, p. S58-65, Aug 2000.
- CARVALHO, C. A. D. *et al.* Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 19, p. 592-598, 2009.
- CASTILLO, C. G. *et al.* Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* [S.I.], v. 24, n. 6, p. 797-804, Nov-Dec 2002.
- CHAKRABORTY, D.; VERMA, R. Spermatotoxic effect of ochratoxin and its amelioration by *Emblica officinalis* aqueous extract. *Acta Pol Pharm* [S.I.], v. 66, n. 6,

p. 689-95, Nov-Dec 2009.

CHAN, K. L. *et al.* The effect of *Eurycoma longifolia* on sperm quality of male rats. *Nat Prod Commun* [S.I.], v. 4, n. 10, p. 1331-6, Oct 2009.

CLAPAUCH, R. *et al.* Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.46, n.6, p.679-695, 2002.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* [S.I.], v. 52, n. 1, p. 198-236, Jan 1972.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 153-63, 1999.

DALLA VECHIA, L. *et al.* Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova* v. 32, p. 1245-7, 2009.

DALSENTER, P. R. *et al.* Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reprod Toxicol* [S.I.], v. 18, n. 6, p. 819-23, Aug-Sep 2004.

DI ROSA, M. *et al.* Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol*, v.104, p. 15-14, 1971.

DI ROSA, M. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leucocyte emigration. *J Pharm Pharmacol*, v.24, n. 7, p. 575-577, 1972.

DI ROSA, M. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leucocyte emigration. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.24, n. 7, p. 575-2, 1971.

DI STASI, L. C. *et al.* Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* [S.I.], v. 73, n. 1, p. 69-91, Feb 2002.

DOMAGALA-KULAWIK, J . Effects of cigarette smoke on the lung and systemic

immunity. *Journal of physiology and pharmacology*, v. 59, n.6, p.19–34, 2008.

EL-ASHMAWY, I. M. *et al.* Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [S.I.], v. 101, n. 5, p. 320-7, Nov 2007.

ELY, J. F. *et al.* Alterações enzimáticas decorrentes de isquemia muscular esquelética em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira* [S.I.], v. 15, p. 00-00, 2000.

ERNST, E. Risks of herbal medicinal products. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* [S.I.], v. 13, n. 11, p. 767-71, Nov 2004.

FERREIRA, D.; MEDEIROS, S. F. Influência dos fatores sócio ambientais sobre a qualidade do sêmen. . *Reprodução e climatério* [S.I.], v. 15, p. 5, 2000.

GARRY, V. F. *et al.* Reproductive outcomes in the women of the Red River Valley of the north. I. The spouses of pesticide applicators: pregnancy loss, age at menarche, and exposures to pesticides. *J Toxicol Environ Health A* [S.I.], v. 65, n. 11, p. 769-86, Jun 14 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Atlas colorido de histologia*. Guanabara: Rio de Janeiro, 2007.

GONZÁLEZ, F. H. D. *et al.* *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006.

GUPTA, R. S. *et al.* Antispermatic, antiandrogenic activities of Albizia lebeck (L.) Benth bark extract in male albino rats. *Phytomedicine* [S.I.], v. 13, n. 4, p. 277-83, Mar 2006.

GUPTA, R. S. *et al.* Antifertility studies of the root extract of the Barleria prionitis Linn in male albino rats with special reference to testicular cell population dynamics. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 70, n. 2, p. 111-7, May 2000.

GUPTA, R. S. *et al.* Effect of methanolic extract of Dendrophthoe falcata stem on reproductive function of male albino rats. *J Herb Pharmacother* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 1-13, 2007.

GUPTA, R. S. *et al.* Effect of Methanolic Extract of Dendrophthoe falcata Stem on Reproductive Function of Male Albino Rats. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 1-13, 2008.

HALLIWELL B. e GUTTERIDGE J.M.C. Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Clarendon Press, p.543. 1993*

HAYWARD, S. W. *et al.* Epithelial Development in the Rat Ventral Prostate, Anterior Prostate and Seminal Vesicle. *Cells Tissues Organs* [S.I.], v. 155, n. 2, p. 81-93, 1996a.

HAYWARD, S. W. *et al.* Stromal Development in the Ventral Prostate, Anterior Prostate and Seminal Vesicle of the Rat. *Cells Tissues Organs* [S.I.], v. 155, n. 2, p. 94-103, 1996b.

HEGNAUER, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkhäuser Verlag Basel, 1989.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B. H., B. T. (Ed.). *The Epididymis - from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, p. 81- 102, 2002.

IKEGAMI, F. *et al.* Toxicological aspects of Kampo medicines in clinical use. *Chemico-Biological Interactions* [S.I.], v. 145, n. 3, p. 235-250, 2003.

ITO, N. *et al.* Lack of carcinogenicity of pesticide mixtures administered in the diet at acceptable daily intake (ADI) dose levels in rats. *Toxicol Lett* [S.I.], v. 82-83, p. 513-20, Dec 1995.

IYANIWURA, T. T. An in vitro evaluation of the potential toxicities and interactions of carbamate pesticides. *Toxicol In Vitro* [S.I.], v. 3, n. 2, p. 91-3, 1989.

JAHN, A. I.; GUNZEL, P. K. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol* [S.I.], v. 11, n. 2-3, p. 171-8, Mar-Jun 1997.

JEGOU, R. *et al.* [Perinasal papulous lesions]. *Ann Pathol* [S.I.], v. 19, n. 6, p. 541-2, Dec 1999.

JONES, R. C. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl* [S.I.], v. 22, n. 2, p. 57-67, Apr 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11 ed. Guanabara: Rio de Janeiro, 2008.

KENJALE, R. *et al.* Effects of *Chlorophytum borivilianum* on sexual behaviour and sperm count in male rats. *Phytother Res* [S.I.], v. 22, n. 6, p. 796-801, Jun 2008.

KIRBY, G. C. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [S.I.], v. 90, n. 6, p. 605-9, Nov-Dec 1996.

KLAASSEN, C. D. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 7th. McGraw-Hill, 2007.

KLIGERMAN, A. D. *et al.* Analyses of cytogenetic damage in rodents following exposure to simulated groundwater contaminated with pesticides and a fertilizer. *Mutat Res* [S.I.], v. 300, n. 2, p. 125-34, Jul 1993.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives alpha-lapachone and beta-lapachone. *Cancer Chemother Pharmacol* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 187-98, Mar 2001.

LEWANDOWSKI, E.C. Update on Cardiac Biomarkers. *J. American Society for Clinical Pathology*, v.37, n.10, p.598-605. 2006.

LOWE, G.D.; MACHADO, S.G. e KROL, W.F.; White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, v.54, p.700-703. 1985.

MABEKU, L. B. K. *et al.* Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 111, n. 3, p. 598-606, May 22 2007.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 179-188, March 1, 1974.

MARONI, B. C. *et al.* *Plantas medicinais do cerrado de Botucatu - guia ilustrado*. São Paulo: Editora UNESP, 2006.

MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. 3^a. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC,

2000.

MAZARO, R. *et al.* Effects of the hydromethanolic extract of *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) on reproductive parameters of male rats. *Contraception* [S.I.], v. 66, n. 3, p. 205-9, Sep 2002.

MELANSON S.E.F. e GREEN S.M. Elevation of myeloperoxidase in conjunction with cardiac-specific markers after marathon running. *Am J Clin Pathol*, v.26, n.6, p.888-893, 2006.

MICHEL, C. C. e CURRY, F. E. Microvascular permeability. *Physiol Rev.* v. 79, n. 3, p. 703-58, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. *Ministério da Saúde: Brasil.* v. 1, p. 60, 2006.

NEUBERT, D. Vulnerability of the endocrine system to xenobiotic influence. *Regul Toxicol Pharmacol* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 9-29, Aug 1997.

NICASIO, P.; MECKES, M. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacaranda mimosaeifolia* leaves in rats. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 97, n. 2, p. 301-4, Feb 28 2005.

NIETO, F.J.; SZKLO, M. E.; FOLSOM, A.R.; Leukocyte count correlates in middle-aged adults: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol*, v.136, p.525-537, 1992.

NUNES, G. P. *et al.* Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 13, p. 83-92, 2003.

O'FARRELL, D. *et al.* Efficacy of recombinant human manganese superoxide dismutase compared to allopurinol in protection of ischemic skeletal muscle against "no-reflow". *J Reconstr Microsurg* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 207-14, May 1995.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). *Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*. Paris: Head of Publications Service, 1996

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development In: CHEMICALS,

O. G. F. T. T. O. (Ed.). *Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)* Paris: Head of Publications Service, p. 27, 2008.

OGURA, M. *et al.* Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 157-68, Mar-Apr 1977.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista Eletrônica de Farmácia* [S.I.], v. 3 (2), 2006.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Adverse health consequences of environmental exposure to 'Endocrine Disruptors'. *ARBS annu. rev. biomed* [S.I.], v. 5, p. 10, 2003.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* [S.I.], v. 25, p. 45-61, 2002.

RANG, H. P. D. *et al.* *Rang & Dale Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAUBER, C. *et al.* Pre-clinic toxicological evaluation of a phytotherapeutic containing *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) in Wistar rats *Acta scientiae veterinariae* [S.I.], v. 34, p. 6, 2006.

REBOREDO, M. M. *et al.* Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* [S.I.], v. 25, p. 12, 2007.

RODRIGUEZ, J. A.; FAVARETTO, A. L. V. *Fisiologia: Sistema reprodutor*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 877.

RONG, X. *et al.* A 35-day gavage safety assessment of ginger in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* [S.I.], v. 54, n. 2, p. 118-23, Jul 2009.

ROY-BURMAN, P. *et al.* Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrine-Related Cancer* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 225-54, June 1, 2004 2004.

SANGALLI, A. *et al.* Levantamento e caracterização de plantas nativas com propriedades medicinais em fragmentos florestais e de cerrado de Dourados - MS, numa visão etnobotânica. *Acta Hort. (ISHS)* [S.I.], p. 11, 2002.

SHARON, J. *Imunologia Basica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

SHARPE, R. M. Could environmental, oestrogenic chemicals be responsible for some disorders of human male reproductive development? *Current Opinion in Urology* [S.I.], v. 4, n. 6, p. 295-302, 1994.

SHAO B. *et al.* Myeloperoxidase Impairs ABCA1-dependent Cholesterol Efflux through Methionine Oxidation and Site-specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. *Journal of biological chemistry*, v.281, n.14, p.9001-9004, 2006.

SGARBI, M.W.M. *et al.* The importance of systemic inflammatory response (SIRS) in the prognosis of polytraumatized patients. *Rev Bras Ortop*, v.41, n.2, p.1-6, 2006.

SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOWEMIMO, A. A. *et al.* Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 113, n. 3, p. 427-432, 2007.

STEVENSON, L. M. *et al.* Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens in male fighting fish *Betta splendens*. *Arch Environ Contam Toxicol* [S.I.], v. 60, n. 3, p. 501-10, Apr 2011.

SUBBARAMAIAH, K. *et al.* Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* [S.I.], v. 60, n. 9, p. 2399-404, May 1 2000.

SULTAN, C. *et al.* Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* [S.I.], v. 178, n. 1-2, p. 99-105, Jun 10 2001.

TOPPARI, J. *et al.* Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* [S.I.], v. 104 Suppl 4, p. 741-803, Aug 1996.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effect Assessment and Analysis. EPA/630/R-96/012, Washington, DC. 1997.

VARANDA, E. M. *et al.* Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. *J Nat Prod* [S.I.], v. 55, n. 6, p. 800-3, Jun 1992.

WANG, T. C. *et al.* Induction of sister-chromatid exchanges by pesticides in primary rat tracheal epithelial cells and Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* [S.I.], v. 188, n. 4, p. 311-21, Aug 1987.

WENIGER, B. *et al.* Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 78, n. 2-3, p. 193-200, Dec 2001.

WIESLANDER, G. *et al.* Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: a double blind crossover study in day-care centre staffs. *Tohoku J Exp Med* [S.I.], v. 225, n. 2, p. 123-30, 2011.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indometacina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 141, p 369-76, 1963.

YAKUBU, M. T. *et al.* Evaluation of antiandrogenic potentials of aqueous extract of *Chromolaena odoratum* (L.) K. R. leaves in male rats. *Andrologia* [S.I.], v. 39, n. 6, p. 235-43, Dec 2007.

YUNES, R. A. *et al.* Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova* [S.I.], v. 24, p. 147-152, 2001.

YUNianto, I. *et al.* Antispermatogetic and antifertility effect of Pegaga (*Centella asiatica* L) on the testis of male Sprague-Dawley rats. *Clin Ter* [S.I.], v. 161, n. 3, p. 235-9, 2010.

ZATTA, D. T. *et al.* Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. *Latin American Journal of Pharmacy* [S.I.], v. 28, p. 9, 2009.

5 Artigo 1

Este trabalho deu origem ao artigo “**Avaliação da toxicidade subaguda e reprodutiva em ratos machos adultos expostos ao extrato hidroetanólico das raízes de *Jacaranda decurrens*.**” que, após versado para o inglês, será submetido para o periódico “Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A”.

**Avaliação da toxicidade subaguda e reprodutiva em ratos
machos adultos expostos ao extrato hidroetanólico das raízes de
Jacaranda decurrens.**

Joyce Alencar Santos¹, Aline de Arruda¹, Cândida Aparecida Leite Kassuya¹, Claudia Andrea Lima Cardoso², Maria do Carmo Vieira³, Arielle Cristina Arena^{1*}.

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)-
Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

²Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do
Sul, Brasil

³Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)-
Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

***Autor de correspondência:**

Arielle Cristina Arena

Faculdade de Ciências da Saúde - UFGD

Rodovia Dourados-Itahum, Km12

Caixa Postal - 533

CEP: 79.804-970

Dourados - MS

Tel: + 55 67 34102331

Título reduzido: Avaliação da toxicidade de *J. decurrens* em ratos

Resumo

Jacaranda decurrens subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Bignoniaceae) é uma espécie amplamente utilizada por suas propriedades medicinais. No entanto, são escassas na literatura informações sobre avaliações toxicológicas utilizando as raízes desta planta, para garantir seu uso com segurança. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos (sistêmico e reprodutivo), após exposição subaguda ao extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens* (EJD) em ratos machos adultos. Os animais foram tratados oralmente (gavage) com 0; 250; 500 ou 1000 mg/kg/dia de massa corporal de EJD durante 28 dias consecutivos. O tratamento subagudo com o extrato de *J. decurrens* não ocasionou efeitos adversos no ganho de peso corporal, consumo de água e ração e nos perfis hematológicos e bioquímicos. Adicionalmente, não houve alterações nos aspectos macroscópicos ou microscópicos do fígado e rim, indicando ausência de toxicidade sistêmica nas doses testadas. Da mesma forma, o extrato não provocou toxicidade reprodutiva, visto que a produção espermática, o número de espermatozóides no epidídimo e a morfologia espermática foram normais. Concluiu-se que o extrato das raízes de *J. decurrens*, neste modelo experimental, não é tóxico para ratos machos Wistar.

Palavras-chaves: plantas medicinais; *Jacaranda decurrens*; toxicidade; reprodução

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), de 65 a 80% da população mundial, recorre ao uso de plantas para fins terapêuticos. Isso ocorre em razão do baixo custo para a população fazer o uso de plantas com a finalidade terapêutica e também por acreditarem no mito de que tudo que é “natural” é inócuo, não oferecendo riscos à saúde (Akerle, 1993; Ernst, 2004). Em estudo realizado em Belo Horizonte, 60% da população relatou que não acreditam que plantas medicinais possam provocar efeitos tóxicos (Oliveira e Gonçalves, 2006). Entretanto, poucas plantas selecionadas para uso foram estudadas cientificamente para avaliar sua qualidade, segurança e eficácia (Calixto, 2005).

A espécie *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença, conhecida popularmente como “carobinha-do-campo”, “carobinha” ou “caroba”, pertence a família Bignoniaceae, e é uma subespécie endêmica do cerrado encontrada nos estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Mauro *et al.*, 2007; Bertoni *et al.*, 2010).

Avaliações com diferentes espécies de *Jacaranda* apresentam propriedades antioxidantes (Carvalho *et al.*, 2009), antimicrobianas (Zatta, 2009), antitumorais (Ogura *et al.*, 1977), quimiopreventivas (Subbaramaiah *et al.*, 2000), sendo o composto responsável por estas atividades o ácido ursólico (Varanda *et al.*, 1992; Subbaramaiah *et al.*, 2000; Zatta *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009).

Estudos farmacológicos revelaram que a espécie *J. caucana*, da mesma família que *J. decurrens*, possui propriedades antitumorais, citotóxicas, anti-helmínticas e anti-hipertensivas (Ogura *et al.*, 1977; Weniger *et al.*, 2001; Nicasio e Meckes, 2005). Jacaranona foi demonstrada ser o composto responsável pela atividade citotóxica e antitumoral desta planta (Ogura *et al.*, 1977).

Em meio ao grande uso desta planta na medicina popular, poucos estudos tem avaliado os efeitos toxicológicos da espécie *J. decurrens*. Em estudo realizado com o extrato etanólico das folhas de *J. decurrens*, nas doses de 2000 e 5000 mg/kg, pode-se concluir que as folhas não apresentaram toxicidade aguda em ratos e camundongos (Zatta *et al.*, 2009). No entanto, em estudo desenvolvido em nosso laboratório, o extrato aquoso das raízes de *J. decurrens* provocou alterações no início do desenvolvimento reprodutivo dos descendentes machos, como antecipação da idade de descida testicular

e redução no peso absoluto e relativo de testículo e epidídimo dos animais com 60 dias de idade (Arena *et al.*, 2011).

Devido à escassez de informações na literatura em relação a avaliações toxicológicas após exposição subaguda, e a evidência de alterações reprodutivas provocadas nos descendentes machos após exposição materna ao extrato aquoso de *J. decurrens*, objetivou-se, no presente estudo, avaliar os possíveis efeitos tóxicos (sistêmicos e reprodutivos) do extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens* (EJD) em ratos machos adultos, após exposição subaguda, para avaliar sua segurança em modelo animal.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Botânico

O material botânico constituído por raízes de *J. decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* foi coletado no Horto de Plantas Medicinais-HPM da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em abril de 2010 e identificado no Instituto de Biologia, Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela Dra. Rosana Farias Singer. A exsicata se encontra no herbário da UNICAMP sob registro W.G. Garcia 14.008.

2. Preparação do extrato hidroetanólico de *J. decurrens*

Logo após a coleta, as raízes foram lavadas, cortadas e trituradas. Estas foram secas em estufa (± 30 °C) até a obtenção de massa constante. A amostra vegetal seca (560 g) foi extraída por maceração, por dois dias, com solução hidroetanólica (3,5 L), à temperatura ambiente, sendo que a solução foi filtrada e o mesmo processo foi realizado por quatro vezes consecutivas. Os filtrados obtidos foram unidos e acondicionados em vidro âmbar e mantidos em refrigerador até o término dos 10 dias. Então o filtrado foi concentrado em rota vapor e seco em liofilizador. No momento do tratamento o extrato foi solubilizado em solução hidroetanólica para obtenção das concentrações desejadas.

3. Animais

Foram utilizados ratos machos adultos Wistar (90 dias de idade, pesando aproximadamente 340 g, n=32), provenientes do Biotério da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais passaram por um período de adaptação antes do início dos experimentos, e foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 horas de claro/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C), recebendo água e ração comercial à vontade.

Todos os procedimentos realizados seguiram as normas da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento 408 e o Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos (OECD, 1998; ANVISA, 2010). Os animais utilizados neste estudo foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN) sob protocolo n. 334/10, de 04/10/2010.

4 Avaliação da toxicidade subaguda e reprodutiva

Ratos machos adultos (n= 8 animais/grupo) foram tratados oralmente (gavage) com 0; 250; 500 e 1000 mg/kg de peso corporal com EJD, durante 28 dias consecutivos. Os animais do grupo controle receberam apenas solução hidroetanólica (veículo). A escolha das doses foi baseada em estudo prévio realizado em nosso laboratório seguindo as recomendações da ANVISA (Arena *et al.*, 2011; ANVISA, 2010).

Para investigar possíveis sinais clínicos de toxicidade, durante todo o período de tratamento, foram analisados, diariamente, parâmetros comportamentais, como presença de irritabilidade, contorção, reflexo de endireitamento, tremores, convulsões, lacrimação, piloereção, respiração e morte (OECD, 2008). Verificou-se também o ganho de peso corporal e o consumo de água e ração.

Ao final do tratamento, os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados e anestesiados com uma combinação de ketamina (25 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e logo após, amostras de sangue da veia renal foram coletadas, com e sem anticoagulante (Heparina sódica 5.000 UI/mL, Heparin® - Cristália). As amostras

sanguíneas com anticoagulante foram utilizadas para determinação dos parâmetros hematológicos (contagem total e diferencial de leucócitos, hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos), enquanto que as amostras sanguíneas sem anticoagulante foram utilizadas para análises bioquímicas (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT, gama-glutamil transferase - δ -GT, creatinina e uréia) (OECD, 2008; Balani *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2011). Os parâmetros bioquímicos avaliados foram determinados, através do equipamento semi-automático Bioplus Bio200, utilizando kits Gold Analise.

Em seguida, os animais foram mortos por decaptação, e os órgãos vitais (fígado, pulmão e rim) foram removidos e pesados e, seus pesos (absoluto e relativo ao peso corporal) determinados. Para a avaliação histopatológica destes órgãos, amostras foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado (tampão fosfato 10 mM, pH 7,4) e processadas para estudo histopatológico em microscopia de luz. As peças foram incluídas em blocos de parafina, seccionadas à 5 μ m, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e observadas em microscópio de luz (40x). Os principais parâmetros investigados nestes cortes foram: lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade reprodutiva, foram utilizados os mesmos animais do teste subagudo. Assim, após a eutanásia dos animais dos diferentes grupos experimentais, os órgãos reprodutores (testículo, epidídimo, próstata, ducto deferente e vesícula seminal) foram removidos e pesados (pesos absoluto e relativo ao peso corporal). Por padronização do laboratório, o testículo e epidídimo direito foram usados para realização das contagens de células germinativas e os órgãos esquerdos foram fixados para avaliação histopatológica, utilizando a mesma técnica descrita acima para os órgãos vitais.

4.1 Contagem de células germinativas no testículo e epidídimo

Espermátides resistentes a homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) e espermatozóides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados, conforme descrito previamente por Robb *et al.* (1978), com adaptações adotadas por Fernandes *et al.* (2007). Resumidamente, cada testículo esquerdo, descapsulado e pesado logo após a coleta, foi homogeneizado em 5 mL de NaCl 0,9% contendo TritonX100 0,5%. Após

diluição de 10 vezes a amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (4 campos por animal), procedendo a contagem de espermátides maduras. Para o cálculo da produção diária de espermatozóides (PDE) o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1, que é o número de dias do ciclo seminífero em que estas espermátides estão presentes no epitélio seminífero.

Da mesma forma, porções da cabeça/corpo e cauda epididimária foram cortadas em pequenos fragmentos e homogeneizados, e procedeu-se a contagem de espermatozóides como descrito para o testículo. O tempo de trânsito de espermatozóides através do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozóides em cada porção pela PDE.

4.2 Morfologia dos espermatozóides

Para a avaliação da morfologia dos espermatozóides, o ducto deferente direito de cada animal foi seccionado nas extremidades anterior e posterior, e lavado internamente com 1,5 mL de solução formol salina utilizando agulha e seringa. Foram realizados esfregaços em lâminas histológicas, e analisados 200 espermatozóides por animal, em microscópio de luz (ampliação total de 200 vezes), onde avaliou-se alterações de cabeça e/ou cauda (flagelo) (Filler, 1993).

5 Análise Estatística

Para a comparação dos resultados entre os quatro grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA, com teste “*a posteriori*” de Tukey-Kramer. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, realizadas no GraphPad InStat (versão 3.02).

RESULTADOS

Após a realização do teste de toxicidade subaguda, não foram observadas nenhuma alteração comportamental, no ganho de peso corporal e no consumo de água e ração dos animais nos 28 dias de tratamento (dados não mostrados). Similarmente, o peso relativo dos órgãos vitais analisados não diferiram significativamente entre os

grupos (Tabela 1). As análises macro e microscópicas de fígado, rim e pulmão apresentaram características normais entre os grupos. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos também apresentaram-se similares entre os grupos experimentais (Tabela 2).

No teste de toxicidade reprodutiva, o peso relativo dos órgãos reprodutores analisados (testículo, epidídimo, próstata, ducto deferente e vesícula seminal) foram semelhantes ao grupo controle (Tabela 1). Após as contagens espermáticas no testículo e epidídimo, nenhuma mudança foi observada na produção espermática diária ou no número de espermatozoides no epidídimo (Tabela 3). Da mesma forma, a análise morfológica dos espermatozoides coletados do ducto deferente mostrou que a porcentagem de formas normais (controle=86,32%; 250mg/kg=85,15%; 500mg/kg=87,27%; 1000mg/kg= 86,75%, $n=8$) e anormais foram similares entre os grupos. A histologia do testículo e epidídimo também não foi afetada pelo tratamento (dados não mostrados).

Tabela 1. Peso relativo de órgãos de animais expostos ao tratamento subagudo com EJD.

	Tratamento subagudo			
	Controle (veículo)	Tratado 250 mg/kg	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000 mg/kg
Peso corporal (g)	430±22,31	422±22,10	439±32,21	426±18,20
Fígado (g)	2,78±0,07	2,74±0,06	2,67±0,21	2,70±0,10
Pulmão (g)	0,427±0,16	0,487±0,03	0,444±0,02	0,420±0,02
Rim (g)	0,310±0,01	0,319±0,01	0,298±0,01	0,292±0,01
Testículo (g)	0,489 ± 0,02	0,466± 0,01	0,437±0,01	0,433±0,01
Epidídimo (mg)	147,0 ± 0,01	167,0± 0,01	157,0±0,01	158,0±0,01
Prostata (mg)	124,0 ± 0,02	155,0± 0,02	166,0 ±0,01	122,0±0,01

Valores expressos como média ±epm, com n=8 animais em cada grupo, sendo $p<0,05$, ANOVA, seguido por Tukey – Kramer.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados após tratamento subagudo com EJD.

	Controle (veículo)	Tratado 250 mg/kg	Tratado 500 mg/kg	Tratado 1000 mg/kg
Creatinina	1,2±0,15	1,5±0,1	1,2±0,1	1,5±0,1
Uréia	49,5±3,8	54,6±3,6	53,0±4,5	47,9±3,5
AST	114,4±19,4	98,4±13,2	100,2±17,4	104,6±24,4
ALT	20,8±2,6	25,2±4,0	22,8±1,7	23,6±3,5
δ-GT	11,78±0,7	13,3±2,1	12,6±0,8	13,3±2,1
Hemácia (x10 ⁶)mm ³	7,5±0,45	6,7±0,5	6,7±2,0	7,3±1,7
Hemoglobina (g/dL)	13,2±0,7	14,1±0,3	14,1±0,3	13,6±1,1
Hematócrito (%)	39,5±1,9	42,6±0,6	44,1±1,1	42,5±2,0
Plaquetas (x10 ³ /μL)	1064±48	1051±20	1070±27	1069±32
Linfócitos (%)	69,8±4,3	78,0±1,1	76,3±2,2	80,0±1,64
Eosinófilo (%)	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1
Monócito (%)	2,9±0,4	3,2±0,2	2,8±0,4	3,3±0,2
Neutrófilos (%)	25,3±4,6	23,8±2,1	22,0±1,0	21,2±0,7

Valores expressos como média±epm, com n=8 animais em cada grupo. p<0,05, ANOVA.

Tabela 3. Parâmetros espermáticos avaliados após exposição a diferentes doses de EJD, durante 28 dias.

Parâmetros	Controle	Tratado 250 mg/kg	Tratado 500mg/kg	Tratado 1000mg/kg
Testículo				
Produção espermática diária (x 10 ⁶)/testículo	35,02±2,27	35,04±0,95	39,79±0,82	34,89±2,59
Produção espermática diária (x 10 ⁶)/g/testículo	25,25±1,58	23,68±0,72	25,59±0,75	25,80±1,58
Número de espermátide (x 10 ⁶)/testículo	154,03±9,68	144,50±4,40	156,123±4,63	157,37±9,63
Cabeça/corpo do epidídimo				
Contagem de espermatozóide (x10 ⁶)/g	352,23±15,96	339±23,52	353,15±17,85	342±16,40
Cauda do epidídimo				
Contagem de espermatozóide (x10 ⁶)/g	650,79±9,45	642,43±20,32	678±19,74	680±17,88

Valores expressos como média± epm, com n=8 animais em cada grupo. p<0,05, ANOVA

DISCUSSÃO

A fitoterapia está se tornando uma alternativa para o tratamento de diversas doenças. Embora as terapias naturais sejam consideradas pela crença popular seguros e sem riscos a saúde, essas substâncias, antes de serem utilizadas, necessitam de avaliações farmacológicas e toxicológicas (Firenzuoli e Gori, 2007; Cheng *et al.*, 2009). A planta selecionada para esse estudo, *J. decurrens*, é muito utilizada para fins terapêuticos, no entanto, são escassos os estudos toxicológicos que comprovem sua segurança.

Para avaliar a ação tóxica de uma substância, a mortalidade é um sinal claro de toxicidade, no entanto, outras variáveis podem ser indicativas de efeitos adversos mais sutis, como perda de massa corporal durante o tratamento e a presença de sinais clínicos de toxicidade, tais como, diarreia, irritabilidade, piloereção, contorção, reflexo de endireitamento, tremores, variações no comportamento, sangramento, entre outros (Muller, 2007; OECD, 2008; Nana *et al.*, 2011).

O extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens* não acarretou em mortalidade ou alterações comportamentais em nenhum dos animais estudados durante os 28 dias de tratamento. O consumo de água e ração também não diferiu entre os grupos. Além disso, o peso corporal e o peso relativo dos órgãos vitais (fígado, rim e pulmão), e a histologia destes órgãos não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis para substâncias tóxicas e é um parâmetro importante para avaliar o status fisiológico e patológico em homens e animais (Li *et al.*, 2010). Após as análises hematológicas, observou-se que os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de plaquetas, eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos nos animais tratados foram similares ao grupo controle, indicando que o extrato não proporcionou efeitos negativos nas células sanguíneas circulantes ou na sua produção.

Na fase inicial, a lesão hepática pode ser detectada a partir das alterações nos níveis das enzimas hepáticas no sangue. Esse aumento pode ser ocasionado pela necrose celular ou aumento da permeabilidade celular. Algumas enzimas podem ser utilizadas como indicadores de lesão hepática, entre elas estão ALT, AST e δ -GT (El Hilaly *et al.*, 2004; Rauber *et al.*, 2006; Brandt *et al.*, 2009). Geralmente, qualquer dano as células

hepáticas parenquimatosas resultam em elevações de ambas as transaminases no sangue.

A creatinina é conhecida como um biomarcador de danos funcionais nos néfrons, sendo muito eficaz na detecção de alterações na função renal (Lameire *et al.*, 2005). O aumento das concentrações séricas indica uma diminuição na filtração glomerular, todavia, o aumento desse metabólito no sangue não reflete necessariamente uma lesão renal induzida por um composto químico, mas podem ser secundários a desidratação, hipovolêmia ou catabolismo de proteínas (Klaassen, 2007).

As análises bioquímicas (AST, ALT, δ -GT, creatinina e uréia) obtidas no presente estudo não diferiram significativamente entre os grupos experimentais, indicando que o fígado e rim não foram afetados pelo tratamento, apesar de não ter diferença estatística os valores de creatinina são considerados clinicamente elevados, podendo ser resultado da alimentação ou stresse, por isso estudos envolvendo a urina devem ser realizados. Da mesma forma, não foram encontradas alterações significativas em relação ao peso absoluto e relativo dos órgãos vitais (fígado, pulmão e rim) ou na análise histopatológica destes órgãos. Tomados em conjunto, os dados discutidos acima indicam que EJD não acarretou toxicidade sistêmica.

Estudos de toxicidade reprodutiva masculina devem ser considerados como parte de um processo de avaliação segura de plantas medicinais, o qual complementa os estudos toxicológicos sistêmicos (Dalsenter *et al.*, 2004). Assim, foram avaliados neste estudo, alguns parâmetros reprodutivos bem validados em toxicologia da reprodução.

Atualmente vem sendo observado uma diminuição na qualidade do sêmen (particularmente na contagem espermática) em uma variedade de espécies, inclusive na população humana. Estudos sugerem que este declínio está relacionado com a exposição a substâncias que afetam o sistema endócrino, conhecidas como desreguladores endócrinos (Gray, 1998; Giwercman, 2011).

No presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas no peso absoluto e relativo dos órgãos do sistema reprodutor (testículo, epidídimo, próstata, ducto deferente e vesícula seminal) dos animais expostos ao extrato. Como variações nos pesos de órgão reprodutores podem ser usados como parâmetro para indicar mudanças nos níveis de hormônios sexuais (Zenick, 1994), sugere-se que o tratamento subagudo ao EJD possivelmente não alterou o status hormonal (andrógenos) dos animais. No entanto, outros estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Tem sido comprovado que algumas plantas medicinais possuem compostos

que interferem no sistema endócrino, afetando a produção espermática e/ou o número de espermatozóides no epidídimo, comprometendo a fertilidade de animais expostos (Mazaro *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2006). Um agente tóxico pode afetar a maturação, função e sobrevivência espermática por atuar diretamente sobre os espermatozóides ou alterando a função epididimária (Gupta, 2011).

Yakubu *et al.* (2007) demonstrou que plantas medicinais podem alterar o sistema reprodutor masculino ao testar o extrato aquoso de *Chromolaena odoratum*, nas doses de 250 e 500 mg/kg, constatando que o mesmo possui atividade antiandrogênica, já que reduziu o número de espermatozóides em ratos machos expostos oralmente durante 14 dias. Da mesma forma, Arena *et al.* (2011) observaram uma alteração no desenvolvimento inicial do sistema reprodutor masculino, caracterizado pela antecipação na descida testicular dos filhotes e diminuição do peso relativo de testículo e epidídimo de animais durante a fase púbere, após uma exposição gestacional e lactacional ao extrato aquoso de *J. decurrens*, ou seja, o tratamento foi realizado no período da formação do sistema reprodutor masculino. Controversamente, no presente estudo, o tratamento subagudo com o extrato hidroetanólico de *J. decurrens* na vida adulta não foi tóxico para o sistema reprodutor masculino, já que não alterou nenhum parâmetro analisado. Essa diferença nos resultados obtidos pode ser decorrente do período de tratamento (período gestacional e vida adulta) e/ou veículo (aquoso ou hidroetanólico) utilizado na preparação do extrato ter sido diferentes entre os dois estudos.

Concluiu-se que o extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens*, neste modelo experimental, apresenta ausência de toxicidade subaguda e reprodutiva. No entanto, outros estudos com fêmeas e outras espécies de animais devem ser realizados para confirmar a segurança desta planta para o homem.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

- AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 390-395, 1993..
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos v. 1, p. 37, 2010.
- ARENA, A. C. *et al.* Maternal exposure to aqueous extract of *Jacaranda decurrens*: Effects on reproductive system in male rats. *Pharmaceutical Biology* [S.I.], 2011.
- BALANI, T. *et al.* Hematological and biochemical changes due to short-term oral administration of imidacloprid. *Toxicol Int* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 2-6, 2011.
- BERTONI, B. W. *et al.* Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. *Genet Mol Biol* [S.I.], v. 33, n. 3, p. 532-540, 2010.
- BRANDT, A. P. *et al.* Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 19, p. 388-393, 2009.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 100, n. 1-2, p. 131-135, 2005.
- CARVALHO, C. A. D. *et al.* Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 19, p. 592-598, 2009.
- CHANG, C. W. *et al.* Identification and categorization of liver toxicity markers induced by a related pair of drugs. *Int J Mol Sci* [S.I.], v. 12, n. 7, p. 4609-4633, 2011.
- CHENG, C. W. *et al.* Systematic review of Chinese herbal medicine for functional constipation. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 15, n. 39, p. 4886-4981, 2009.
- DALSENTER, P. R. *et al.* Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reprod Toxicol* [S.I.], v. 18, n. 6, p. 819-842, 2004.

- EL HILALY, J. *et al.* Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004.
- ERNST, E. Risks of herbal medicinal products. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* [S.I.], v. 13, n. 11, p. 767-838, 2004.
- FERNANDES, G.S. *et al.* Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol*, v.26, p. 106-112, 2007.
- FILLER, R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: CHAPIN, R. E. H., J. D. (Ed.). *Male Reproductive Toxicology*. San Diego: Academic Press Inc. p. 334-343, 1993.
- FIRENZUOLI, F.; GORI, L. Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], v. 4, n. Suppl 1, p. 37-40, 2007.
- GIWERCMAN, A. Estrogens and phytoestrogens in male infertility. *Curr Opin Urol* [S.I.], v. 21, n. 6, p. 519-545, 2011.
- GRAY, L. E., JR. Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicol Lett* [S.I.], v. 102-103, p. 331-336, 1998.
- GUPTA, R. S. *et al.* Antispermatic, antiandrogenic activities of *Albizia lebbek* (L.) Benth bark extract in male albino rats. *Phytomedicine* [S.I.], v. 13, n. 4, p. 277-360, 2006.
- GUPTA, R. C. *Reproductive and Developmental Toxicology*. 1ª ed. San Diego, USA: Elsevier Science & Technology, 2011.
- KLAASSEN, C. D. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. McGraw-Hill, 2007.
- LAMEIRE, N. *et al.* Acute renal failure. *Lancet* [S.I.], v. 365, n. 9457, p. 417-447, 2005.
- LI, X. *et al.* Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 131, n. 1, p. 110-115, 2010.
- MAURO, C. *et al.* Estudo anatômico das espécies de cerrado *Anemopaegma arvense* (Vell.) Steff. ex de Souza (catuaba), *Zeyheria montana* Mart. (bolsa-de-pastor) e *Jacaranda decurrens* Chamisso (caroba) - Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 17, p. 262-265, 2007.

MAZARO, R. *et al.* Effects of the hydromethanolic extract of *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) on reproductive parameters of male rats. *Contraception* [S.I.], v. 66, n. 3, p. 205-214, 2002.

MULLER, J. C. *Toxicidade reprodutiva da Morinda citrifolia* Linn. 88 f. (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NANA, H. M. *et al.* Acute and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hylodendron* stem bark. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 137, n. 1, p. 70-76, 2011.

NICASIO, P.; MECKES, M. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacaranda mimosaeifolia* leaves in rats. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 97, n. 2, p. 301-305, 2005.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). *Guideline 408: Repeated Dose Oral Toxicity Study in Rodents* Paris: Head of Publications Service, 1998.

OGURA, M. *et al.* Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 157-225, 1977.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista Eletrônica de Farmácia* [S.I.], v. 3, n.2, 2006.

RAUBER, C. *et al.* Pre-clinic toxicological evaluation of a phytotherapeutic containing *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) in Wistar rats *Acta scientiae veterinariae* [S.I.], v. 34, p. 6, 2006.

ROBB, G. W. *et al.* Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

SUBBARAMAIAH, K. *et al.* Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* [S.I.], v. 60, n. 9, p. 2399-2803, 2000.

VARANDA, E. M. *et al.* Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. *J Nat Prod* [S.I.], v. 55, n. 6, p. 800-803, 1992.

WENIGER, B. *et al.* Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

YAKUBU, M. T. *et al.* Evaluation of antiandrogenic potentials of aqueous extract of *Chromolaena odoratum* (L.) K. R. leaves in male rats. *Andrologia* [S.I.], v. 39, n. 6, p. 235-278, 2007.

ZATTA, D. T. *et al.* Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. *Latin American Journal of Pharmacy* [S.I.], v. 28, p. 9, 2009

ZENICK, H. C. *et al.* Assessment of male reproductive toxicity: A risk assessment approach. In: HAYES, A. W. (Ed.). *Principles and methods of toxicology* New York: Raven, p. 937 -988, 1994.

6 Artigo 2

Este trabalho deu origem ao artigo “**Avaliação da toxicidade aguda e da atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das raízes de *Jacaranda decurrens* em ratos machos adultos**”.” que, após versado para o inglês, será submetido para o periódico “Journal of Ethnopharmacology”.

**Avaliação da toxicidade aguda e da atividade anti-inflamatória
do extrato hidroetanólico das raízes de *Jacaranda decurrens* em ratos
machos adultos”**

Joyce Alencar Santos¹, Aline de Arruda¹, Magaiver Andrade da Silva¹, Cândida Aparecida Leite Kassuya¹, Claudia Andrea Lima Cardoso², Maria do Carmo Vieira³, Arielle Cristina Arena^{1*}.

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)- Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

²Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

³Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)- Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

***Autor de correspondência:**

Arielle Cristina Arena

Faculdade de Ciências da Saúde - UFGD

Rodovia Dourados-Itahum, Km12

Caixa Postal - 533

CEP: 79.804-970

Dourados - MS

Tel: + 55 67 34102331

E-mail: ariellearena@ufgd.edu.br

Versão reduzida do título: Segurança e ação anti-inflamatória de *J. decurrens*

Resumo

Jacaranda decurrens subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Bignoniaceae) é uma espécie popularmente utilizada para o tratamento de diversas patologias, incluindo doenças inflamatórias. No entanto, até o momento, não há estudos que comprovem esses efeitos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens* (EJD) em ratos machos adultos e determinar a segurança desta planta após exposição aguda.

Material e métodos: Para os testes de toxicidade aguda, ratos foram tratados oralmente (gavage) com 0; 500; 1000 ou 2000 mg/kg de massa corporal de EJD. O comportamento geral, efeitos adversos e mortalidade foram registrados durante 14 dias. A atividade anti-inflamatória foi avaliada em modelo experimental de inflamação por edema de pata e atividade da mieloperoxidase (MPO) induzida por carragenina em ratos machos adultos.

Resultados: No teste de toxicidade aguda, o EJD não provocou alterações comportamentais ou morte, demonstrando que a DL50 é superior a 2000 mg/kg. A administração oral de EJD, nas doses de 100 e 300 mg/kg, reduziu o desenvolvimento do edema de pata, sendo que, na dose de 300 mg/kg, esta redução foi semelhante a provocada pela dexametasona (1mg/kg). Também se pode observar uma diminuição significativa na atividade da enzima MPO.

Conclusões: Os resultados deste estudo demonstram que o EJD apresenta propriedades anti-inflamatórias e não apresentou sinais de toxicidade após exposição oral aguda, nos parâmetros avaliados. As propriedades observadas pode ser devido a presença de constituintes bioativos como o ácido ursólico.

Palavras-chaves: *Jacaranda decurrens*, edema de pata, carragenina, toxicidade aguda, rato

Introdução

O processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um mecanismo complexo que não pode ser atribuído a um único fator, por isso possui capacidade de manifestar-se a partir de agente lesivo, podendo ser físico (queimadura ou trauma), biológico (microrganismo) ou químico (substância cáustica) (Sharon, 2000; Silva, 2006).

A inflamação pode ser classificada com relação ao tempo de duração em: aguda e crônica. É caracterizada por febre, dor, rubor e edema, sendo esses definidos como sinais primários da inflamação, enquanto o processo inflamatório crônico é caracterizado pela proliferação celular (Sharon, 2000) sendo capaz de levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, doença de Alzheimer e aterosclerose (Kassuya *et al.*, 2009).

Após a lesão tecidual ocorre a ativação de monócitos, neutrófilos e macrófagos (Aderem e Ulevitch, 2000). Geralmente, a ativação dessas células pode atuar sobre a secreção de várias moléculas pró-inflamatórias e de toxicidade como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), eicosanóides e óxido nítrico (NO) (Nantel *et al.*, 1999). No entanto, a resposta inflamatória excessiva tem efeitos prejudiciais, tais como choque séptico, o que pode levar à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e morte. Prostaglandinas (PGs) e NO são dois importantes mediadores pró-inflamatórios e a inibição da produção de ambos através da inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), respectivamente, tem sido demonstrado ser benéfica em tratamento da doença inflamatória (Bogdan, 2001).

Anti-inflamatórios, tais como esteróides ou anti-inflamatórios não-hormonais (AINEs) têm um número de efeitos colaterais adversos, tais como desconforto gastrointestinal, inibição da agregação plaquetária e toxicidade hepática e renal (Batlouni, 2010). Assim, há um interesse considerável na identificação de novos agentes anti-inflamatórios obtidos de plantas utilizadas na medicina popular.

A espécie *Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença é conhecida popularmente como “carobinha-do-campo”, “carobinha” ou “caroba”, pertence a família Bignoniaceae, e é uma subespécie encontrada nos estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Mauro *et al.*, 2007; Bertoni *et al.*, 2010). De acordo com a medicina popular, o chá de suas raízes é utilizado para combater diversas enfermidades, entre elas, doenças inflamatórias (Nunes

et al., 2003).

Avaliações farmacológicas revelaram que diferentes espécies de *Jacaranda* apresentam propriedades antioxidantes (Carvalho *et al.*, 2009), antimicrobianas (Zatta, 2009), antitumorais (Ogura *et al.*, 1977), quimiopreventivas (Subbaramaiah *et al.*, 2000), podendo ser composto responsável por estas atividades o ácido ursólico (Varanda *et al.*, 1992; Subbaramaiah *et al.*, 2000; Zatta, 2009; Carvalho *et al.*, 2009).

Análises realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) evidenciaram a presença dos triterpenos, ácido ursólico, oleanólico e flavonóides glicosilados em frações do extrato das folhas de *J. decurrens* (Carvalho *et al.*, 2009). Em testes realizados com as folhas de *J. decurrens* foi constatada a presença de flavonóides heterosídeos, saponinas e cumarinas (Zatta, 2009), podendo esses compostos apresentar atividades anti-inflamatória, antifúngicas, espermicida, expectorante, vasodilatadora e diurética (Subbaramaiah *et al.*, 2000).

Em virtude do uso das raízes de *J. decurrens* pela medicina popular para combater doenças inflamatórias, sem comprovação científica “*in vivo*” desse potencial terapêutico, objetivou-se no presente estudo avaliar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato hidroetanólico das raízes de *J. decurrens* (EJD) em ratos machos adultos e determinar a segurança desta planta após exposição aguda.

Material e Métodos

1. Material Botânico

O material botânico constituído por raízes de *J. decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* foi coletado no Horto de Plantas Medicinais-HPM da UFGD em abril de 2010 e identificado no Instituto de Biologia, Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela Dra. Rosana Farias Singer. A exsicata se encontra no herbário da UNICAMP sob registro W.G. Garcia 14.008.

2. Preparação do extrato hidroetanólico de *J. decurrens*

Logo após a coleta, as raízes foram lavadas, cortadas e trituradas. Estas foram secas em estufa (± 30 °C) até a obtenção de massa constante. A amostra vegetal seca (560 g) foi extraída por maceração, por dois dias, com solução hidroetanólica (3,5 L), à

temperatura ambiente, sendo que a solução foi filtrada e o mesmo processo foi realizado por quatro vezes consecutivas. Os filtrados obtidos foram unidos e acondicionados em vidro âmbar e mantidos em refrigerador até o término dos 10 dias. Então o filtrado foi concentrado em rota vapor e seco em liofilizador. No momento do tratamento o extrato foi solubilizado em solução hidroetanólica para obtenção das concentrações desejadas.

3. Animais

Foram utilizados ratos machos adultos *Wistar* (90 dias de idade, pesando aproximadamente 340 g, n=56 , provenientes do Biotério da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais passaram por um período de adaptação no Biotério Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde-UFGD antes do início dos experimentos, e foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 horas de claro/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C), recebendo água e ração comercial à vontade.

Os procedimentos realizados para toxicidade aguda seguiram as normas da Organização para cooperação econômica e desenvolvimento 425 e ANVISA (OECD, 2008; ANVISA, 2010). Os animais utilizados neste estudo foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN) sob protocolo 334/10, de 04/10/2010.

4 Avaliação da toxicidade aguda

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=3 animais/grupo). Ratos machos adultos foram tratados com 0; 500; 1000 e 2000 mg/kg de peso corporal de EJD (OECD, 2008). Os animais permaneceram em jejum de 12 h antes da administração dos extratos. Os tratamentos foram realizados em dose única, por via oral (gavage), e foram observados, nos primeiros 0,5 h, 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 12 h e a cada 24 h durante 14 dias. Foram analisados parâmetros comportamentais, como irritabilidade, contorção, tremores, convulsões, piloereção, respiração e morte. Também verificou-se o peso corporal e a quantidade de água e ração consumida pelo grupo.

Após 14 dias do tratamento, os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados e anestesiados com uma combinação de ketamina (25 mg/kg) e xilazina

(10 mg/kg), logo após, amostras de sangue da veia renal foram coletadas, com e sem anticoagulante (Heparina sódica 5.000 UI/mL, Heparin® - Cristália). As amostras sanguíneas com anticoagulante foram utilizadas para determinação dos parâmetros hematológicos (contagem total e diferencial de leucócitos, hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos), enquanto que as amostras sanguíneas sem anticoagulante foram utilizadas para análises bioquímicas (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT, gama-glutamil transferase - δ -GT, creatinina e uréia) (OECD, 2008; Balani *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2011). Os parâmetros bioquímicos avaliados foram determinados, através do equipamento semi-automático Bioplus Bio200, utilizando kits Gold Analise. Em seguida os animais foram mortos por decapitação.

Órgãos vitais (fígado, pulmão e rim) foram removidos e pesados e, seus pesos (absoluto e relativo ao peso corporal, sendo peso absoluto não mostrado) foram determinados. Para a avaliação histopatológica destes órgãos, amostras foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado (tampão fosfato 10 mM, pH 7,4) e processados para estudo histológico em microscopia de luz. As peças foram incluídas em blocos de parafina, seccionadas à 5 μ m, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e observadas em microscópio de luz (40x). Os principais parâmetros investigados nestes cortes foram: lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose.

5 Teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos

5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=6 animais/grupo). Após 12 h em jejum, um grupo foi tratado com o veículo por gavagem (grupo controle), um grupo foi tratado com dexametasona (s.c., 1 mg/kg) como controle positivo e dois grupos foram tratados com doses de 100 e 300 mg/kg, de EJD. Após 1 h os animais receberam uma injeção intraplantar (ipl.) de carragenina (300 μ g/pata) em uma pata traseira. O volume final foi de 100 μ L/pata e uma pata contralateral recebeu o mesmo volume de salina estéril e foi usado como controle. A espessura do edema de pata foi medida utilizando um micrômetro digital, 0,5 h antes de qualquer tratamento e em momentos diferentes (0,5; 1; 2 e 4 h) após a injeção de

carragenina. Resultados foram expressos em μm e a diferença entre os valores basais e pós-injeção quantificado como edema (Kassuya *et al.*, 2005; Kassuya *et al.*, 2009).

5.2 Determinação de mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar se o tratamento oral com extrato EJD poderia afetar a migração celular induzida por carragenina na pata, a atividade da mieloperoxidase (MPO) foi medida. Seis horas após a injeção de carragenina intraplantar, as patas foram removidas e tratadas conforme (De Young *et al.*, 1989). Para a atividade de MPO, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato 80 mM, pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio. O homogenato foi centrifugado a $12.000\times g$ a 4°C por 20 min. Alíquotas (30 μl) de cada sobrenadante foram misturados com 100 μl de tampão fosfato (80 mM), 85 μl de tampão fosfato (0,22 M) e 15 μl de H_2O_2 (0,017%) em uma placa de 96 poços. A reação foi desencadeada com 20 μl de 3,3,3-tetrametilbenzidina (dissolvido em N, N-dimetilformamida). A placa foi mantida a 37°C por 3 min, a reação interrompida pela adição de acetato de sódio (30 μl , 1,46 M, pH 3,0). A atividade enzimática foi determinada pela medição da densidade óptica (630 nm) e expressa como OD por mg de tecido (Kassuya *et al.*, 2009).

6 Análise Estatística

Para a comparação dos resultados entre os quatro grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA, com teste “*a posteriori*” de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, realizadas no GraphPad InStat (versão 3.02).

RESULTADOS

Toxicidade Aguda

Após a realização do teste de toxicidade aguda, observou-se que o extrato de EJD não acarretou morte ou alterações comportamentais nos animais. Da mesma forma, o consumo de água e ração não diferiu entre os grupos experimentais (dados não mostrados). Adicionalmente, o peso relativo e absoluto dos órgãos vitais (fígado, rim e pulmão) (Tabela 1), parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de

hemoglobina, contagem de plaquetas, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos), bioquímicos (AST, ALT, δ -GT, creatinina e uréia) (Tabela 2) e análise histopatológica dos órgãos vitais não apresentaram diferença estatisticamente significativamente em nenhuma das doses testadas (dados não mostrados).

Tabela 1. Peso corporal absoluto e peso relativo de órgãos de animais expostos ao tratamento agudo com EJD.

	Tratamento agudo			
	Controle (veículo)	Tratado 500mg/kg	Tratado 1000mg/kg	Tratado 2000mg/kg
Peso corporal (g)	370±14,28	388±19,21	402±9,23	391±13,21
Fígado (g)	2,71±0,08	2,70±0,07	2,66±0,17	2,73±0,15
Pulmão (g)	0,439±0,16	0,469±0,03	0,451±0,02	0,435±0,02
Rim (g)	0,295±0,01	0,312±0,01	0,302±0,01	0,315±0,01
Testículo(g)	0,449±0,11	0,423±0,07	0,426±0,18	0,434±0,06
Epidídimo(mg)	152,0±0,03	145,0±0,04	148,0±0,06	150,0±0,01
Prostata(mg)	132,0±0,01	126,0±0,01	141,0±0,02	143,0±0,01

Valores expressos como média \pm epm, com n=8 animais em cada grupo, sendo $p < 0,05$, ANOVA, seguido por Tukey – Kramer.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados após tratamento subagudo com EJD.

	Tratamento agudo			
	Controle (veículo)	Tratado 500mg/kg	Tratado 1000mg/kg	Tratado 2000mg/kg
Creatinina	0,9±0,1	1,1±0,0	1,0±0,1	1,0±0,0
Uréia	35,5±1,2	35,5±1,2	35,1±0,9	35,0±0,8
AST	96,5±21,2	104,2±16,9	113,7±19,2	108,3±16,2
ALT	20,9±2,2	23,4±3,9	19,5±2,4	22,7±2,2
δ -GT	11,5±1,3	11,8±2,4	13,2±1,8	12,2±1,3
Hemácia ($\times 10^6$)mm ³	8,5±0,3	8,6±0,4	8,6±1,1	8,7±0,5
Hemoglobina (g/dL)	16,0±0,6	16,5±0,8	15,9±0,7	15,9±1,1
Hematócrito (%)	38,2±3,2	40,1±3,3	43,6±1,2	42,9±0,5
Plaquetas ($\times 10^3$ / μ L)	1048±24	1034±36	1053±36	1089±45

Linfócitos (%)	73,1±4,1	75,8±2,3	78,5±1,2	76,7±2,1
Eosinófilo (%)	1,1±0,1	1,1±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2
Monócito (%)	3,6±0,3	4,1±0,4	3,3±0,3	3,1±0,2
Neutrófilos (%)	22,2±3,2	19,0±1,2	19,4±4,2	21,0±1,5

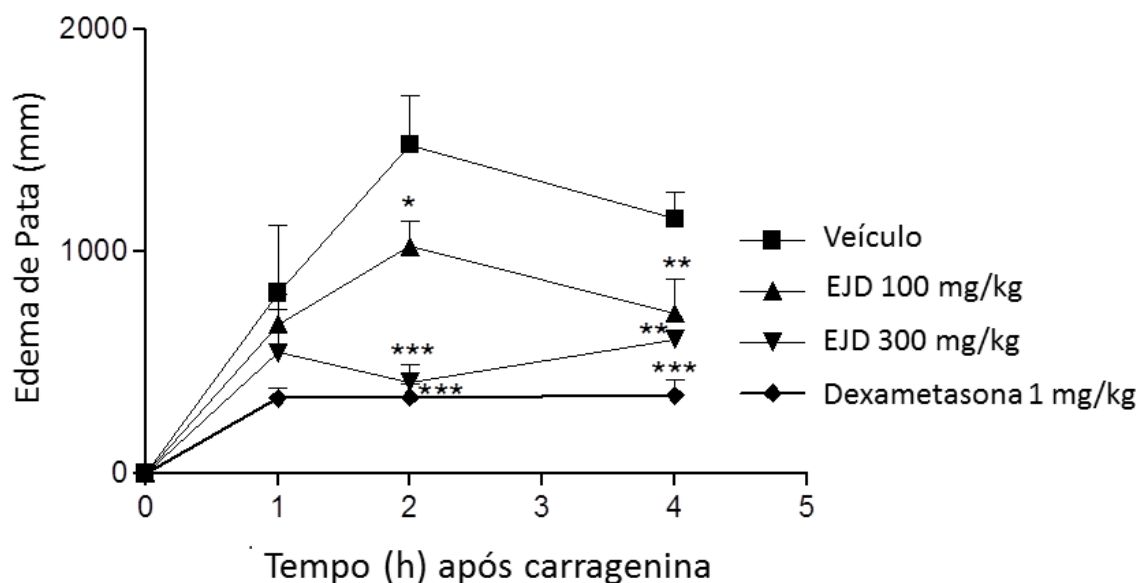
Valores expressos como média± epm, com n=8 animais em cada grupo. P<0,05, ANOVA.

Atividade anti-inflamatória por carragenina e determinação de mieloperoxidase

Foi observado que o EJD provocou diminuição no edema de pata induzido por carragenina. A figura 1 mostra que EJD, nas doses de 100 e 300 mg/kg, reduziu significativamente o edema da pata posterior após 2 horas, sendo que o grupo tratado com o extrato na dose de 300 mg/kg apresentou diminuição igual ao grupo tratado com dexametasona e após 4 horas pode-se observar que os grupos tratados com EJD apresentaram diferença estatística ($P<0,01$) em relação ao grupo controle.

O EJD induziu diminuição significativa na atividade da enzima mieloperoxidase apenas na concentração de 300 mg/kg, em comparação ao grupo controle (veículo) (Figura 1).

A



B

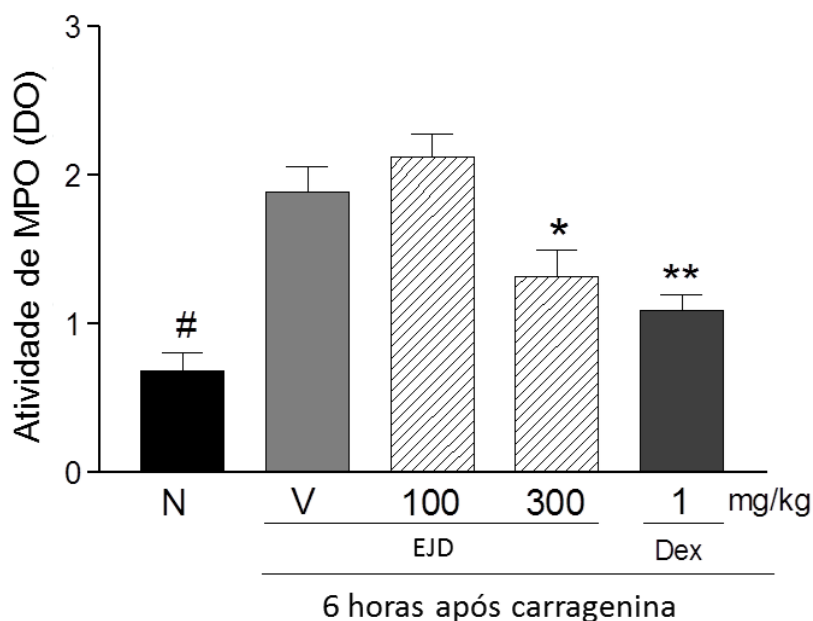


Figura 1 - Efeito de EJD em edema de pata induzida por carragenina em ratos, os animais receberam Extrato de *J. decurrens* (100 e 300 mg/Kg), veículo (V), por via oral ou dexametasona 1 mg/kg (dex ou dexamethasone), após 1 h injeção intraplantar de Carragenina (300 g/pata) . O painel A, demonstra a relação entre o tempo em horas após administração de carragenina e o tamanho do edema de pata. Em B, a atividade de mieloperoxidase 6 h após a administração com carragenina, onde N é o grupo que não foi tratado. Cada barra ou ponto representa a média \pm epm de 6 animais. # Denota uma diferença significativa N vs V ($p < 0,01$). Os asteriscos indicam os níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com o grupo tratado.

DISCUSSÃO

A fitoterapia está se tornando uma alternativa para o tratamento de diversas doenças. Embora as terapias naturais sejam considerados pela crença popular segura e sem riscos a saúde, essas substâncias, antes de serem utilizadas, necessitam de avaliações farmacológicas e toxicológicas (Firenzuoli e Gori, 2007; Cheng *et al.*, 2009). A planta selecionada para esse estudo, *J. decurrens*, é muito utilizada para fins terapêuticos, no entanto, são escassos os estudos toxicológicos que comprovem sua segurança.

Para avaliar a ação tóxica de uma substância, a mortalidade é um sinal claro de toxicidade, no entanto, outras variáveis podem ser indicativas de efeitos adversos mais sutis, como perda de massa corporal durante o tratamento e a presença de sinais clínicos de toxicidade como diarreia, irritabilidade, piloereção, contorção, reflexo de endireitamento, tremores, variações no comportamento, sangramento, entre outros (Muller, 2007; OECD, 2008; Nana *et al.*, 2011).

O teste de toxicidade aguda foi investigado para estabelecer os efeitos adversos da administração de EJD sobre parâmetros comportamentais, hematológicos e bioquímicos. No presente estudo, em nenhuma das doses testadas, acarretou mortalidade e alterações nos sinais clínicos indicativos de toxicidade nos animais expostos. Estes resultados corroboram com aqueles observados por Zatta *et al.* (2009), os quais utilizaram o extrato etanólico das folhas de *J. decurrens*, nas doses de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg e também não observaram sinais de toxicidade. Assim, sugere-se que a dose letal (DL50) de *J. decurrens*, via oral, é superior a 2000 mg/kg, podendo ser classificado como um extrato de baixa toxicidade, de acordo com a OECD (2008).

A inflamação aguda é caracterizada por sintomas clássicos, como edema, febre, rubor e dor. O edema (inchaço) é, portanto, uma boa medida de inflamação e é útil para a quantificação da inflamação cutânea induzida (Cabrini *et al.*, 2011). A carragenina, um agente inflamatório, produz inflamação por liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de um edema, que atinge o pico máximo entre 2 a 3 horas após a aplicação (Di Rosa *et al.*, 1971).

O edema induzido por carragenina é bifásico, com vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1 h) ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina (Di Rosa *et al.*, 1971). A fase posterior (1-6 h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-

2 e, mais recentemente liberação de NO, na resposta inflamatória (Di Rosa *et al.* 1971). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se observar que EJD parece atuar principalmente sobre a fase inicial da resposta inflamatória induzida por carragenina, já que os resultados do grupo tratado com 300 mg/kg de EJD foram semelhantes ao do controle positivo, tratado com dexametasona, após 2 horas da administração de carragenina.

A mieloperoxidase é uma hemeoproteína abundante em neutrófilos e monócitos, e é localizada nos grânulos azurófilos primários desses leucócitos e secretada no meio extracelular e no compartimento fagolisossomal após ativação do fagócito por uma variedade de estímulos, sendo eficiente na morte de microrganismos (Buchmann *et al.*, 2002; Wieslander *et al.*, 2011). Por apresentar essas características, tem sido utilizada a quantificação da MPO tecidual, como marcador inflamatório (Wieslander *et al.*, 2011). Em relação ao tratamento com EJD, apenas o grupo tratado com 300 mg/kg de EJD apresentou diminuição significativa na atividade de MPO em relação ao grupo controle, assim como o controle positivo, a dexametasona.

O protocolo utilizado para medida da MPO avalia a presença de enzima ativa no tecido, desta forma, um tratamento que apresente diminuição deste parâmetro pode ter agido de duas formas: através da inibição da migração dos neutrófilos para o sítio inflamatório; ou por impedir a atividade da enzima.

Análises realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) evidenciaram a presença de ácido ursólico em frações do extrato de *J. decurrens* (Carvalho *et al.*, 2009), composto cuja molécula é semelhante a dexametasona. Assim, o ácido ursólico poderia explicar a ação anti-inflamatória do extrato *J. decurrens* em ratos machos adultos encontrados neste estudo. No entanto, estudos fitoquímicos realizados com extrato bruto das raízes de *J. decurrens* devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Os resultados deste estudo demonstram que o EJD, nas doses utilizadas, apresenta propriedades anti-inflamatórias e não caracterizou nenhum sinal de toxicidade após exposição oral aguda. As propriedades observadas pode ser devido a presença de constituintes bioativos como o ácido ursólico, porém outros estudos estão sendo realizados para confirmar o potencial antiinflamatório e teste toxicológico com fêmeas também será realizado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* [S.I.], v. 406, n. 6797, p. 782-7, Aug 17 2000.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos v. 1, p. 37, 2010.
- BALANI, T. *et al.* Hematological and biochemical changes due to short-term oral administration of imidacloprid. *Toxicol Int* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 2-4, Jan 2011.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebrovasculares e renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [S.I.], v. 94, p. 556-563, 2010.
- BERTONI, B. W. *et al.* Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. *Genet Mol Biol* [S.I.], v. 33, n. 3, p. 532-8, Jul 2010.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* [S.I.], v. 2, n. 10, p. 907-16, Oct 2001.
- BUCHMANN, R. *et al.* Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. *J Dent Res* [S.I.], v. 81, n. 10, p. 716-21, Oct 2002.
- CABRINI, D. A. *et al.* Analysis of the Potential Topical Anti-Inflammatory Activity of *Averrhoa carambola* L. in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], v. 2011, p. 908059, 2011.
- CARVALHO, C. A. D. *et al.* Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 19, p. 592-598, 2009.
- CHANG, C. W. *et al.* Identification and categorization of liver toxicity markers induced by a related pair of drugs. *Int J Mol Sci* [S.I.], v. 12, n. 7, p. 4609-24, 2011.
- CHENG, C. W. *et al.* Systematic review of Chinese herbal medicine for functional constipation. *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 15, n. 39, p. 4886-95, Oct 21 2009.

DE YOUNG, L. M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* [S.I.], v. 26, n. 3-4, p. 335-41, Mar 1989.

DI ROSA, M. *et al.* Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* [S.I.], v. 104, n. 1, p. 15-29, May 1971.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L. Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], v. 4, n. Suppl 1, p. 37-40, Sep 2007.

KASSUYA, C. A. *et al.* Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta Med* [S.I.], v. 71, n. 8, p. 721-6, Aug 2005.

KASSUYA, C. A. *et al.* Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 124, n. 3, p. 369-76, Jul 30 2009.

MAURO, C. *et al.* Estudo anatômico das espécies de cerrado *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. ex de Souza (catuaba), *Zeyheria montana* Mart. (bolsa-de-pastor) e *Jacaranda decurrens* Chamisso (caroba) - Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 17, p. 262-265, 2007.

MULLER, J. C. *Toxicidade reprodutiva da Morinda citrifolia* Linn (2007). 88 f. (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NANA, H. M. *et al.* Acute and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hylodendron* stem bark. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 137, n. 1, p. 70-6, Sep 1 2011.

NANTEL, F. *et al.* Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 128, n. 4, p. 853-9, Oct 1999.

NUNES, G. P. *et al.* Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 13, p. 83-92, 2003.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). *Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)* Paris: Head of Publications Service, 2008. p. 27.

OGURA, M. *et al.* Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 157-68, Mar-Apr 1977.

SHARON, J. *Imunologia Basica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SUBBARAMAIAH, K. *et al.* Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* [S.I.], v. 60, n. 9, p. 2399-404, May 1 2000.

VARANDA, E. M. *et al.* Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. *J Nat Prod* [S.I.], v. 55, n. 6, p. 800-3, Jun 1992.

WIESLANDER, G. *et al.* Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: a double blind crossover study in day-care centre staffs. *Tohoku J Exp Med* [S.I.], v. 225, n. 2, p. 123-30, 2011.

ZATTA, D. T. *et al.* Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. *Latin American Journal of Pharmacy* [S.I.], v. 28, p. 9, 2009.

