



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-CCS  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA “PROF. DELBY  
FERNANDES DE MEDEIROS”-LTF  
LABORATÓRIO DE ENSAIOS TOXICOLÓGICOS – LABETOX  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DAS CASCAS  
DO CAULE DE *Zizyphus joazeiro Mart.* EM  
CAMUNDONGOS**

**JOÃO PESSOA/PB  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DAS CASCAS  
DO CAULE DE *Zizyphus joazeiro Mart.* EM  
CAMUNDONGOS**

**ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM**

**JOÃO PESSOA/PB  
2008**

**ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DAS CASCAS  
DO CAULE DE *Zizyphus joazeiro* Mart. EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Liana Clébia Soares Lima de Moraes

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

**JOÃO PESSOA  
2008**

E79a Estevam, Ethiene Castellucci.

Avaliação da toxicidade pré-clínica das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro Mart.* em camundongos / Ethiene Castellucci Estevam.-João Pessoa, 2008

134p.

Orientadora: Liana Clébia Soares Lima de Moraes

Co-Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

Dissertação (mestrado)-UFPB/CCS/LTF

1. Produtos Naturais. 2. *Zizyphus joazeiro* – Avaliação – Toxicidade.

UFPB/BC

CDU:547.9(043)

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DAS CASCAS  
DO CAULE DE *Zizyphus joazeiro* Mart. EM  
CAMUNDONGOS**

**ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liana Clébia Soares Lima de Moraes  
Orientadora**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz  
Coorientadora**

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida  
Examinador interno**

**Prof. Dr. Antonio Pedro de Araújo Filho  
Examinador externo**

“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas, muito conhecimento faz com se sintam humildes, é assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo Da Vinci

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus; muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

Este trabalho é dedicado ao meus queridos “nonos” Júlia e Symbolo, por todo amor que sempre me devotaram, por toda dedicação a mim e por terem em sua simplicidade feito com que eu começasse a enxergar a imensa e maravilhosa farmácia criada por Deus, que é a natureza.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e aos anjos de luz que sempre guiaram meus passos e colocaram pessoas e oportunidades maravilhosas em meu caminho, por me inspirarem, me fortalecerem e por perdoarem meus muitos momentos de ingratidão, sem jamais me abandonarem.

Aos meus pais Edna e Sebastião e ao meu nono Symbolo, por me apoiarem em todos os sentidos, por todo o amor que têm por mim, por acreditarem tanto em minha capacidade, muito mais do que eu mesma acredito.

A minha noninha Júlia, que sempre cuidou de mim e que mesmo não estando hoje fisicamente ao meu lado, nunca deixou de estar presente em espírito e sei que tem sido meu anjo guardião.

Aos meus tios e padrinhos Regina e Rogério por depositarem fé na pessoa que sou e por terem orgulho de mim.

A todos de minha família, que mesmo estando a quilômetros de distância, estão sempre perto em coração.

À minha orientadora Liana, por sua paciência, seus ensinamentos e por ser uma pessoa com um astral tão bom, capaz de me tranquilizar no momento de desespero.

À Prof<sup>a</sup> Margareth Formiga, por ter me recebido tão bem no mundo da toxicologia e por tentar sempre auxiliar da melhor maneira possível a todos que precisam de apoio.

À Cláudia Sampaio de Andrade Lima do DBR/UFPE pelo fornecimento do extrato, pelo apoio com os dados químicos e por ser acima de tudo uma grande amiga.

Às amigas Clélia e Aldeíde, companheiras de toxicologia, por seu apoio, amizade e por compartilharem incertezas e sucessos durante a realização deste trabalho.

Aos estagiários do LABETOX Patrícia, Jadson, Thayse, Josué, Nelson e João Carlos por todo o auxílio e pelos ensinamentos.

À Igara, Heloína, Vanine, Adriana, Camila, Marcela, Vivianne, Ápio, Egberto, Narlize e tantos outros amigos que fiz neste Mestrado: é um grande prazer conhecê-los.

À Kardilândia Mendes e Hosana Bandeira, pelo apoio nas análises hematológicas e bioquímicas.

À todos os integrantes do grupo de úlcera do LTF, pelo companheirismo.

Aos amigos de Recife Jackeline, Valdeene, Julyanne, Clarissa, Ronaldo e Luanna, por sua grande torcida por mim.

Aos meus sempre amigos e orientadores Ana Maria Mendonça e Francisco Amancio, grandes mestres, sempre dispostos a ensinar, ajudar e torcer pelo meu sucesso.

Às professoras Paloma Liz de Medeiros e Eliete Cavalcanti do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE, pela realização das análises histopatológicas e pelos ensinamentos.

À Tânia Maria Alves, secretária da pós-graduação, por seus conselhos, seu auxílio e atenção.

À José Crispim Duarte e a seu Luís, pelo cuidado com os animais de experimentação.

À todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que não por isso deixam de ser importantes por terem de alguma forma contribuído para a realização deste mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Gostaria também de agradecer aos animais de experimentação, pelos quais tenho grande respeito e que deram suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

Por fim, agradeço às coisas que não deram certo e até mesmo às pessoas que de certo modo me prejudicaram, porque acabaram por contribuir para que eu me tornasse uma pessoa mais forte e até um ser humano melhor.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	XIV
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	XVII
<b>RESUMO</b> .....	XVIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIX
<b>CAPÍTULO I</b> .....	01
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	02
<b>1.1 Toxicologia de plantas medicinais</b> .....	02
<b>1.2 Considerações Gerais sobre parâmetros bioquímicos séricos</b> .....	07
<b>1.3 <i>Zizyphus joazeiro Mart.</i></b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	14
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	14
<b>CAPÍTULO II</b> .....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
<b>3.1 Local da Pesquisa</b> .....	16
<b>3.2 Materiais</b> .....	16
3.2.1 Material botânico .....	16
3.2.2 Animais .....	16
3.2.3 Aparelhagem.....	17
<b>3.3 Metodologia</b> .....	18
3.3.1 Obtenção do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Zizyphus joazeiro</i> ...	18
3.3.2 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo .....	19
3.3.2.1 Consumo de água e alimentos .....	19
3.3.2.2 Peso corporal .....	19
3.3.2.3 Avaliação laboratorial de sangue .....	20
3.3.2.4 Estudo anatomopatológico .....	20
3.3.3 Ensaio toxicológico pré-clínico crônico.....	21
3.3.3.1 Tratamento dos animais .....	21
3.3.3.2 Temperatura.....	22

3.3.3.3 Glicemia .....	22
3.3.3.4 Consumo de água e alimentos.....	22
3.3.3.5 Peso corporal .....	22
3.3.3.6 Avaliação comportamental (teste do campo aberto) .....	22
3.3.3.7 Avaliação motora ( teste rota-rod) .....	23
3.3.3.8 Avaliação laboratorial de sangue .....	24
3.3.3.9 Estudo anatomopatológico .....	24
<b>3.4 Análise estatística .....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>25</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Estudos toxicológicos pré-clínico agudo .....</b>	<b>26</b>
4.1.1 Avaliação comportamental .....	26
4.1.2 Evolução ponderal .....	26
4.1.3 Consumo de água .....	26
4.1.4 Consumo de alimentos .....	27
4.1.5 Análise laboratorial de sangue .....	28
4.1.5.1 Parâmetros bioquímicos .....	28
4.1.5.2 Parâmetros hematológicos .....	31
4.1.6 Análise anatomopatológica.....	33
<b>4.2 Estudo toxicológico pré-clínico crônico .....</b>	<b>33</b>
4.2.1 Observações gerais .....	34
4.2.2 Temperatura colônica .....	36
4.2.3 Glicemia caudal .....	36
4.2.4 Consumo de água e alimentos .....	36
4.2.5 Peso Corporal.....	43
4.2.6 Avaliação Comportamental (Teste do Campo Aberto).....	46
4.2.7 Avaliação Motora (Teste do Rota Rod).....	48
4.2.8 Avaliação Laboratorial de Sangue.....	48
4.2.8.1 Parâmetros Bioquímicos.....	48
4.2.8.2 Parâmetros Hematológicos.....	53
4.2.9 Estudo Anatomopatológico.....	61
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>88</b>
<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>

<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>101</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>103</b>
<b>7.REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01-</b> <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart: aspecto geral, partes aéreas, flores e frutos.....	13
<b>Figura 02-</b> Animal tratado com EEB apresentando furunculose .....	35
<b>Figura 03-</b> Animal tratado com EEB apresentando edema de pata .....	35
<b>Figura 04-</b> Fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB apresentando tumor.....	35
<b>Figura 05-</b> Rim de animal tratado cronicamente com EEB de <i>Z. joazeiro</i> apresentando massa endurecida .....	62
<b>Figura 06-</b> Tumor retirado de fêmea tratada cronicamente com 175 mg/kg de EEB de <i>Z. joazeiro</i> .....	62
<b>Figura 07-</b> Rim de camundongo controle (HE X 400): A= região medular, B= região cortical .....	63
<b>Figura 08-</b> Pulmão de camundongo controle A= alvéolos (HE X 400), B= bronquíolo (HE X 200) .....	64
<b>Figura 09-</b> Hepatócito do fígado de camundongos controle (HE): A= X200, B=X400 .....	64
<b>Figura 10-</b> Fibras cardíacas de camundongo controle (HE): A=X200, B=X400.....	65
<b>Figura 11-</b> Rim de camundongo macho tratado com 7 mg/kg de EEB: A= infiltrado perivascular(HE X200); B=desarranjo na região medular(HE X200).....	66
<b>Figura 12-</b> Rim de camundongos machos tratados com 7mg/kg de EEB: A=espaço capsular reduzido(HE X200); B=região anormal no interior do rim (HE X200) .....	66
<b>Figura 13-</b> Pulmão de camundongos machos tratados com 7mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X200); B= congestão vascular (HE X200) .....	67
<b>Figura 14-</b> Rim de camundongo macho tratado com 35 mg/kg de EEB: A= região fibrosa no exterior da cápsula renal (HE X200); B= congestão (HE X400) .....	68
<b>Figura 15-</b> Pulmão de camundongos machos tratados com 35 mg/kg de EEB: A= congestão vascular e infiltrado linfocitário (HE X400); B= espessamento da parede alveolar e congestão dos septos (HE X200) .....	68
<b>Figura 16-</b> Pulmão de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado peribronquiolar (HE X200);B= congestão vascular (HE X200) .....	69
<b>Figura 17-</b> Rim de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário ao redor do glomérulo (HE X200); B= sangue na luz dos túbulos proximais (HE X400) .....	70
<b>Figura 18-</b> Rim de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado perivascular (HE X400); B= atrofia glomerular (HE X200) .....	70
<b>Figura 19-</b> Rim de camundongo macho satélite 35 mg/kg de EEB: A= grande infiltrado linfocitário próximo ao glomérulo (HE X200); B= área de infiltração linfocitária (HE X400).....	71
<b>Figura 20-</b> Rim de camundongo macho satélite 35 mg/kg de EEB: A= descolamento do epitélio tubular da membrana basal (HE X400); B=presença de material (exsudato) no interior dos túbulos (HE X400).....	72

<b>Figura 21-</b> Fígado de camundongo macho satélite 35 mg/kg de EEB: A= infiltrado perivascular (HE X200), B= infiltrado linfocitário no interior de veia centrolobular (HE X400).....	72
<b>Figura 22-</b> Pulmão de camundongo macho satélite 35 mg/kg: congestão de capilares alveolares (HE X400) .....	73
<b>Figura 23-</b> Pulmão de camundongo macho satélite 175 mg/kg: A= infiltrado inflamatório (HE X200), B= congestão vascular (HE X200).....	74
<b>Figura 24-</b> Fígado de camundongo macho satélite 175 mg/kg de EEB: pequeno infiltrado linfocitário (HE X400) .....	74
<b>Figura 25-</b> Rim de camundongo macho satélite 175 mg/kg de EEB: A= hemorragia intersticial (HE X200); B= intenso infiltrado perivascular (HE X200).....	75
<b>Figura 26-</b> Rim de camundongo fêmea tratada com 7 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X200), B= atrofia glomerular (HE X400) .....	76
<b>Figura 27-</b> Rim de camundongo fêmea tratada com 7 mg/kg de EEB: A= desorganização do epitélio tubular (HE X400), B= sangue na luz do túbulo (HE X400).....	76
<b>Figura 28-</b> Pulmão de camundongo fêmea tratada com 7 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X400), B= infiltrado peribronquiolar (HE X200) .....	77
<b>Figura 29-</b> Fígado de camundongo fêmea tratado com 7 mg/kg de EEB: reação inflamatória junto ao ducto biliar (HE X200) .....	77
<b>Figura 30-</b> Rim de camundongo fêmea tratada com 35 mg/kg de EEB: A= área de infiltração linfocitária (HE X400), B= descolamento do epitélio tubular (HE X200).....	78
<b>Figura 31-</b> Rim de camundongo fêmea tratada com 35 mg/kg de EEB: glomérulo anormal (HE X200) .....	79
<b>Figura 32-</b> Pulmão de camundongo fêmea tratada com 35 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X400), B= infiltrado próximo a bronquíolo (HE X200).....	79
<b>Figura 33-</b> Pulmão de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: A= espessamento da parede alveolar e hemorragia alveolar (HE X200), B= área de congestão dos capilares alveolares x área normal (HE X200) .....	80
<b>Figura 34-</b> Pulmão de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: área de intensa infiltração linfocitária (HE X200) .....	81
<b>Figura 35-</b> Rim de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário próximo a glomérulo (HE X200), B= infiltrado perivascular (HE X400) .....	81
<b>Figura 36-</b> Rim de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: presença de sangue na luz dos túbulos (HE X200) .....	82
<b>Figura 37-</b> Fígado de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: presença de infiltrados linfocitários (HE X200) .....	82
<b>Figura 38-</b> Pulmão de camundongo fêmea satélite 35 mg/kg: infiltrado peribronquiolar (HE X200).....	83
<b>Figura 39-</b> Rim de camundongo fêmea satélite 35 mg/kg: infiltrado linfocitário (HE X200). .....	83
<b>Figura 40-</b> Fígado de camundongo fêmea satélite 35 mg/kg: A= infiltrado perivascular (HE	

X200), B= congestão dos capilares sinusoidais (HE X400).....	83
<b>Figura 41-</b> Pulmão de camundongo fêmea satélite 175 mg/kg: leve infiltração linfocitária (HE X200) .....	84
<b>Figura 42-</b> Rim de camundongo fêmea satélite 175 mg/kg: área de intensa infiltração linfocitária (HE X200) .....	84
<b>Figura 43-</b> Rim de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB morto durante o tratamento: A= presença de sangue e fechamento dos túbulos coletores (HE X400), B= hipertrofia e atrofia glomerular (HE X400) .....	85
<b>Figura 44-</b> Fibras cardíacas de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB morto durante o tratamento: presença de grandes e numerosos vasos congestos em meio às fibras (HE X200) .....	86
<b>Figura 45-</b> Fígado de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB morto durante o tratamento: dilatação de capilares (HE X400) .....	86
<b>Figura 46-</b> Tumor de fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB morta durante período experimental: presença de hepatócitos (HE X200). .....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01-</b> Ganho de peso médio (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, após 14 dias de tratamento com a dose de 2000 mg/kg v.o. do EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	26
<b>TABELA 02-</b> Consumo médio diário de água (em mL) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de <i>Z. joazeiro</i> durante 13 dias de observação.....	27
<b>TABELA 03-</b> Consumo médio diário de ração (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de <i>Z. joazeiro</i> durante 13 dias de observação.....	28
<b>TABELA 04 -</b> Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss albinos tratados com 2000 mg/kg de EEB de <i>Z. joazeiro</i> .....	29
<b>TABELA 05 -</b> Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss albinos tratados com 2000 mg/kg de EEB de <i>Z. joazeiro</i> .....	31
<b>TABELA 06-</b> Peso dos órgãos de camundongos Swiss albinos tratados com 2000 mg/kg de EEB de <i>Z. joazeiro</i> .....	34
<b>TABELA 07-</b> Efeito da administração crônica de diferentes doses do EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> sobre a glicemia dos animais.....	36
<b>TABELA 08-</b> Consumo semanal de ração (em gramas) por camundongo durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB.....	38
<b>TABELA 09-</b> Consumo semanal de água por camundongo (em mL) durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB.....	40
<b>TABELA 10-</b> Variação da evolução ponderal de camundongos (em gramas) tratados diariamente com diferentes doses de EEB durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB.....	44
<b>TABELA 11-</b> Número de ambulções no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> durante o ensaio crônico.....	46
<b>TABELA 12-</b> Frequência do comportamento “levantar” no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> durante o ensaio crônico.....	47

<b>TABELA 13-</b> Duração em segundos do comportamento “auto-limpeza” no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> durante o ensaio crônico.....	47
<b>TABELA 14-</b> Número de bolos fecais no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> durante o ensaio crônico.....	48
<b>TABELA 15-</b> Parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas tratados com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica.....	50
<b>TABELA 16-</b> Parâmetros bioquímicos de camundongos machos tratados com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica.....	51
<b>TABELA 17-</b> Parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica.....	54
<b>TABELA 18-</b> Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas tratadas com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica.....	55
<b>TABELA 19-</b> Peso dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do EEB após o tratamento crônico.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 01** - Consumo médio diário de água (em mL) por camundongos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de *Z. Joazeiro*.durante 13 dias de observação..... 27
- GRÁFICO 02** - Consumo médio diário de ração (em gramas) por camundongos fêmeas tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de *Z. Joazeiro*.durante 13 dias de observação ..... 28
- GRÁFICO 03** - Concentração de uréia no soro de camundongos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 30
- GRÁFICO 04** - Concentração de creatinina no soro de camundongos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 30
- GRÁFICO 05** - Contagem de leucócitos no sangue de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 32
- GRÁFICO 06** - Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 32
- GRÁFICO 07** - Percentagem de linfócitos no sangue de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 33
- GRÁFICO 08** - Consumo de água (em mL) por camundongos fêmeas tratadas durante 12 semanas com 3 doses de EEB..... 40
- GRÁFICO 09** - Consumo de água (em mL) por camundongos fêmeas dos grupos 35 e 175 mg/kg (semana 12) e satélites 35 e 175 mg/kg (semana 13)..... 42

<b>GRÁFICO 10</b> - Valores de creatinina no soro de camundongos machos tratados com EEB durante 90 dias.....	52
<b>GRÁFICO 11</b> - Valores de uréia no soro de camundongos machos tratados com EEB durante 90 dias.....	52
<b>GRÁFICO 12</b> - Valores de creatinina no soro de camundongos fêmeas tratadas com EEB durante 90 dias.....	53
<b>GRÁFICO 13</b> – Contagem de eritrócitos no sangue de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	56
<b>GRÁFICO 14</b> – Valor de hematócrito de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	56
<b>GRÁFICO 15</b> – Contagem de leucócitos no sangue de camundongos fêmeas tratadas durante 12 semanas com diferentes doses de EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	57
<b>GRÁFICO 16</b> – Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	57
<b>GRÁFICO 17</b> – Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos fêmeas dos grupos 175 mg/kg e satélite 175 mg/kg submetidas a tratamento prolongado com EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	58
<b>GRÁFICO 18</b> – Percentagem de monócitos no sangue de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	58
<b>GRÁFICO 19</b> – Percentagem de monócitos no sangue de camundongos fêmeas dos grupos 35 mg/kg e satélite 35 mg/kg submetidas a tratamento prolongado com EEB de <i>Zizyphus joazeiro</i> .....	59

**GRÁFICO 20** – Contagem de leucócitos no sangue de camundongos machos submetidos a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 59

**GRÁFICO 21** – Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos machos submetidos a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 60

**GRÁFICO 22** – Percentagem de monócitos no sangue de camundongos machos submetidos a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*..... 60

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST- Aspartato Amino Transferase

ALT- Alanina Amino Transferase

*Z. joazeiro* – *Zizyphus joazeiro*

CHCM- Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

EEB- Extrato Etanólico Bruto

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetracético

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

LABETOX-Laboratório de Ensaio Toxicológicos

LTF- Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

RDC-Resolução da Diretoria Colegiada

rpm- rotações por minuto

VCM- Volume Corpuscular Médio

## RESUMO

ESTEVA, ETHIENE CASTELLUCCI. **Avaliação da Toxicidade Pré-Clinica das Cascas do Caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. em camundongos** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

*Zizyphus joazeiro* Mart. é uma planta da família *Rhamnaceae*, popularmente conhecida como “juazeiro” ou “juá”, sendo suas folhas e cascas tradicionalmente empregadas pela população do nordeste do Brasil como febrífuga, antiinflamatória, no tratamento de problemas gástricos, doenças de pele e como agente de limpeza dos cabelos e dentes. A ampla utilização desta espécie vegetal pela população com fins medicinais justifica estudos de toxicidade que garantam a segurança de seu uso. Neste sentido nos propomos realizar uma avaliação toxicológica pré-clínica do extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* seguindo a Resolução Específica (RE) nº 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), empregando-se camundongos Swiss albinos de ambos os sexos. Este estudo consistiu inicialmente da realização de uma triagem farmacológica com intuito de verificar os efeitos do extrato sobre o Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Autônomo. Em etapas posteriores, realizou-se a análise da variação ponderal e do consumo de água e de alimentos. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos também foram monitorados. A influência do extrato sobre o Sistema Nervoso Central foi mais uma vez analisada utilizando metodologias psicofarmacológicas e as prováveis alterações toxicológicas foram confrontadas com a avaliação histopatológica. No ensaio toxicológico agudo em que foi utilizada a dose única de 2000 mg/kg por via oral com observação dos animais durante 14 dias, as fêmeas apresentaram leucopenia e neutropenia e tiveram sua ingestão de ração aumentada, nos machos a ingestão de água e os níveis séricos de uréia apresentaram-se diminuídos, enquanto os de creatinina aumentaram. No estudo toxicológico crônico administraram-se as doses de 7 mg/kg (dose de uso popular), 35 mg/kg (5 x a dose de uso popular) e 175 mg/kg (25 x a dose de uso popular) aos camundongos por 90 dias. Durante o tratamento, não foram observadas alterações sobre temperatura corporal, glicemia caudal, comportamento (campo aberto), coordenação motora e tônus muscular (rota rod) dos animais. Porém, houve alterações na ingestão de alimento e água, sendo esta última, mais intensa nas fêmeas (redução no consumo de água). Ao final do período de administração e 30 dias após este período, foram constatados níveis séricos de creatinina elevadas em machos e fêmeas, diminuição da uréia em machos, além de leucopenia, neutropenia e monocitose em ambos os sexos. A análise histológica das vísceras revelou alterações renais, hepáticas e pulmonares com múltiplos focos de infiltração linfocitária. A análise dos resultados obtidos neste estudo com o extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* por via oral permite concluir que, apesar das indicações populares, esta planta apresentou toxicidade e assim estudos posteriores são necessários para melhor esclarecer a segurança quanto ao seu uso, principalmente sua utilização tópica.

Palavras-chave: Toxicidade, *Zizyphus joazeiro*, creatinina.

**ABSTRACT**

ESTEVA M, ETHIENE CASTELLUCCI. **Evaluation of pre-clinical toxicity of the ethanolic extract of the stem bark from *Zizyphus joazeiro* Mart.** (Dissertation). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

*Zizyphus joazeiro* Mart. is a plant of the family *Rhamnaceae*, popularly known as "juazeiro" or "juá", and its leaves and bark traditionally employed by the population of northeastern Brazil as febrifuge, anti-inflammatory, to treat stomach problems, skin diseases, and as agent for cleaning of hair and teeth. The wide use of plant species by the population with medical purposes justify the toxicology studies to ensure the safety of its use. Therefore we propose hold a pre-clinical toxicological evaluation of ethanolic extract of the stem bark of the *Zizyphus joazeiro* according to National Agency of Sanitary Surveillance of Brazil (ANVISA) in its Resolution nº 90/2004, using Swiss albino mice of both sexes. This study consisted initially of a pharmacological screening in order to check the effects of the extract on the Central and Autonomous Nervous System. In subsequent stages, held on analysis of the variation in weight in the consumption of water and food. The biochemical and hematological parameters were also monitored. The influence of the extract on the Central Nervous System was once again examined using psychopharmacological methodologies and likely toxicological changes were confronted with the histopathological evaluation. In acute toxicological test was used in which a single dose of 2000 mg/kg orally with observation of the animals for 14 days, the females showed leukopenia and neutropenia and had increased their intake of feed, while the males decreased the intake of water, serum urea, while creatinine increased. In chronic toxicological study were administered doses of 7 mg/kg (dose of popular usage), 35 mg/kg (5 x dose of popular usage) and 175 mg/kg (25 x dose of popular usage) to mice for 90 days. During treatment, no changes were observed on body temperature, blood glucose, behavior (open field), motor coordination and muscular tone (rota rod) of the animals. However, there were changes in the intake of food and water, and the latter, more intense in females (reduction in water consumption). At the end of the administration and 30 days after this period were observed serum creatinine higher in males and females, decreased urea in males, and leukopenia, neutropenia and monocytosis in both sexes. The histological analysis of viscera revealed renal, liver and lung with multiple outbreaks of lymphocyte infiltration. The analysis of the results obtained in this study with ethanolic extract of the stem bark of the *Zizyphus joazeiro* orally indicates that, despite popular indications, this plant showed toxicity and thus subsequent studies are needed to better clarify the security on its use, mainly its topical use.

Key words: Toxicity, *Zizyphus joazeiro*, creatinine.

# CAPI TULO I

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1.TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas, desde os primórdios dos tempos, são fundamentais tanto na alimentação quanto na cura de enfermidades. Sua utilização é como recurso terapêutico é baseada na cultura popular, constituindo um emprego predominantemente empírico. Apesar disso, elas continuam a ser usadas pela população e não foram substituídas pelos fármacos sintéticos por vários motivos, como sua eficácia, o custo elevado dos medicamentos alopáticos convencionais e a falta de acesso aos mesmos. Tal valorização das plantas medicinais impulsionou a busca de informações comprovadas cientificamente sobre sua segurança e eficácia terapêutica (COSTA, 1994; ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000).

Análises dos dados de prescrições dispensadas nas farmácias das comunidades dos Estados Unidos entre 1959 e 1980 indicam que 25% continham extratos de plantas ou princípios ativos derivados de plantas e que 119 substâncias químicas derivadas de 90 espécies vegetais poderiam ser consideradas drogas importantes em uso corrente em um ou mais países (FARNSWORTH, 1993). Dentre estes medicamentos 74% foram descobertos como resultado de estudos químicos direcionados ao isolamento de substâncias ativas de plantas usadas na medicina tradicional (GURIB-FALKIM, 2006).

A Organização Mundial de Saúde classificou 252 drogas como medicamentos básicos e essenciais e dentre estas, 11% são exclusivamente originárias de plantas e um número significativo é de fármacos sintéticos obtidos de precursores naturais (RATES, 2001).

Assim, as plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas não apenas como modelo para a síntese e obtenção de novos fármacos, mas também como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SCHENKEL *et al.*, 1999; MCCHESENEY, 1996).

A planta possui um laboratório químico único no qual as células vegetais utilizando substâncias químicas simples e fontes de energias naturais, conseguem sintetizar substâncias complexas e fundamentais para a vida do

homem (CASTELLANO, 1981). O número total de produtos naturais produzidos por plantas está estimado em torno de 500.000 (DEMAIN, 2000). Assim, ao se estudar uma planta com relação às suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para seu desenvolvimento: metabólitos primários e metabólitos secundários.

Alguns metabólitos secundários possuem reconhecida importância comercial, pois são biologicamente ativos e, como muitos deles possuem propriedades terapêuticas importantes, são considerados princípios ativos para vários medicamentos, tais como a digoxina, a quinina, a morfina e o ácido salicílico (MARASCHI; VERPOORTE, 1999).

Quando se fala em drogas de origem vegetal é importante manter em mente certas distinções conceituais. As plantas podem ser usadas como recursos terapêuticos de diversos modos, como chás ou outros remédios caseiros ou podem ser submetidas a extrações sucessivas e procedimentos de purificação para isolar os compostos de interesse que possam ser ativos (RATES, 2001).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, medicamento fitoterápico é um produto obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (RDC nº 17/2000).

No Brasil, o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica é uma prática realizada por milhares de brasileiros, sendo influenciada por fatores sociais, econômicos e culturais. Frente a esta realidade, faz-se necessária a adoção de medidas que visem a ampliação das pesquisas e propiciem o uso seguro das plantas medicinais.

Apesar de muitas plantas serem usadas há séculos e serem obviamente “naturais”, a percepção popular de que este atributo sozinho garante segurança é tão ingênua quanto a suposição de que seu tempo de uso comprava sua

eficácia (TALALAY; TALALAY, 2001). É neste contexto que a percepção popular de que produtos naturais não apresentam toxicidade surge, uma vez que o aparecimento de efeitos tóxicos do produto é apenas ligado ao seu uso quando os efeitos ocorrem imediatamente após a administração (FÉRES *et al.*, 2006).

No entanto, é preciso lembrar que um remédio pode ser transformado em veneno através da interferência de diversos fatores relacionados tanto à condição de exposição ao produto utilizado como dose, frequência de uso e / ou exposição e forma farmacêutica quanto ao organismo usuário como idade, sexo, raça e estados fisiopatológicos (AMARAL; BARCIA, 2003). Sendo assim, parece que o grande problema está associado ao uso inadequado dos produtos, já que os efeitos maléficos ou benéficos dos medicamentos dependem inicialmente, de sua forma de utilização (MARIZ, 2007).

Muitos, se não a maioria, dos produtos a base de plantas utilizados na medicina alternativa compreendem múltiplos componentes que ainda não foram rigorosamente caracterizados, são difíceis de quantificar e variam qualitativamente e quantitativamente de planta para planta, em diferentes partes da planta e de acordo com os estágios de desenvolvimento e condições de crescimento da planta (TALALAY; TALALAY, 2001).

Todos os produtos derivados de plantas usados como drogas devem ser avaliados para segurança e eficácia por métodos idênticos àqueles usados para novos compostos sintéticos. Esta prática inclui avaliação pré-clínica de segurança e eficácia, estudos controlados de fase clínica (placebo – controlados, randomizados, duplo – cegos, estatisticamente validados) com consentimento dos participantes da pesquisa e a exigência de que tais estudos sejam conduzidos de acordo com regulamentações federais (TALALAY; TALALAY, 2001).

Um tema bastante importante na toxicologia é a busca por modelos *in vitro* e *in vivo* que sejam preditivos dos efeitos adversos em humanos expostos a substâncias químicas. A condução dos estudos toxicológicos em animais de laboratório deve ser baseada na suposição de que a escolha dos modelos animais e do modelo dos estudos é realmente capaz de prever os riscos para a saúde humana e a identificação de qualquer falha nesta predição levaria a

uma revisão dos regulamentos existentes, estimulando a busca por novos métodos de avaliação toxicológica (OLSON *et al.*, 2000).

Testes *in vitro* são considerados métodos alternativos para avaliações toxicológicas, já que existe uma grande preocupação ética em relação ao uso de animais de laboratório (MARIZ, 2007). Os ensaios de citotoxicidade basal *in vitro* foram validados e são empregados como uma importante ferramenta para reduzir o número de animais numa avaliação de toxicidade aguda sistêmica. Estes testes são considerados preditivos de toxicidade humana por basearem-se no conceito de que as funções celulares basais suportam as funções específicas dos órgãos. Porém, dados como o efeito dos metabólitos das drogas investigadas não podem ser obtidos neste tipo de estudo (VALADARES, 2006).

Olson *et al.* (2000), mostraram que houve taxa de concordância positiva entre a toxicidade humana e espécies roedoras e não roedoras de 71%, com os não roedores sozinhos sendo preditivos para 63% de toxicidade humana e os roedores sozinhos por 43%. A mais alta incidência da concordância total foi vista na toxicidade humana ocorrida nos sistemas hematológico, gastrointestinal e cardiovascular. Os pesquisadores concluíram então, que os resultados desta investigação suportam o valor dos estudos toxicológicos *in vivo* como preditivos para muitas toxicidades humanas significantes associadas com medicamentos.

No Brasil, a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, determina que um dos critérios para a avaliação da segurança de uso e indicações terapêuticas é a apresentação da comprovação de segurança de uso (Toxicologia pré-clínica e Toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (Farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde-CNS através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004.

Este guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de Toxicologia pré-clínica de acordo com a resolução vigente para

Registro e renovação de registro de fitoterápicos. De acordo com este guia, deverão ser realizados ensaios para avaliação de Toxicidade aguda (avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas), ensaios para avaliação de Toxicidade de doses repetidas (avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas) e estudos sobre Genotoxicidade (devem ser efetuados quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos).

## 1.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS

De acordo com a RE 90 (2004), dentre os efeitos que devem ser avaliados nos estudos toxicológicos, tanto agudos quanto crônicos, estão aqueles indicados por alterações nos parâmetros bioquímicos séricos dos animais submetidos a tratamento. Deste modo, algumas considerações gerais sobre o significado destes parâmetros devem ser feitas, e serão a seguir expostas.

**Glicemia:** a determinação dos níveis de glicemia permite a avaliação da homeostasia da glicose sanguínea. O fígado exerce influência sobre o nível glicêmico através da conversão reversível da glicose à glicogênio (glicogênese), síntese de glicose a partir de gordura e proteínas (gliconeogênese) e da quebra de glicogênio liberando glicose para a corrente sanguínea (glicogenólise). O nível de glicemia também é influenciado pelo pâncreas, através dos hormônios insulina e glucagon, capazes de regular a utilização da glicose pelos tecidos, sendo que sua homeostasia normal é dependente da interação entre a sensibilidade dos tecidos à insulina e sua secreção (RAVEL, 1997; AMARAL, 2000).

**Uréia:** é um produto de degradação contendo nitrogênio, proveniente do metabolismo das proteínas. O fígado normal desfaz-se do nitrogênio dos aminoácidos por transaminação com a formação de ácido glutâmico. Em adição, a amônia produzida em diversos tecidos pode ser removida pela aminação do ácido glutâmico com a formação da glutamina. O nitrogênio é então liberado no fígado como amônia e entra no ciclo da uréia e ao final do qual forma-se, como o nome já diz, uréia que é livremente filtrada pelos glomérulos, sendo que cerca de 40% são reabsorvidos nos túbulos proximais. A filtração é dependente da velocidade do fluxo urinário, ligado diretamente ao grau de hidratação. Apesar de ser um marcador da função renal, é considerada menos eficiente do que a creatinina pelos diferentes fatores não renais que podem afetar sua concentração (MEZEY, 1982; RAVEL, 1997).

**Creatinina:** é um produto metabólico da fosforilação da creatina fosfato no músculo. Sua produção é relativamente constante, sendo que seus níveis sanguíneos são muito estáveis. A excreção é feita através da combinação de filtração glomerular e secreção tubular. Suas concentrações séricas de creatinina juntamente com as de uréia são testes tradicionais de triagem da função renal (RAVEL, 1997; TRAVLOS *et al.*, 1996).

**Acido Úrico:** é o produto final do metabolismo das purinas provenientes de fonte exógena (dieta) ou endógena. Sua formação é predominantemente hepática, contudo outros órgãos como intestino delgado e rins, também podem contribuir com sua formação. O Acido úrico é prontamente ultrafiltrado e dializado do plasma. Porém, muitos fatores endógenos, incluindo o nível do volume do fluido extracelular, taxa de fluxo urinário, pH e hormônios podem influenciar sua depuração renal (SICA; SCHOOLWERTH, 2002).

**Lipídeos Séricos:** os principais lipídeos do plasma são: colesterol, ésteres do colesterol, triglicerídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos não esterificados. Trata-se de substâncias insolúveis em água, necessitando ser transportados na forma de lipoproteínas.

A principal função das lipoproteínas plasmáticas parece ser o transporte de triglicerídeos e colesterol de seus locais de origem como intestino (origem exógena) e fígado (origem endógena) para locais de armazenamento e utilização. Os triglicerídeos e o colesterol entram então no plasma como lipoproteínas (quilomícrons e VLDL) e sofrem mudanças intravasculares sendo hidrolizados pela enzima lipase lipoprotéica à ácidos graxos e monoglicerídeos (SCHIAVO *et al.*, 2003). Desta forma é mantido um delicado equilíbrio orgânico para que as células sejam supridas com lipídeos, sem que haja acúmulo excessivo dos mesmos. A elevação dos níveis de um ou mais componentes lipídicos na corrente sanguínea está correlacionada com o surgimento de doença arterial coronariana (GONÇALVES *et al.*, 2006).

**Colesterol Total:** o colesterol é um esteroide proveniente da dieta, e da síntese endógena pelo fígado a partir do acetato, sendo encontrado em todos os tecidos animais desempenhando funções fisiológicas, como a síntese de ácidos biliares, vitamina D, hormônios esteróides e constituintes das membranas plasmáticas celulares. O colesterol sérico total inclui todo o colesterol presente nas várias lipoproteínas, sendo o principal componente das LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade), e um constituinte em menor proporção das HDL (Lipoproteínas de Alta Densidade) e VLDL (Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa) (RAVEL, 1997). É importante ressaltar que o HDL tem papel vital no transporte do excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos de volta para o fígado, para que seja excretado através da bile (transporte reverso de colesterol) (SCHIAVO *et al.*, 2003).

**Triglicerídeos:** são ésteres de ácido graxos de glicerol provenientes da dieta e do fígado. Representam a maior quantidade de gordura no organismo e têm como função principal é armazenar e providenciar energia para as células. Os triglicerídeos são encontrados primariamente nos quilomícrons e nas VLDL e sua concentração plasmática é dada pelo balanço entre as taxas de entrada e de eliminação dessas moléculas no organismo. Os níveis de triglicerídeos podem ser influenciados por diversos fatores como obesidade, estresse agudo interno, estrogênioterapia, dieta, pancreatite aguda, diabetes e síndrome nefrológica, entre outros (RAVEL, 1997).

**Aminotransferases:** embora essas enzimas não sejam órgão – específicas, sendo encontradas em vários tecidos do organismo, seus níveis séricos elevam-se mais frequentemente nos casos de doença hepática, podendo refletir dano ao fígado, razão pela qual, vários autores as denominam enzimas hepáticas. A determinação da atividade sérica dessas enzimas possibilita estabelecer o tipo de lesão hepática, seja hepatocelular ou colestatia (MINCIS; MINCIS, 2007).

**Aspartato – Aminotransferase (AST):** antigamente denominada transaminase oxaloacética (TGO), é encontrada em ordem decrescente de

concentração no fígado, músculos cardíaco e esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos estando presente tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias destas células (RAVEL, 1997; MINCIS; MINCIS, 2007).

**Alamina – Aminotransferase (ALT):** antigamente denominada transaminase pirúrica (TGP), é uma enzima encontrada em pequenas quantidades nos rins, coração e musculatura esquelética tendo, porém, seus níveis mais elevados no fígado, podendo por este motivo ser considerada marcador específico de dano hepático. Está presente no citoplasma das células e sua atividade sérica é usada como biomarcador da integridade hepatocelular, embora haja pouca correlação entre a intensidade de dano hepático e níveis de transaminases (RAVEL, 1997; MINCIS; MINCIS, 2007).

**Fosfatase Alcalina:** trata-se de um grupo de enzimas fortemente relacionadas e com atividade máxima em pH de aproximadamente 10. É encontrada em praticamente todos os tecidos do organismo, sendo suas maiores concentrações observadas no fígado e epitélio do trato biliar, nos ossos, mucosa intestinal e placenta. Embora até hoje sua função não esteja bem definida, a fosfatase alcalina parece estar envolvida com transporte de lipídeos no intestino e nos processos de calcificação óssea. Na prática clínica, a grande utilidade está na investigação de doenças hepatobiliares e em doenças ósseas em que ocorre aumento de atividade osteoblástica (RAVEL, 1997)

**Proteínas Séricas:** consistem em albuminas e globulinas, atuando de forma livre ou como proteínas transportadoras. As concentrações de proteínas séricas podem ser afetadas pela função dos rins e do fígado. A Albumina é sintetizada no fígado, sendo bastante ativa na manutenção da pressão oncótica do soro e atuando também como proteína de transporte para certas substâncias como alguns medicamentos. O termo globulinas refere-se à porção não albumínica das proteínas séricas e incluem glicoproteínas, lipoproteínas e imunoglobulinas que exercem funções mais variadas do que albumina, formando um sistema de transporte de substâncias e constituindo o sistema de

anticorpos, proteínas de coagulação, sistema complemento e algumas substâncias de função especial, como as proteínas de reação aguda em processos inflamatórios (RAVEL, 1997; TRAVLOS *et al.*, 1996).

### **Eletrólitos Séricos:**

Sódio ( $\text{Na}^+$ ): é o cátion que existe em maior quantidade nos líquidos extracelulares, participando do equilíbrio hidroeletrolítico, da transmissão dos impulsos nervosos e da contração muscular. É importante ressaltar que o equilíbrio hidroeletrolítico é regido por importante princípio fisiológico: a água vai para onde for o sódio. Seus níveis podem ser influenciados por diversos fatores, incluindo a ingestão através da dieta, distúrbios do trato gastrointestinal, ingestão  $\text{H}_2\text{O}$  e função renal (RAVEL, 1997; ÉVORA *et al.*, 1999).

Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ): é o ânion extracelular mais abundante, sendo afetado pelas mesmas condições que afetam o sódio (RAVEL, 1997).

Potássio ( $\text{K}^+$ ): é o principal cátion intracelular que regula a excitabilidade neuromuscular e a contratilidade muscular. O potássio é necessário para a formação de glicogênio, síntese protéica e correção do desequilíbrio ácido-base. Sua importância neste desequilíbrio se explica pelo fato de que os íons  $\text{K}^+$  competem com íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ). Além disso, ocorre permuta com  $\text{Na}^+$  nos túbulos renais e deste modo, a retenção de sódio é acompanhada por eliminação de potássio (ÉVORA *et al.*, 1999).

Cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ): ocupa o 5º lugar entre os elementos mais abundantes do corpo humano, sendo necessário para a integridade e estrutura de membranas celulares, condução adequada dos estímulos cardíacos, coagulação sanguínea e crescimento ósseo. O cálcio sérico total é constituído de cálcio ionizado, cálcio não difusível (formando complexos com ânions protéicos) e sais de cálcio, como citrato e fosfato de cálcio. O cálcio contido nos líquidos orgânicos representa apenas uma pequena fração do cálcio total, já que a maior parte encontra-se em ossos e dentes. Sua regulação no líquido extracelular se dá

através da ação dos hormônios das tireóides e paratireóides (ÉVORA *et al.*, 1999).

Magnésio ( $Mg^{++}$ ): é o quarto cátion mais comum do organismo e ocupa o segundo lugar por ordem de importância entre os cátions do líquido intracelular. O magnésio é importante para a síntese protéica, ativação enzimática e fosforilação oxidativa. Exerce influência sobre a troca renal de íons potássio e hidrogênio e afeta os níveis de cálcio. Além disso, desempenha importante papel no controle do músculo pelo sistema nervoso a nível da junção neuromuscular, retardando a transmissão dos impulsos nervosos por inibição da acetilcolina. Seus níveis são regulados de forma indireta, dependendo da eliminação renal e do hormônio das paratireóides (RAVEL, 1997; ÉVORA *et al.*, 1999).

### 1.3. *Zizyphus joazeiro* Mart.

*Zizyphus joazeiro* Mart é uma árvore frondosa de porte mediano podendo atingir até 16 metros de altura e ramos armados com fortes espinhos pertencente à família *Rhamnaceae*, que cresce em tabuleiros áridos e pedregosos, possui flores pequenas amarelo-esverdeadas e fruto drupáceo com caroço grande envolto por polpa branca e mucilaginosa. Conserva-se sempre verde, mesmo nas mais rigorosas secas graças a sua capacidade de coletar a escassa umidade existente no solo. É nativa do nordeste do Brasil e ocorre próximo aos vales sertanejos desde o estado do Piauí até o norte de Minas Gerais (TRIGUEIRO, 1981; LORENZI; ABREU MATOS, 2002).

Popularmente conhecida como juazeiro, joazeiro, joá, juá-espinho ou laranjeira-de-vaqueiro, tem suas cascas e folhas tradicionalmente empregadas na medicina popular do nordeste, na forma de extrato aquoso para tratamento de problemas gástricos, de febres das mais diversas origens, alívio da tosse, antiinflamatório, como agente de limpeza dos cabelos e dos dentes e como medicamento para doenças de pele (LORENZI; ABREU MATOS, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O amplo emprego dessa planta nas práticas caseiras da medicina, odontologia e cosmética aplicadas pela população, é motivo suficiente para sua escolha como tema de estudos químicos e farmacológicos, visando seu melhor aproveitamento (LORENZI; ABREU MATOS, 2002).



FIGURA 1- *Zizyphus joazeiro* Mart.: aspecto geral, partes aéreas, flores e frutos

(Fonte: [www.plantarum.com.br](http://www.plantarum.com.br))

## **2.0.OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

- ❖ Realizar ensaios toxicológicos pré-clínicos com o extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro*, de acordo com a Resolução RE nº 90/2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

### **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* utilizando camundongos Swiss albinos através da observação de parâmetros comportamentais, ponderais, metabólicos, hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos.
- ❖ Avaliar a toxicidade crônica do extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* utilizando camundongos Swiss albinos através da observação de parâmetros comportamentais, ponderais, metabólicos, hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos.
- ❖ Avaliar a segurança na utilização desta planta para fins medicinais na intenção de contribuir com seu uso racional e conseqüentemente para a melhoria da saúde e qualidade de vida da população.

## *CAPÍTULO II*

### **3.0.MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1.LOCAL DA PESQUISA**

As atividades desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

#### **3.2.MATERIAIS**

##### **3.2.1.MATERIAL BOTÂNICO**

Foram utilizadas as cascas do caule de *Zizyphus joazeiro*, coletadas no mês de julho de 2006 na cidade de Passira, estado de Pernambuco cuja identificação botânica foi realizada no Herbário UFP Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, onde uma excicata encontra-se depositada sob o número de registro 48.432.

##### **3.2.2.ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss albinos adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), pesando entre 28 e 30 gramas, fornecidos pelo Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros - da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo pellets de ração da marca Purina<sup>®</sup>) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, com bicos em metal, colocadas nas grades metálicas das gaiolas na sua parte superior.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados

no ambiente de trabalho, pelo menos 30 minutos antes da execução do experimento.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba sob o n° de protocolo 0102/07.

### 3.2.3.APARELHAGEM

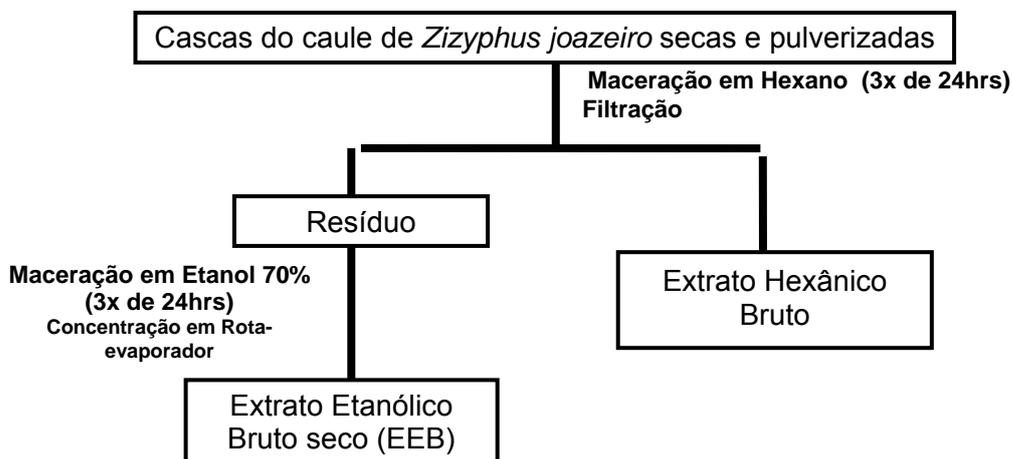
- ✓ Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus® - Roche Diagnostic System - para determinações bioquímicas no soro;
- ✓ Analisador de íons seletivos, 9180 Electrolyte Analyzer Roche®, para determinações dos íons sódio, potássio;
- ✓ Analisador hematológico celular automático – ABX Vet ABC® - Horiba - para determinação dos parâmetros hematológicos. Os esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio Olympus®;
- ✓ Balança analítica marca AID® – HR – 120g – Japão;
- ✓ Balança eletrônica BG – 8000 GEHAKA®;
- ✓ Centrífuga BIO ENG® BE 4000.
- ✓ Glicosímetro OPTIUM® Medisense Abbott: monitor de glicemia com fitas reativas;
- ✓ Microscópio Olympus® utilizado nas análises histopatológicas;
- ✓ Termômetro digital, modelo MC – 3BC®, OMRON/China.
- ✓ Rota-rod
- ✓ Campo Aberto

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS CASCAS DO CAULE DE *Zizyphus joazeiro*

O Extrato Etanólico Bruto das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* foi fornecido pela Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima do Laboratório de Biofísica Química, Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

As cascas do caule secas e pulverizadas foram submetidas a uma extração inicial utilizando-se hexano. Após filtração foram obtidos o Extrato Hexânico Bruto e um resíduo, sendo este último submetido à maceração em etanol a 70%. O extrato resultante foi concentrado a vácuo em rota- evaporador até a secura, fornecendo o Extrato Etanólico Bruto (EEB), utilizado nos ensaios toxicológicos. O procedimento de extração é esquematizado no fluxograma a seguir.



### **3.3.2. ENSAIO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO AGUDO**

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou no Sistema Nervoso Autônomo (SNA), foi realizado experimento, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo Setor de Psicofarmacologia do LTF-UFPB e descrito por Almeida *et al.* (1999). Grupos de camundongos, sendo 6 machos e 6 fêmeas, colocados 6 animais por caixa, receberam a dose de 2000mg/Kg de peso corporal por via oral. Após o tratamento foram observados os efeitos gerais apresentados pelos animais experimentais nos tempos: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 13 dias seguintes.

Um grupo também com 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) foi tratado com o veículo de diluição do extrato (água), permanecendo como grupo controle.

#### **3.3.2.1. CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS**

Foi avaliado o consumo de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, desde a 24<sup>a</sup> hora e até 14 dias após a administração da dose. Para avaliar o consumo de água, mamadeiras graduadas cheias foram colocadas e, no dia seguinte, o volume de água ingerido pelos animais foi mensurado. Em relação aos alimentos, a ração foi colocada diariamente e, no dia posterior, o peso consumido de ração foi contabilizado.

#### **3.3.2.2. PESO CORPORAL**

A pesagem dos animais foi realizada antes da administração do extrato e no 14<sup>o</sup> dia após o tratamento.

### **3.3.2.3.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE SANGUE**

Após 14 dias de observação e sendo observado um jejum prévio de 06 horas, os animais foram sacrificados por tração cervical e amostras de sangue coletadas através de sangria do plexo braquial, de todos os animais, machos e fêmeas, dos grupos tratado e controle.

O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA para avaliação dos seguintes parâmetros hematológicos: contagem de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), contagem global e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas. Foram feitos estiraços sanguíneos que após coloração com foram analisados em microscópio óptico para confirmação e controle da contagem diferencial de células sanguíneas.

Para as análises bioquímicas, o sangue foi acondicionado em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado as dosagens dos seguintes parâmetros: glicose, uréia, creatinina, transaminases AST e ALT, colesterol, triglicerídios, ácido úrico, fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina, sódio, potássio, e magnésio.

### **3.3.2.4.ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO**

Quatorze dias após o tratamento, 50% dos camundongos dos grupos experimental e controle sacrificados por tração cervical, tiveram suas vísceras examinadas macroscopicamente, com ressecção e pesagem consecutiva de pulmão (submetido a perfusão, via traquéia, com solução de formol a 10%), coração, fígado e rins (seccionados por incisão sagital). As secções teciduais foram dos órgãos excisados foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada para posterior processamento histológico seguindo métodos usuais: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm,

subseqüentemente submetidos a coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico.

### **3.3.3. ENSAIO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO CRÔNICO**

O estudo toxicológico foi realizado segundo Resolução RE nº90/2004 da ANVISA, com algumas modificações, utilizando camundongos Swiss albinos.

#### **3.3.3.1. TRATAMENTO DOS ANIMAIS**

Os animais foram divididos em quatro grupos de 20 animais, sendo que cada grupo foi composto por 10 machos e 10 fêmeas, que foram tratados da seguinte maneira:

- Três grupos foram tratados diariamente, no turno da manhã, por via oral (gavagem), com doses de 7 mg/kg (uso popular), 35 mg/kg e 175 mg/kg do Extrato Etanólico de *Zizyphus joazeiro*, por um período de 13 semanas (90 dias)

- Ao quarto grupo, controle, foi administrada água, veículo utilizado na dissolução do extrato.

Além destes quatro grupos, outros 2 contendo 10 animais cada, sendo 5 machos e 5 fêmeas foram formados, constituindo os grupos satélite. Estes animais foram tratados durante 90 dias com as doses de 35 e 175 mg/kg do Extrato Etanólico Bruto de *Zizyphus joazeiro* (EEB), porém só foram sacrificados 30 dias após o fim do experimento, para a verificação da reversão de um possível quadro de intoxicação

Foram avaliados os efeitos da administração prolongada do extrato, sobre a temperatura, glicemia, consumo de água e alimentos, evolução ponderal, atividade exploratória (teste de campo aberto) e motora dos animais, parâmetros hematológicos e bioquímicos, considerando-se como padrão os

dados obtidos no grupo controle, sendo ainda realizados exames histopatológicos dos órgãos dos camundongos em estudo.

### **3.3.3.2.TEMPERATURA**

Para medida da temperatura corporal foi utilizado um termômetro digital modelo MC – 3BC<sup>®</sup> – ORON/China, cujo termosensor lubrificado com vaselina líquida foi introduzido pelo reto (atingindo o cólon), quinzenalmente em todos os animais, a partir da quarta semana de tratamento.

### **3.3.3.3.GLICEMIA**

Durante as treze semanas de tratamento, foram avaliados mensalmente os níveis glicêmicos dos animais da seguinte forma: os camundongos foram imobilizados em contentores plásticos e uma gota de sangue foi coletada na veia caudal e analisada em fita reativa para dosagem de glicemia. A leitura foi efetivada em monitor de glicemia, sendo observado jejum prévio de 06 horas.

### **3.3.3.4. CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS**

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, nas 13 semanas de tratamento. Mamadeiras graduadas cheias foram colocadas e, no dia seguinte, o volume de água ingerido pelos animais foi mensurado. Quanto ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente, em caixas contendo 10 animais e, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração.

### **3.3.3.5. PESO CORPORAL**

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente, para posterior cálculo de evolução da curva ponderal.

### 3.3.3.6. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL (TESTE DO CAMPO ABERTO)

Foi utilizado nesta metodologia, o aparelho de campo aberto, seguindo o descrito por Carlini *et al.* (1986) para avaliar a atividade exploratória dos animais através:

- ❖ Da movimentação espontânea (ambulação), registrada pelo número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo;
- ❖ Da quantificação do comportamento de levantar sobre as duas patas traseiras (Rearing);
- ❖ Da cronometragem do tempo de auto-limpeza (Grooming);
- ❖ Da contagem do número de bolos fecais (defecação).

Esses parâmetros foram utilizados como índice da interferência do extrato sobre o comportamento emocional do animal, indicando alterações sobre o sistema nervoso central.

Quinzenalmente, uma hora após o tratamento, 50% dos animais dos grupos tratados e controle foram expostos (durante 3 minutos para cada animal) ao aparelho para a observação dos parâmetros acima descritos (MANSUR *et al.*, 1971).

É importante ressaltar que foram avaliados apenas 50% dos animais neste protocolo, no intuito de minimizar a exposição dos mesmos ao estresse.

### 3.3.3.7. AVALIAÇÃO MOTORA (TESTE DE ROTA-ROD)

Este teste foi realizado também quinzenalmente, uma hora após administração do extrato ou veículo, colocando-se os animais não submetidos ao teste de Campo Aberto na barra giratória do aparelho Rota-rod, com velocidade constante de 7,0 rpm, e registrando-se o tempo de permanência dos mesmos na barra, com três reconduções no aparelho até atingir o tempo máximo de 3 minutos (MORAIS *et al.*, 1998).

Os animais avaliados neste teste foram submetidos a um treinamento no aparelho antes que se iniciasse o tratamento para constatar sua capacidade de permanecer sobre a barra giratória durante o período de tempo estabelecido.

O objetivo deste protocolo foi verificar uma possível interferência do tratamento com a coordenação motora e o tônus muscular dos camundongos (ALMEIDA *et al.*, 2006).

### **3.3.3.8.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE SANGUE**

Após o período de tratamento sendo observado um jejum prévio de 06 horas, os animais foram sacrificados por tração cervical e amostras de sangue coletadas através de sangria do plexo braquial, de todos os animais, machos e fêmeas, dos grupos tratado e controle de acordo com metodologia descrita no item 3.3.2.3.

### **3.3.3.9.ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO**

Após os 90 dias de tratamento, 30% dos camundongos dos grupos experimental e controle sacrificados por tração cervical, tiveram suas vísceras submetidas a exame necroscópico, com posterior ressecção e pesagem consecutiva de pulmão (submetido a perfusão, via traquéia, com solução de formol a 10%), coração, fígado, rins e baço (seccionados por incisão sagital). O processamento do material foi realizado como descrito no item 3.3.2.4.

## **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística dos resultados foram utilizados, o Teste “t” de Student não pareado e Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós teste mais adequado ao parâmetro avaliado utilizando-se o Software Graph Pad Prism 4.0, sendo os resultados considerados significativos quando apresentassem valores de  $p < 0,05$ .

## *CAPÍTULO III*

## 4.0.RESULTADOS

### 4.1.ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO AGUDO

#### 4.1.1.AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Nenhuma alteração comportamental foi evidenciada nos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB nos tempos 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após a administração ou durante os 14 dias de observação.

#### 4.1.2.EVOLUÇÃO PONDERAL

Não houve qualquer alteração na evolução ponderal de camundongos machos e fêmeas tratados com o extrato na dose de 2000 mg/kg v.o. em comparação aos seus respectivos grupos controle. Os resultados são vistos na Tabela 1.

**TABELA 1** – Ganho de peso médio (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, após 14 dias de tratamento a dose de 2000 mg/kg v.o. do EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.

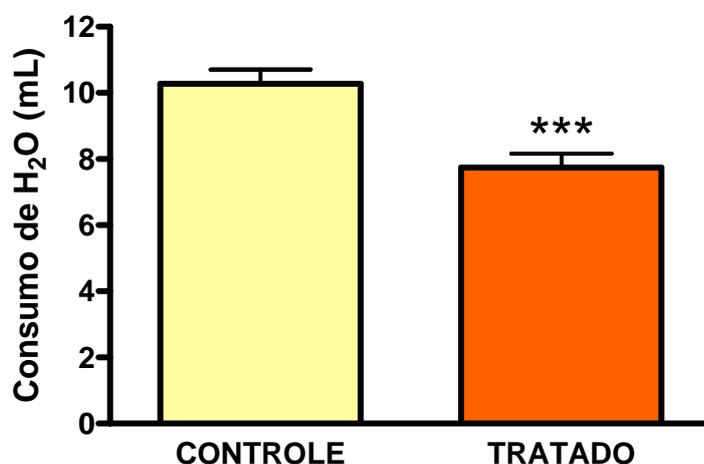
GRUPOS			
Machos		Fêmeas	
Controle	Tratado	Controle	Tratado
7,27 $\pm$ 1,34	5,33 $\pm$ 0,74	2,33 $\pm$ 0,68	2,31 $\pm$ 0,85

#### 4.1.3.CONSUMO DE ÁGUA

As fêmeas que receberam o extrato apresentaram ingesta de água semelhante a do grupo controle, enquanto que os machos tratados tiveram sua ingesta de água reduzida em relação a seu controle. Os resultados são apresentados na Tabela 2 e Gráfico 1.

**TABELA 2** - Consumo médio diário de água (em mL) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de *Z. joazeiro* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*\*p<0,001.

GRUPOS			
Machos		Fêmeas	
Controle	Tratado	Controle	Tratado
10,27 $\pm$ 0,43	7,74 $\pm$ 0,41***	8,11 $\pm$ 0,26	8,01 $\pm$ 0,15



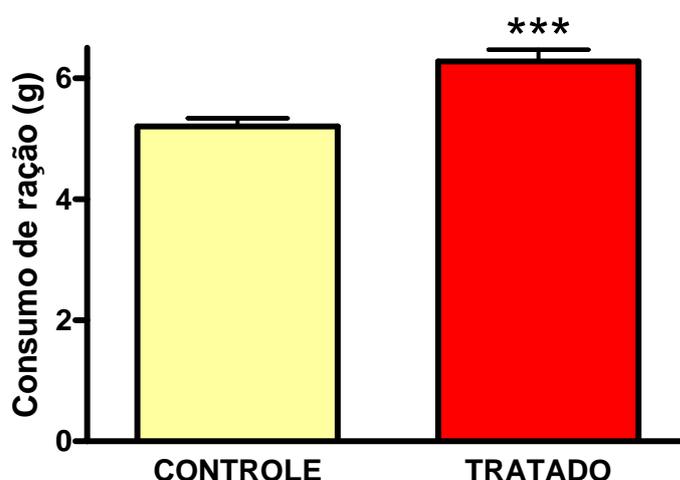
**GRÁFICO 1** - Consumo médio diário de água (em mL) por camundongos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de *Z. joazeiro* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*\*p<0,001.

#### 4.1.4. CONSUMO DE ALIMENTOS

Os machos tratados com o extrato apresentaram consumo de alimentos semelhante a do grupo controle, enquanto que as fêmeas tratadas aumentaram significativamente seu consumo de ração em comparação a seu controle. Os resultados são apresentados na Tabela 3 e Gráfico 2.

**TABELA 3** - Consumo médio diário de ração (em gramas) por camundongo, machos e fêmeas, tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de *Z. joazeiro* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*\*p<0,001.

GRUPOS			
Machos		Fêmeas	
Controle	Tratado	Controle	Tratado
6,92 $\pm$ 0,12	6,81 $\pm$ 0,18	5,20 $\pm$ 0,13	6,27 $\pm$ 0,19***



**GRÁFICO 2** - Consumo médio diário de ração (em gramas) por camundongos fêmeas, tratados com a dose de 2000 mg/kg v.o. de EEB de *Z. joazeiro* durante 13 dias de observação. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*\*p<0,001.

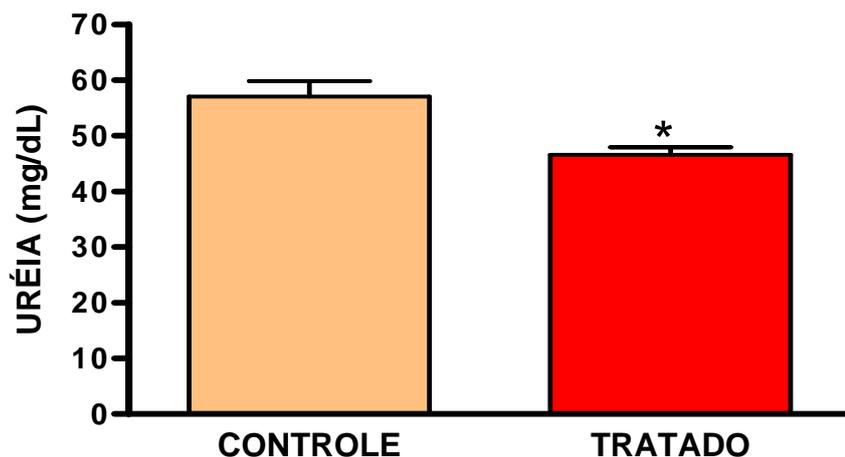
#### 4.1.5. ANÁLISE LABORATORIAL DE SANGUE

##### 4.1.5.1. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

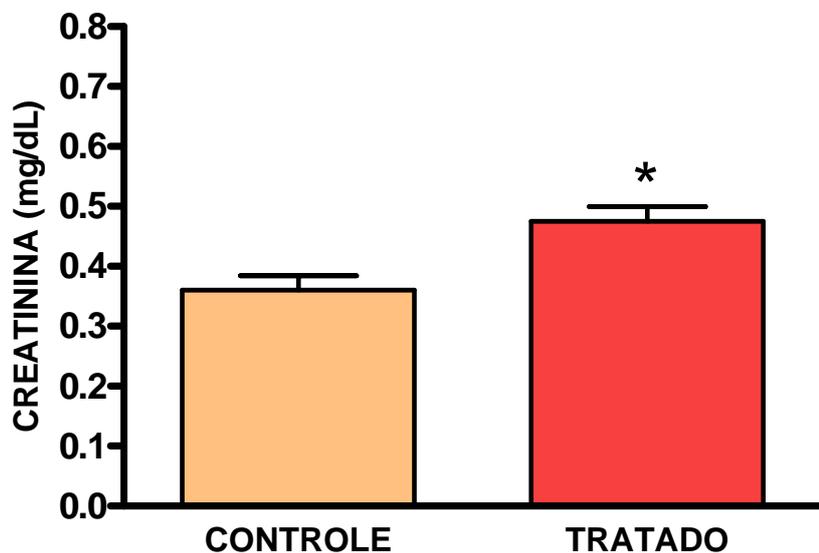
Após 14 dias da administração de EEB de *Z. joazeiro*, foram encontradas alterações bioquímicas estatisticamente significantes apenas em machos. Nestes animais houve elevação da concentração sérica de creatinina e diminuição dos níveis de uréia. Os parâmetros bioquímicos são apresentados na Tabela 4 e Gráficos 3 e 4.

**TABELA 4** - Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss albinos tratados com 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student/Mann Whitney. \*p<0,05.

Parâmetro (unidade)	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Glicose (mg/dL)	113,20 $\pm$ 29,00	148,0 $\pm$ 17,22	110,8 $\pm$ 17,02	131,4 $\pm$ 7,00
Uréia (mg/dL)	57,0 $\pm$ 2,81	46,6 $\pm$ 1,32*	46,33 $\pm$ 12,33	50,75 $\pm$ 5,73
Creatinina (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02*	0,4 $\pm$ 0,0	0,45 $\pm$ 0,02
Colesterol Total (mg/dL)	125,8 $\pm$ 8,55	101,6 $\pm$ 11,24	77,67 $\pm$ 10,17	80,60 $\pm$ 5,33
Triglicerídeos (mg/dL)	271,4 $\pm$ 36,63	192,8 $\pm$ 34,67	90,67 $\pm$ 6,38	135,30 $\pm$ 19,48
Ácido úrico (mg/dL)	2,3 $\pm$ 0,38	1,96 $\pm$ 0,44	1,13 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,27
AST (U/l)	235,8 $\pm$ 17,51	252,2 $\pm$ 21,64	220,4 $\pm$ 48,27	152,00 $\pm$ 24,69
ALT (U/l)	66,80 $\pm$ 4,67	78,0 $\pm$ 6,17	52,67 $\pm$ 14,71	48,20 $\pm$ 5,71
Fosfatase Alcalina (U/l)	281,0 $\pm$ 64,16	224,8 $\pm$ 57,48	121,3 $\pm$ 44,83	84,00 $\pm$ 12,63
Proteínas Totais (g/dL)	6,33 $\pm$ 0,24	5,78 $\pm$ 0,29	5,9 $\pm$ 0,46	5,58 $\pm$ 0,35
Albumina (g/dL)	2,62 $\pm$ 0,15	2,66 $\pm$ 0,12	2,53 $\pm$ 0,27	2,86 $\pm$ 0,04
Globulinas (g/dL)	3,60 $\pm$ 0,40	3,12 $\pm$ 0,37	2,93 $\pm$ 0,93	2,40 $\pm$ 0,16
Sódio (mEq/L)	170,0 $\pm$ 3,39	166,4 $\pm$ 4,49	167,6 $\pm$ 3,17	159,30 $\pm$ 1,85
Potássio (mEq/L)	6,98 $\pm$ 0,78	6,86 $\pm$ 0,90	7,24 $\pm$ 0,86	5,36 $\pm$ 0,27
Magnésio (mEq/L)	2,97 $\pm$ 0,39	2,86 $\pm$ 0,23	2,86 $\pm$ 0,51	2,62 $\pm$ 0,04
Cloreto (mEq/L)	119,3 $\pm$ 2,60	115,3 $\pm$ 0,81	120,5 $\pm$ 4,5	124,00 $\pm$ 1,0



**GRÁFICO 3** - Concentração de uréia no soro de camundongos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*p<0,05.



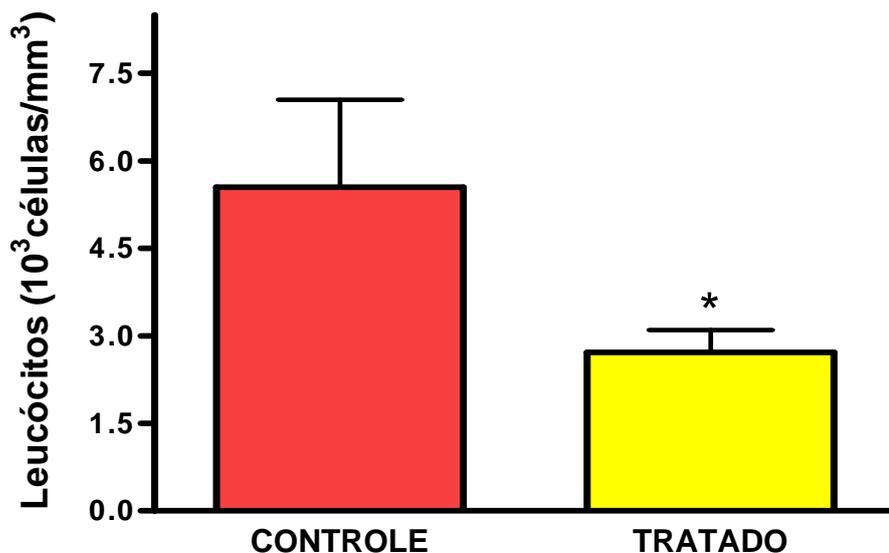
**GRÁFICO 4** - Concentração de creatinina no soro de camundongos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*p<0,05.

#### 4.1.5.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

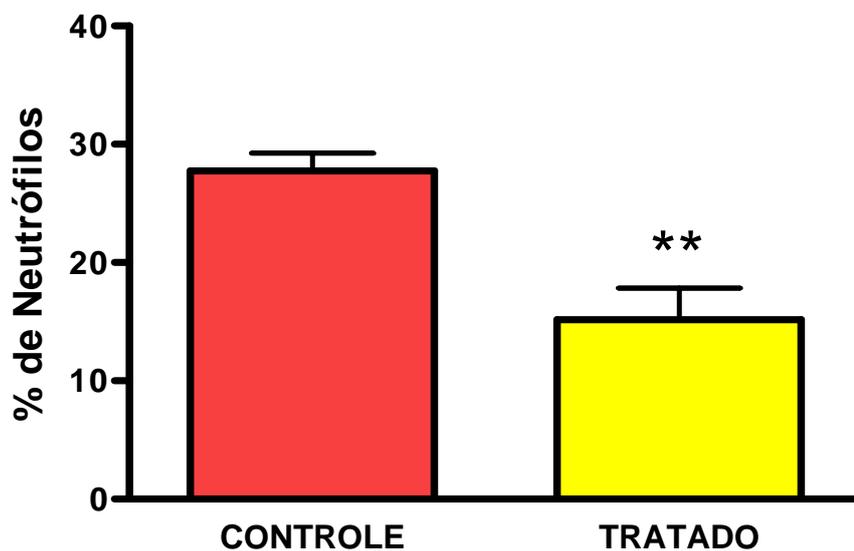
Os resultados apresentados na tabela 5 mostram que houve alterações estatisticamente significantes nos parâmetros hematológicos de fêmeas tratadas com 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*, especificamente na série branca com contagem global de leucócitos diminuída e contagem diferencial apresentando queda na percentagem de neutrófilos e aumento de linfócitos (Gráficos 5, 6 e 7). Não foram encontradas alterações hematológicas nos machos tratados.

**Tabela 5** - Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss albinos tratados com 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student/ Mann Whitney. \*p<0,05 \*\*p<0,01.

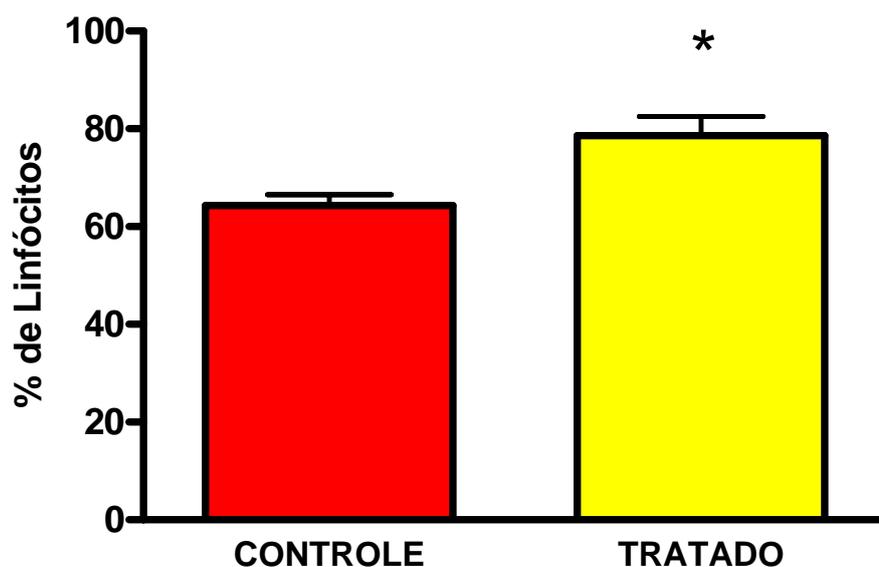
Parâmetro (unidade)	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Hemácias (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8,59 $\pm$ 0,35	8,92 $\pm$ 0,28	9,16 $\pm$ 0,04	9,10 $\pm$ 0,13
Hemoglobina (g/dL)	13,45 $\pm$ 0,60	14,32 $\pm$ 0,38	14,80 $\pm$ 0,17	14,85 $\pm$ 0,31
Hematócrito (%)	35,58 $\pm$ 1,66	38,46 $\pm$ 1,36	36,58 $\pm$ 0,52	38,17 $\pm$ 1,41
VCM ( $\mu^3$ )	41,33 $\pm$ 1,08	43,0 $\pm$ 0,54	40,00 $\pm$ 0,70	42,00 $\pm$ 1,36
HCM ( $\mu\mu$ g)	15,70 $\pm$ 0,43	16,08 $\pm$ 0,09	16,15 $\pm$ 0,17	16,35 $\pm$ 0,28
CHCM (%)	37,92 $\pm$ 0,61	37,32 $\pm$ 0,63	40,53 $\pm$ 0,39	39,03 $\pm$ 0,72
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,85 $\pm$ 0,46	5,20 $\pm$ 0,65	5,55 $\pm$ 1,16	2,71 $\pm$ 0,38*
Neutrófilos (%)	16,17 $\pm$ 2,02	20,0 $\pm$ 3,91	27,75 $\pm$ 1,49	15,17 $\pm$ 2,67**
Eosinófilos (%)	0,5 $\pm$ 0,22	0,20 $\pm$ 0,20	1,25 $\pm$ 0,62	0,16 $\pm$ 0,16
Linfócitos (%)	75,0 $\pm$ 3,18	73,20 $\pm$ 3,70	64,25 $\pm$ 2,32	78,67 $\pm$ 3,86*
Monócitos (%)	8,33 $\pm$ 1,90	6,40 $\pm$ 0,81	6,75 $\pm$ 0,75	4,66 $\pm$ 1,78
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	814,2 $\pm$ 105,1	928,6 $\pm$ 128,9	944,5 $\pm$ 111,3	689,5 $\pm$ 127,0



**GRÁFICO 5** - Contagem de leucócitos no sangue de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*p<0,05.



**GRÁFICO 6** - Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6). Teste "t" de Student. \*\*p<0,01.



**GRÁFICO 7** - Percentagem de linfócitos no sangue de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média ± e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. \*p<0,05.

#### 4.1.6. ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

Nenhuma diferença foi constatada entre o peso dos órgãos dos animais tratados e dos animais dos grupos controle (dados mostrados na tabela 6). O exame macroscópico das vísceras (fígado, pulmões, rins e coração) não revelou anormalidades em relação à coloração e consistência.

A análise histológica dos órgãos revelou que os mesmos encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade.

**TABELA 6** – Peso dos órgãos de camundongos Swiss albinos tratados com 2000 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=3). Teste “t” de Student/ Mann Whitney.

ÓRGÃOS	GRUPOS			
	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
<b>Coração</b>	0,18 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,01
<b>Fígado</b>	1,78 $\pm$ 0,17	1,64 $\pm$ 0,21	1,79 $\pm$ 0,11	1,88 $\pm$ 0,22
<b>Rins</b>	0,47 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,04

## 4.2.ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO CRÔNICO

A seguir serão apresentados os resultados dos parâmetros avaliados em camundongos machos e fêmeas submetidos a tratamento com extrato etanólico bruto das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* nas doses de 7 mg/kg, 35 mg/kg e 175 mg/kg durante 90 dias.

### 4.2.1.OBSERVAÇÕES GERAIS

Durante o período de tratamento não foram observadas alterações no comportamento dos camundongos. Porém, a partir do 41º dia de tratamento notou-se o aparecimento de furúnculos (Figura 2) nos animais, tanto machos quanto fêmeas recebendo o extrato. Este achado persistiu até o fim do período experimental, quando a região das feridas foi dissecada apresentando-se necrótica. Além disso, 2 machos recebendo a dose de 7 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro* apresentaram edema de pata (Figura 3) e 1 em uma fêmea tratada com 175 mg/kg do extrato houve surgimento de grande massa tumoral na região abdominal (Figura 4), o que provocou excessiva perda de peso do

animal e sua morte antes que se completassem os 90 dias de tratamento. O tumor foi excisado, pesado e submetido a análise histológica (Dados apresentados no item 4.2.9) .

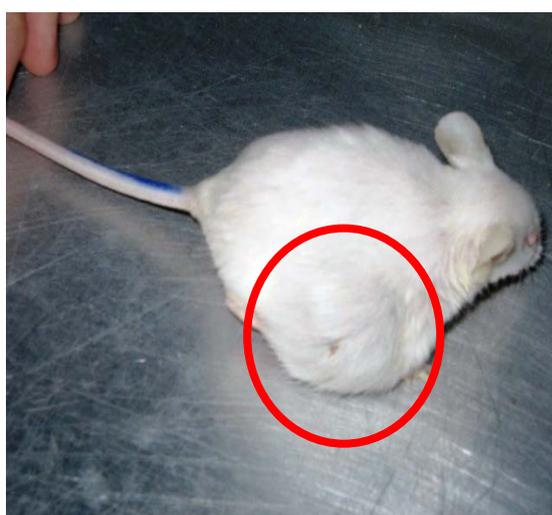
Outros animais pertencentes aos grupos experimentais vieram a óbito antes do término do tratamento e seus órgãos foram analisados macroscopicamente constatando-se alterações na coloração e consistência de rins e pulmões, bem como a presença de material purulento. Rins, coração e fígado de um dos animais foram submetidos avaliação histológica (dados apresentados no item 4.2.9).



**FIGURA 2-**Animal tratado com EEB apresentando furunculose.



**FIGURA 3-**Animal tratado com EEB apresentando edema de pata.



**FIGURA 4-**Fêmea tratada com 175 mg/ka de EEB apresentando tumor.

#### 4.2.2.TEMPERATURA COLÔNICA

Durante todo o período experimental, não foram observadas alterações na temperatura colônica média dos animais machos e fêmeas tratados com as doses de 7 mg/kg, 35 mg/kg e 175 mg/kg bem como dos grupos controle que apresentou-se variando entre 35,2°C e 37,9°C.

#### 4.2.3.GLICEMIA CAUDAL

Não foram constatadas alterações nos níveis glicêmicos mensais dos animais de ambos os sexos durante a administração das três doses nos 90 dias de administração do EEB de *Z. joazeiro* (tabela 7).

**TABELA 7:** Efeito da administração crônica de diferentes doses do EEB de *Zizyphus joazeiro*. sobre a glicemia dos animais. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=4). Kruskal Wallis/ Dunn.

GRUPOS	MESES			
	BASAL	1	2	3
<b>FÊMEAS</b>				
CONTROLE	89,75 $\pm$ 2,05	103,80 $\pm$ 4,62	94,75 $\pm$ 8,33	93,25 $\pm$ 8,86
7 mg/kg	88,50 $\pm$ 8,39	84,75 $\pm$ 14,71	92,50 $\pm$ 12,45	88,25 $\pm$ 12,23
35 mg/kg	87,75 $\pm$ 1,70	89,75 $\pm$ 8,45	86,00 $\pm$ 6,92	76,25 $\pm$ 3,70
175 mg/kg	87,25 $\pm$ 5,07	96,25 $\pm$ 5,05	84,50 $\pm$ 5,45	84,00 $\pm$ 11,92
<b>MACHOS</b>				
CONTROLE	95,25 $\pm$ 7,87	111,80 $\pm$ 6,89	91,75 $\pm$ 4,88	89,25 $\pm$ 1,10
7 mg/kg	86,00 $\pm$ 7,62	98,00 $\pm$ 8,69	84,50 $\pm$ 5,42	88,25 $\pm$ 12,23
35 mg/kg	87,50 $\pm$ 2,90	89,50 $\pm$ 6,33	80,25 $\pm$ 9,15	75,25 $\pm$ 5,15
175 mg/kg	84,00 $\pm$ 3,46	87,00 $\pm$ 4,06	88,25 $\pm$ 5,72	92,50 $\pm$ 6,06

#### 4.2.4.CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS

Os dados obtidos revelaram uma elevação estatisticamente significativa no consumo de água de fêmeas tratadas com as 3 doses do extrato durante praticamente todo o período experimental com exceção das semanas 1 (para a dose de 35 mg/kg), 6 (para as 3 doses), 7 (para as 3 doses) e 12 (para as dose de 7 e 175 mg/kg). O grupo satélite tratado com a dose de 35 mg/kg teve sua ingesta de água significativamente reduzida nas 4 semanas seguintes a interrupção do tratamento, quando comparados os valores obtidos com aqueles da 12<sup>a</sup> semana do grupo de 35 mg/kg.

O consumo de ração das fêmeas foi alterado apenas nas semanas 2 (doses de 7 e 175 mg/kg), 4 (dose de 35 mg/kg), 7 (dose de 7 mg/kg) e 9 (35 mg/kg).

Quanto aos machos, houve alteração na ingestão de alimentos nas doses de 35 mg/kg (semanas 4, 5 e 7) e 175 mg/kg (semana 3) e aumento no consumo de água dos animais tratados com as doses de 7 mg/kg (semanas 1, 3 e 9) e 35 mg/kg (semana 10).

Os resultados do consumo de água e de alimentos são apresentados nas tabelas 8 e 9 e gráficos 8 e 9.

**TABELA 8-** Consumo semanal de ração (em gramas) por camundongo durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

GRUPOS	SEMANAS					
	1	2	3	4	5	6
MACHOS						
CONTROLE	6,09 $\pm$ 0,71	6,47 $\pm$ 0,33	5,53 $\pm$ 0,11	6,37 $\pm$ 0,10	6,62 $\pm$ 0,20	6,37 $\pm$ 0,19
7mg/kg	6,65 $\pm$ 0,36	5,91 $\pm$ 0,16	6,06 $\pm$ 0,26	6,50 $\pm$ 0,13	6,58 $\pm$ 0,19	6,21 $\pm$ 0,11
35mg/kg	5,62 $\pm$ 0,38	6,21 $\pm$ 0,14	5,47 $\pm$ 0,16	5,46 $\pm$ 0,15**	5,85 $\pm$ 0,20*	5,99 $\pm$ 0,13
175mg/kg	5,71 $\pm$ 0,44	6,62 $\pm$ 0,62	6,35 $\pm$ 0,19*	6,50 $\pm$ 0,09	6,43 $\pm$ 0,17	6,13 $\pm$ 0,10
FÊMEAS						
CONTROLE	4,56 $\pm$ 0,15	4,01 $\pm$ 0,11	4,74 $\pm$ 0,10	4,76 $\pm$ 0,04	4,88 $\pm$ 0,16	4,90 $\pm$ 0,18
7mg/kg	4,99 $\pm$ 0,13	4,79 $\pm$ 0,11**	4,96 $\pm$ 0,16	4,99 $\pm$ 0,11	4,49 $\pm$ 0,13	4,68 $\pm$ 0,21
35mg/kg	4,87 $\pm$ 0,10	4,16 $\pm$ 0,16	4,90 $\pm$ 0,11	5,41 $\pm$ 0,11**	5,02 $\pm$ 0,16	4,90 $\pm$ 0,14
175mg/kg	4,64 $\pm$ 0,17	4,58 $\pm$ 0,21*	4,97 $\pm$ 0,21	5,21 $\pm$ 0,19	4,84 $\pm$ 0,16	5,07 $\pm$ 0,17

**TABELA 8-** Consumo semanal de ração (em gramas) por camundongo durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnett.\*p<0,05; p<0,01. (Continuação).

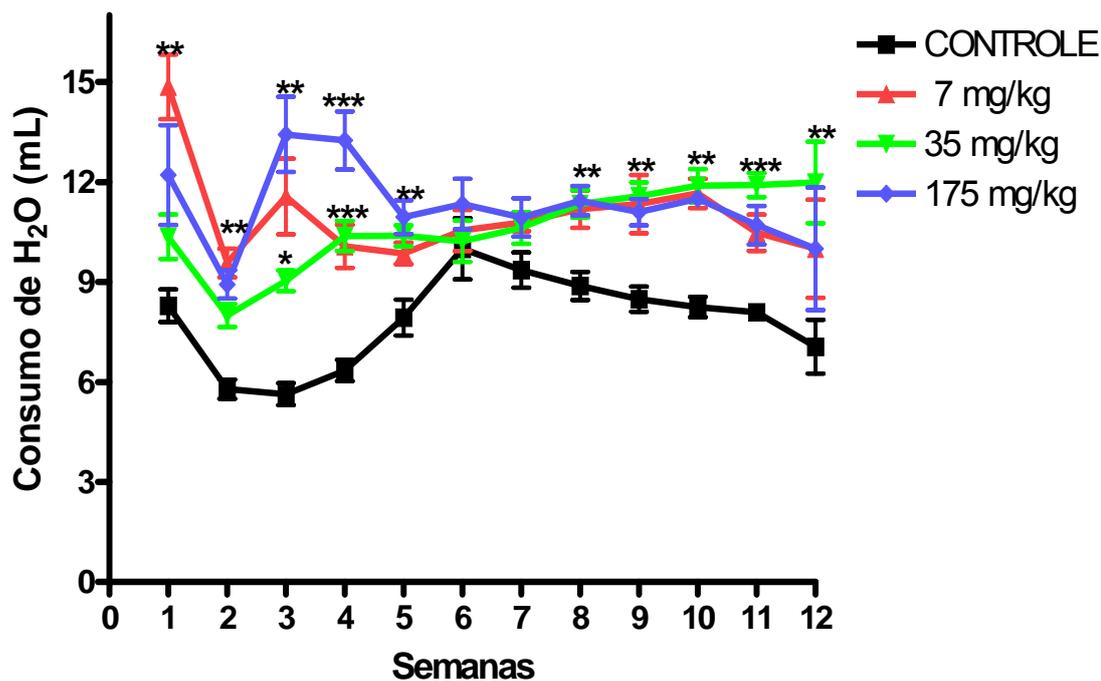
GRUPOS	SEMANAS					
	7	8	9	10	11	12
MACHOS						
CONTROLE	6,86 $\pm$ 0,20	7,06 $\pm$ 0,14	7,18 $\pm$ 0,23	6,77 $\pm$ 0,15	6,86 $\pm$ 0,22	7,43 $\pm$ 0,93
7mg/kg	6,35 $\pm$ 0,11	6,77 $\pm$ 0,28	7,02 $\pm$ 0,29	6,76 $\pm$ 0,17	6,81 $\pm$ 0,16	7,27 $\pm$ 0,51
35mg/kg	5,99 $\pm$ 0,18**	6,61 $\pm$ 0,15	6,70 $\pm$ 0,13	7,31 $\pm$ 0,15	6,73 $\pm$ 0,08	6,05 $\pm$ 0,44
175mg/kg	6,34 $\pm$ 0,13	6,41 $\pm$ 0,38	6,69 $\pm$ 0,28	6,76 $\pm$ 0,25	6,17 $\pm$ 0,67	6,07 $\pm$ 0,87
FÊMEAS						
CONTROLE	5,17 $\pm$ 0,15	4,97 $\pm$ 0,10	5,26 $\pm$ 0,13	4,99 $\pm$ 0,14	5,01 $\pm$ 0,17	3,97 $\pm$ 0,48
7mg/kg	4,55 $\pm$ 0,10*	4,83 $\pm$ 0,15	4,94 $\pm$ 0,20	4,94 $\pm$ 0,14	4,81 $\pm$ 0,25	4,27 $\pm$ 0,16
35mg/kg	5,29 $\pm$ 0,26	4,94 $\pm$ 0,19	4,72 $\pm$ 0,12	4,93 $\pm$ 0,14	4,79 $\pm$ 0,14	4,74 $\pm$ 0,41
175mg/kg	4,93 $\pm$ 0,12	5,17 $\pm$ 0,14	5,21 $\pm$ 0,13	5,05 $\pm$ 0,13	4,84 $\pm$ 0,21	4,62 $\pm$ 0,57

**TABELA 9-** Consumo semanal de água por camundongo (em mL) durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnett.\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

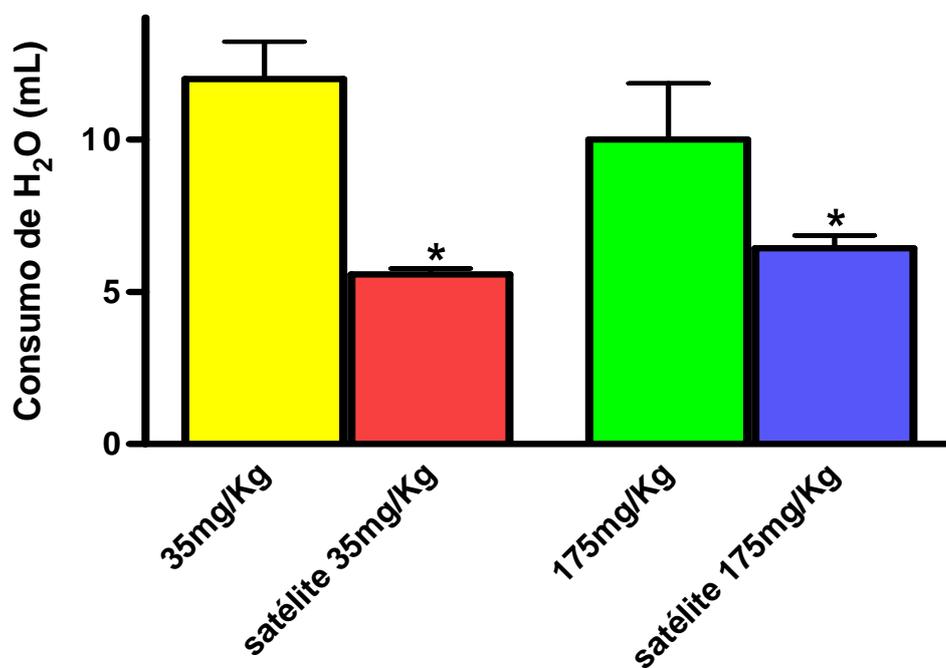
GRUPOS	SEMANAS					
	1	2	3	4	5	6
MACHOS						
CONTROLE	10,56 $\pm$ 0,73	8,48 $\pm$ 0,33	6,33 $\pm$ 0,58	8,36 $\pm$ 0,30	8,97 $\pm$ 0,37	9,38 $\pm$ 0,65
7mg/kg	15,57 $\pm$ 1,19*	8,07 $\pm$ 0,67	8,21 $\pm$ 0,49*	8,78 $\pm$ 0,39	10,07 $\pm$ 0,76	10,50 $\pm$ 0,44
35mg/kg	12,93 $\pm$ 1,09	8,50 $\pm$ 0,32	7,57 $\pm$ 0,22*	8,21 $\pm$ 0,43	8,50 $\pm$ 0,34	9,71 $\pm$ 0,55
175mg/kg	12,71 $\pm$ 1,06	8,00 $\pm$ 0,37	8,07 $\pm$ 0,33	8,28 $\pm$ 0,28	8,42 $\pm$ 0,31	8,92 $\pm$ 0,56
FÊMEAS						
CONTROLE	8,28 $\pm$ 0,48	5,78 $\pm$ 0,28	5,63 $\pm$ 0,32	6,34 $\pm$ 0,31	7,93 $\pm$ 0,53	9,99 $\pm$ 0,92
7mg/kg	14,86 $\pm$ 0,96**	9,57 $\pm$ 0,42**	11,57 $\pm$ 1,13**	10,07 $\pm$ 0,64*	9,85 $\pm$ 0,32*	10,55 $\pm$ 0,61
35mg/kg	10,36 $\pm$ 0,66	8,0 $\pm$ 0,34**	9,03 $\pm$ 0,31*	10,38 $\pm$ 0,44*	10,39 $\pm$ 0,31**	10,23 $\pm$ 0,61
175mg/kg	12,21 $\pm$ 1,49*	8,92 $\pm$ 0,42**	13,43 $\pm$ 1,12**	13,25 $\pm$ 0,86***	10,95 $\pm$ 0,50**	11,34 $\pm$ 0,75

**TABELA 9-** Consumo semanal de água por camundongo (em mL) durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. (Continuação)

GRUPOS	SEMANAS					
	7	8	9	10	11	12
MACHOS						
CONTROLE	9,99 $\pm$ 0,56	9,79 $\pm$ 0,30	9,69 $\pm$ 0,30	9,58 $\pm$ 0,48	10,61 $\pm$ 0,36	9,49 $\pm$ 1,69
7mg/kg	10,29 $\pm$ 0,37	9,57 $\pm$ 0,50	12,67 $\pm$ 0,63**	10,31 $\pm$ 0,66	11,27 $\pm$ 0,43	11,19 $\pm$ 1,21
35mg/kg	9,21 $\pm$ 0,42	9,59 $\pm$ 0,33	10,09 $\pm$ 0,41	11,02 $\pm$ 0,37*	10,72 $\pm$ 1,24	12,62 $\pm$ 1,18
175mg/kg	9,42 $\pm$ 0,51	8,92 $\pm$ 0,75	10,93 $\pm$ 0,42	10,93 $\pm$ 0,36	10,43 $\pm$ 0,46	9,35 $\pm$ 1,07
FÊMEAS						
CONTROLE	9,35 $\pm$ 0,53	8,88 $\pm$ 0,41	8,48 $\pm$ 0,37	8,25 $\pm$ 0,30	8,09 $\pm$ 0,20	7,06 $\pm$ 0,81
7mg/kg	10,79 $\pm$ 0,26	11,19 $\pm$ 0,56**	11,34 $\pm$ 0,87**	11,66 $\pm$ 0,43**	10,48 $\pm$ 0,54*	10,00 $\pm$ 1,47
35mg/kg	10,63 $\pm$ 0,47	11,34 $\pm$ 0,41**	11,58 $\pm$ 0,40**	11,89 $\pm$ 0,49**	11,91 $\pm$ 0,36***	11,99 $\pm$ 1,22**
175mg/kg	10,94 $\pm$ 0,57	11,44 $\pm$ 0,43**	11,10 $\pm$ 0,39**	11,50 $\pm$ 0,23**	10,71 $\pm$ 0,57*	10,00 $\pm$ 1,84



**GRÁFICO 8** - Consumo de água (em mL) por camundongos fêmeas tratadas durante 12 semanas com 3 doses de EEB. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=10). ANOVA/Dunnett. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.



**GRÁFICO 9** - Consumo de água (em mL) por camundongos fêmeas dos grupos 35 e 175 mg/kg (semana 12) e satélites 35 e 175 mg/kg (semana 13). Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=10). Teste "t" de Student. \*p<0,05.

#### **4.2.5.PESO CORPORAL**

A avaliação ponderal revelou alterações estatisticamente significantes para fêmeas tratadas com as doses de 7 mg/kg (semana 7) e 35 mg/kg (semanas 6 e 9) e para os machos que receberam 7 mg/kg (semana 11), 35 mg/kg (semana 12) e 175 mg/kg (semana 12) de EEB.

Os resultados são mostrados na tabela 10.

**TABELA 10-** Variação da evolução ponderal de camundongos (em gramas) durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnett. \*\*p<0,01.

GRUPOS	SEMANAS					
	1	2	3	4	5	6
MACHOS						
CONTROLE	2,32 $\pm$ 0,67	1,88 $\pm$ 0,86	0,87 $\pm$ 0,18	0,37 $\pm$ 0,14	1,5 $\pm$ 0,28	0,47 $\pm$ 0,53
7mg/kg	2,44 $\pm$ 1,07	2,25 $\pm$ 0,68	1,60 $\pm$ 0,62	1,98 $\pm$ 0,64	0,64 $\pm$ 0,21	0,80 $\pm$ 0,38
35mg/kg	2,01 $\pm$ 0,62	4,02 $\pm$ 0,75	0,35 $\pm$ 0,65	-0,11 $\pm$ 0,84	0,92 $\pm$ 0,45	0,64 $\pm$ 0,51
175mg/kg	0,09 $\pm$ 0,45	2,20 $\pm$ 0,95	2,39 $\pm$ 0,46	1,43 $\pm$ 0,44	0,72 $\pm$ 0,24	0,92 $\pm$ 0,33
FÊMEAS						
CONTROLE	-0,28 $\pm$ 0,24	0,34 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,32	0,33 $\pm$ 0,45	0,26 $\pm$ 0,32	1,58 $\pm$ 0,31
7mg/kg	0,63 $\pm$ 0,45	0,39 $\pm$ 0,92	0,43 $\pm$ 0,43	0,41 $\pm$ 0,40	-0,31 $\pm$ 0,78	1,11 $\pm$ 0,50
35mg/kg	0,4 $\pm$ 0,44	0,13 $\pm$ 0,54	0,34 $\pm$ 0,46	1,24 $\pm$ 0,34	1,01 $\pm$ 0,50	-0,13 $\pm$ 0,39**
175mg/kg	0,16 $\pm$ 0,23	-0,33 $\pm$ 0,90	1,28 $\pm$ 0,49	0,01 $\pm$ 0,63	0,85 $\pm$ 0,38	1,64 $\pm$ 0,26

**TABELA 10-** Variação da evolução ponderal de camundongos (em gramas) durante as 12 semanas de tratamento crônico com diferentes doses do EEB. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/ Dunnett.\*p<0,05. (Continuação)

GRUPOS	SEMANAS						
	7	8	9	10	11	12	13
MACHOS							
CONTROLE	0,27 $\pm$ 0,39	0,85 $\pm$ 0,33	0,95 $\pm$ 0,35	0,37 $\pm$ 0,47	-0,31 $\pm$ 0,38	1,81 $\pm$ 0,38	0,58 $\pm$ 0,26
7mg/kg	0,03 $\pm$ 0,23	0,06 $\pm$ 0,25	1,05 $\pm$ 0,29	0,86 $\pm$ 0,42	-1,90 $\pm$ 0,64*	0,91 $\pm$ 0,65	-0,08 $\pm$ 0,37
35mg/kg	0,25 $\pm$ 0,42	0,74 $\pm$ 0,40	1,33 $\pm$ 0,30	-0,43 $\pm$ 0,50	0,04 $\pm$ 0,23	0,68 $\pm$ 0,17*	0,12 $\pm$ 0,19
175mg/kg	0,12 $\pm$ 0,38	1,09 $\pm$ 0,35	-0,61 $\pm$ 0,45	0,62 $\pm$ 0,55	0,67 $\pm$ 0,24	0,32 $\pm$ 0,63*	0,26 $\pm$ 0,41
FÊMEAS							
CONTROLE	0,73 $\pm$ 0,49	0,44 $\pm$ 0,34	1,13 $\pm$ 0,63	0,37 $\pm$ 0,52	0,32 $\pm$ 0,53	1,16 $\pm$ 0,60	-1,36 $\pm$ 1,03
7mg/kg	-0,95 $\pm$ 0,52*	0,55 $\pm$ 0,48	0,71 $\pm$ 0,54	0,31 $\pm$ 0,60	0,73 $\pm$ 0,37	-0,5 $\pm$ 0,51	-0,53 $\pm$ 0,46
35mg/kg	1,12 $\pm$ 0,29	0,44 $\pm$ 0,58	-0,73 $\pm$ 0,34*	0,63 $\pm$ 0,36	0,14 $\pm$ 0,38	0,92 $\pm$ 0,52	-0,26 $\pm$ 0,45
175mg/kg	-0,06 $\pm$ 0,39	0,78 $\pm$ 0,41	0,36 $\pm$ 0,39	1,44 $\pm$ 0,56	-0,02 $\pm$ 0,49	0,71 $\pm$ 0,26	-0,53 $\pm$ 0,32

#### 4.2.6. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL (TESTE DO CAMPO ABERTO)

Dentre os parâmetros avaliados neste teste houve aumento na ambulação de machos e fêmeas tratados com as doses de 7 e 35 mg/kg (2ª semana) e diminuição do número de bolos fecais para fêmeas na 2ª semana (dose de 7 mg/kg).

Os resultados são apresentados nas tabelas 11 a 14.

**TABELA 11-** Número de ambulações no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de *Zizyphus joazeiro* durante o ensaio crônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). One-way ANOVA/ Dunnett \*p<0,05.

GRUPOS	SEMANAS					
	2	4	6	8	10	12
<b>FÊMEAS</b>						
CONTROLE	31,40 $\pm$ 4,30	72,20 $\pm$ 11,70	39,50 $\pm$ 8,60	56,20 $\pm$ 2,20	48,00 $\pm$ 11,80	56,50 $\pm$ 11,10
7mg/kg	62,40 $\pm$ 12,60**	72,60 $\pm$ 12,50	36,00 $\pm$ 7,40	52,20 $\pm$ 12,80	59,00 $\pm$ 19,20	50,50 $\pm$ 3,80
35mg/kg	59,50 $\pm$ 3,60*	78,50 $\pm$ 8,70	36,00 $\pm$ 6,00	66,70 $\pm$ 17,70	54,50 $\pm$ 6,70	53,20 $\pm$ 3,00
175mg/kg	33,00 $\pm$ 2,30	61,70 $\pm$ 13,60	36,20 $\pm$ 2,60	47,50 $\pm$ 8,80	27,70 $\pm$ 10,30	44,00 $\pm$ 15,40
<b>MACHOS</b>						
CONTROLE	27,20 $\pm$ 7,20	67,00 $\pm$ 17,70	46,60 $\pm$ 12,80	85,00 $\pm$ 13,80	68,60 $\pm$ 16,60	91,30 $\pm$ 12,70
7mg/kg	62,60 $\pm$ 4,60**	91,40 $\pm$ 10,80	37,40 $\pm$ 7,70	73,80 $\pm$ 14,90	61,00 $\pm$ 11,70	67,60 $\pm$ 7,50
35mg/kg	58,00 $\pm$ 2,70**	70,40 $\pm$ 16,60	35,60 $\pm$ 8,40	77,50 $\pm$ 21,40	67,70 $\pm$ 27,80	77,70 $\pm$ 24,00
175mg/kg	38,40 $\pm$ 3,10	73,60 $\pm$ 6,10	35,00 $\pm$ 3,70	52,40 $\pm$ 11,90	40,80 $\pm$ 12,00	52,00 $\pm$ 12,50

**TABELA 12-** Frequência do comportamento “ levantar” no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de *Zizyphus joazeiro* durante o ensaio crônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). One-way ANOVA/ Dunnett

GRUPOS	SEMANAS					
	2	4	6	8	10	12
<b>FÊMEAS</b>						
CONTROLE	26,20 $\pm$ 4,60	23,00 $\pm$ 4,50	18,75 $\pm$ 7,70	17,50 $\pm$ 4,60	15,25 $\pm$ 6,00	15,75 $\pm$ 3,40
7 mg/kg	33,60 $\pm$ 6,00	26,00 $\pm$ 4,20	22,50 $\pm$ 6,90	18,50 $\pm$ 3,00	19,75 $\pm$ 5,30	15,50 $\pm$ 3,50
35mg/kg	26,50 $\pm$ 2,90	25,75 $\pm$ 1,90	12,00 $\pm$ 1,70	12,75 $\pm$ 3,10	16,50 $\pm$ 5,40	14,50 $\pm$ 2,30
175mg/kg	32,00 $\pm$ 3,80	20,50 $\pm$ 3,40	14,50 $\pm$ 4,00	13,50 $\pm$ 4,30	6,50 $\pm$ 2,60	7,25 $\pm$ 3,30
<b>MACHOS</b>						
CONTROLE	26,25 $\pm$ 8,80	22,33 $\pm$ 7,70	27,67 $\pm$ 4,80	19,33 $\pm$ 6,30	17,00 $\pm$ 6,80	23,67 $\pm$ 4,80
7 mg/kg	22,80 $\pm$ 2,40	24,40 $\pm$ 4,30	15,40 $\pm$ 5,70	20,60 $\pm$ 4,90	12,40 $\pm$ 3,10	15,80 $\pm$ 2,60
35 mg/kg	37,00 $\pm$ 1,50	18,60 $\pm$ 5,60	10,20 $\pm$ 3,80	17,50 $\pm$ 4,90	21,25 $\pm$ 8,10	19,50 $\pm$ 6,00
175 mg/kg	26,00 $\pm$ 2,10	20,80 $\pm$ 4,60	13,60 $\pm$ 3,80	18,20 $\pm$ 8,00	10,00 $\pm$ 6,50	12,60 $\pm$ 5,40

**TABELA 13-** Duração em segundos do comportamento “ auto-limpeza” no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de *Zizyphus joazeiro* durante o ensaio crônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). One-way ANOVA/ Dunnett

GRUPOS	SEMANAS					
	2	4	6	8	10	12
<b>FÊMEAS</b>						
CONTROLE	9,98 $\pm$ 3,50	5,05 $\pm$ 1,90	4,25 $\pm$ 0,70	6,25 $\pm$ 2,10	3,43 $\pm$ 1,70	1,33 $\pm$ 0,90
7mg/kg	5,48 $\pm$ 3,50	4,41 $\pm$ 2,60	9,32 $\pm$ 5,70	20,38 $\pm$ 9,20	6,29 $\pm$ 3,20	6,60 $\pm$ 2,90
35mg/kg	3,63 $\pm$ 1,40	0,79 $\pm$ 0,70	5,25 $\pm$ 3,50	4,37 $\pm$ 4,30	1,41 $\pm$ 1,10	0,60 $\pm$ 0,30
175mg/kg	2,19 $\pm$ 0,90	2,37 $\pm$ 0,80	2,00 $\pm$ 1,00	4,18 $\pm$ 1,50	1,63 $\pm$ 0,90	15,25 $\pm$ 15,20
<b>MACHOS</b>						
CONTROLE	2,37 $\pm$ 1,10	4,49 $\pm$ 4,40	4,13 $\pm$ 1,90	4,00 $\pm$ 2,60	3,27 $\pm$ 1,90	2,77 $\pm$ 2,10
7mg/kg	3,48 $\pm$ 1,40	2,51 $\pm$ 1,50	7,35 $\pm$ 1,90	2,13 $\pm$ 1,90	4,13 $\pm$ 1,80	7,43 $\pm$ 3,20
35mg/kg	4,01 $\pm$ 1,80	7,96 $\pm$ 4,30	8,39 $\pm$ 3,20	2,17 $\pm$ 1,70	2,23 $\pm$ 1,70	3,11 $\pm$ 1,20
175mg/kg	4,45 $\pm$ 2,60	4,36 $\pm$ 1,80	8,40 $\pm$ 2,80	3,73 $\pm$ 2,70	6,29 $\pm$ 3,40	1,36 $\pm$ 0,90

**TABELA 14-** Número de bolos fecais no experimento de campo aberto, em camundongos tratados com diferentes doses do EEB de *Zizyphus joazeiro*. durante o ensaio crônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). One-way ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05.

GRUPOS	SEMANAS					
	2	4	6	8	10	12
<b>FÊMEAS</b>						
CONTROLE	3,60 $\pm$ 0,90	4,25 $\pm$ 0,80	3,25 $\pm$ 0,80	5,0 $\pm$ 1,20	3,50 $\pm$ 1,00	1,25 $\pm$ 0,40
7mg/kg	2,60 $\pm$ 0,50	0,80 $\pm$ 0,30*	2,75 $\pm$ 0,90	1,50 $\pm$ 0,50	1,00 $\pm$ 0,50	1,25 $\pm$ 0,60
35mg/kg	4,00 $\pm$ 1,20	3,00 $\pm$ 1,00	2,25 $\pm$ 1,40	2,50 $\pm$ 0,80	1,25 $\pm$ 0,60	0,50 $\pm$ 0,50
175mg/kg	4,80 $\pm$ 1,10	3,75 $\pm$ 1,00	4,75 $\pm$ 1,20	5,50 $\pm$ 0,50	2,50 $\pm$ 0,60	1,75 $\pm$ 1,00
<b>MACHOS</b>						
CONTROLE	3,25 $\pm$ 2,00	2,66 $\pm$ 1,70	2,66 $\pm$ 0,60	3,33 $\pm$ 0,80	1,66 $\pm$ 0,80	1,33 $\pm$ 0,80
7mg/kg	3,80 $\pm$ 1,00	4,20 $\pm$ 0,80	1,60 $\pm$ 0,50	2,40 $\pm$ 0,20	2,00 $\pm$ 1,20	2,20 $\pm$ 1,00
35mg/kg	2,60 $\pm$ 0,80	2,80 $\pm$ 0,80	2,00 $\pm$ 0,60	1,50 $\pm$ 0,60	2,00 $\pm$ 1,10	1,75 $\pm$ 1,70
175mg/kg	3,80 $\pm$ 0,50	2,60 $\pm$ 0,20	2,80 $\pm$ 0,70	2,60 $\pm$ 0,20	2,40 $\pm$ 0,70	2,80 $\pm$ 0,30

#### 4.2.7.AVALIAÇÃO MOTORA (TESTE DO ROTA ROD)

Na avaliação da atividade motora dos animais através do teste do de Rota Rod não houve qualquer alteração no tempo de permanência na barra giratória em ambos os sexos nas 3 doses de EEB testadas, sendo que todos os animais permaneceram por 180 segundos na barra.

#### 4.2.8.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE SANGUE

##### 4.2.8.1.PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os resultados são mostrados nas tabelas 15 e 16 e gráficos 10, 11 e 12.

Com relação aos machos foram encontradas alterações significativas apenas nos dois grupos satélite (35 e 175 mg/kg), que apresentaram elevação dos níveis de creatinina e diminuição da uréia sérica. Também foi observado decréscimo de íons  $K^+$  e de íons  $Na^+$  (satélite 35 mg/kg).

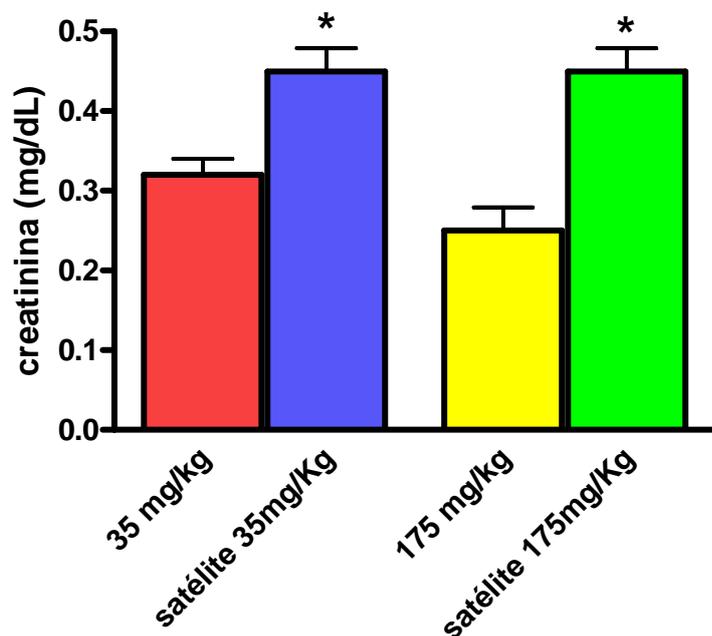
Entre os grupos de fêmeas, houve elevação de  $Na^+$  na dose de 35 mg/kg, além de aumento da creatinina sérica nos dois grupos satélite (35 e 175 mg/kg).

**TABELA 15-** Parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas tratados com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Kruskal-wallis/Dunn's. \*p<0,05.

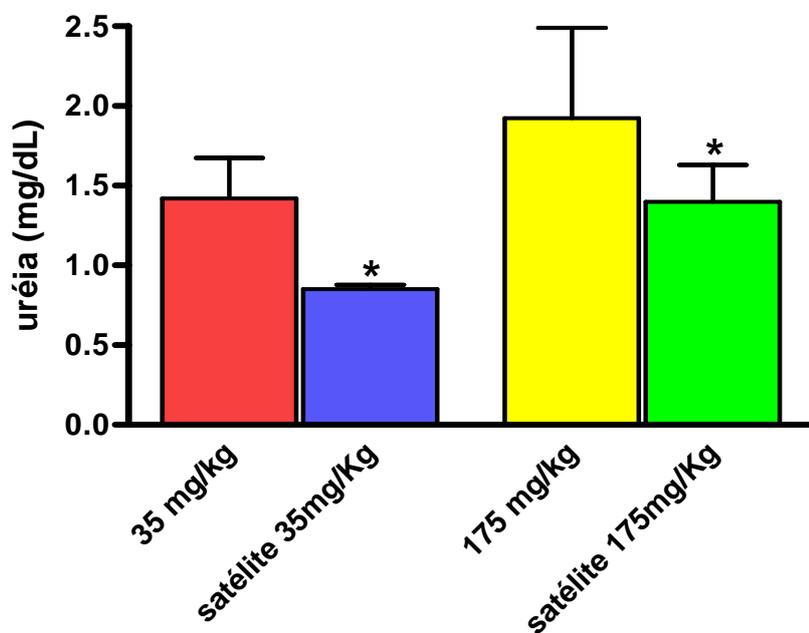
Parâmetro (unidade)	Grupos					
	Controle	7 mg/kg	35 mg/kg	175 mg/kg	Satélite 35 mg/kg	Satélite 175 mg/kg
Glicose (mg/dL)	102,7 $\pm$ 12,6	121,6 $\pm$ 10,36	136,3 $\pm$ 2,40	108,3 $\pm$ 10,48	103,5 $\pm$ 11,84	142,5 $\pm$ 2,02
Uréia (mg/dL)	27,67 $\pm$ 2,33	37,0 $\pm$ 9,07	19,33 $\pm$ 2,33	38,67 $\pm$ 4,05	32,5 $\pm$ 0,28	39,5 $\pm$ 2,02
Creatinina (mg/dL)	0,26 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02*	0,48 $\pm$ 0,02*
Colesterol Total (mg/dL)	67,67 $\pm$ 6,74	65,4 $\pm$ 3,54	73,33 $\pm$ 4,63	62,0 $\pm$ 7	59,0 $\pm$ 3,46	59 $\pm$ 2,88
Triglicerídeos (mg/dL)	138,7 $\pm$ 10,17	114,8 $\pm$ 11,55	145,0 $\pm$ 2,51	119,0 $\pm$ 9,0	43,5 $\pm$ 4,33	83,0 $\pm$ 5,77
Ácido úrico (mg/dL)	2,7 $\pm$ 1,53	1,54 $\pm$ 0,58	2,20 $\pm$ 1,20	1,20 $\pm$ 0,45	0,70 $\pm$ 0,17	0,70 $\pm$ 0,05
AST (U/l)	408,5 $\pm$ 113,5	268,6 $\pm$ 19,62	271,0 $\pm$ 45,0	303,3 $\pm$ 29,34	210,5 $\pm$ 3,17	174,5 $\pm$ 2,59
ALT (U/l)	74,5 $\pm$ 8,5	91,4 $\pm$ 27,05	69,0 $\pm$ 6,0	63,0 $\pm$ 11,36	56,5 $\pm$ 6,64	53,5 $\pm$ 1,44
Fosfatase Alcalina (U/l)	84,67 $\pm$ 9,28	85,25 $\pm$ 6,76	116,7 $\pm$ 20,19	126,0 $\pm$ 52,73	82,5 $\pm$ 0,28	118,5 $\pm$ 0,86
Proteínas Totais (g/dL)	7,0 $\pm$ 0,26	6,9 $\pm$ 0,3	6,56 $\pm$ 0,29	6,66 $\pm$ 0,41	6,25 $\pm$ 0,37	6,35 $\pm$ 0,14
Albumina (g/dL)	2,3 $\pm$ 0,3	2,53 $\pm$ 0,18	2,23 $\pm$ 0,06	1,76 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,08	1,95 $\pm$ 0,08
Globulinas (g/dL)	4,7 $\pm$ 0,2	4,55 $\pm$ 0,25	4,33 $\pm$ 0,31	4,9 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,46	4,4 $\pm$ 0,05
Sódio (mEq/L)	146,0 $\pm$ 0,57	146,7 $\pm$ 0,33	150,7 $\pm$ 0,33*	147,0 $\pm$ 1,15	150,0 $\pm$ 1,15	145,5 $\pm$ 0,28
Potássio (mEq/L)	7,3 $\pm$ 0,05	10,37 $\pm$ 0,03	7,56 $\pm$ 0,03	6,85 $\pm$ 0,20	8,0 $\pm$ 0,51	7,77 $\pm$ 0,02*
Cálcio (mEq/L)	9,46 $\pm$ 0,63	9,35 $\pm$ 0,15	8,5 $\pm$ 1,00	9,93 $\pm$ 0,35	9,9 $\pm$ 0,11	10,4 $\pm$ 0,17

**TABELA 16-** Parâmetros bioquímicos de camundongos machos tratados com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Kruskal-wallis/Dunn.. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

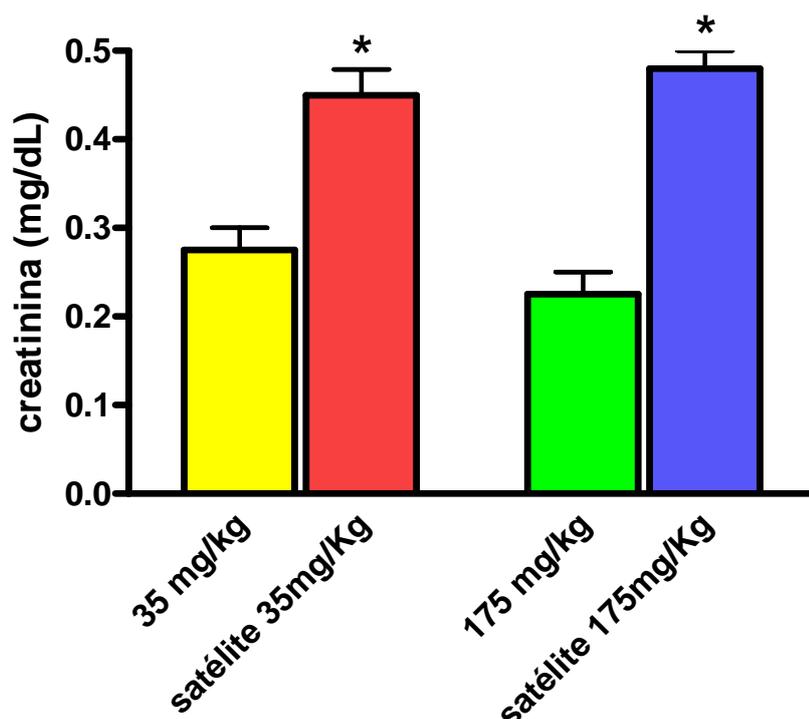
Parâmetro (unidade)	Grupos					
	Controle	7 mg/kg	35 mg/kg	175 mg/kg	Satélite 35 mg/kg	Satélite 175 mg/kg
Glicose (mg/dL)	80,25 $\pm$ 13,65	83,0 $\pm$ 11,85	106,2 $\pm$ 11,34	84,25 $\pm$ 8,33	87,5 $\pm$ 5,48	107,0 $\pm$ 15,01
Uréia (mg/dL)	53,00 $\pm$ 4,70	66,7 $\pm$ 4,60	48,25 $\pm$ 3,81	46,00 $\pm$ 3,80	25,5 $\pm$ 0,86*	32,00 $\pm$ 3,46*
Creatinina (mg/dL)	0,32 $\pm$ 0	0,35 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02*	0,45 $\pm$ 0,28*
Colesterol Total (mg/dL)	82,67 $\pm$ 1,66	79,5 $\pm$ 5,80	87,8 $\pm$ 6,85	90,0 $\pm$ 2,27	74,0 $\pm$ 0,57	86,0 $\pm$ 5,77
Triglicerídeos (mg/dL)	110,0 $\pm$ 11,31	139,8 $\pm$ 14,81	112,6 $\pm$ 9,90	78,75 $\pm$ 5,39	114,5 $\pm$ 23,38	75,0 $\pm$ 1,15
Ácido úrico (mg/dL)	2,45 $\pm$ 0,58	0,95 $\pm$ 0,15	1,42 $\pm$ 0,25	1,92 $\pm$ 0,56	0,85 $\pm$ 0,02	1,4 $\pm$ 0,23
AST (U/l)	240,0 $\pm$ 6,0	303,3 $\pm$ 19,47	199,0 $\pm$ 36,33	352,0 $\pm$ 115,8	173,5 $\pm$ 4,90	199,5 $\pm$ 7,21
ALT (U/l)	75,33 $\pm$ 5,84	66,67 $\pm$ 3,28	60,25 $\pm$ 8,66	70,75 $\pm$ 10,09	54,0 $\pm$ 3,46	53,0 $\pm$ 1,15
Fosfatase Alcalina (U/l)	72,0 $\pm$ 8,76	62,0 $\pm$ 5,58	51,67 $\pm$ 8,21	67,00 $\pm$ 8,02	61,5 $\pm$ 7,21	95,5 $\pm$ 1,44
Proteínas Totais (g/dL)	6,17 $\pm$ 0,16	6,45 $\pm$ 0,27	5,6 $\pm$ 0,23	6,12 $\pm$ 0,08	5,7 $\pm$ 0,34	6,27 $\pm$ 0,02
Albumina (g/dL)	1,97 $\pm$ 0,06	2,22 $\pm$ 0,11	1,72 $\pm$ 0,10	1,87 $\pm$ 0,08	1,35 $\pm$ 0,20	1,9 $\pm$ 0,17
Globulinas (g/dL)	4,2 $\pm$ 0,10	4,22 $\pm$ 0,20	3,87 $\pm$ 0,15	4,25 $\pm$ 0,02	4,35 $\pm$ 0,14	4,4 $\pm$ 0,17
Sódio (mEq/L)	146,3 $\pm$ 0,88	153,5 $\pm$ 2,5	153,0 $\pm$ 0,57	153,0 $\pm$ 2,30	149,5 $\pm$ 0,86*	150,5 $\pm$ 0,28
Potássio (mEq/L)	8,63 $\pm$ 0,33	8,55 $\pm$ 0,75	8,85 $\pm$ 0,31	8,35 $\pm$ 0,31	6,4 $\pm$ 0,05*	7,35 $\pm$ 0,49
Cálcio (mEq/L)	10,58 $\pm$ 0,44	9,55 $\pm$ 0,27	9,57 $\pm$ 0,34	10,20 $\pm$ 0,27	9,65 $\pm$ 0,25	10,28 $\pm$ 0,02



**GRÁFICO 10-** Valores de creatinina no soro de camundongos machos tratados com EEB durante 90 dias. Teste “t” de Student. \* $p < 0,05$ .



**GRÁFICO 11-** Valores de uréia no soro de camundongos machos tratados com EEB durante 90 dias. Teste “t” de Student. \* $p < 0,05$ .



**GRÁFICO 12-** Valores de creatinina no soro de camundongos fêmeas tratadas com EEB durante 90 dias. Teste “t” de Student. \* $p < 0,05$ .

#### 4.2.8.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

As tabelas 17 e 18 e gráficos 13 a 22 apresentam os resultados da análise hematológica, evidenciando que nos machos tratados com 7 e 35 mg/kg do extrato houve elevação do número de leucócitos, enquanto que no grupo satélite 35 mg/kg ocorreu uma diminuição desse número. Houve também decréscimo no HCM e na percentagem de neutrófilos dos dois grupos satélite, além de queda no VCM e percentagem aumentada de monócitos (satélite 175 mg/kg) e CHCM e percentagem de linfócitos reduzida com elevação de monócitos (satélite 35 mg/kg).

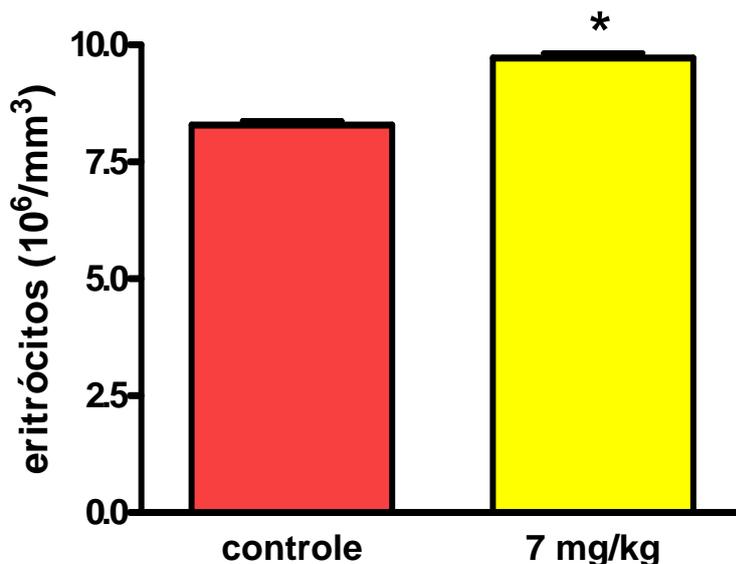
As alterações observadas em fêmeas foram: aumento de eritrócitos e hematócrito (7 mg/kg), diminuição de CHCM (7, 35 e 175 mg/kg), diminuição do número de leucócitos (35 e 175 mg/kg), percentagem reduzida de neutrófilos (7mg/kg e satélite 175 mg/kg), aumento na percentagem de eosinófilos (7 mg/kg) e monócitos (7 mg/kg e satélite 35 mg/kg) e aumento na percentagem de linfócitos e no VCM (satélite 175 mg/kg).

**TABELA 17-** Parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Kruskal-wallis/Dunn.\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

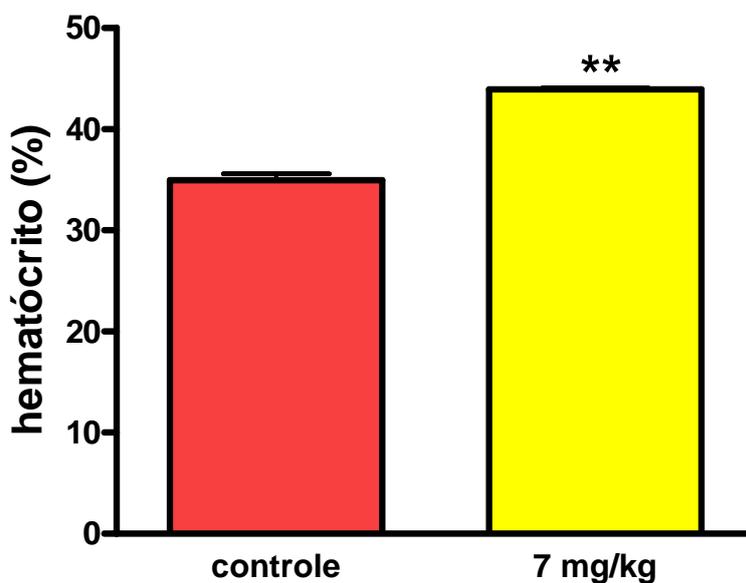
PARÂMETROS	GRUPOS					
	Controle	7 mg/kg	35 mg/kg	175 mg/kg	Satélite 35 mg/kg	Satélite 175 mg/kg
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,01 $\pm$ 0,22	9,17 $\pm$ 0,01	7,49 $\pm$ 0,25	8,92 $\pm$ 0,72	8,33 $\pm$ 0,44	9,14 $\pm$ 0,27
Hemoglobina (g/dL)	12,13 $\pm$ 0,16	13,20 $\pm$ 0,44	12,10 $\pm$ 0,49	13,54 $\pm$ 0,97	12,34 $\pm$ 0,55	13,10 $\pm$ 0,40
Hematócrito (%)	33,70 $\pm$ 0,63	37,80 $\pm$ 0,93	34,04 $\pm$ 1,72	38,60 $\pm$ 3,14	37,14 $\pm$ 2,03	37,10 $\pm$ 1,52
VCM ( $\mu^3$ )	42,20 $\pm$ 0,80	41,4 $\pm$ 1,12	45,0 $\pm$ 0,83	43,4 $\pm$ 0,4	44,4 $\pm$ 0,24	40,5 $\pm$ 0,24**
HCM ( $\mu\text{g}$ )	15,18 $\pm$ 0,21	14,34 $\pm$ 0,51	16,10 $\pm$ 0,15	15,3 $\pm$ 0,20	14,8 $\pm$ 0,08***	14,34 $\pm$ 0,02**
CHCM (%)	35,98 $\pm$ 0,31	34,8 $\pm$ 0,35	35,64 $\pm$ 0,46	35,22 $\pm$ 0,40	33,2 $\pm$ 0,31**	35,44 $\pm$ 0,35
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	3,74 $\pm$ 0,46	7,44 $\pm$ 0,51**	7,02 $\pm$ 0,62**	3,10 $\pm$ 0,57	4,0 $\pm$ 0,58**	2,94 $\pm$ 0,33
Neutrófilos (%)	20,8 $\pm$ 1,02	17,40 $\pm$ 4,25	26,0 $\pm$ 3,01	23,0 $\pm$ 2,70	8,0 $\pm$ 2,68**	9,0 $\pm$ 2,68*
Eosinófilos (%)	1,0 $\pm$ 0,0	0,40 $\pm$ 0,24	1,0 $\pm$ 0,0	0,20 $\pm$ 0,20 *	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,44
Linfócitos (%)	73,8 $\pm$ 1,74	74,4 $\pm$ 3,35	66,8 $\pm$ 3,48	71,20 $\pm$ 2,90	77,0 $\pm$ 2,23*	80,0 $\pm$ 4,02
Monócitos (%)	4,80 $\pm$ 1,20	7,40 $\pm$ 1,12	5,00 $\pm$ 0,31	5,40 $\pm$ 1,28	15,0 $\pm$ 0,44***	10,0 $\pm$ 0,89*
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	915 $\pm$ 79,04	1.092 $\pm$ 9,61	903,4 $\pm$ 139,7	767,8 $\pm$ 33,72	648 $\pm$ 107,3	640 $\pm$ 49,64

**TABELA 18-** Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas tratadas com diferentes doses do EEB durante o ensaio de toxicidade crônica. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Kruskal-wallis/Dunn. \*p<0,05.

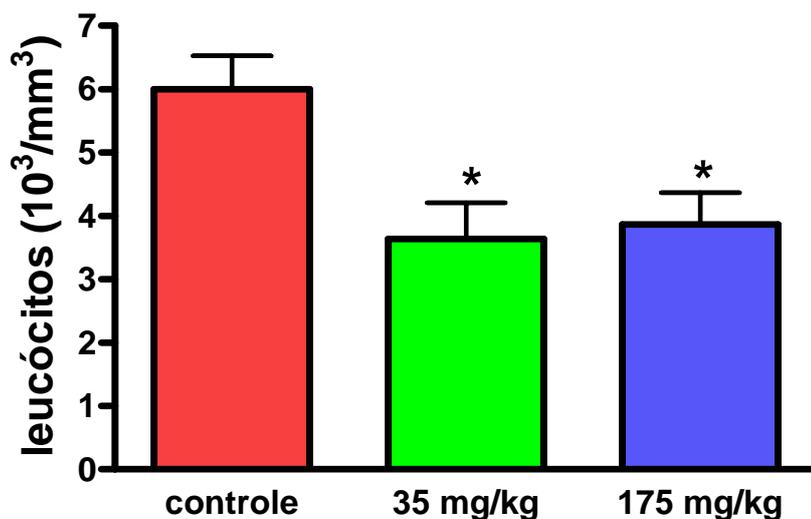
Parâmetro (unidade)	Grupos					
	Controle	7 mg/kg	35 mg/kg	175 mg/kg	Satélite 35 mg/kg	Satélite 175 mg/kg
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,29 $\pm$ 0,09	9,72 $\pm$ 0,10*	8,74 $\pm$ 0,63	8,59 $\pm$ 0,33	8,04 $\pm$ 0,18	8,18 $\pm$ 0,04
Hemoglobina (g/dL)	13,72 $\pm$ 0,14	14,60 $\pm$ 0,24	12,64 $\pm$ 0,37	12,54 $\pm$ 0,50	11,2 $\pm$ 0,89	12,94 $\pm$ 0,15
Hematócrito (%)	34,94 $\pm$ 0,63	43,9 $\pm$ 0,15**	35,7 $\pm$ 1,36	35,24 $\pm$ 1,35	32,2 $\pm$ 2,41	36,84 $\pm$ 0,33
VCM ( $\mu^3$ )	44,0 $\pm$ 0,63	45,0 $\pm$ 0,31	41,2 $\pm$ 1,59	41,2 $\pm$ 1,28	39,4 $\pm$ 2,01	45,0 $\pm$ 0,31*
HCM ( $\mu\mu\text{g}$ )	16,6 $\pm$ 0,32	15,12 $\pm$ 0,08	14,84 $\pm$ 0,69	14,70 $\pm$ 0,59*	13,74 $\pm$ 0,78	15,84 $\pm$ 0,11
CHCM (%)	37,7 $\pm$ 0,35	33,52 $\pm$ 0,42**	35,62 $\pm$ 0,40**	35,54 $\pm$ 0,34**	34,64 $\pm$ 0,20	35,14 $\pm$ 0,11
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	6,0 $\pm$ 0,52	4,35 $\pm$ 0,52	3,64 $\pm$ 0,56*	3,86 $\pm$ 0,50*	4,30 $\pm$ 0,80	3,10 $\pm$ 0,62
Neutrófilos (%)	20,20 $\pm$ 0,73	11,0 $\pm$ 0,31*	20,0 $\pm$ 4,78	20,40 $\pm$ 0,92	16,4 $\pm$ 5,14	8,40 $\pm$ 1,12**
Eosinófilos (%)	0,2 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4*	0,4 $\pm$ 0,24	1,2 $\pm$ 0,48	0,6 $\pm$ 0,24	0,6 $\pm$ 0,24
Linfócitos (%)	74,0 $\pm$ 0,63	78,2 $\pm$ 0,2	73,4 $\pm$ 5,15	70,4 $\pm$ 3,29	71,0 $\pm$ 5,81	82,0 $\pm$ 2,23*
Monócitos (%)	5,2 $\pm$ 0,48	8,2 $\pm$ 0,2*	5,4 $\pm$ 0,74	7,0 $\pm$ 3,01	12,0 $\pm$ 0,44***	9,0 $\pm$ 0,89
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	615,4 $\pm$ 42,2	937,2 $\pm$ 16,92	733 $\pm$ 173,8	494,0 $\pm$ 60,80	832 $\pm$ 125,2	610 $\pm$ 105,5



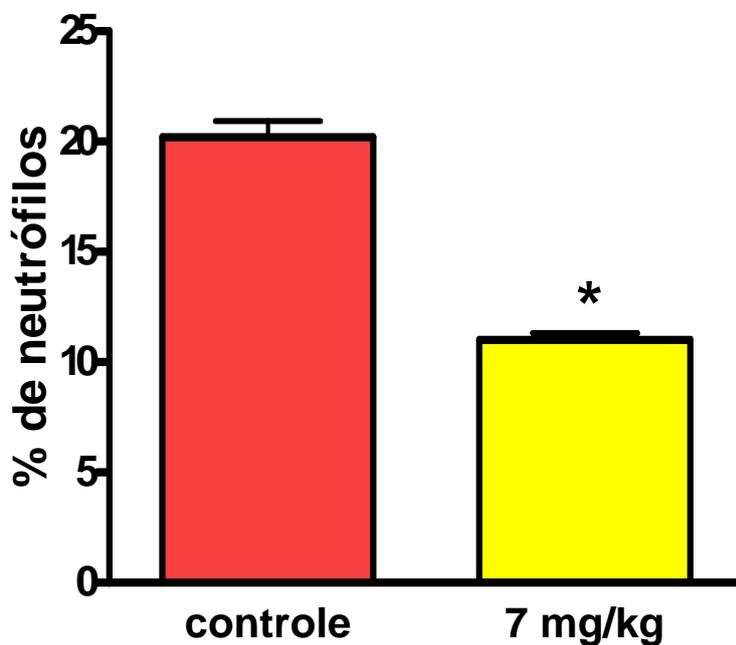
**GRÁFICO 13** – Contagem de eritrócitos no sangue de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05.



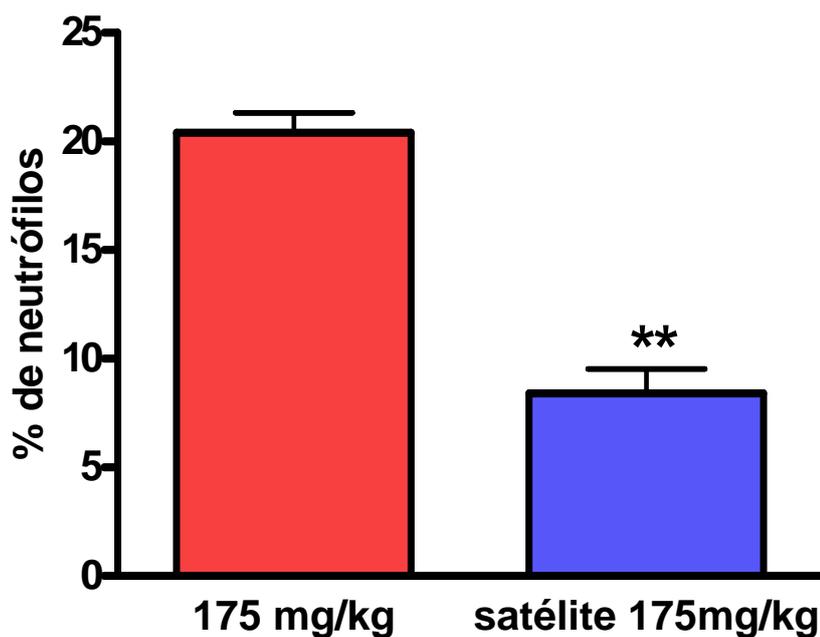
**GRÁFICO 14**– Valor de hematócrito de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05.



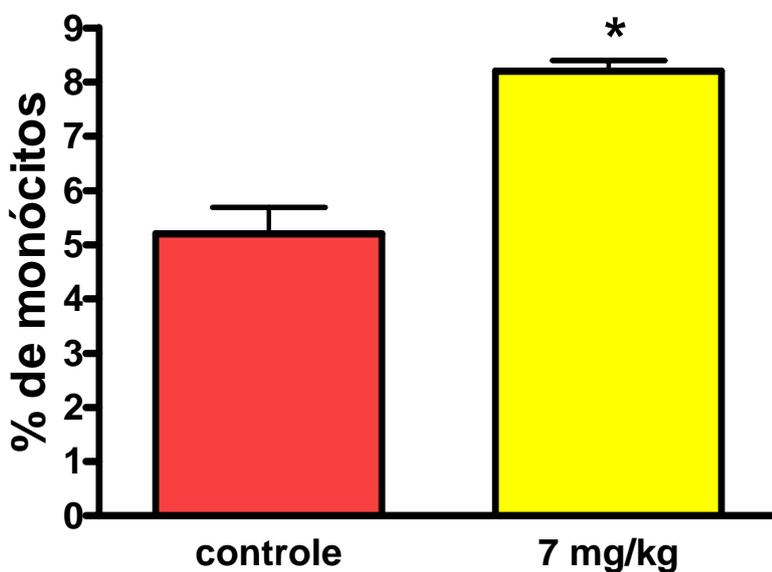
**GRÁFICO 15** - Contagem de leucócitos no sangue de camundongos fêmeas tratadas durante 12 semanas com diferentes doses de EEB *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05.



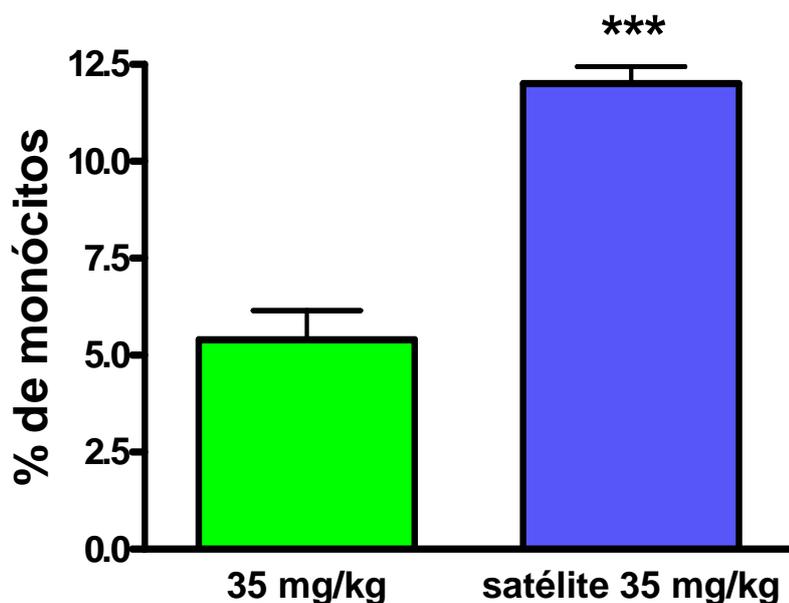
**GRÁFICO 16** – Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05.



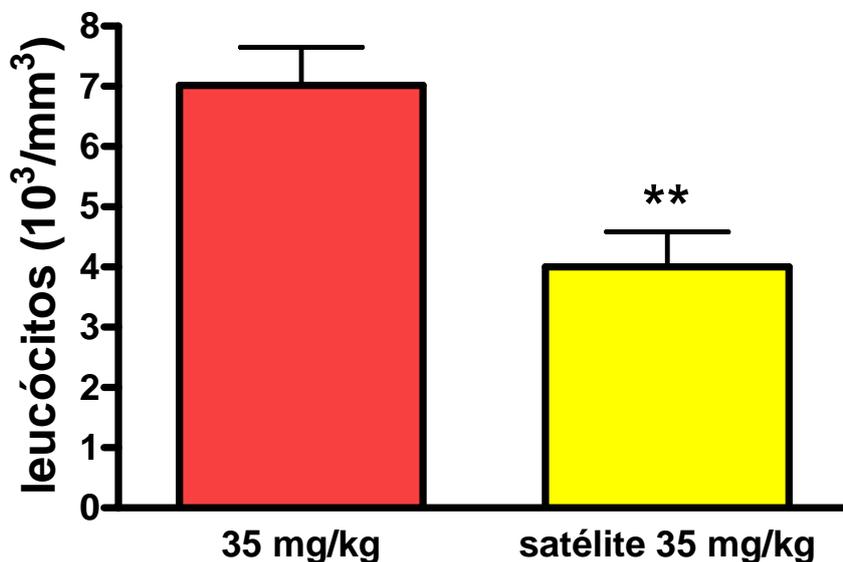
**GRÁFICO 17** – Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos fêmeas dos grupos 175 mg/kg e satélite 175 mg/kg submetidas a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. \* \*p<0,01.



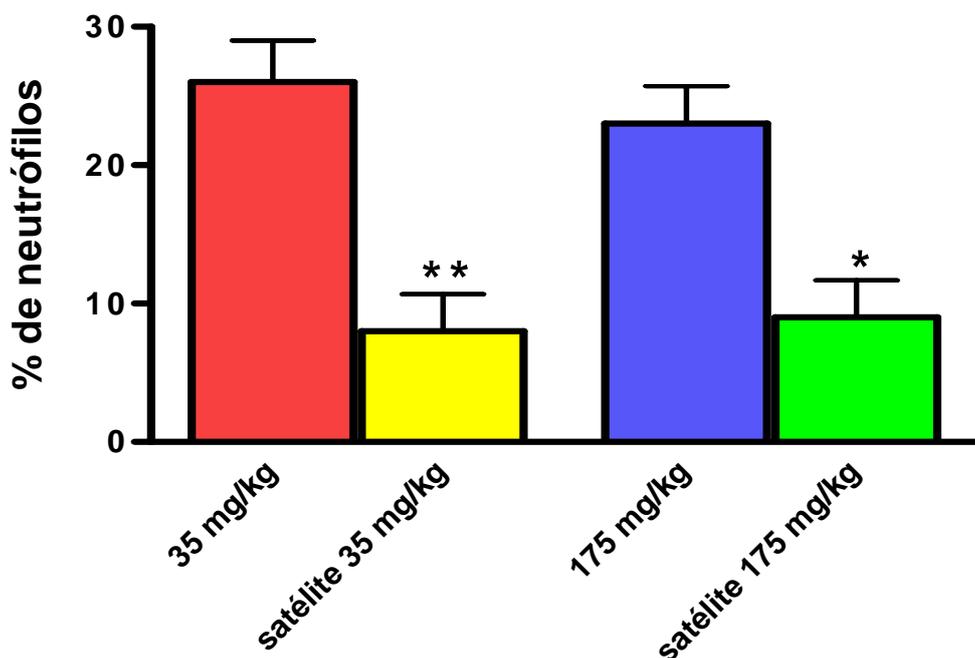
**GRÁFICO 18** – Percentagem de monócitos no sangue de camundongos fêmeas submetidas a tratamento prolongado com 7 mg/kg de EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). ANOVA/ Dunnett. \*p<0,05.



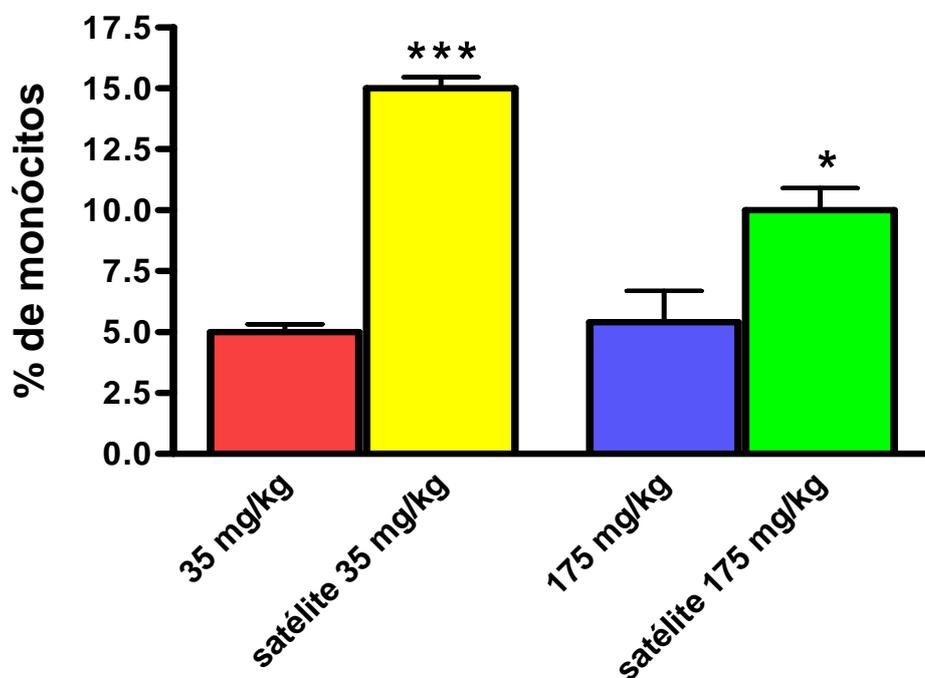
**GRÁFICO 19** – Percentagem de monócitos no sangue de camundongos fêmeas dos grupos 35 mg/kg e satélite 35 mg/kg submetidas a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. \* \*p<0,01.



**GRÁFICO 20** – Contagem de leucócitos no sangue de camundongos machos submetidos a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. \*\*p<0,01.



**GRÁFICO 21** – Percentagem de neutrófilos no sangue de camundongos machos submetidos a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01



**GRÁFICO 22** – Percentagem de monócitos no sangue de camundongos machos submetidos a tratamento prolongado com EEB de *Zizyphus joazeiro*. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01

#### 4.2.9. ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

Em relação ao peso dos órgãos não houve nenhuma alteração em ambos os sexos e em qualquer das doses administradas (tabela 19)

**TABELA 19-** Peso dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do EEB após o tratamento crônico. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=3). Mann Whitney/ Dunn.

GRUPOS	ÓRGÃOS			
	BAÇO	FÍGADO	CORAÇÃO	RINS
MACHOS				
CONTROLE	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,03	2,02 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,03
7mg/kg	0,24 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,01	2,12 $\pm$ 0,22	0,61 $\pm$ 0,03
35mg/kg	0,39 $\pm$ 0,13	0,21 $\pm$ 0,01	2,13 $\pm$ 0,10	0,58 $\pm$ 0,05
175mg/kg	0,29 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,01	2,06 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,03
FÊMEAS				
CONTROLE	0,17 $\pm$ 0,02	1,74 $\pm$ 0,12	0,14 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,03
7mg/kg	0,22 $\pm$ 0,02	1,73 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0	0,51 $\pm$ 0,04
35mg/kg	0,24 $\pm$ 0,06	1,79 $\pm$ 0,14	0,18 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,05
175mg/kg	0,33 $\pm$ 0,10	1,81 $\pm$ 0,12	0,16 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,13

Algumas alterações foram observadas a análise macroscópica. Estas incluíam: nos camundongos machos a presença de material purulento no interior dos rins (7 mg/kg), formação de massas endurecidas sobre os rins e manchas gordurosas no fígado (35 mg/kg), manchas amarelo-escuras de distribuição homogênea nos rins (175 mg/kg) e nas fêmeas foram observadas manchas gordurosas no fígado (35 mg/kg). Além disso, uma fêmea tratada com 175mg/kg do extrato apresentou os rins aderidos ao intestino com formação de massas endurecidas sobre os mesmos e a presença de uma massa tumoral vascularizada na região mediastínica que impossibilitou a separação de pulmões e coração.

Um animal macho do grupo tratado com a dose de 175 mg/kg EEB veio a óbito morto antes do término do período experimental, bem como uma fêmea também tratada com a dose de 175 mg/kg e apresentado uma massa tumoral abdominal.

A análise macroscópica dos órgãos do macho revelou que os pulmões encontravam-se endurecidos e repletos de material purulento, o que acabou por impedir sua conservação em formol para posterior análise histológica, ao contrário dos outros órgãos. Quanto à fêmea, o tumor excisado constituía-se em uma massa endurecida cercada por tecido necrosado e os rins apresentaram morfologia anormal (atrofia) e manchas enegrecidas. Os órgãos não foram analisados histologicamente.



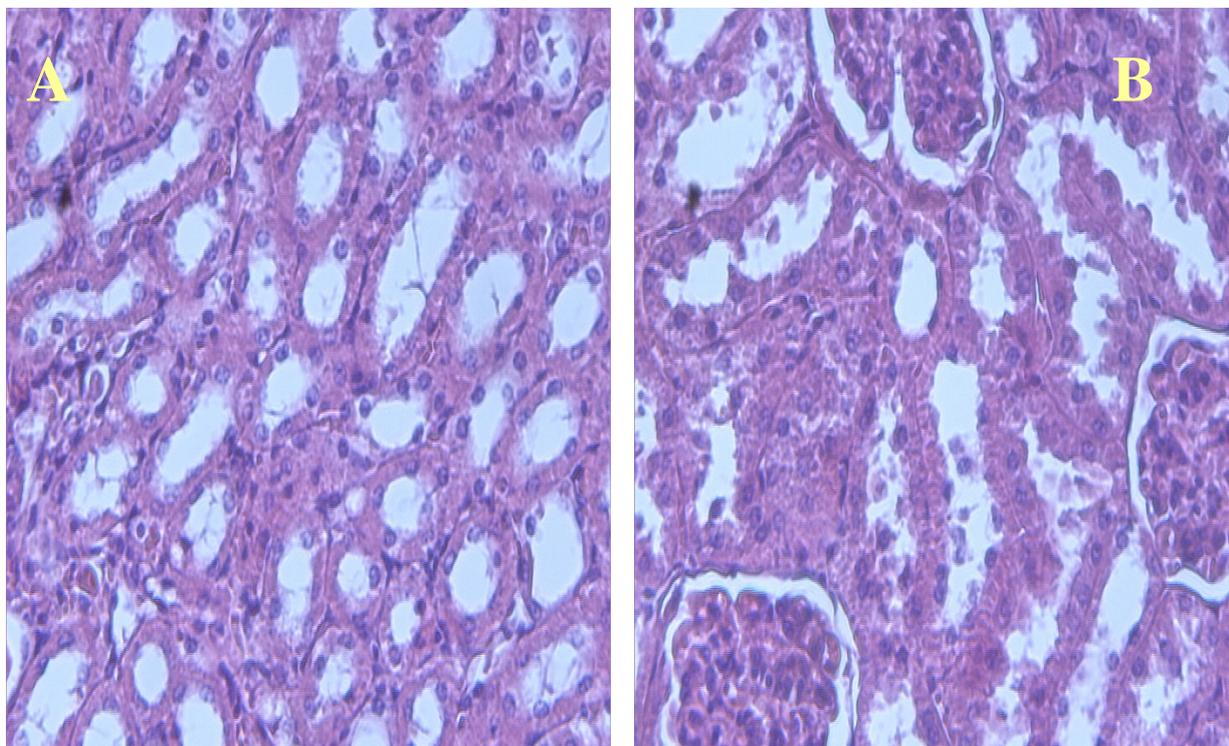
**FIGURA 5**-Rim de animal tratado cronicamente com EEB de *Z. joazeiro* apresentando massa endurecida.



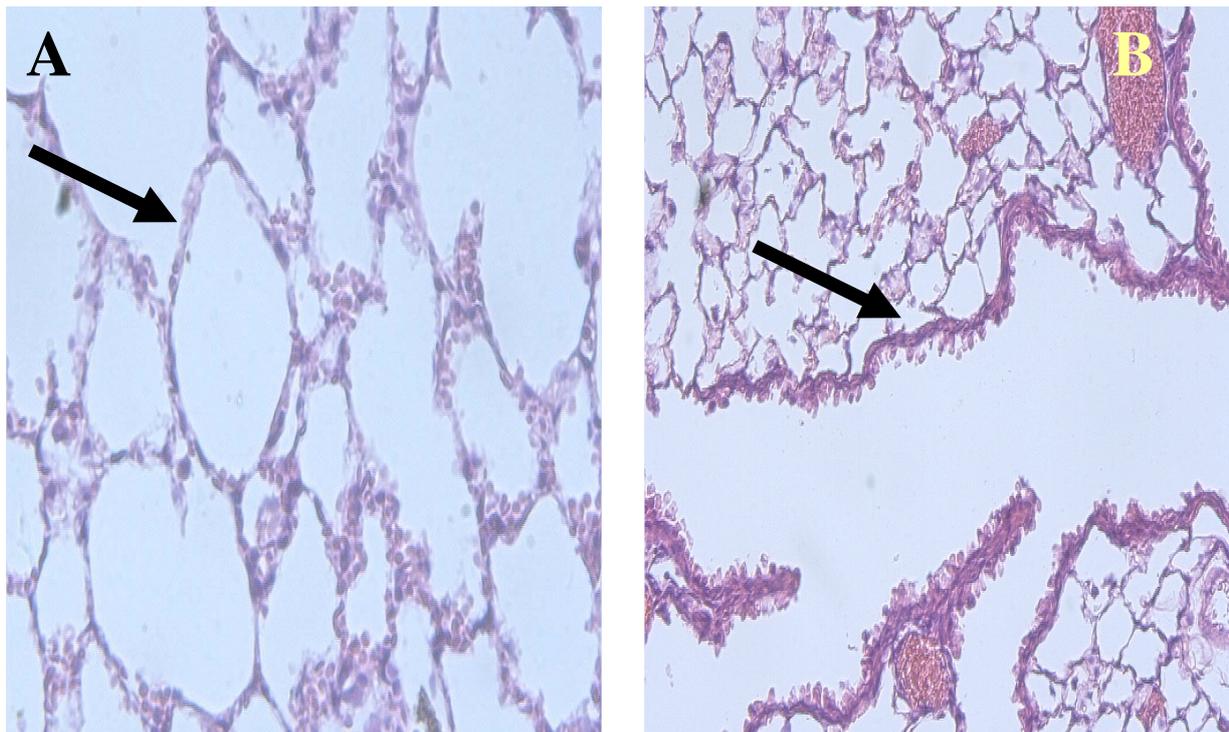
**FIGURA 6**-Tumor retirado de fêmea tratada cronicamente com 175 mg/kg de EEB de *Z. joazeiro*.

A seguir são apresentadas imagens histológicas das vísceras de animais controle, mostrando seu aspecto de normalidade.

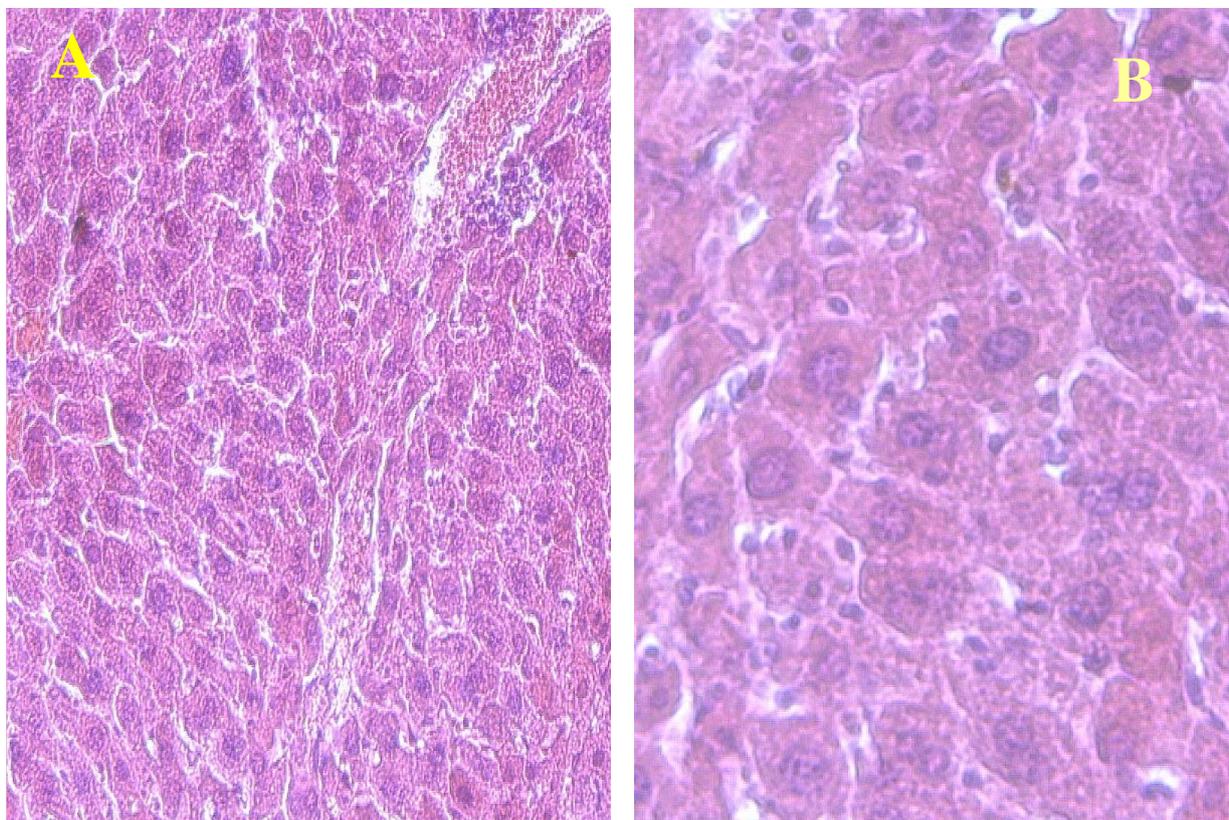
- ❖ Rins com arquitetura lobular preservada e limites corticomedulares bem definidos. Túbulos coletores e glomérulos preservados (Figura 7).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos (Figura 8).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada e hepatócitos bem conservados (Figura 9).
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal (Figura 10).



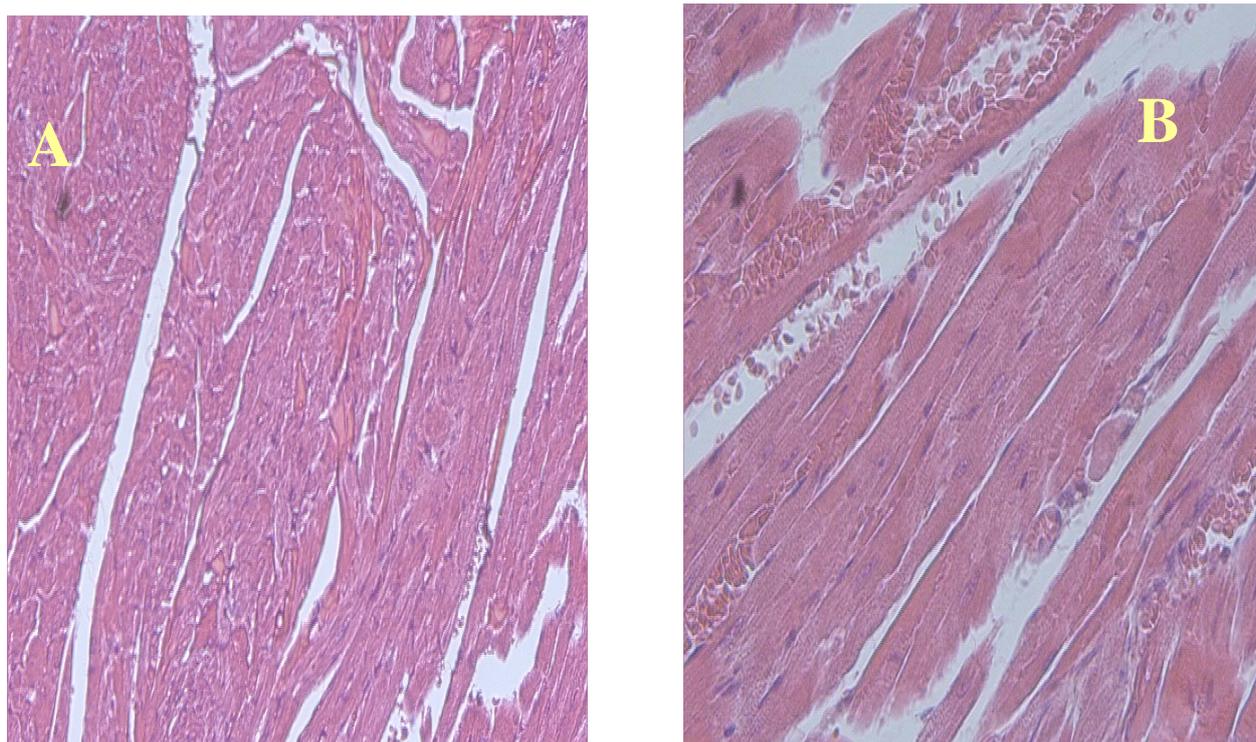
**FIGURA 7** - Rim de camundongo controle (HE x 400): A=região medular, B= região cortical



**FIGURA 8** – Pulmão de camundongo controle: A= alvéolos (HE X400), B= bronquíolo (HE X 200)



**FIGURA 9** – Hepatócitos do fígado de camundongos controle (HE): A= X200, B= X400

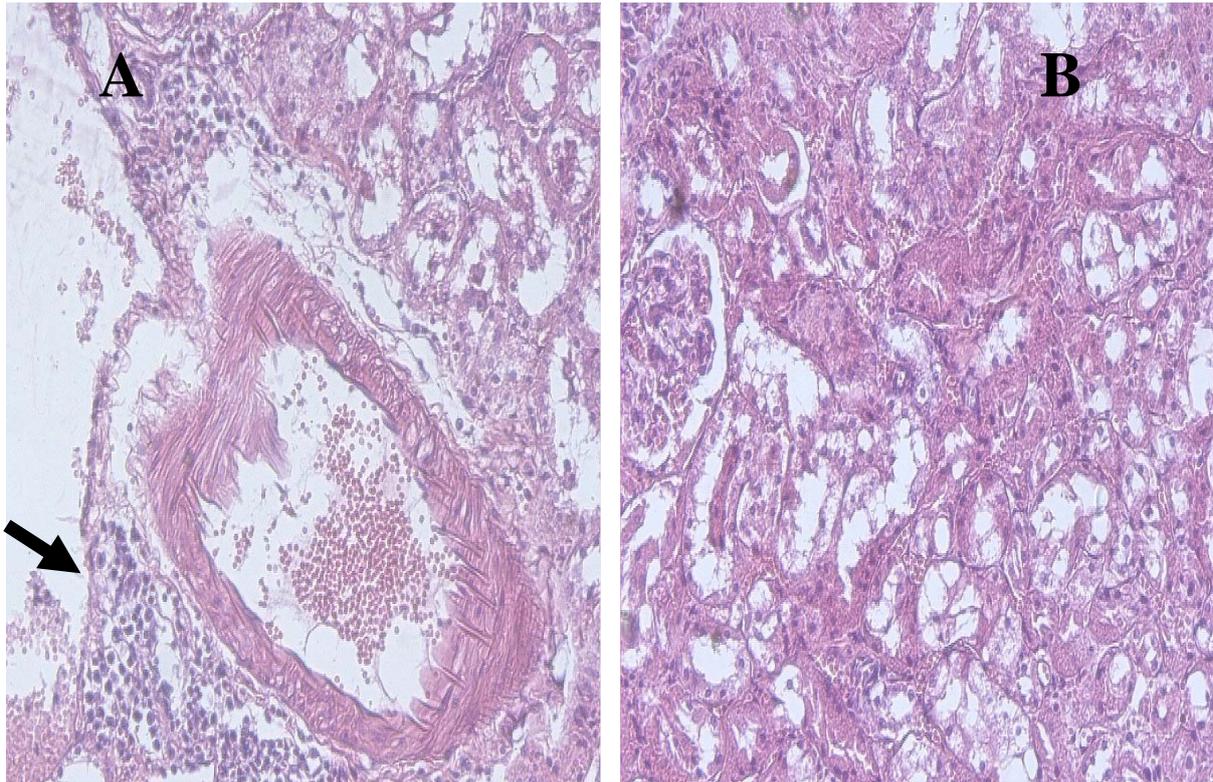


**FIGURA 10** – Fibras cardíacas de camundongo controle (HE): A=X200, B= X400

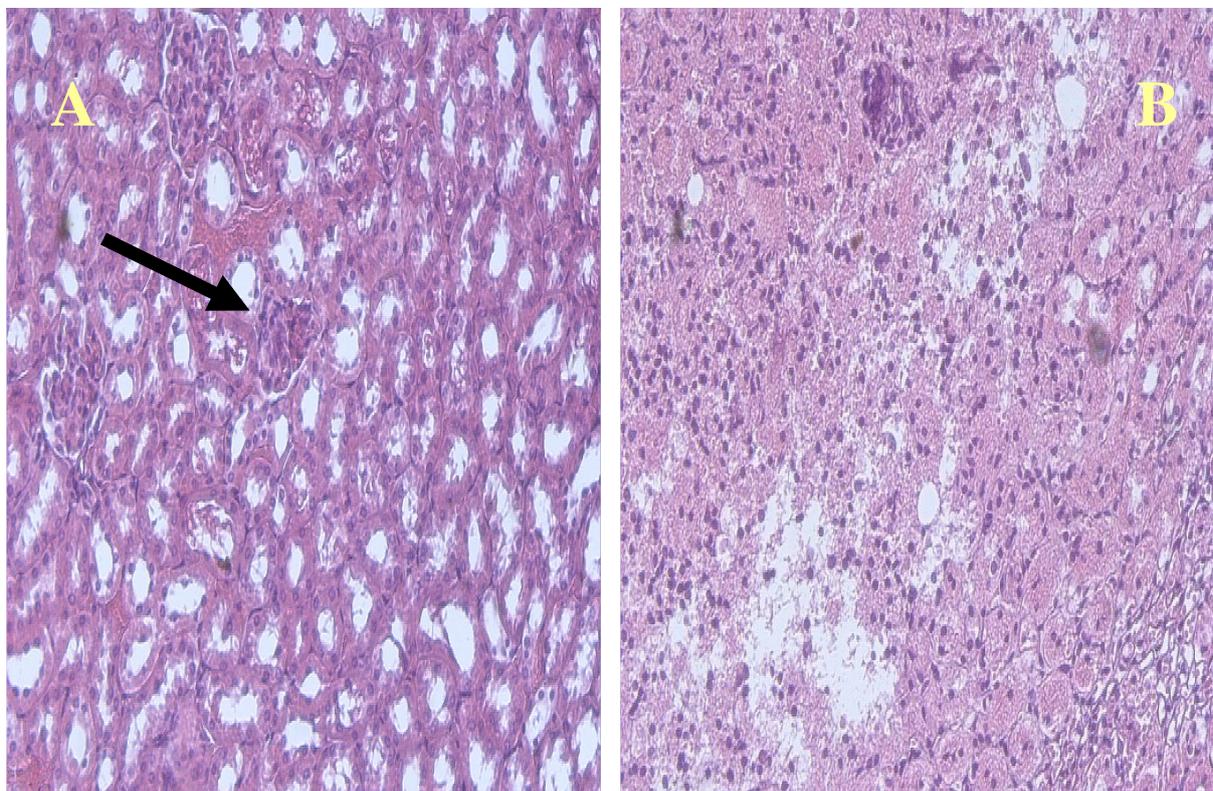
O exame histológico das vísceras dos animais tratados revelou inúmeras alterações descritas a seguir:

#### **I- Machos tratados com 7mg/kg do extrato**

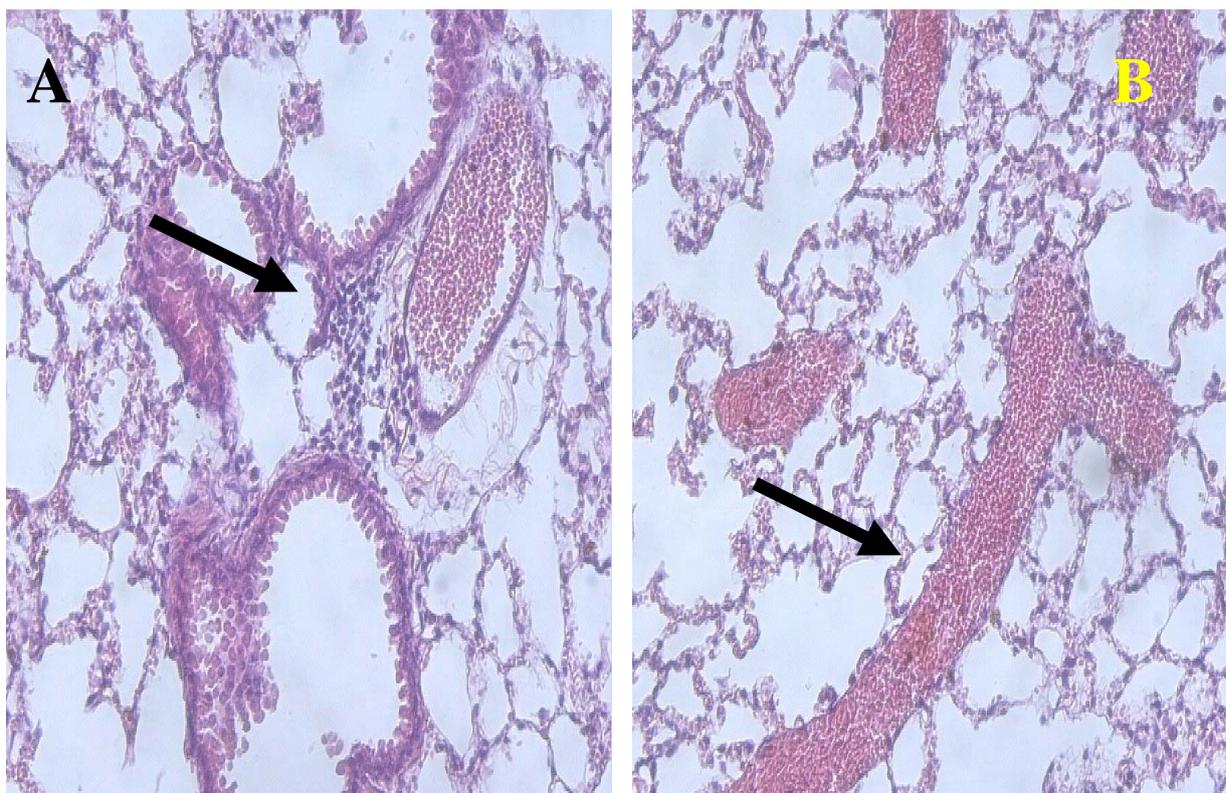
- ❖ Rins apresentando infiltrados linfocitários perivasculares (Figura 11 A), glomérulos bem distribuídos, porém com espaço capsular reduzido (Figura 12 A). Foi observada uma área de extenso dano tecidual (Figura 12 B), com desarranjo estrutural na região medular (Figura 11 B).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos, apresentando vasos congestionados de paredes finas (Figura 13 B) com infiltrados perivasculares (Figura 13 A).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados e vasos congestionados.
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



**FIGURA 11**– Rim de camundongos machos tratados com 7 mg/kg de EEB: A= infiltrado perivascular (HE X200), B= desarranjo na região medular (HE X200)



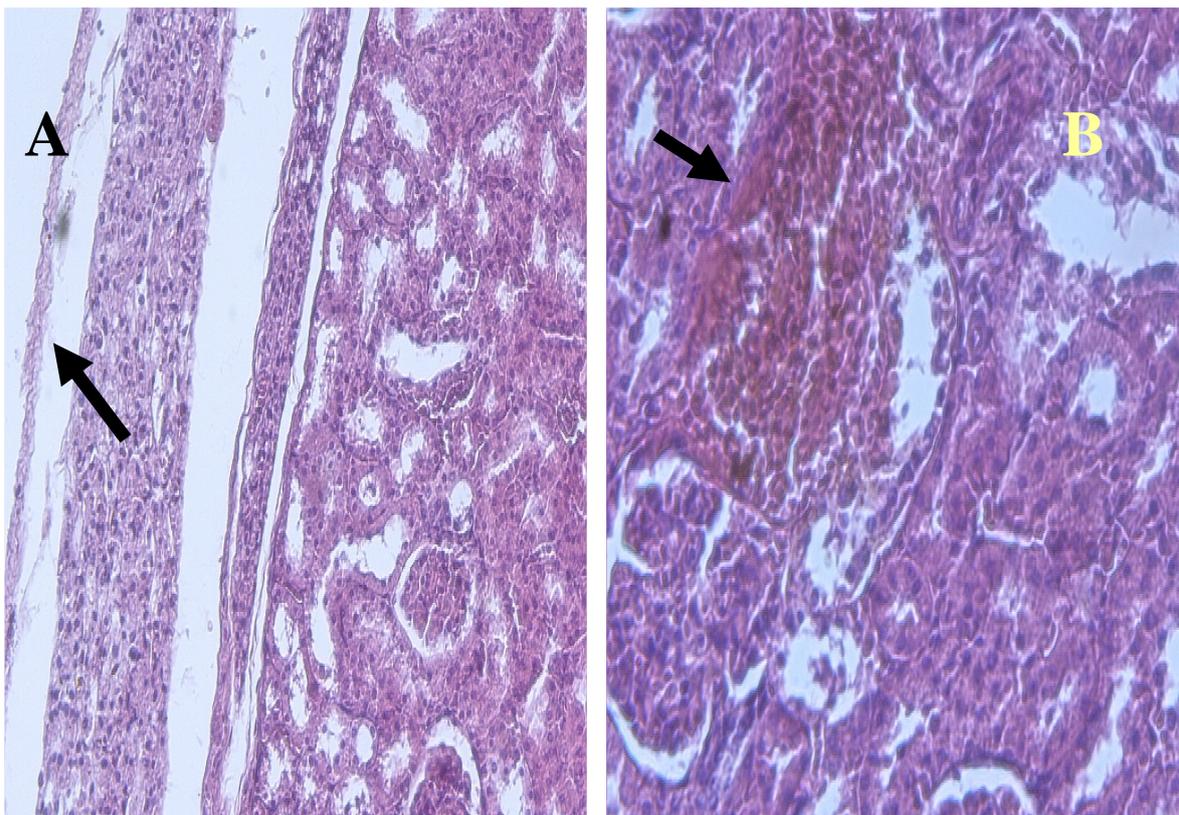
**FIGURA 12** – Rim de camundongos machos tratados com 7 mg/kg de EEB: A= espaço capsular reduzido (HE X200), B= região anormal no interior do rim (HE X200)



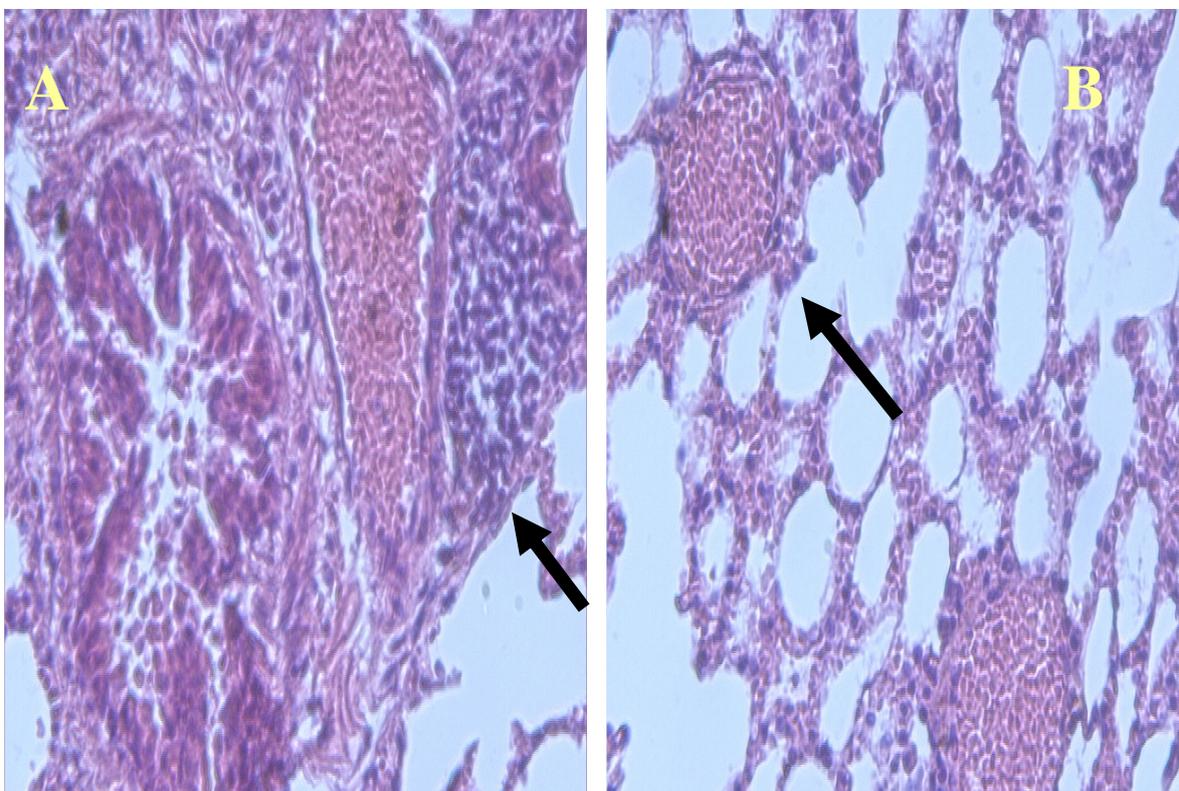
**FIGURA 13** – Pulmão de camundongos machos tratados com 7 mg/kg EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X200), B= congestão vascular (HE X200)

## II-Machos tratados com 35 mg/kg do extrato

- ❖ Rins com arquitetura lobular preservada e limites corticomedulares bem definidos, apresentando vasos congestionados (Figura 14 B) e cápsula envolta por material fibrinoso frouxo (Figura 14 A).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos, septos pulmonares repletos de sangue (Figura 15 B), vasos congestionados e presença de infiltrados linfocitários peribronquiolares (Figura 15 A).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados e vasos congestionados.
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



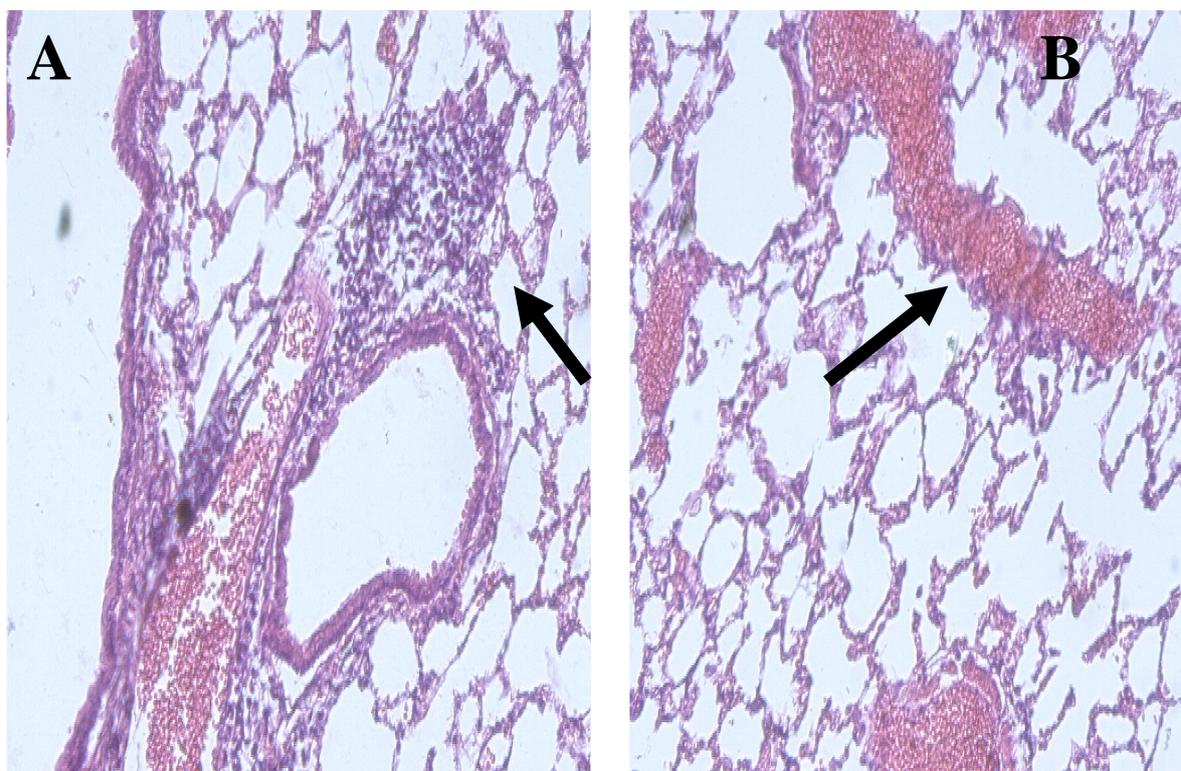
**FIGURA 14**– Rim de camundongo machos tratado com 35 mg/kg de EEB: A= região fibrinosa no exterior da cápsula renal (HE X200), B= congestão (HE X400)



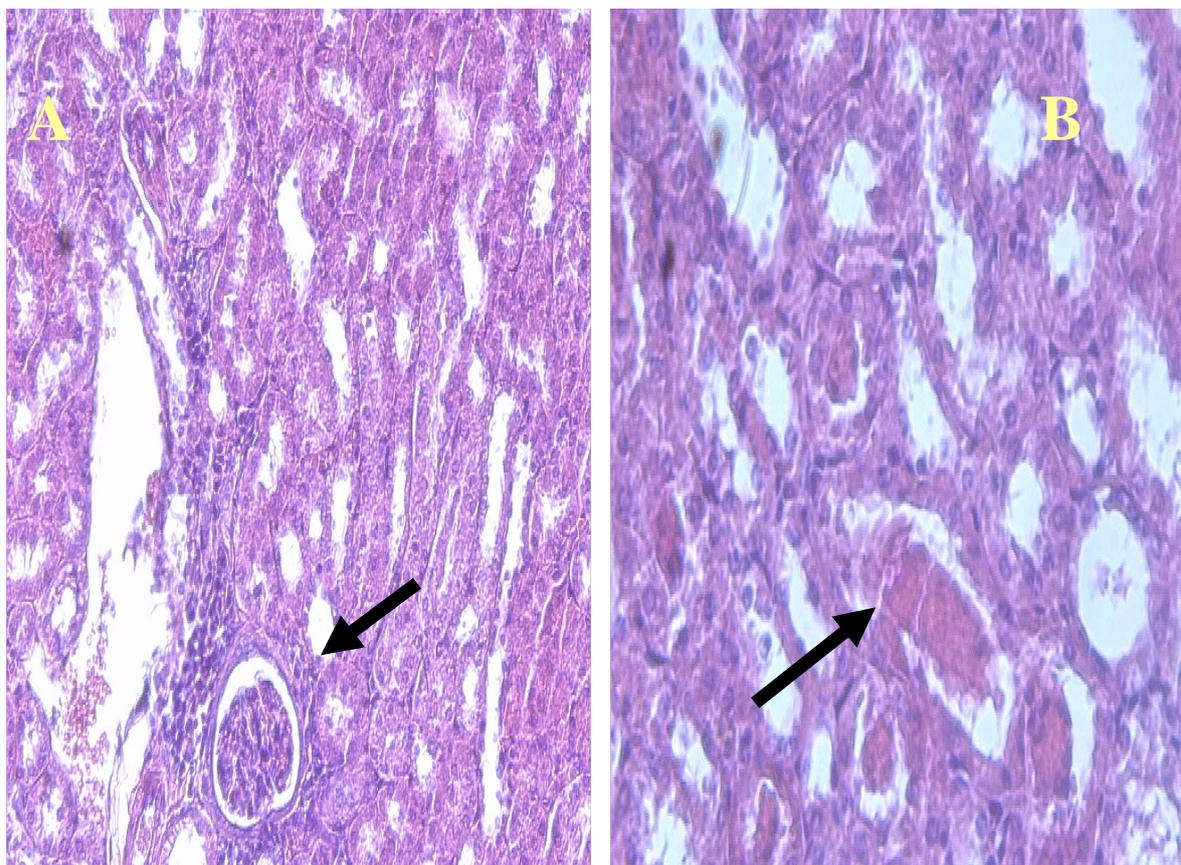
**FIGURA 15** – Pulmão de camundongos machos tratados com 35 mg/kg de EEB: A= congestão vascular e infiltrado linfocitário (HE X400), B= espessamento da parede alveolar e congestão dos septos (HE X200)

### III-Machos tratados com 175 mg/kg do extrato

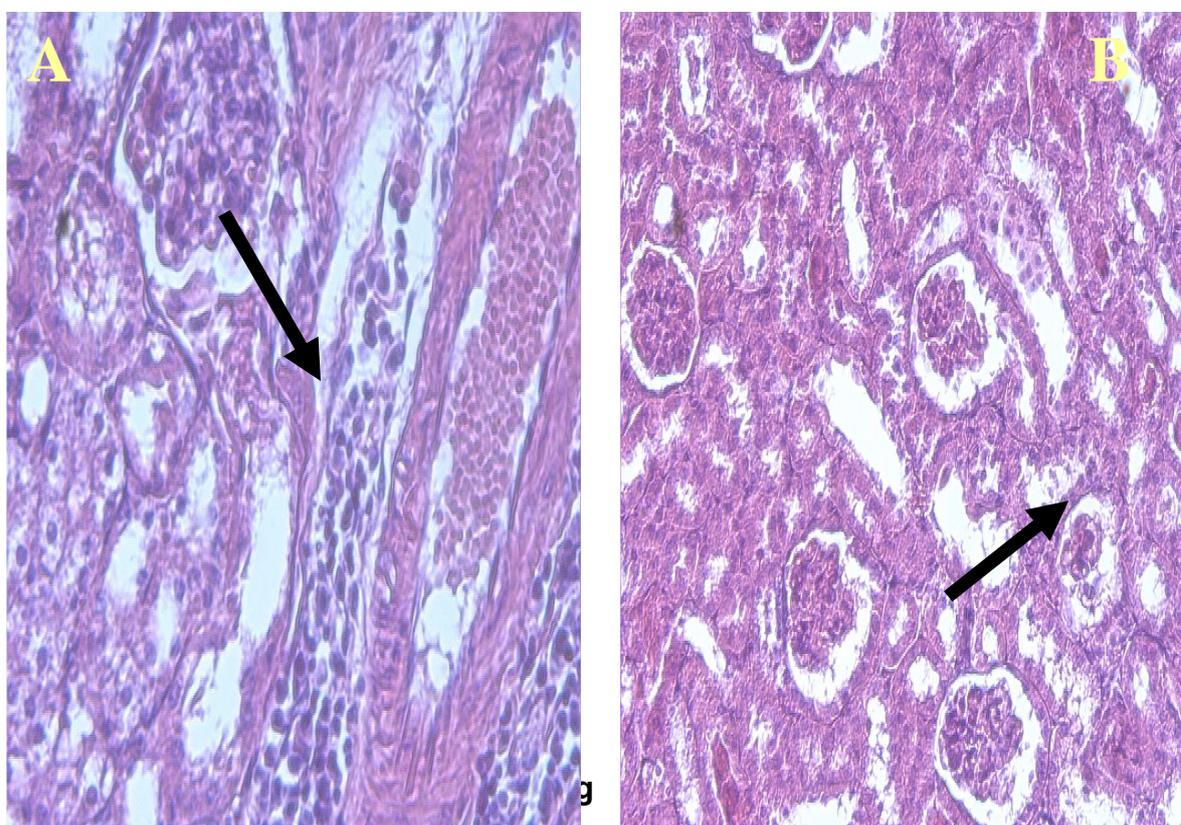
- ❖ Rins com arquitetura lobular preservada e limites corticomedulares bem definidos, apresentando atrofia glomerular (Figura 18 B), infiltrados linfocitários ao redor de glomérulos (Figura 17 A) e túbulos e no interior dos vasos (Figura 18 A). Foi observada também a presença de sangue no interior dos túbulos proximais (Figura 17 B).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos, presença de infiltrados linfocitários peribronquiolares (Figura 16 A) e vasos congestionados (Figura 16 B).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados e vasos congestionados.
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



**FIGURA 16**– Pulmão de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado peribronquiolar (HE X200), B= congestão vascular (HE X200)

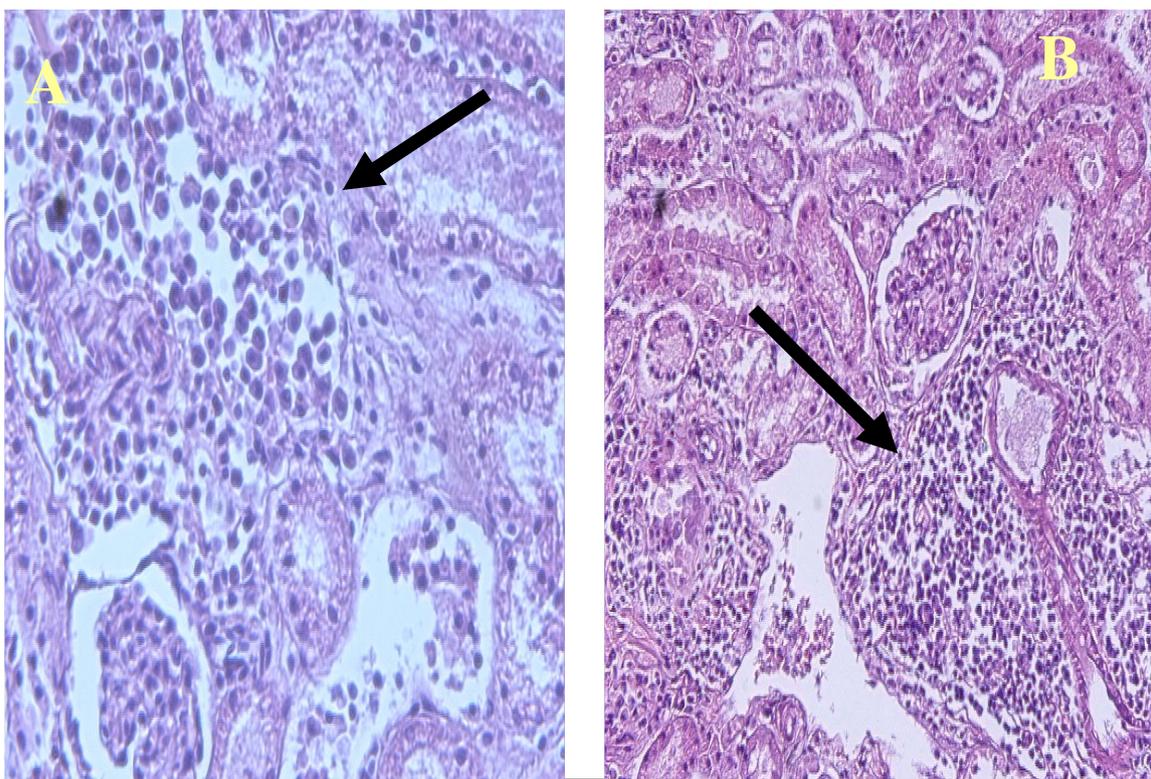


**FIGURA 17**– Rim de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário ao redor do glomérulo (HE X200), B= sangue na luz dos túbulos proximais proximais (HE X400)

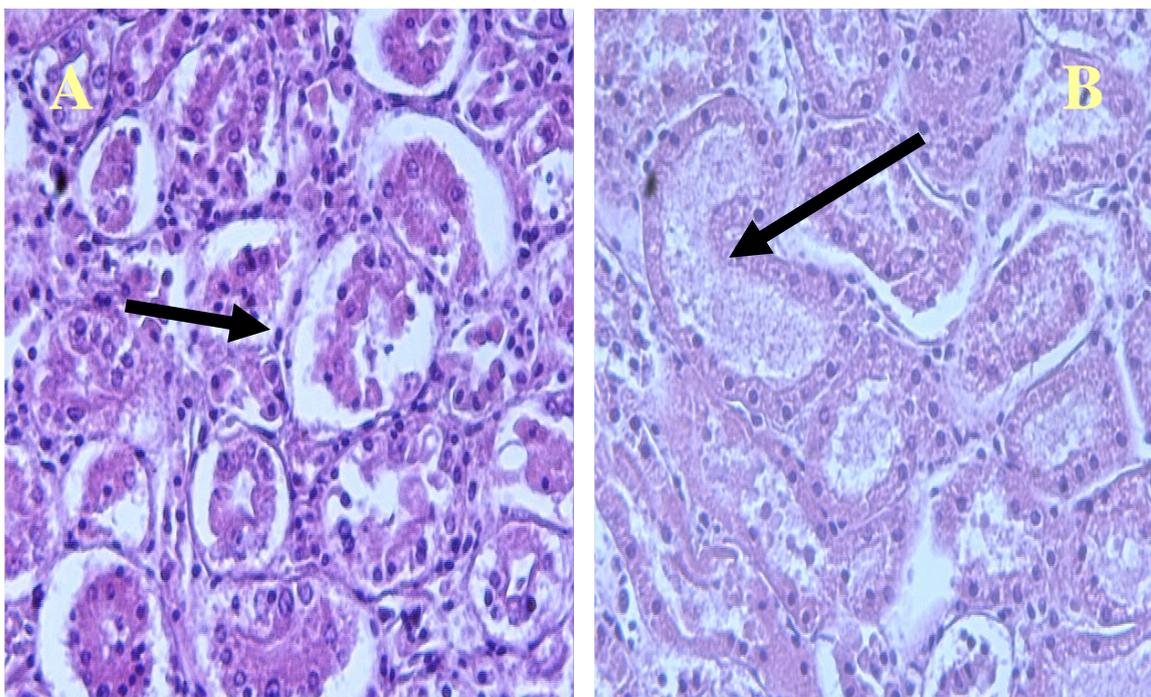


**FIGURA 18** – Rim de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado perivascular (HE X400), B= atrofia glomerular (HE X200)

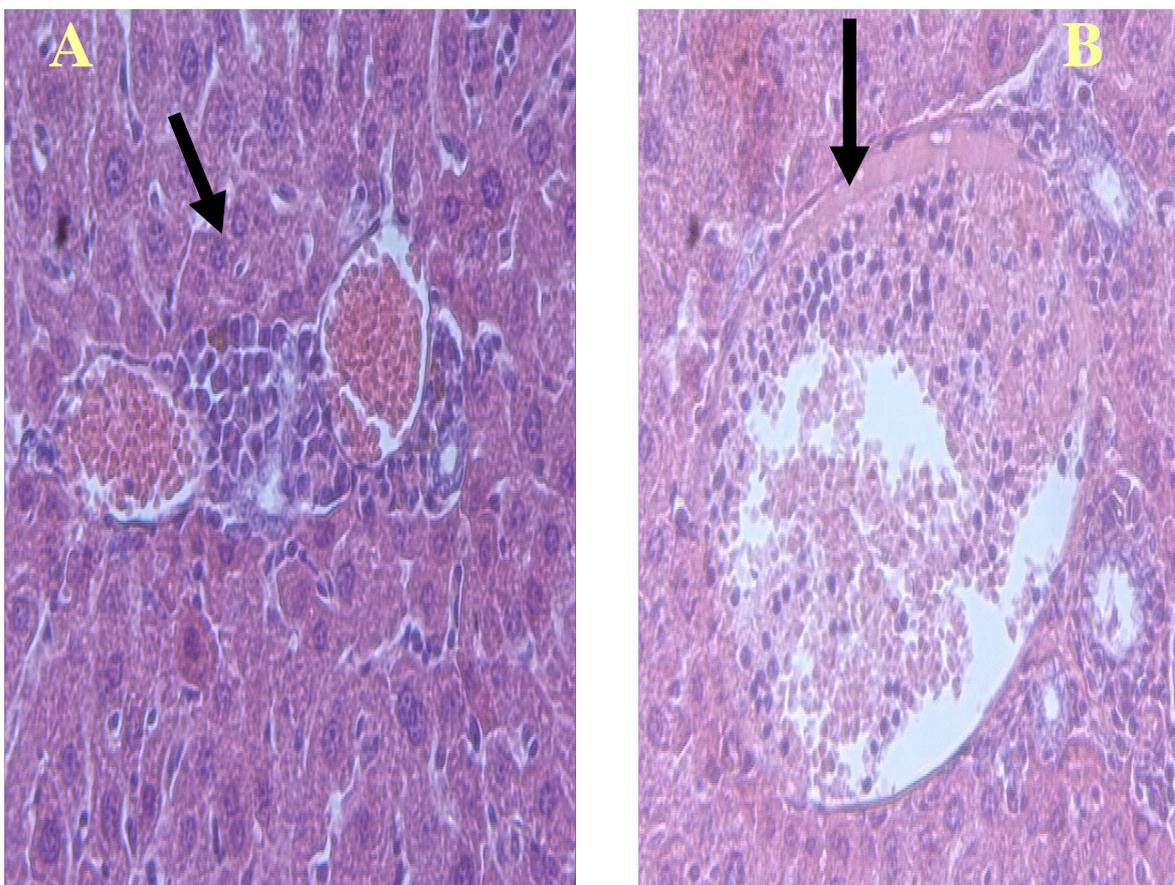
- ❖ Rins apresentando infiltrados linfocitários perivascularares (Figura 19 B), glomérulos bem distribuídos, porém com espaço capsular reduzido e infiltração linfocitária ao redor (Figura 19 A). Alterações tubulares caracterizadas por descolamento do epitélio tubular da membrana basal (Figura 20 A) e presença de exsudatos na luz (Figura 20 B).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos, apresentando vasos congestos (Figura 22) e áreas de intensa infiltração linfocitária.
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada e hepatócitos bem conservados. Presença de infiltrados linfocitários teciduais e perivascularares (Figura 21 A e B).
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



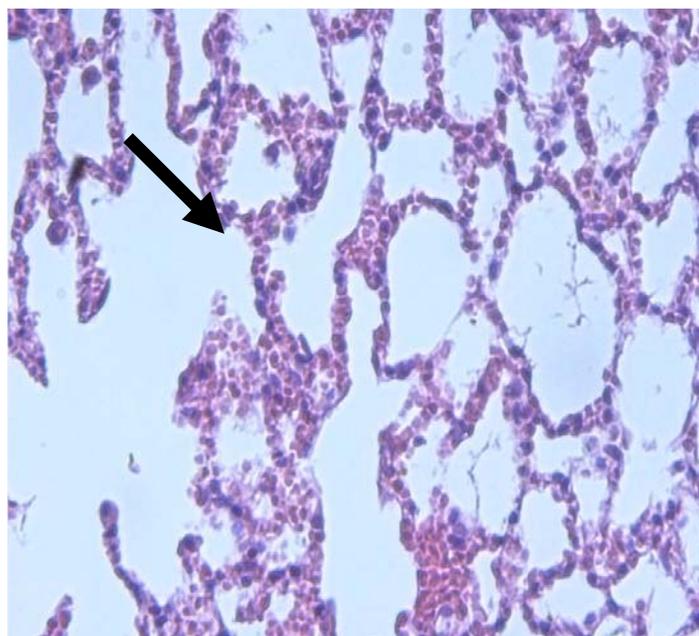
**FIGURA 19** – Rim de camundongo macho satélite 35 mg/kg de EEB: A: grande infiltrado linfocitário próximo ao glomérulo (HE X200), B= área de infiltração linfocitária (HE X400)



**FIGURA 20** – Rim de camundongo macho satélite 35 mg/kg de EEB: A= descolamento do epitélio tubular da membrana basal (HE X400), B= presença de material (exsudato) no interior dos túbulos (HE X400)



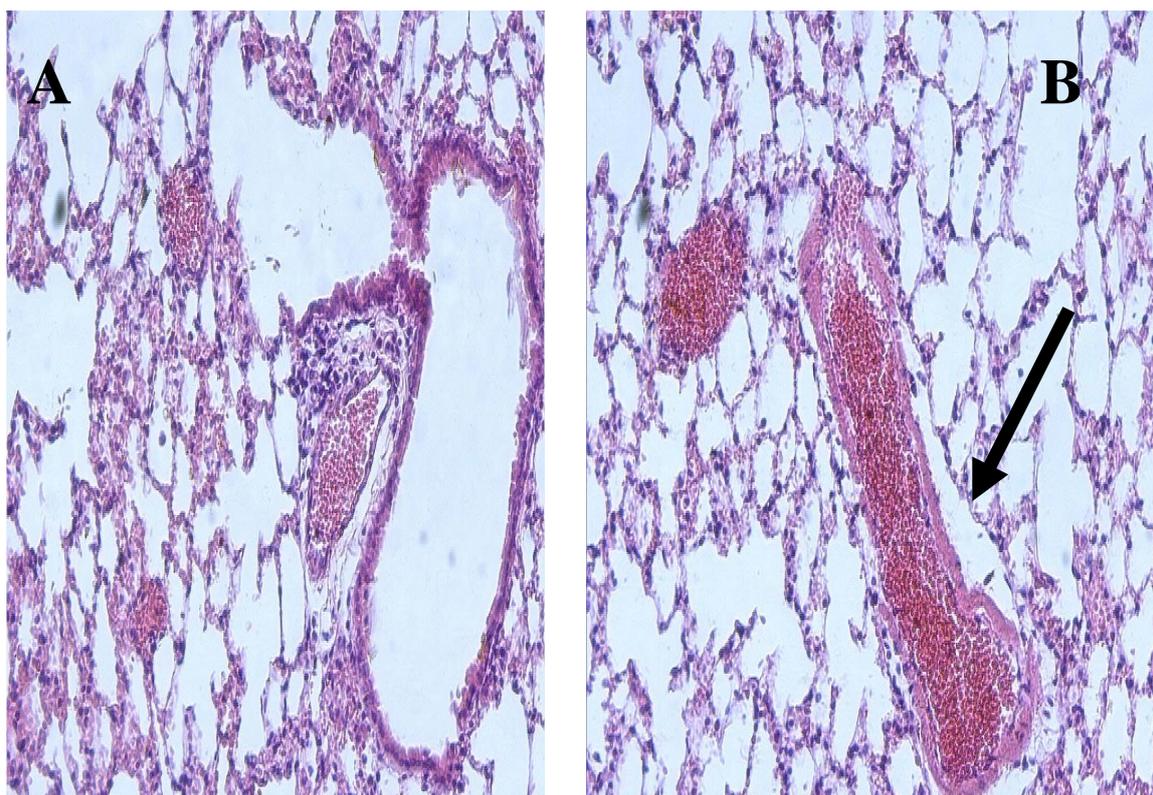
**FIGURA 21**– Fígado de camundongo macho satélite 35 mg/kg de EEB: A= infiltrado perivascular (HE X200), B= infiltrado linfocitário no interior de veia centrolobular (HE X400)



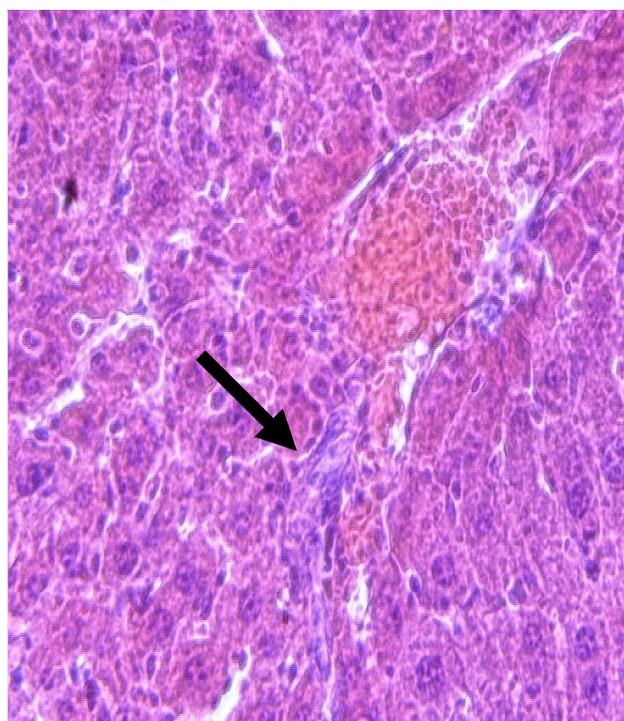
**FIGURA 22** – Pulmão de camundongo macho satélite 35 mg/kg: congestão de capilares alveolares (HE X400)

#### **V- Machos do grupo satélite 175mg/kg**

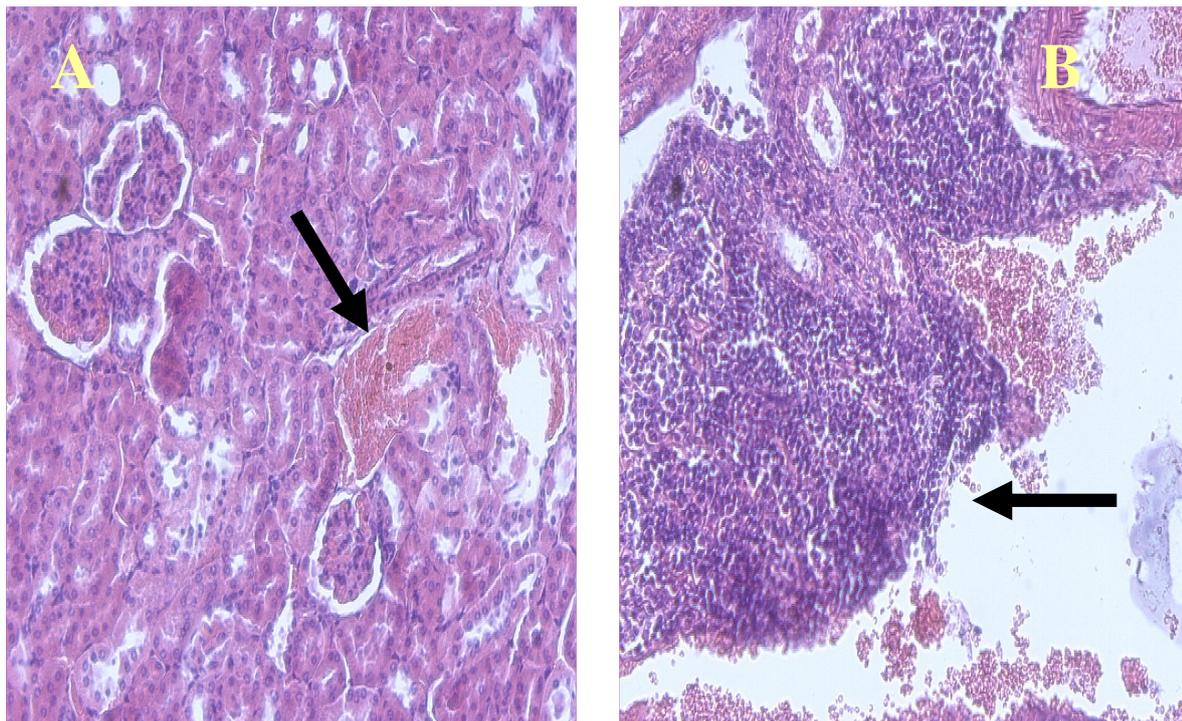
- ❖ Rins com arquitetura lobular preservada e limites corticomedulares bem definidos. Túbulos coletores e glomérulos preservados. Presença de infiltrados perivasculares (Figura 25 B) e extravasamento sanguíneo no interior do tecido (Figura A).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos e conservados, apresentando áreas de infiltração linfocitária tecidual (Figura 23 A) e vasos congestionados (Figura 23 B).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada e hepatócitos bem conservados. Presença de áreas de infiltração linfocitária (Figura 24).
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



**FIGURA 23** -Pulmão de camundongo macho satélite 175 mg/kg: A= infiltrado inflamatório (HE X200), B= congestão vascular (HE X200).



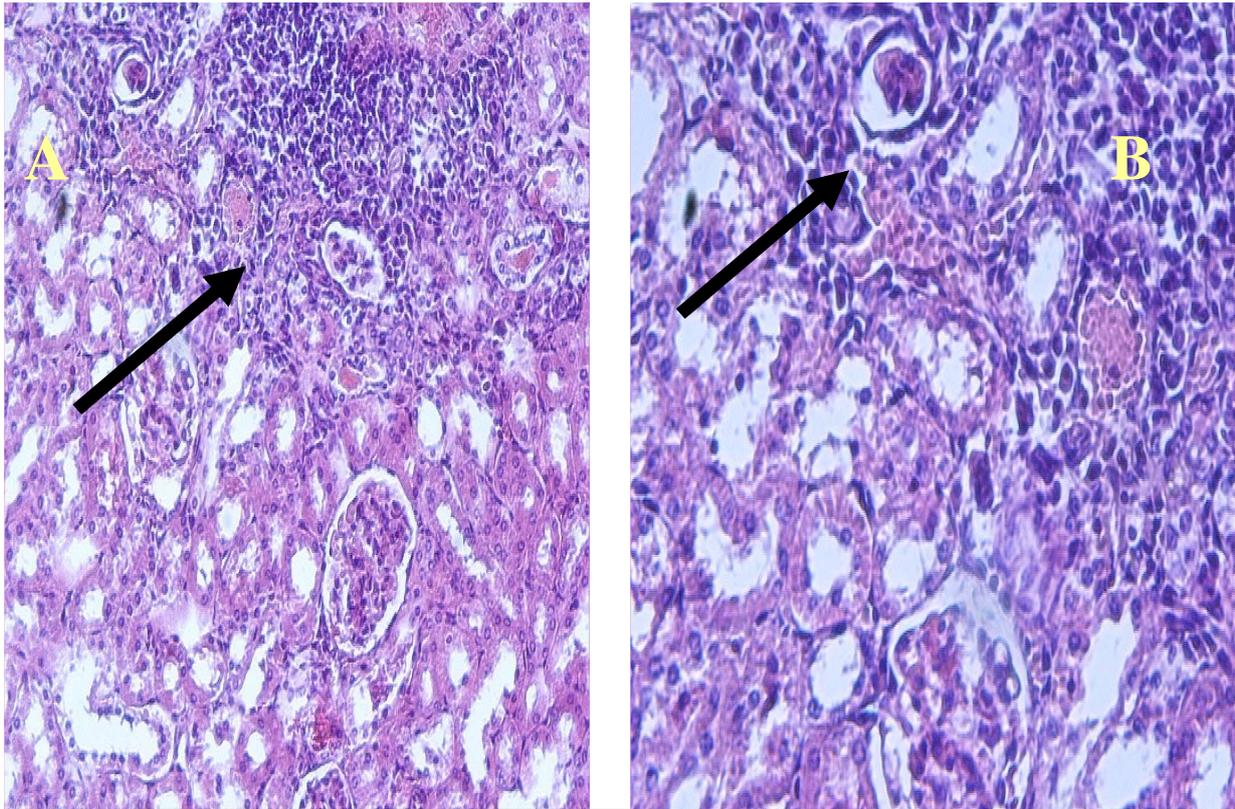
**FIGURA 24**- Fígado de camundongo macho satélite 175 mg/kg de EEB: pequeno infiltrado linfocitário (HE X400)



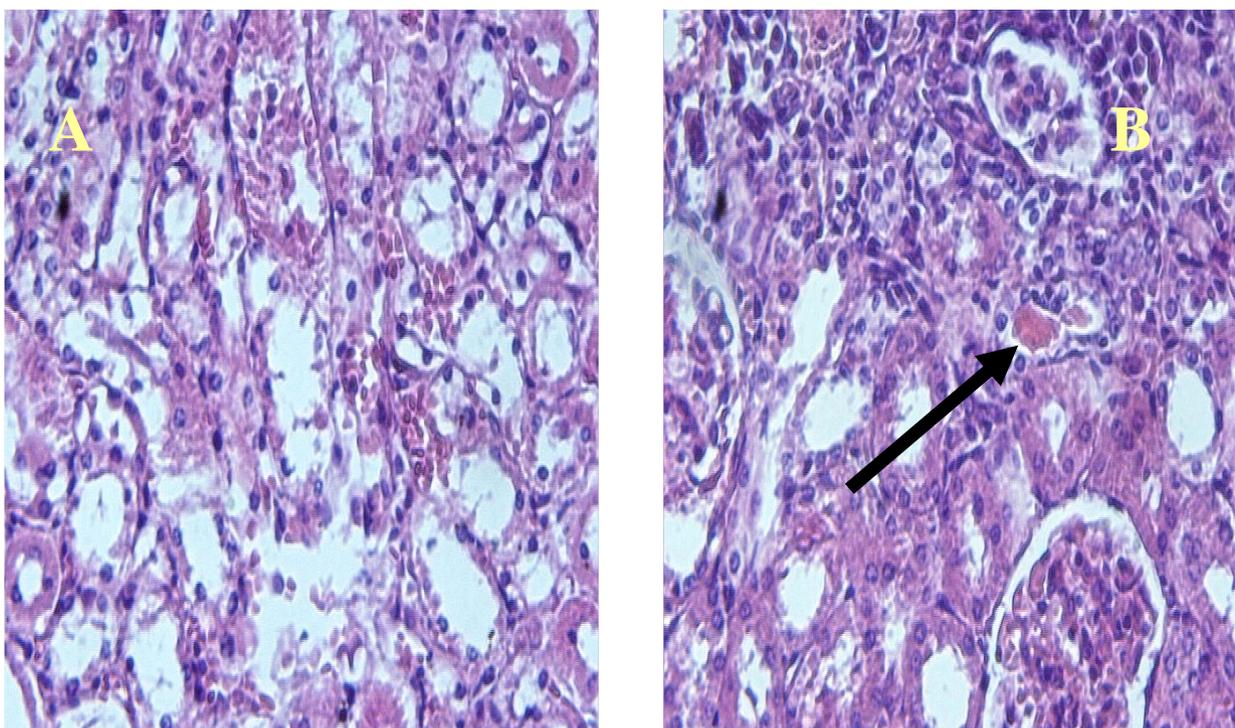
**FIGURA 25** - Rim de camundongo macho satélite 175 mg/kg de EEB: A= hemorragia intersticial (HE X200), B= intenso infiltrado perivascular (HE X200).

#### **VI- Fêmeas tratados com 7 mg/kg do extrato**

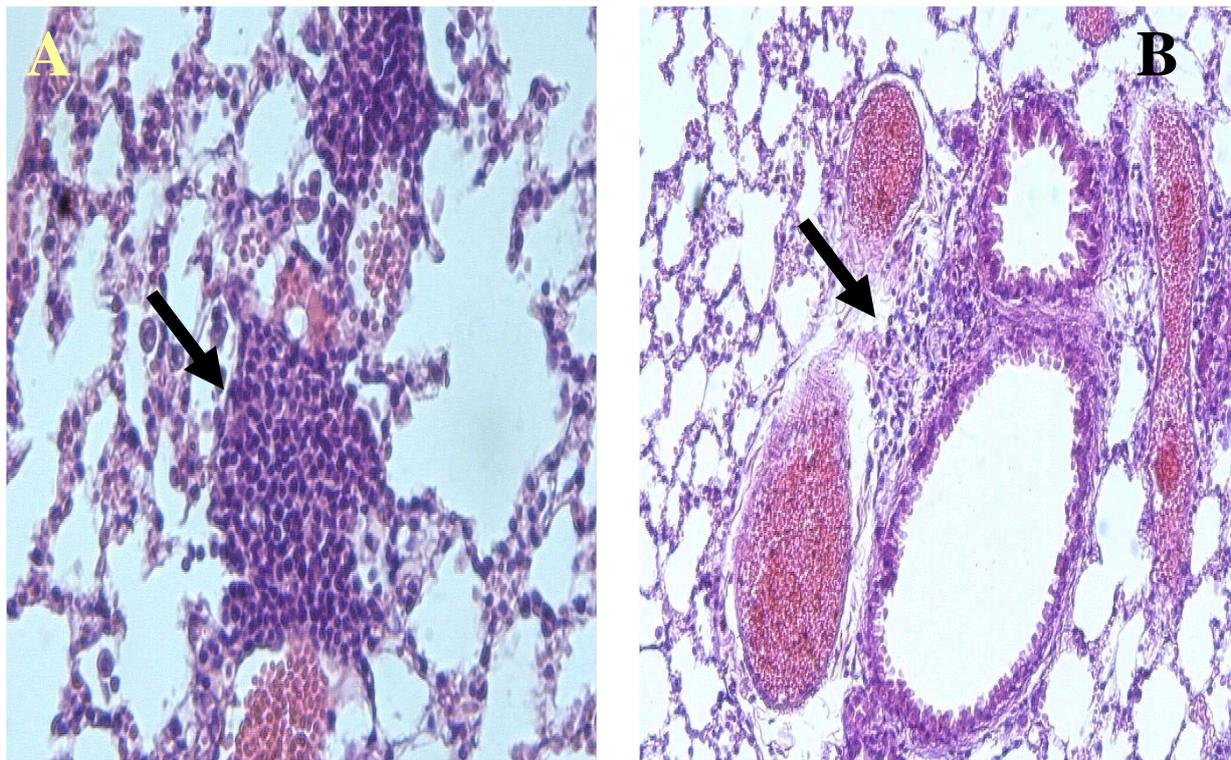
- ❖ Rins apresentando infiltrados linfocitários teciduais (Figura 26), glomérulos bem distribuídos, porém com espaço capsular reduzido. Alterações tubulares caracterizadas por descolamento do epitélio tubular da membrana basal, desorganização epitelial (Figura 27 A) e presença de sangue na luz dos túbulos (Figura 27 B).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos e conservados. Presença de infiltrados perivasculares (Figura 28).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada e hepatócitos bem conservados. Presença de infiltrados linfocitários junto aos ductos biliares (Figura 29).
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



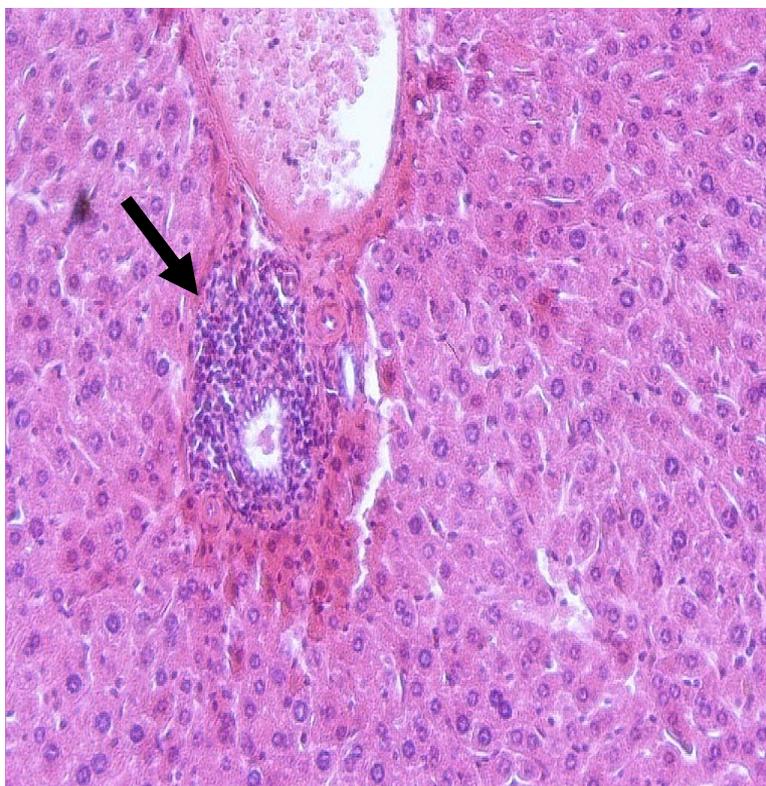
**FIGURA 26** – Rim de camundongo fêmea tratada com 7 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X200), B= atrofia glomerular (HE X400)



**FIGURA 27**– Rim de camundongo fêmea tratada com 7 mg/kg de EEB: A= desorganização do epitélio tubular (HE X400), B= sangue na luz do túbulo (HE X400)



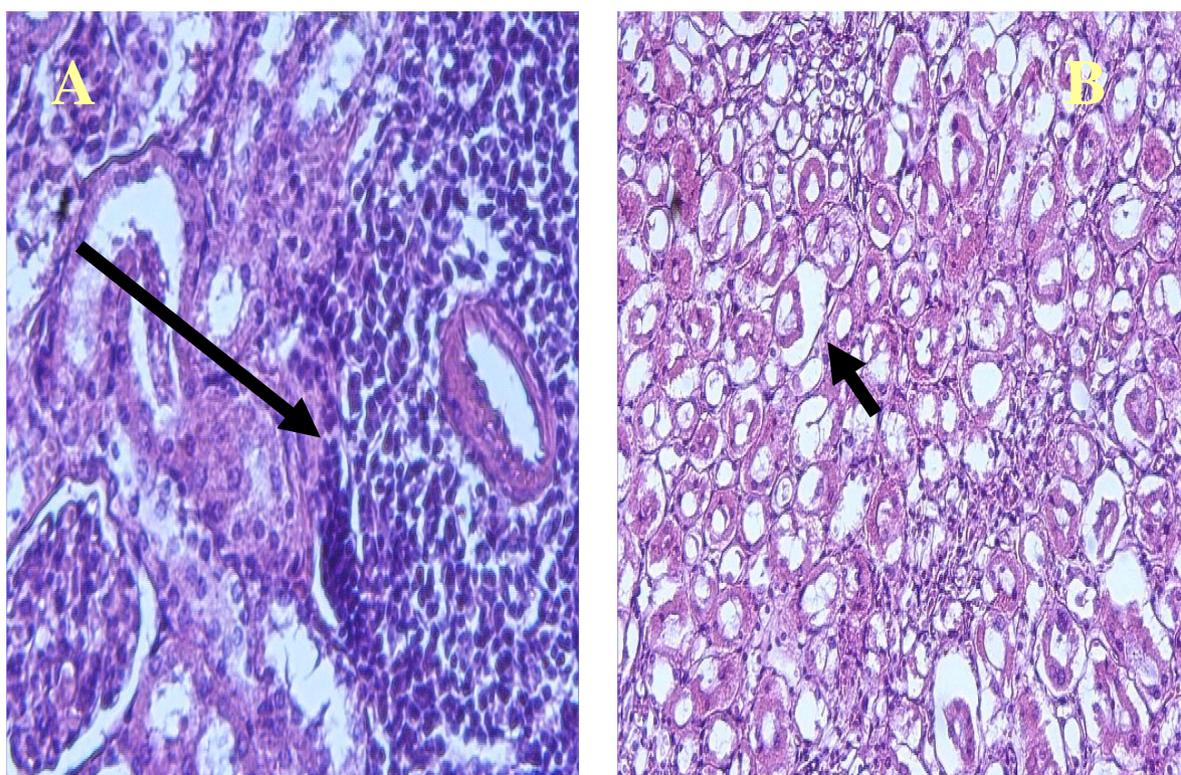
**FIGURA 28-** Pulmão de camundongo fêmea tratada com 7 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X400), B= infiltrado peribronquiolar (HE X200)



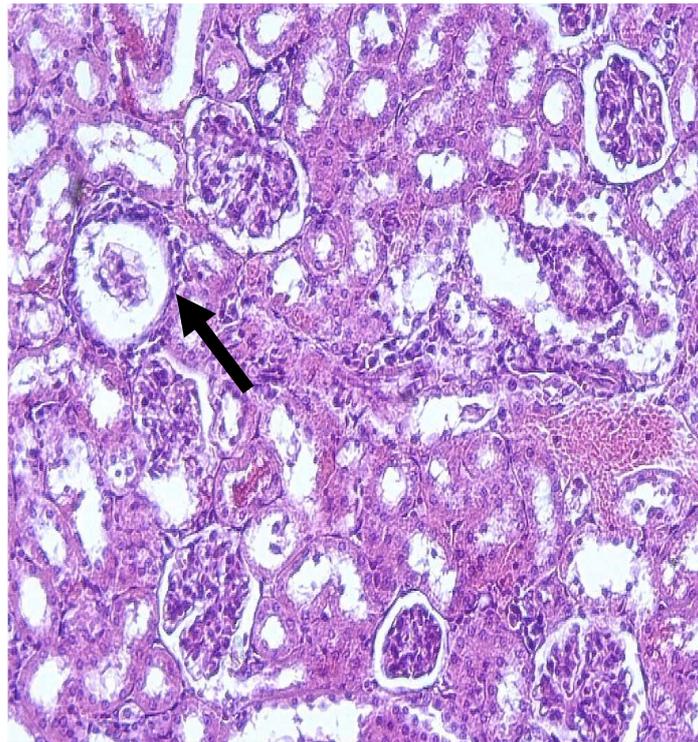
**FIGURA 29** – Fígado de camundongo fêmea tratado com 7 mg/kg de EEB: reação inflamatória junto ao ducto biliar (HE X200)

## VII- Fêmeas tratados com 35 mg/kg do extrato

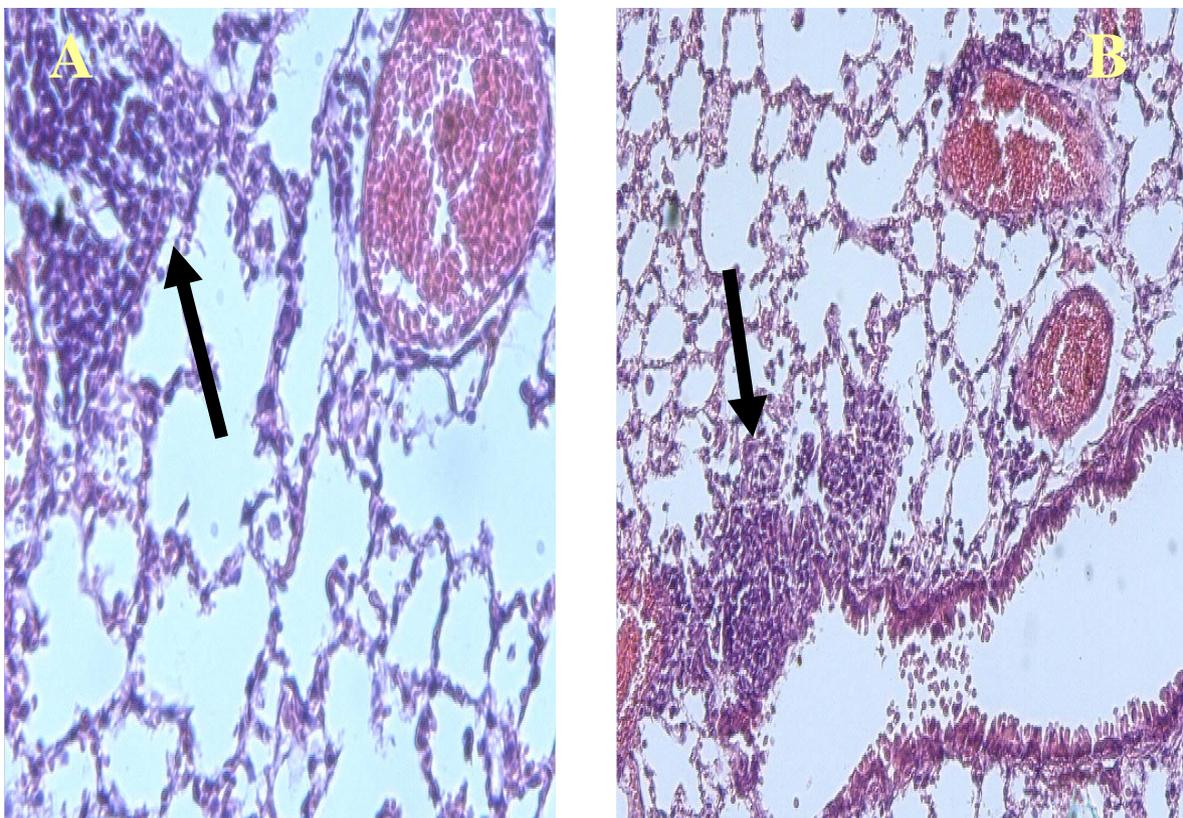
- ❖ Rins apresentando intensa reação inflamatória próxima aos glomérulos (Figura 30 A), presença de glomérulos de morfologia anormal (Figura 31) e descolamento do epitélio tubular da membrana basal (Figura 30 B).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos e conservados. Presença de infiltrados peribronquiolares (Figura 32 B) e intra-alveolares (Figura 32 A).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados e vasos congestionados.
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



**FIGURA 30-** Rim de camundongo fêmea tratada com 35 mg/kg de EEB: A= área de infiltração linfocitária (HE X400), B= descolamento do epitélio tubular (HE X200)



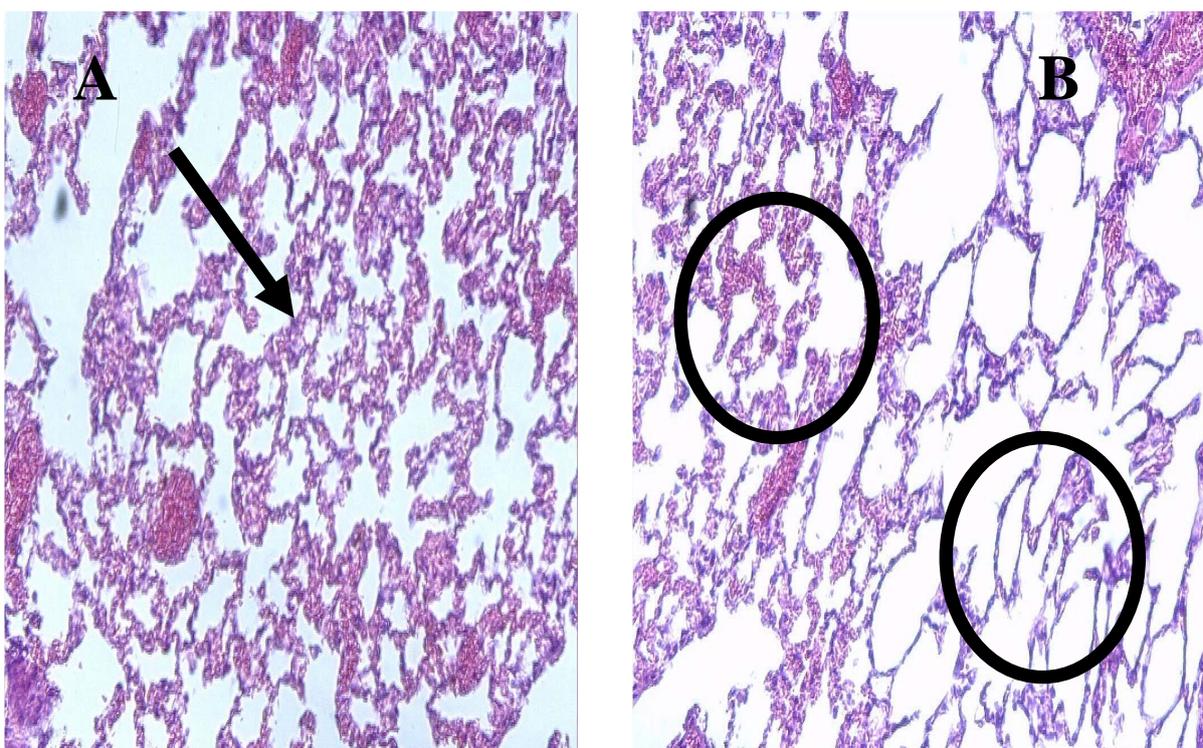
**FÍGURA 31-** Rim de camundongo fêmea tratada com 35 mg/kg de EEB: glomérulo anormal (HE X200)



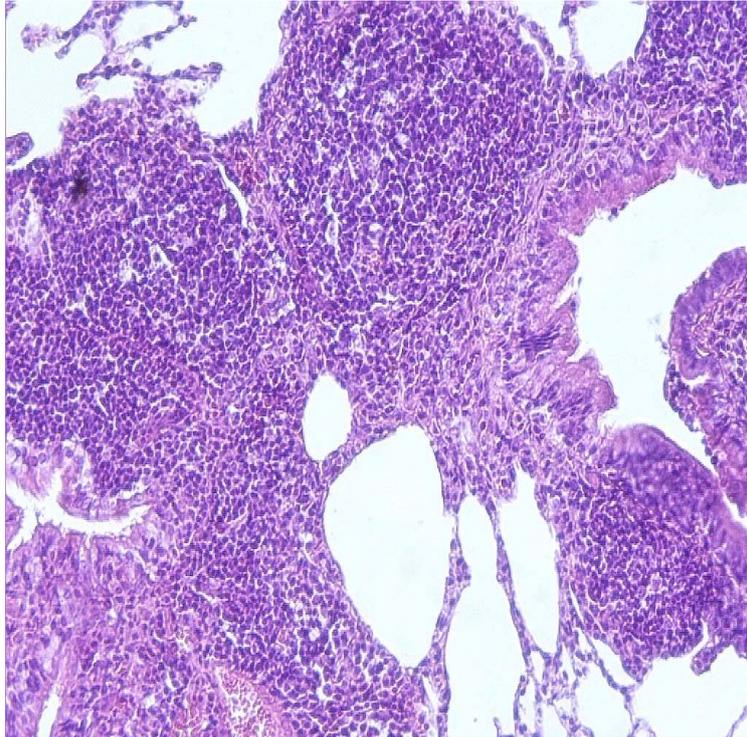
**FIGURA 32-** Pulmão de camundongo fêmea tratada com 35 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário (HE X400), B= infiltrado próximo a bronquíolo (HE X200)

### VIII- Fêmeas tratados com 175 mg/kg do extrato

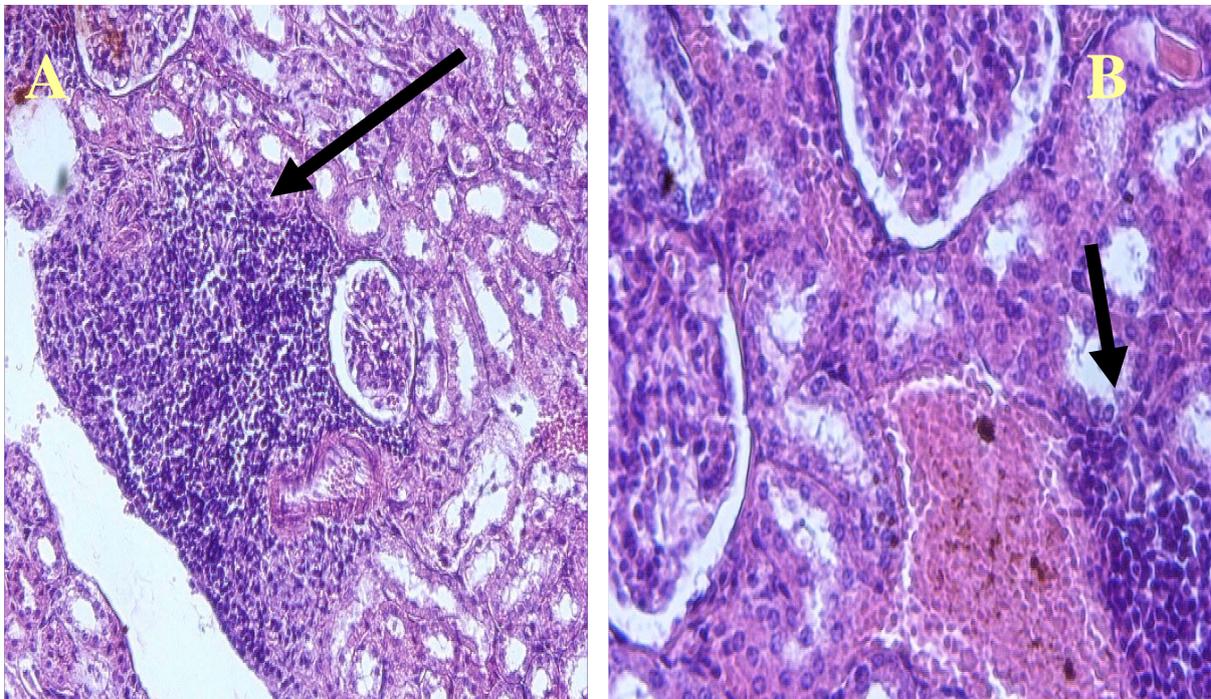
- ❖ Rins apresentando glomérulos bem distribuídos, porém com espaço capsular reduzido e presença de intensos infiltrados linfocitários ao redor (Figura 35 A). Presença de sangue na luz dos túbulos (Figura 36) e reações inflamatórias a nível vascular (Figura 35 B).
- ❖ Pulmões apresentando espessamento das paredes alveolares com presença de sangue no interior (Figura 33 A), congestão capilar e infiltrados perivascularares e perialveolares (Figuras 33 B e 34).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados apresentando infiltrados linfocitários perivascularares (Figura 37).
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



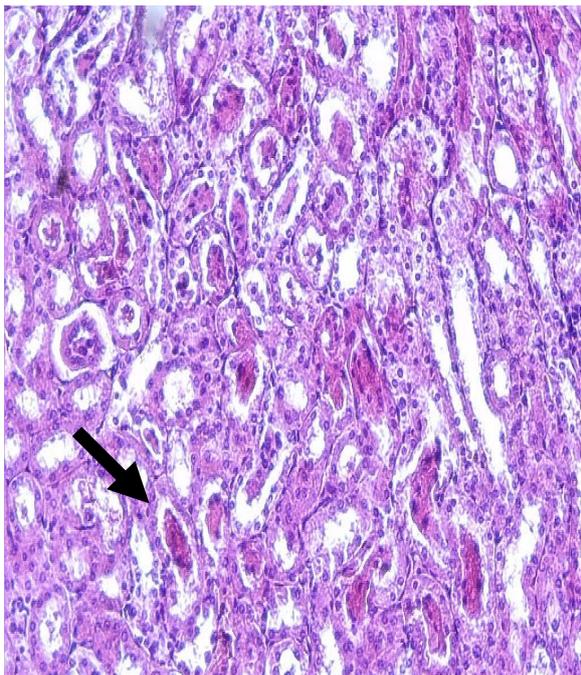
**FIGURA 33** - Pulmão de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: A= espessamento da parede alveolar e hemorragia alveolar (HE X200), B= área de congestão dos capilares alveolares x área normal (HE X200)



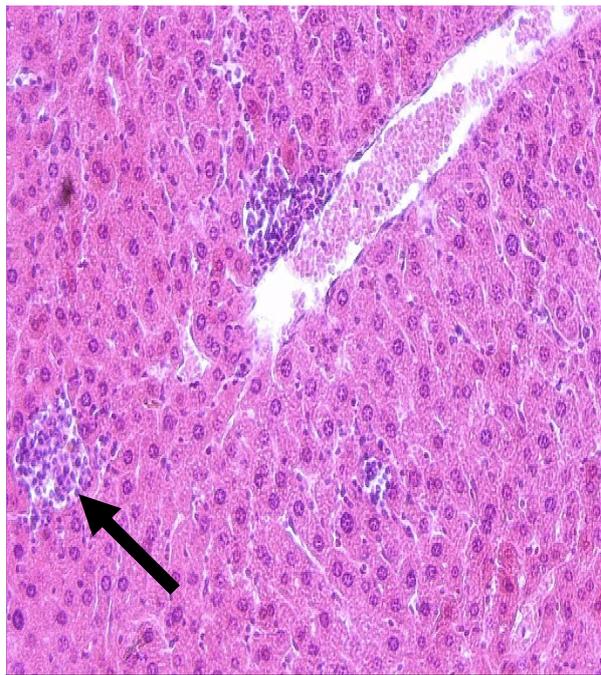
**FIGURA 34-** Pulmão de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: área de intensa infiltração linfocitária (HE X200)



**FIGURA 35-** Rim de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: A= infiltrado linfocitário próximo a glomérulo (HE X200), B= infiltrado perivascular (HE X400)



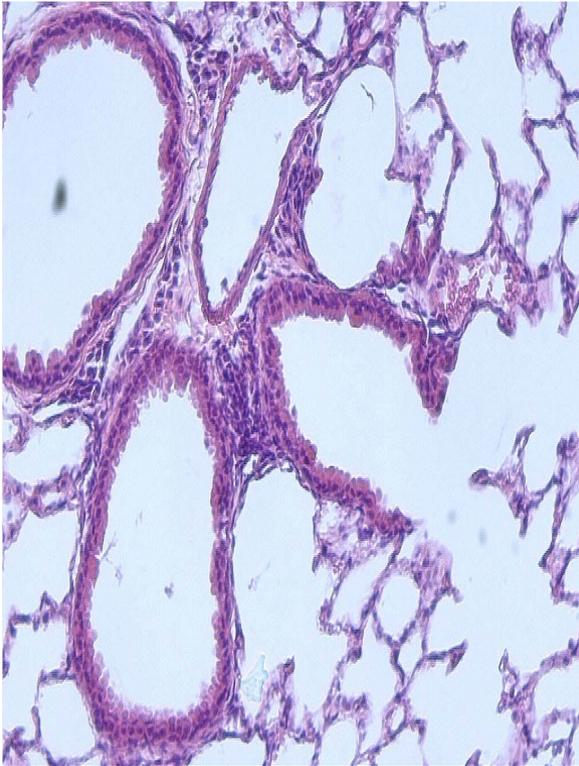
**FIGURA 36** – Rim de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: presença de sangue na luz dos túbulos (HE X200)



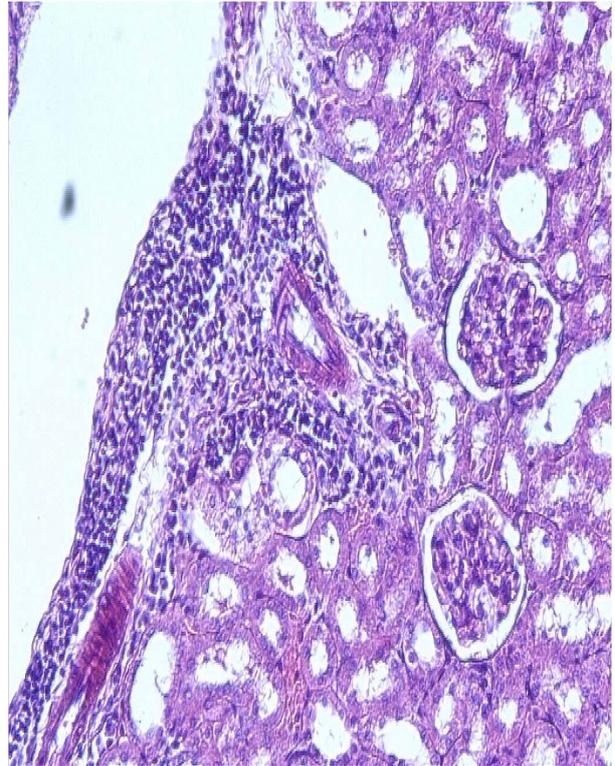
**FIGURA 37** – Fígado de camundongo fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB: presença de infiltrados linfocitários (HE X200)

#### **IX- Fêmeas do grupo satélite 35 mg/kg**

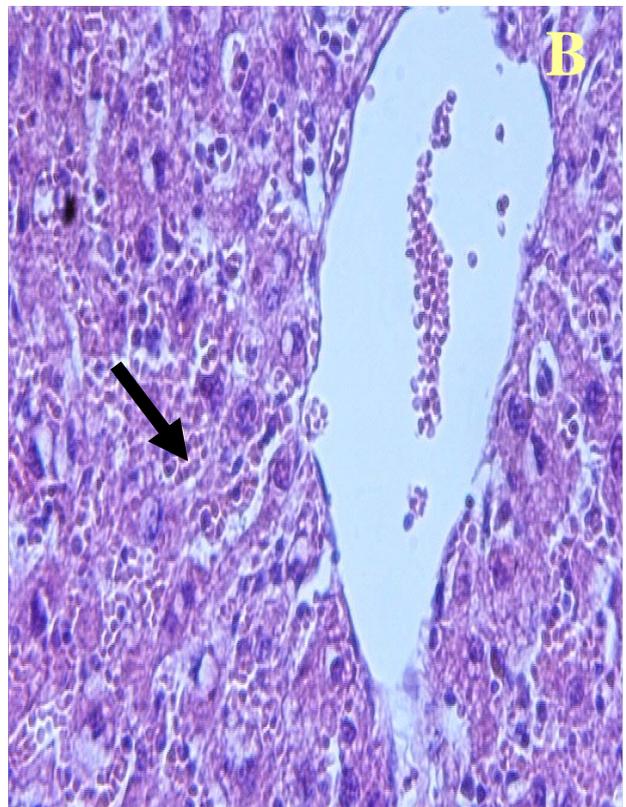
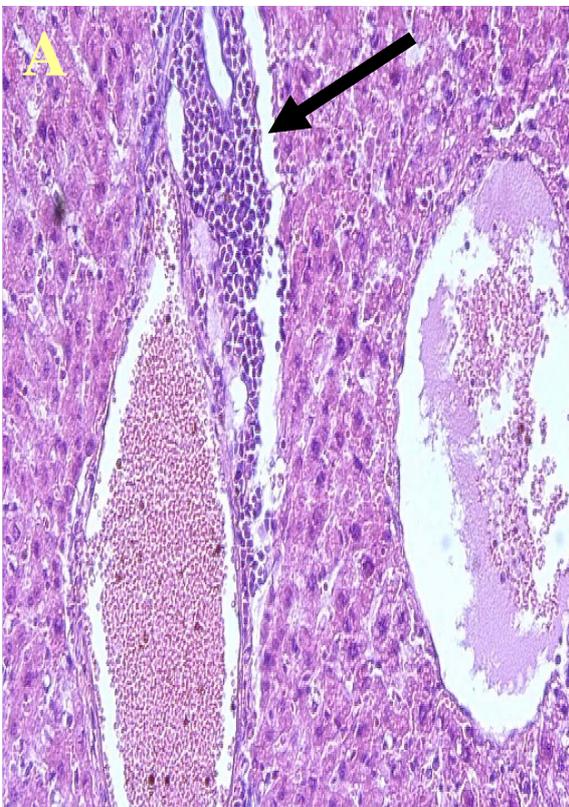
- ❖ Rins com arquitetura lobular preservada e limites corticomedulares bem definidos. glomérulos e túbulos bem preservados com presença de infiltrados linfocitários perivascularares e próximos aos glomérulos (Figura 39).
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos e conservados. Presença de leve infiltrado peribronquiolar (Figura 38).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados apresentando capilares sinusoidais congestionados (Figura 40 B) e infiltrados perivascularares (Figura 40 A).
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



**FIGURA 38-** Pulmão de camundongo fêmea satélite 35 mg/kg: infiltrado peribronquiolar (HE X200).



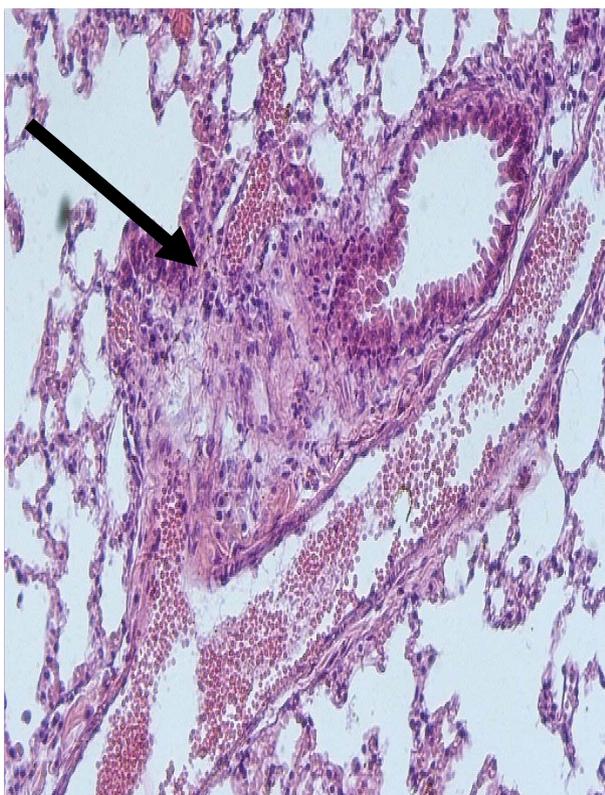
**FIGURA 39-** Rim de camundongo fêmea satélite 35 mg/kg: infiltrado linfocitário (HE X200).



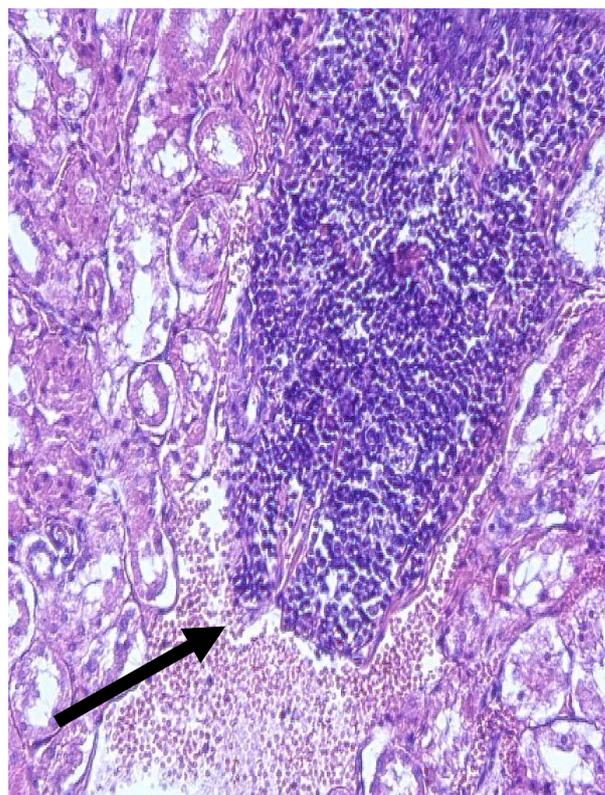
**FIGURA 40-** Fígado de camundngo fêmea satélite 35 mg/kg: A= infiltrado perivascular (HE X200), B= congestão dos capilares sinusoidais (HE X400).

### X- Fêmeas do grupo satélite 175 mg/kg

- ❖ Rins apresentando grande área de infiltração perivascular e infiltrados próximos aos glomérulos (Figura 42). Túbulos bem preservados.
- ❖ Pulmões com arquitetura lobular preservada, trama alveolar e bronquíolos bem distribuídos e conservados. Vasos congestos e presença de leve infiltração peribronquiolar e perivascular (Figura 41).
- ❖ Fígado de arquitetura lobular preservada, hepatócitos bem conservados apresentando leve infiltração linfocitária perivascular.
- ❖ Coração apresentando fibras cardíacas de aspecto normal.



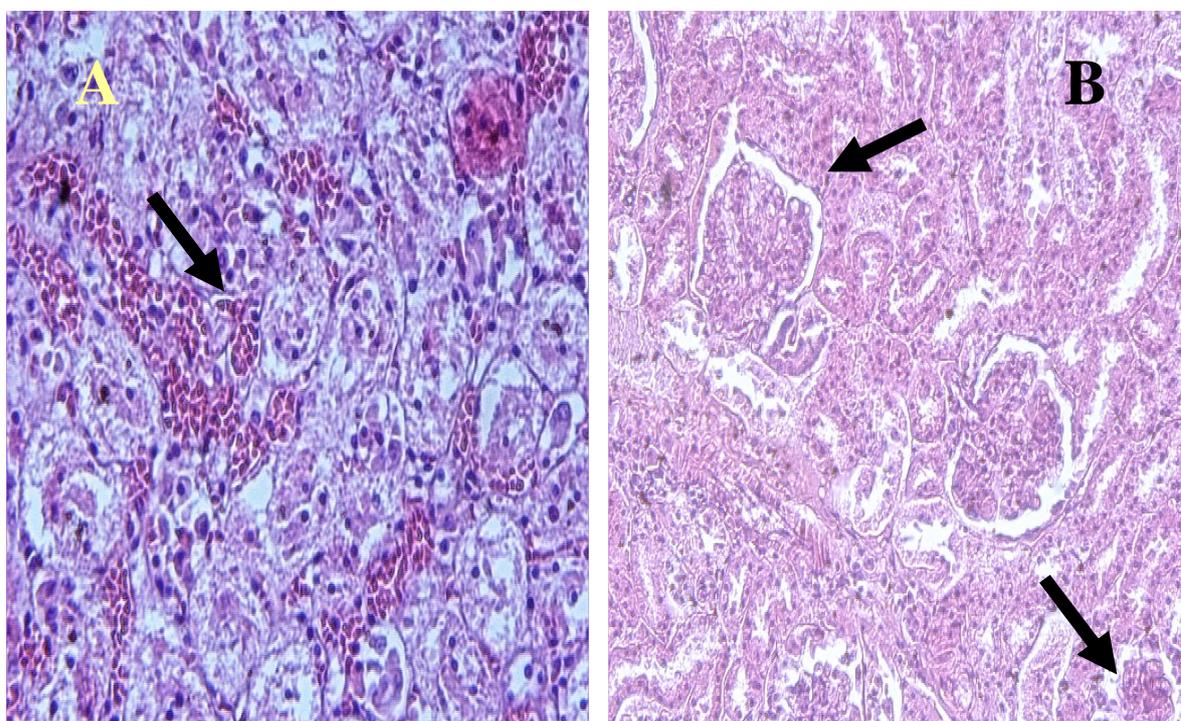
**FIGURA 41** – Pulmão de camundongo fêmea satélite 175 mg/kg: leve infiltração linfocitária (HE X200)



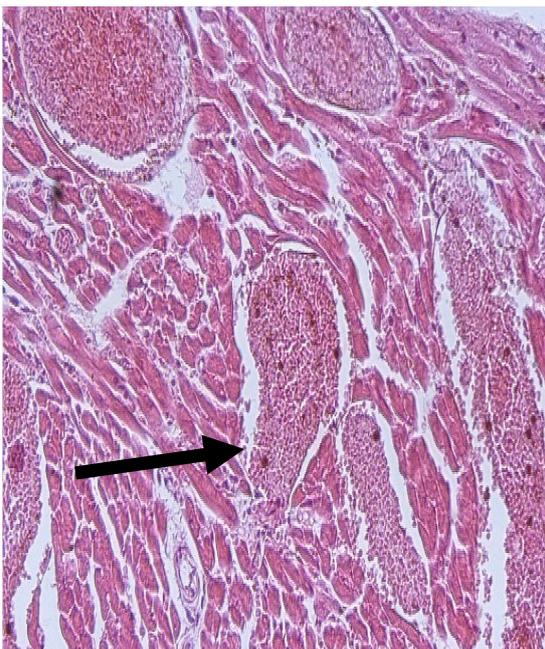
**FIGURA 42** – Rim de camundongo fêmea satélite 175 mg/kg: área de intensa infiltração linfocitária (HE X200)

## XI- Macho tratado com 175 mg/kg do extrato e morto durante o período experimental

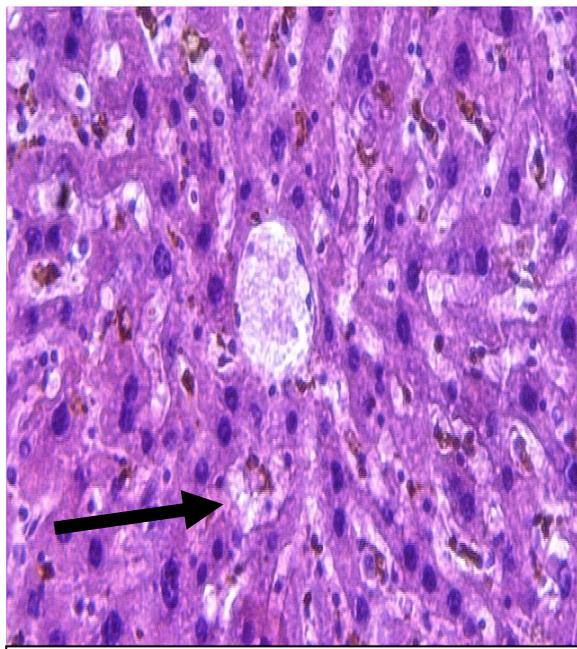
- ❖ Rins apresentando morfologia glomerular anormal, espaços capsulares reduzidos, presença de áreas de hipertrofia glomerular e outras de atrofia glomerular (Figura 43 B). Túbulos coletores fechados (Figura 43 A).
- ❖ Fígado com hepatócitos conservados, apresentando dilatação dos espaços capilares (Figura 45).
- ❖ Tecido cardíaco apresentando grande quantidade de vasos congestionados entre as fibras cardíacas (Figura 44).



**FIGURA 43** – Rim de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB morto durante o tratamento: A= presença de sangue e fechamento dos túbulos coletores (HE X400), B= hipertrofia e atrofia glomerular (HE X400)



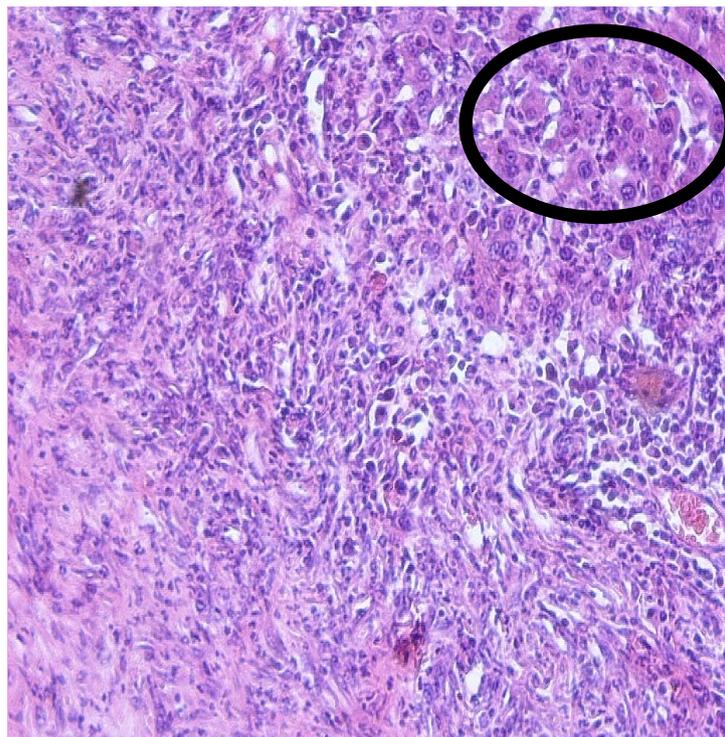
**FIGURA 44** – Fibras cardíacas de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB morto durante o tratamento: presença de grandes e numerosos vasos congestionados em meio às fibras (HE X200)



**FIGURA 45**–Fígado de camundongo macho tratado com 175 mg/kg de EEB morto durante o tratamento: dilatação de capilares (HE X400)

## **XII- Tumor de fêmea tratada com 175 mg/kg do extrato e morta durante o período experimental**

- ❖ Tumor pesando 4,56 gramas e com aspecto de massa endurecida cercada por tecido necrosado. A histologia revelou um tecido apresentando áreas de fibrose, intensa infiltração linfocitária e presença de hepatócitos (Figura 46) em quadro de diferenciação celular indicando invasão hepática.
- ❖ Os rins do animal apresentaram anormalidades morfológicas (atrofia) e manchas enegrecidas. Os órgãos não foram analisados histologicamente.



**FIGURA 46**– Tumor de fêmea tratada com 175 mg/kg de EEB morta durante período experimental: presença de hepatócitos (HE X200).

## *CAPÍTULO IV*

## 5.DISSCUSSÃO

Apesar da ampla utilização das plantas medicinais pela população, principalmente onde as condições sociais e econômicas são mais precárias, poucos estudos científicos têm sido realizados para garantir a segurança e eficácia dos remédios tradicionais (HILALY et al, 2004).

Estudos realizados com espécies do gênero *Zizyphus* demonstraram uma variedade de efeitos farmacológicos destacando-se atividade antiinflamatória (BORGI et al, 2007), ação antinociceptiva via mecanismos centrais e periféricos, efeito protetor contra diarreia induzida por óleo de rícino, promovendo o decréscimo de acúmulo do fluído intraluminal e do trânsito gastrointestinal (ADZU et al., 2003; ADZU et al., 2001), além de apresentarem ação gastroprotetora em ratos, a qual foi atribuída a efeito antissecretor e estimulante de prostaglandinas (SHAH et al., 1997; WASHIDA et al., 2007).

O extrato aquoso das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* demonstrou atividade antipirética por via oral em coelhos (NUNES et al., 1987), além de uma atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, um dos causadores das placas dentais sendo, por isso, largamente empregado na fabricação de cremes dentais (DINIZ et al., 2006).

Trigueiro (1981) utilizando o extrato etanólico das cascas do caule da planta determinou uma DL<sub>50</sub> de 600 mg/kg por via intraperitoneal em camundongos, sem, no entanto verificar a ocorrência de mortes no tratamento via oral até a dose máxima de 2000 mg/kg.

Barros et al. (1970), em uma triagem farmacológica realizada com diversas plantas brasileiras, relatam que os extratos etanólico e aquoso de *Zizyphus joazeiro* apresentaram ação espasmogênica em duodeno de coelho e íleo de cobaia, promoveram a contração do músculo reto abdominal de sapo e efeito estimulante do coração de sapo.

Uma investigação realizada por Cruz et al. (2007), comprovou uma significativa atividade antifúngica da infusão do caule da espécie frente aos patógenos *Trichophyton rubrum*, *Cândida guilliermondii*, *Cândida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi*, o que valida o uso popular da mesma no tratamento de micoses.

Considerando então, sua importância como planta medicinal e observando-se através de revisão bibliográfica a relativa escassez de dados acerca de suas atividades tóxicas, objetivou-se neste trabalho a realização de uma avaliação toxicológica pré-clínica desta espécie.

O ensaio toxicológico agudo foi iniciado com a realização de uma triagem farmacológica comportamental utilizando-se metodologia padronizada por Almeida *et al.* (1999) com o objetivo de detectar alterações em nível do Sistema Nervoso Central provocadas pelo extrato. Para tanto, os camundongos receberam através de gavagem a dose única de 2000 mg/kg de EEB e após avaliação dos parâmetros descritos no protocolo, nenhuma alteração foi constatada.

Ainda na avaliação da toxicidade aguda, durante os 14 dias de observação constatou-se um aumento do consumo de ração das fêmeas sem, no entanto, ter havido alteração no ganho de peso dos animais em relação ao grupo controle. Ao final do período experimental, foi evidenciada através da análise laboratorial de sangue neste mesmo grupo uma queda na contagem global de leucócitos e percentagem de neutrófilos com aumento da percentagem de linfócitos. O aumento na contagem de linfócitos foi considerado insignificante do ponto de vista clínico, uma vez que os valores encontrados estavam dentro dos limites de referência relatados por Diniz (2000), porém a leucopenia neutropênica observada, tem importância clínica. A associação entre os achados de ação do extrato sobre metabolismo e sistema imunológico é relevante, uma vez que os sistemas imune e neuroendócrino estão intimamente envolvidos na regulação do metabolismo a níveis periférico e hipotalâmico central. Tanto em condições fisiológicas quanto em estados patológicos, células imunes são ativadas respondendo com a liberação de citocinas e outros mediadores imunes. No hipotálamo, as citocinas influenciam o metabolismo por agirem no centro envolvido na alimentação e regulação da homeostase, levando a uma resposta de fase aguda que objetiva manter a integridade corporal (GUIJARRO *et al.*, 2006).

Entre as citocinas, o papel da interleucina 1 (IL-1) e do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) como mediadores comuns das cascatas imunes e metabólicas tem sido investigado. Ambos são produzidos por monócitos e macrófagos e seu efeito no metabolismo inclui indução de anorexia e inibição

da síntese de gordura e diferenciação de adipócitos (MATARESE; LA CAVA, 2004).

A diminuição na contagem global de leucócitos e na percentagem de neutrófilos sugere ação sobre o sistema imunológico e nesse sentido poderia haver também supressão ou diminuição da síntese de citocinas. Tendo em vista que um de seus efeitos é a promoção de anorexia e perda de peso, sua supressão poderia levar a aumento na ingestão de alimentos.

Outro fato que apóia esta sugestão, surge da ação antipirética provocada pelo extrato quando um estado febril em coelhos pela injeção de lipopolisacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) foi induzido. IL-1 e TNF- $\alpha$  liberadas durante reações inflamatórias provocam febre e uma inibição desta liberação poderia ser responsável pela atividade antitérmica da planta encontrada por Nunes *et al.* (1987).

Efeito supressor de citocinas é induzido também pelos glicocorticóides, utilizados como antiinflamatórios. Estes exercem seu efeito através da diminuição da produção de prostanóides e citocinas, e fator estimulante de colônias para granulócitos-macrófagos, diminuição da ação das células T auxiliares e da atividade de neutrófilos e macrófagos, entre outras ações (ADCOCK, 2001) e, portanto não seria impossível que o EEB de *Z. joazeiro* fosse capaz de exercer tal efeito sobre citocinas.

A diminuição do volume de água consumido costuma ser relacionado a concomitante redução na ingestão de alimentos (JULIEN *et al.*, 2000). Esta associação, no entanto, não ocorreu aqui já que houve diminuição da ingestão de água pelos machos durante as duas semanas de avaliação, sem que seu consumo de ração fosse alterado. Este fato, somado à constatação de níveis séricos elevados de creatinina sanguínea nos mesmos após o término do período experimental sugere ação do EEB sobre metabolismo e funcionamento renal. Racotta *et al.* (1995), relatam que uma hipodipsia pode estar relacionada à vasoconstrição e conseqüente elevação da pressão arterial e um efeito nefrotóxico induzido pelo extrato poderia acarretar insuficiência renal, levando a vasoconstrição e hipertensão.

O fato de que alterações renais não foram evidenciadas nas fêmeas, poderia ser explicado por um efeito protetor promovido pelo aumento na quantidade de ração ingerida. O processo pelo qual o alimento é protetor ainda

não está bem compreendido, mas poderia se dar por estímulo do aumento do clearance da droga e da regeneração celular tubular renal (JULIEN *et al.*, 2000).

Outra alteração nos parâmetros bioquímicos de camundongos machos submetidos a tratamento agudo com extrato de *Z. joazeiro* chama atenção. Houve redução nos níveis de uréia, ainda que tenha havido elevação da creatinina. Contudo, sabe-se que a concentração de uréia pode ser influenciada por diversos fatores extrarenais como dieta rica em proteínas, desidratação, função hepática e status nutricional (TRAVLOS *et al.*, 1996) e esta diminuição de uréia sérica poderia indicar uma interferência de EEB com o metabolismo hepático.

Com relação à análise histopatológica dos órgãos dos animais do estudo toxicológico agudo, nenhuma alteração foi observada em rins, coração e fígado de ambos os sexos, apesar das alterações observadas em parâmetros bioquímicos de camundongos machos. Este achado parece não ser raro e já foi relatado em outros trabalhos como o de Vidal *et al.* (2003) em um estudo toxicológico de *Punica granatum* L., que encontrou elevação dos níveis de creatinina sérica dos animais tratados por 35 dias, sem, no entanto haver alterações histológicas que acusassem dano renal.

No ensaio toxicológico crônico, os animais de ambos os sexos foram tratados com 3 diferentes doses por via oral: dose de uso popular (7 mg/kg), 5X a dose de uso popular (35 mg/kg) e 25X a dose de uso popular (175 mg/kg). A administração foi realizada diariamente durante 12 semanas, sendo avaliados temperatura corpórea, glicemia caudal, parâmetros comportamentais e motores, evolução ponderal, consumo de água e ração e ao final do período experimental parâmetros bioquímicos, hematológicos e estudo anatomopatológico como preconizado pela RE 90 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004).

A temperatura colônica dos animais tratados, tanto machos quanto fêmeas, variou entre 35,2°C e 37,9°C, faixa considerada normal para camundongos mostrando que o extrato não exerce efeitos sobre o centro de regulação térmica corporal.

Nenhuma alteração foi constatada também na glicemia dos camundongos durante todo o experimento. Um efeito hipoglicemiante poderia

ser esperado, uma vez que outras espécies do mesmo gênero, a exemplo de *Zizyphus spina-christi*, possuem atividade antidiabética mediada pela liberação de insulina via bloqueio de canais de  $K_{ATP}$  nas membranas das células pancreáticas  $\beta$  (ABDEL-ZAHER *et al.*, 2005).

A avaliação do consumo de água e alimentos durante estudos toxicológicos é utilizada como indicador de interferência das substâncias teste sobre o metabolismo (MUKINDA; SYCE, 2007) e em relação a estes parâmetros, alterações significativas foram induzidas por EEB. As fêmeas tratadas com as 3 doses do extrato aumentaram a ingestão de água durante todo o período de observação, com exceção de apenas algumas semanas. Esta alteração foi revertida com a interrupção do tratamento, para a dose de 35 mg/kg como ficou demonstrado pelo grupo satélite. Nos machos a ingestão de água apresentou-se aumentada raras vezes e somente em duas doses: 7 mg/kg (semanas 1, 3 e 9) e 35 mg/kg (semana 10).

Houve elevação no consumo de ração de fêmeas nas doses de 7 e 175 mg/kg na 2ª semana e 35 mg/kg na 4ª semana. Uma diminuição desse consumo foi observada na 7ª (7 mg/kg) e 9ª semanas (35 mg/kg). Para os machos ocorreu aumento da ingestão de ração apenas na 3ª semana para a dose de 175 mg/kg e decréscimo na 4ª, 5ª e 7ª semanas para o grupo tratado com 35 mg/kg de extrato.

Uma relação entre o decréscimo na ingestão de ração e perda de peso ocorreu entre as fêmeas dos grupos tratados com 7 e 35 mg/kg. Porém, o mesmo não ocorreu com os camundongos machos, nos quais o ganho ponderal diminuiu, sem que se alterasse concomitantemente a tomada de água e ração.

O teste de campo aberto, realizado para a avaliação de parâmetros comportamentais, acusou aumento na ambulação de camundongos machos e fêmeas nas doses de 7 e 35 mg/kg apenas na 2ª semana de tratamento, fato que poderia ser atribuído a uma possível ação estimulante do Sistema Nervoso Central provocada pela administração do extrato. A redução no número de bolos fecais ocorrida nas fêmeas na 4ª semana, por ser um achado isolado, pode ser desconsiderada.

A avaliação da atividade motora através do aparelho Rota-rod, revelou ausência de qualquer efeito estimulante ou depressor do extrato sobre a atividade motora dos animais.

Ao final do ensaio crônico com EEB das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro*, foram analisados parâmetros bioquímicos e hematológicos dos camundongos. Com exceção da elevação da concentração sérica de sódio nas fêmeas que receberam 35 mg/kg de extrato, nenhuma alteração bioquímica foi encontrada após 90 dias de tratamento. Contudo, nos grupos satélite de ambos os sexos, as taxas de creatinina elevaram-se e entre os machos a uréia diminuiu. Além disso, o grupo satélite 35 mg/kg macho apresentou decréscimo de íons  $K^+$  e de íons  $Na^+$ .

As alterações bioquímicas encontradas nos animais que tiveram seu tratamento interrompido por 30 dias, podem ser entendidas como efeito tóxico tardio do extrato. Elevações nos níveis séricos de creatinina, bem alterações de íons  $Na^+$  (ainda que somente em machos na dose de 35 mg/kg), sugerem nefrotoxicidade (BALIGA *et al.*, 2004).

A hipótese de que uma lesão renal tivesse se instalado no período de suspensão da administração de EEB é descartada pelo fato de que danos renais foram encontrados em todos os grupos, exceto nos controles.

Lesões renais ocorrem com frequência maior do que o aparecimento de alterações nas taxas de uréia e creatinina. Adicionalmente, associações entre concentrações alteradas destes parâmetros e a histopatologia, muitas vezes não ocorrem até a 13ª semana em estudos toxicológicos com duração de 12 semanas, indicando que é necessário tempo para o surgimento de lesão suficientemente extensa que provocasse expressão bioquímica do efeito tóxico renal. É preciso que aproximadamente 75% dos néfrons estejam não funcionantes, antes que alterações nestas variáveis ocorram (TRAVLOS *et al.*, 1996).

Some-se a isso, o fato de que apesar das taxas de uréia e creatinina serem válidas para a detecção de decréscimos na taxa de filtração renal e serem essencialmente os únicos marcadores séricos de injúria renal, eles parecem ser indicadores relativamente insensíveis de dano, exigindo que

outras avaliações, como análise química de urina, sejam realizadas quando há suspeita de que um composto teste seja nefrotóxico (TRAVLOS *et al.*, 1996).

Dentre os constituintes químicos de *Zizyphus joazeiro*, foram encontrados triterpenos como os ácidos alifitólico, oleanólico, ursólico, ácido betulínico e seus derivados e ebelin-lactona. Além disso, foram isoladas agliconas derivadas de saponinas como as jujubogeninas (derivadas dos jujubosídeos) e as joazeirogeninas (derivadas dos joazeirosídeos), além de grande riqueza de saponinas em sua forma original e do alcalóide anfibia-D (TSCHESCHE *et al.*, 1981; HIGUCHI *et al.*, 1984; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1985; SOARES *et al.*, 1998; SCHUHLY *et al.*, 1999; SCHUHLY *et al.*, 2000).

Wisloff *et al.* (2008), demonstraram que apesar das saponinas não estarem normalmente associadas a danos renais, sua forma não hidrolisada pode ser absorvida pelo trato gastrointestinal e deste modo, seria hipotetizado que as mesmas, em sua forma original poderiam ser excretadas pela via renal, possibilitando a promoção de efeitos nocivos aos rins.

Além disso, uma das propriedades desta classe de compostos é de permeabilização das membranas. Algumas saponinas aumentam a permeabilidade das células da mucosa intestinal *in vitro*, facilitando a absorção de substâncias potencialmente nefrotóxicas que normalmente não são absorvidas (WISLOFF *et al.*, 2008).

Na avaliação toxicológica de doses repetidas, ao contrário do que aconteceu após administração de dose única de EEB, nefrotoxicidade foi induzida nas fêmeas. Estes animais não tiveram seu consumo de ração alterado, o que corrobora com a hipótese de efeito protetor dos alimentos. Contudo, a ingestão de água foi aumentada durante praticamente todo o período de tratamento, efeito que foi revertido apenas no satélite 35 mg/kg. Esta elevação na ingestão de água, poderia sugerir uma resposta do organismo durante o período de desenvolvimento da doença renal.

A resposta de perda de néfrons funcionantes produz um aumento no fluxo sanguíneo renal com hiperfiltração glomerular como resultado da vasoconstrição arteriolar (RUGGENTI *et al.* 2001)

O principal mediador envolvido no processo de vasoconstrição é a Angiotensina II, que medeia numerosas respostas comportamentais e fisiológicas como aumento na ingestão de água e Na<sup>+</sup>, contribuindo para a

expansão do volume sanguíneo e extracelular (SANTOS *et al.*, 2005). É o que ocorre no modelo experimental de hipertensão renovascular de Goldblatt, em que o induz-se vasoconstrição do fluxo sanguíneo de um dos rins através da colocação de um clipe na artéria renal, os ratos submetidos ao procedimento elevam por algumas semanas seu consumo de água (SANTOS *et al.*, 2005).

A sugestão de que o extrato estaria induzindo hepatotoxicidade, provocando diminuição da síntese de uréia e conseqüentemente diminuindo seus níveis sanguíneos ganhou maior apoio quando se observa o aparecimento de infiltrados inflamatórios no fígado dos machos dos dois grupos satélite. Decréscimo das taxas sanguíneas por síntese de uréia hepática diminuída poderiam ocorrer por: diminuição de enzimas ou substratos do ciclo da uréia, fluxo sanguíneo hepático reduzido e menor massa funcional hepática (MEZEY, 1982).

Os indicadores bioquímicos habituais de dano hepático não forneceram qualquer indício de lesão mas, há relatos de que alterações morfológicas no fígado, e não acompanhadas por aumentos de ALT ocorrem em aproximadamente 23% dos estudos. Portanto, apesar da relação positiva entre ALT e a histopatologia, resultados discordantes podem surgir e demonstram que efeitos bioquímicos e histopatológicos não estão sempre ligados, embora suas razões não sejam conhecidas (TRAVLOS *et al.*, 1996).

As alterações dos parâmetros hematológicos de camundongos machos aos quais foi administrado EEB são evidenciadas por redução de HCM nos dois grupos satélite e de CHCM no satélite 35 mg/kg e VCM apenas no satélite 175 mg/kg. A alteração em CHCM apesar de estatisticamente significativa poderia ser considerada sem importância clínica, encontrando-se dentro de valores de referência (DINIZ, 2000). Diminuições dos índices VCM e HCM parecem ser neste estudo, achados isolados e inespecíficos, sendo, portanto desprovidos de qualquer significado clínico.

Ainda com relação a alterações na série vermelha e índices hematimétricos, a diminuição de CHCM em fêmeas nas 3 doses avaliadas foi desconsiderada, levando-se em consideração o fato de que em comparação com os valores citados por Diniz (2000), encontravam-se elevados. A diminuição de HCM na dose de 175 mg/kg não foi revertida em seu grupo satélite correspondente e somou-se ao aumento de VCM neste grupo.

Contudo, em comparação com parâmetros de referência o VCM estaria diminuído enquanto o HCM estaria elevado, o que torna a interpretação deste resultado questionável e imprecisa.

Nas fêmeas da dose de 7 mg/kg, a elevação do número de hemácias com conseqüente aumento de hematócrito pode ser explicada por liberação ou produção aumentada de eritrócitos provocada por hipóxia devido a presença de doença pulmonar.

Policitemias são definidas como um aumento no hematócrito. No cenário clínico uma policitemia existe quando a quantidade de hemoglobina e a contagem de hemácias estão aumentadas refletindo uma elevação do volume total de células sanguíneas vermelhas (MARAN; PRCHAL, 2004).

As policitemias podem ser de dois tipos: policitemias primárias que independem da demanda e requerimento de oxigênio e as secundárias, caracterizadas pela responsividade normal dos progenitores eritróides podendo ser vistas como uma resposta fisiológica para satisfazer a necessidade de oxigênio dos tecidos como conseqüência de hipóxia provocada por diferentes condições (MARAN; PRCHAL, 2004).

As paredes alveolares oferecem extensa área superficial para as trocas gasosas entre o ar nos alvéolos e os capilares na parede do septo. Uma doença que reduza a quantidade de ar nos alvéolos, diminua sua superfície ou cause espessamento das paredes alveolares, levará a oxigenação inadequada do sangue (hipoxia) (YOUNG *et al.*, 2007; JAIN; BELLINGAN, 2007). Drogas citotóxicas utilizadas na terapia antitumoral causam dano pulmonar e fibrose resultantes da toxicidade direta da droga e da estimulação do influxo de células inflamatórias para os alvéolos (HUSAIN; KUMAR, 2005).

A análise histológica dos pulmões dos camundongos submetidos a tratamento constatou áreas de infiltração linfocitária entre outras alterações, corroborando com a hipótese de hipóxia.

A avaliação da série branca das fêmeas através de leucograma e contagem diferencial acusou diminuição do número de leucócitos (35 e 175 mg/kg), percentagem reduzida de neutrófilos (7 mg/kg e satélite 175 mg/kg) e aumento nas percentagens de eosinófilos (7 mg/kg), e monócitos (7 mg/kg e satélite 35 mg/kg). Assim como no ensaio toxicológico agudo, evidencia-se aqui

um quadro de leucopenia neutropênica, ainda que não seja em todos os grupos.

Nos machos tratados com 7 e 35 mg/kg houve elevação inicial do número de leucócitos, considerada clinicamente irrelevante, quando comparada a valores relatados pela literatura e que apresentaram-se diminuídas no grupo satélite 35 mg/kg. Ocorreu ainda decréscimo na percentagem de neutrófilos e aumento na percentagem de monócitos dos dois grupos satélite, e contagem aumentada de linfócitos (satélite 175 mg/kg) e eosinófilos (175 mg/kg), porém sem significado clínico. Embora as percentagens de neutrófilos dos grupos satélite se encontrassem dentro dos limites de referência, o quadro clínico dos animais nos faz acreditar que houve neutropenia significativa.

Quadros de neutropenia podem ser provocados por diferentes fatores como: produção inadequada pela medula óssea, decorrente de diminuição do número de células progenitoras, de substituição do tecido hematopoiético ou de granulopoiese ineficaz; destruição pelos macrófagos da medula óssea e por outras células reticuloendoteliais nas síndromes hemofagocíticas; liberação medular defeituosa; redistribuição dentro do sistema vascular, como ocorre no início da hemodiálise; retenção no baço; sobrevida intravascular encurtada, como nas neutropenias imunes e rápido egresso para os tecidos, quando a liberação medular não consegue aumentar proporcionalmente (ANDRÉS, et al, 2006 ;BAIN, 2007). Determinadas drogas, como dipirona, clozapina, dapsona, antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e os agentes alquilantes e antimetabólitos utilizados no tratamento do câncer, estão ligados a quadros de agranulocitose (COLEMAN, 2001; BAIN, 2007).

Fagócitos são células do sistema imune responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo contra bactérias, fungos e parasitas. O sistema fagocítico é constituído por dois principais grupos de células: os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos teciduais) (ANDRADE; 2003).

Clinicamente, defeitos neste sistema podem levar a sintomas específicos tais como abscessos cutâneos recorrentes, periodontite, abscessos hepáticos e pulmonares e úlceras aftosas. O defeito pode ocorrer em qualquer das atividades fagocíticas, podendo ser numérico como na neutropenia, ou

funcional como no caso da Doença Granulomatosa Crônica (DGC) (ETZIONI, 2001).

A doença granulomatosa crônica (DGC) é uma síndrome caracterizada por alterações genéticas que determinam um defeito na produção dos reativos intermediários do oxigênio, interferindo na capacidade dos leucócitos de destruir microorganismos fagocitados (PRANDO – ANDRADE *et al.*, 2004). O quadro clínico caracteriza-se por infecções cutâneas e mucosas como piodermite, furunculose e abscessos, alterações pulmonares com pneumonia lobar, bronquial ou difusa e generalizada, comprometimento do trato gastrointestinal podendo haver abscessos hepáticos e envolvimento do trato genitourinário, podendo haver infecções do trato urinário, glomerulonefrite, abscesso renal e inflamação granulomatosa do parênquima renal com elevação dos níveis séricos de creatinina (ANDRADE, 2003).

Um quadro semelhante, com aparecimento de furunculose e infiltrados inflamatórios em pulmões, rins e fígado foi encontrado nos animais que receberam extrato, o que nos permite hipotetizar que *Z. joazeiro* exerce efeitos sobre o sistema imunológico, especificamente sobre neutrófilos e este efeito merece ser melhor investigado.

Ainda em relação ao leucograma, a monocitose encontrada em alguns grupos de machos e fêmeas tratados, poderia ser decorrente da instalação de um processo inflamatório de evolução crônica (RAVEL, 1997) e um quadro de inflamações em múltiplos órgãos foi constatado através da análise histológica das vísceras dos animais.

Uma fêmea tratada com a dose de 175 mg/kg veio a óbito durante o período experimental em decorrência do surgimento de grande tumor. O desenvolvimento de tumores pode ocorrer por falhas no sistema imunológico no reconhecimento de células anormais devido a imunodeficiência do organismo, ou ainda em decorrência de processos inflamatórios crônicos, que por aumentarem a taxa de reprodução celular, contribuem para a carcinogênese (VIOLA *et al.*, 2004). Posteriormente foi constatada leucopenia e presença de múltiplos infiltrados inflamatórios nos animais tratados, o que pode ter provocado o tumor.

Não se pode deixar de mencionar as diferentes ações do extrato entre machos e fêmeas, seja na intensidade, momento de aparição ou surgimento propriamente dito do efeito tóxico.

Existem diferenças importantes relacionados ao sexo, em parâmetros farmacológicos, que são demonstradas pelo número crescente de dados sobre a variação na eficácia e perfil toxicológico de drogas. Tem sido claramente demonstrado que a motilidade do trato gastrointestinal é influenciada por hormônios sexuais, bem como a atividade e o conteúdo de enzimas gastrointestinais, enzimas do citocromo P450, proteínas transportadoras de drogas e a velocidade de excreção renal (GANDHI *et al.*, 2004). Além disso, diferenças na percentagem de gordura corporal podem fazer com que agentes lipofílicos tenham um volume maior de distribuição e compostos solúveis em água exibam menor volume de distribuição em fêmeas quando comparadas aos machos (GANDHI *et al.*, 2004).

Outro fator contribuinte nas diferenças constatadas neste estudo, poderia ser atribuído a um possível efeito anti-esteroidogênico de *Z. joazeiro*, já que outra espécie do gênero, *Zizyphus jujuba*, possui esta atividade (GUPTA *et al.*, 2004), constituindo mais uma fonte de interferência com os hormônios sexuais.

Podemos afirmar ainda, que os efeitos tóxicos induzidos pelo extrato sobre os diferentes parâmetros avaliados neste ensaio não possuem qualquer relação dose-efeito.

Por fim, deve-se levar em consideração o fato de que os extratos vegetais são misturas de substâncias químicas e quando estudos toxicológicos com misturas químicas de qualquer origem são realizados, faz-se necessário reconhecer que diferentes tipos de interações entre os constituintes dessa mistura e o organismo animal podem ocorrer (FERON; GROTEN, 2002), o que demonstra a complexidade de ações que podem ser induzidas por estes extratos e sua dificuldade de interpretação tornando necessários estudos complementares que possam elucidar os efeitos encontrados.

## *CAPÍTULO V*

## 6.CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos através da realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos com o extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart, pode-se concluir que:

- ❖ No que diz respeito a toxicidade aguda, o extrato administrado por via oral apresenta toxicidade principalmente por induzir alterações em parâmetros metabólicos como ingestão de água e de ração; hematológicos e bioquímicos;
- ❖ O extrato ao ser administrado por via oral durante 90 dias tem alta toxicidade sendo observadas alterações na ingestão de água, em parâmetros bioquímicos, leucocitários e histopatológicos com efeitos pulmonares, renais e hepáticos;
- ❖ Considerando que o uso tópico da planta é bastante difundido pela população, é necessária a realização de estudos mais específicos que possam garantir a segurança de seu uso por esta via.
- ❖ Levando em conta sua toxicidade, faz-se importante alertar a população quanto ao uso indiscriminado da planta em preparações caseiras para uso medicinal.

## *CAPÍTULO VI*

## 7.REFERÊNCIAS

ABDEL-ZAHER A. O.; SALIM S. Y.; ASSAF M. H.; ABDEL-HADY R. A. Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. **Journal of Ethopharmacology**. v. 101, p. 149-138, 2005.

ADCOCK, I. M. Glucocorticoid regulated Transcription Factors. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**. v. 14, p. 211-219, 2001.

ADZU B.; AMOS S.; WAMBEBE C.; GAMANIEL K. Antinociceptive activity of *Zizyphus spina-christi* root bark extract. **Fitoterapia**, v. 72, p. 344-350, 2001.

ADZU B.; AMOS S.; AMIZAN M. B.; GAMANIEL K. Evaluation of the antidiarrhoeal effects of *Zizyphus spina-christi* stem bark in rats. **Acta Tropica**. v. 87, p. 245-250, 2003.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

ALMEIDA R. N.; FALCÃO A. C. G. M.; DINIZ R. S. T.; QUINTANS-JUNIOR D. J.; POLARI R. M.; BARBOSA-FILHO J. M.; AGRA M. F.; DUARTE J. C.; FERREIRA C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 80(3/4), p. 72-76, 1999.

AMARAL, D. A.; BARCIA, S. A. D. Intoxicações por Medicamentos. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, São Paulo: editora Atheneu, 2ª Edição, 2003.

AMARAL, M. E. C. **Regulação da Glicemia e Secreção de Insulina em Camundongos Transgênicos Hipertrigliceridêmicos**. [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2000.

ANDRADE, C. C. P. **Aspectos clínicos de pacientes sob suspeita de imunodeficiência fagocitária** [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2003.

ANDRÉS, E.; ZIMMER, J.; AFFENBERGER, S.; FEDERICI, L.; ALT, M.; MALOISEL, F. Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis: update of an old disorder. **European Journal of Internal Medicine**. v. 17, p. 529 – 535, 2006.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. Porto Alegre: editora Artmed, 4<sup>a</sup>. Edição, 2007.

BALIGA, M. S.; JAGETIA, G. C.; ULLOOR, J. N.; BALIGA, M. P.; VENKATESH, P.; REDDY, R.; RAO, K. V. N. M.; BALIGA, B. S.; DEVI, S.; RAJU, S. K.; VEERESH, V.; REDDY, T. K.; BAIRY, K. L. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of Saphthaparna (*Alstonia scholaris*) in mice and rats. **Toxicology Letters**. v. 151; p. 317-326, 2004.

BARBOSA-FILHO, J. M.; TRIGUEIRO, J. A.; CHERIYAN, U. O.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. **Journal of Natural Products**, v. 48(1), p. 152-153, 1985.

BARROS G. S. G.; MATOS F. J. A.; VIEIRA J. E. V.; SOUSA M. P.; MEDEIROS M. C. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 22, p. 116-122, 1970.

BORGI, W.; GHEDIRA, K.; CHOUCANE, N. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. **Fitoterapia**. v. 78, p. 16-19, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE”**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P. ; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENDGARDEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 17, p. 37-64, 1986.

CASTELLANO, O. **Introdução à Fitoterapia**. Serviço de Arte Gráfica da Coordenadoria de Atividades Culturais - USP – São Paulo, 1981.

COLEMAN, M. D. Dapsone-mediated agranulocytosis: risks, possible mechanisms and prevention. **Toxicology**. v. 162, p. 53 – 60, 2001.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 5ª Edição, v. 1, 1994.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JUNIOR, A. M. R.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, IN PRESS, 2007.

DEMAIN, A. L. **2000 Years of Natural Products Reseach: Past, Present and Future**, Editora Teus J. C. Luijendijk, Phytoconsult, 2000.

DINIZ, M. F. M. **Ensaio Toxicológicos Pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* EICHEL**. [Tese]. João Pessoa: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), 2000.

DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MALTA JÚNIOR, A.; MOURA, M. D. **Memento de Plantas Medicinais**, Editora Universitária-UFPB, 2ª Edição, p.79-81, 2006.

ETZIONI, A. Novel aspects of phagocytic cells disorders. **Current Opinion in Allergy and clinical immunology**. v.1; p. 535-540, 2001.

ÉVORA, P. R. B.; REIS, C. L.; FERREZ, M. A.; CONTE, D. A.; GARCIA, L. V. Distúrbios do equilíbrio hidroelétrólítico e do equilíbrio ácidobásico- uma revisão prática, **Medicina Ribeirão Preto**. v. 32; p. 451– 469, 1999.

FARNSWORTH, N. R. Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 38, p. 145-152, 1993.

FÉRES, C. A. O.; MADALOSSO, R. C.; ROCHA O. A.; LEITE J. P. V.; GUIMARÃES T. M. D. P.; TOLEDO V. P. P.; TAGLIATI C. A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108, p. 450-456, 2006.

FERON, V. J.; GROTEN, T.P.; Toxicological evaluation of chemical mixtures. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p. 825–839, 2002.

GANDHI, M.; AWEEKKA, F.; GREENBLATT, R.M.; BLASCHKE, T.F. Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 44, p. 499–523, 2004.

GONÇALVES, M. C. R.; DINIZ, M. F. F. M.; BORBA, J. D. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Berinjela (*Solanum melongena* L.) – Mito ou Realidade no Combate as Dislipidemias? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (2), p. 252–257, 2006.

GUIJARRO, A.; LAVIANO, A.; MEGUID, M. M. Hypothalamic integration of immune function and metabolism. **Progress in Brain Research**. v.153, p. 367–405, 2006.

GUPTA M.; MAZUMDER U. K.; VAMSI M. L. M.; SIVAKUMAR T.; KANDAR, C. C. Anti-steroidogenic activity of the two Indian medicinal plants in mice. **Journal of Ethopharmacology**. v. 90, p. 21-25, 2004.

GURIB-FALKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 1 – 93, 2006.

HIGUCHI, R.; KUBOTA, S.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; SINGH, J. P.; SHAH, A.H. Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. **Phytochemistry**. v. 23(11), 2597-2600, 1984.

HILALY, J. E.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91, p. 43-50, 2004.

HUSAIN, A. N.; KUMAR, V. O Pulmão. IN: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: editora Saunders Elsevier, 7ª edição, cap. 15, p. 747–812, 2005.

JAIN, S.; BELLINGAN, G. Basic science of acute lung injury. **Surgery**. v. 25(3), p. 112 – 116, 2007.

JULIEN, N.; KARZAZI, M.; LABRECQUE, D.; BEAUCHAMP, D. ; THIBAUT, D. Temporal modulation of nephrotoxicity, feeding and drinking in gentamicin-treated rats. **Physiology and Behavior**. v. 68, p. 533-541, 2000.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Editora do Instituto Plantarum, p. 396-397, São Paulo, 2002.

MANSUR, J.; MARTZ, R. M. W. ; URLINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-)  $\Delta^9$ - transtetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open field arena. **Psychopharmacology**. v. 9, p. 388- 397, 1971.

MARAN, J.; PRCHAL, J. Polycythemia and oxygen sensing. **Pathologie Biologie**. v. 52, p. 280 – 284, 2004.

MARASCHI, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, v. 10, p. 24-28, 1999.

MARIZ, S. R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** [Tese]. João Pessoa: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/ Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), 2007.

MATARESE, G.; LA CAVA, A. The intricate interface between immune system and metabolism. **TRENDS in Immunology**. v. 25 (4), p. 193– 200, 2004.

MCCHESENEY, J. D. Biological diversity, chemical diversity, and search for new pharmaceuticals. In: **BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, E. S. A. Medicinal Resources of the Tropical Forest – Biodiversity and its importance to human health**, Columbia University Press, p. 11-17, 1996.

MEZEY, E.; Liver Disease and Protein Needs. **Ann. Rev. Nutr.** v. 2, p. 21–50, 1982.

MINCIS, M. E MINCIS, R. Enzimas Hepáticas: por que são importantes para o estudo de doenças do fígado. **Prática Hospitalar**, ano IX, nº 51, mai/jun, p. 44-48, 2007.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 62, p. 57-61, 1998.

MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 138-144, 2007.

NUNES, P. H. M.; MARINHO, L. C.; NUNES, M. L. R. L.; SOARES, E. O. Antipyretic activity of an aqueous extract of of *Zizyphus joazeiro* MART. (Rhamnaceae). **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v. 20, p. 599-601, 1987.

OLIVEIRA, R. L. C.; LINS NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). **Environ Monit Assess.** v. 132, p. 189-206, 2007.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRANCKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K. V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** v. 32, p. 56-67, 2000.

PRANDO-ANDRADE, C.; AGUDELO-FLOREZ, P.; LOPEZ, J. A.; PAIVA, M. A. S.; COSTA-CARVALHO, B. T.; CONDINO-NETO, A. Doença granulomatosa crônica autossômica: relato de caso e análise genético-molecular de dois irmãos brasileiros. **Jornal de Pediatria.** v. 80, p. 425-428, 2004.

RACOTTA, R.; SOTO-MORA, L. M.; PALÁCIOS, E.; QUEVEDO, L. Norepinephrine inhibition of water and food intake: comparison with vasopressin effects. **Physiology and Behavior.** v. 57 (1), p. 141– 145, 1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon.** v. 39 (5), p. 603-613, 2001.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais.**, Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 6ª Edição, 1997.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia.** Colômbia: Premier. 1, 1997.

RUGGENENTI, P.; SCHIEPPATI, A.; REMUZZI, G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. **The Lancet.** v. 357, p. 1601 – 1608, 2001.

SANTOS, C. M.; JOHSON, R. F.; BELTZ, T. G.; THUNHORST, R. L., JOHNSON, A. K. Water intake during the development of renal hypertension (2K – 1C) in mice. **Physiology and Behavior**. v. 85, p. 512-516, 2005.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC e UFRGS, 1ª edição, 1999.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39 (4), p. 283–288, 2003.

SHAH, A. H.; KHAN, Z. A.; BAIG, M. Z. A.; QURESHI, S.; AL-BEKAIRI, A. M. Gastroprotective effects of pretreatment with *Zizyphus sativa* fruits against toxic damage in rats. **Fitoterapia**, v. LXVIII (3), p. 226-234, 1997.

SCHUHLY, W.; HEILMANN, J.; CALIS, I.; STICHER, O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Medica**. v. 65(8), p. 740-743, 1999.

SCHUHLY W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. Novel Triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*. **Helvetica Chimica Acta**. v. 83, p. 1509-1513, 2000.

SICA, D. A.; SCHOOLWERTH, A. C. Part 1- Uric acid and losartan. **Current Opinion in Nephrology and hypertension**. v. 11, p. 475–482, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Editora da Universidade/UFRGS, 2000.

SOARES, F. P.; RONCONI, C. A. V.; CUNHA, E. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. D.; BRAZ-FILHO, R. Four known triterpenoids isolated from three brazilian plants: 1H and 13C chemical shift assignments. **Magn Reson Chem**. v. 36(8), p. 608-614, 1998.

TALALAY, P.; TALALAY; P. The importance of Using Scientific Principles in the Development of Medicinal Agents from Plants. **Academic Medicine**. v. 76(3), p. 238-247, 2001.

TRAVLOS, G. S.; MORRIS, R. W.; ELWELL, M. R.; DUKE, A.; ROSENBLUM, S.; THOMPSON, M. B. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. **Toxicology**. v. 107, p. 17-29, 1996.

TRIGUEIRO, J. A. **Contribuição ao Estudo Químico e Farmacológico do *Zizyphus joazeiro* MART**. [Dissertação]. João Pessoa: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), 1981.

TSCHESCHE, R.; SHAH, A. H.; PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; RADLOFF, M. V.; ECKHARDT, G. Alkaloids of Rhamnaceae- Part 33. **Pharmazie**, v. 36, p. 511, 1981.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3(2), p. 93-98, 2006.

VIDAL, A.; FALLARERO, A.; PEÑA, B. R.; MEDINA, M. E.; GRÃ, B.; RIVERA; F.; GUTIERREZ, Y.; VUORELA, P. M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (*Punicaceae*) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 89, p. 295–300, 2003.

VIOLA, J. P. B.; TEIXEIRA, L. K.; WERNECK, M. B. F. Imunologia tumoral. In: **FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C., Oncologia Molecular**, São Paulo: editora Atheneu, 2004.

WASHIDA, B.; ABDERRAHMAN, B.; NABIL, C. Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 228-231, 2007.

WISLOFF, H.; UHLIG, S.; SCHEIE, E.; LOADER, J.; WILSINS, A.; FLAYEN, A. Toxicity testing of saponin-containing *Yucca schidigera* Roetzl. juice in relation

to hepato– and nephrotoxicity of *Nartheceium ossifragum* (L.) Huds. **Toxicon**. v. 51, p. 140-150, 2008.

YOUNG, B.; LOUISE, J.S.; STEVENS, A.; HETH, J.W. **Wheater – Histologia Funcional**. Rio de Janeiro: editora Elsevier Churchill Livinstone, 5<sup>a</sup> Edição, 2007

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)