

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA *Ipomoea asarifolia*
(SALSA) EM RATOS.**

Evaldo Augusto Salomão Monteiro

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA *Ipomoea asarifolia*
(SALSA) EM RATOS

Evaldo Augusto Salomão Monteiro

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, com parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária - área de concentração em Clínica Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

MAIO - 2010

M775a Monteiro, Evaldo Augusto Salomão
Avaliação toxicológica da Ipomoea asarifolia (salsa) em ratos./
Evaldo Augusto Salomão Monteiro – – Jaboticabal, 2010
vii, 102 f. il; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Antonio de Queiroz Neto

Banca examinadora: Maria Isabel Mataqueiro, Juliana Corrêa
Borges Silva, Maria do Carmo de Souza Batista, Fabiana Garcia
Chistovão

Bibliografia

1. Ipomoea asarifolia. 2. Ratos. 3. Toxicidade. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615:599.323.0

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EVALDO AUGUSTO SALOMÃO MONTEIRO - nascido em 03 de março de 1960 no município de Pedreiras-MA, é Médico Veterinário formado em 1982 pela Universidade Estadual do Maranhão - UEMA. Iniciou suas atividades docentes no Departamento das Clínicas do curso de Medicina Veterinária da UEMA em 1983, onde atualmente é professor assistente IV. Coursou especialização em Farmacologia de Produtos Naturais em 1983 na Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Foi diretor do Curso de Medicina Veterinária – UEMA de dezembro de 1994 a dezembro de 2003. Membro efetivo da comissão de ensino da Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior (ABEAS) no ano de 1998 a 2000. Coursou Mestrado em Administração – concentração em Políticas e Gestão Institucional na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), concluindo-o em 2002, defendendo a dissertação “A Percepção de Diretores de Curso da Universidade Estadual do Maranhão sobre a Implantação do Programa de Avaliação Institucional – UEMA com Base no PAIUB”. Coursou doutorado em Medicina Veterinária no período de outubro de 2006 a maio de 2010 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Jaboticabal, através do doutorado interinstitucional (DINTER), entre a UNESP-Jaboticabal e a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

**Somente a luz da ciência ainda é capaz de
brilhar na profunda escuridão da ignorância!**

(autor desconhecido)

A minha esposa **Isanilde**, pelo seu amor, apoio, companheirismo e acima de tudo compreender minha ausência durante a realização do experimento.

Aos meus filhos **Iago** e **Caio** por seu amor incondicional sendo eles meu principal elo com a vida.

Aos meus pais **Olinda** e **Raimundo** por seu exemplo de vida, principalmente na educação dos filhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, pelo apoio e incentivo em prol da qualificação dos docentes.

Ao prof. Dr. **Antonio de Queiroz Neto**, pela firmeza na orientação, o meu agradecimento sincero.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, **Sr. Euclídes, William, Talita, Analuê, Aline, Michael, Marcela e Damares**, todos imprescindíveis para o desenvolvimento de todas as etapas desta pesquisa.

A prof^a. Dr^a. **Rosângela Zacarias Machado**, pela amizade e apoio em todos os momentos.

A colega prof^a. Dr^a. **Francisca Neide Costa**, pela luta para implantação do DINTER entre a UNESP e a UEMA e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o período de agosto de 2009 a abril de 2010.

Aos professores do DINTER pelo exemplo de profissionalismo, pela palavra permanente de incentivo e pela postura acadêmica exemplar.

A todos os colegas do DINTER, em especial a **Antônia, Cristiane, Daniel, Zé Filho e Júnior** pelo companheirismo nos momentos de angústia, de aflição e de alegria.

A Dr^a **Rosemeri Vasconcelos**, Dr^a **Juliana Borges** e Dr^a **Maria Isabel Mataqueiro**, por apontar os caminhos e me auxiliar nas soluções das dúvidas e dificuldades na execução desta pesquisa científica.

Ao colega Prof. Dr. **Fábio Evangelista** pelo incentivo e auxílio na pesquisa laboratorial deste experimento.

A aluna de graduação da UEMA **Odinéia**, por me acompanhar na realização do início da pesquisa.

Aos colegas do Departamento das Clínicas da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, pelo apoio e incentivo.

Ao amigo Prof. **Gustavo Pereira da Costa**, pelo apoio e por fazer-me acreditar no significado da amizade.

A Prof^a **Maridalva Varão Ribeiro** pela oportunidade e apoio na carreira do magistério superior.

A Educadora **Leutres Zaqueu Monte** (D. Moreninha), pelo apoio e incentivo no início da minha vida estudantil, minha eterna gratidão.

Aos amigos **Gilson, Itaan, Alana, Nestor e José Benedito** pelo apoio constante em toda minha vida.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito de minha caminhada, meu justo agradecimento.

Acima de tudo, a **Deus**, por me dar força, coragem, saúde e determinação.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	1
Capítulo I - Considerações Gerais	3
1. Efeitos tóxicos em animais	5
2. Métodos de avaliação da toxicidade	8
3. Objetivo Geral.....	11
3.1. Objetivos Específicos.....	11
Referências.....	12

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA E SUBAGUDA DE EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DE *IPOMOEA ASARIFOLIA* (SALSA) EM RATOS

.....	17
Resumo	17
1. Introdução.....	19
2. Material e Método	22
2.1. Local do Experimento.....	22
2.2. Material Botânico e preparação dos extratos	22
3. Delineamento Experimental.....	23
3.1. Extrato Aquoso	23
3.1.1. Avaliação da toxicidade aguda	23
3.1.2. Avaliação da toxicidade subaguda	24
3.2. Resultados e Discussão	25
3.3. Extrato Hidroalcoólico	35
3.3.1. Avaliação da toxicidade aguda	35
3.3.2. Avaliação da toxicidade subaguda	36
3.4. Resultados e discussão	37
4. Conclusões	49
Referências.....	50

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PERINATAL EM FILHOTES DE RATAS, SUBMETIDAS A ADMINISTRAÇÃO DA *IPOMOEASARIFOLIA* EM FORMA DE RAÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO..... 56

Resumo	56
1. Introdução	58
2. Material e Métodos	61
2.1. Local do experimento	61
2.2. Material botânico e preparação das rações	61
2.3. Preparo da ração de salsa	62
2.4. Preparo da ração de feno.....	62
2.5. Análise das rações	62
2.6. Análise química e bioquímica da ração de feno e de salsa.....	63
3. Delineamento experimental	64
3.1. Avaliação da toxicidade perinatal	64
3.1.1 Animais	64
3.1.2. Fases	65
3.1.2.1. Pré-acasalamento	65
3.1.2.2. Acasalamento.....	65
3.1.2.2.1. Acasalamento Pré-experimento	66
3.1.2.3. Gestação	67
3.1.2.4. Nascimento	67
3.1.2.5. Pós-desmame	67
3.2. Avaliação comportamental da prole	68
3.2.1. Desenvolvimento físico da prole	68
3.2.2. Avaliação neurocomportamental da prole.....	68
4. Resultados e discussão	76
4.1. Avaliação do desenvolvimento físico da prole.....	78
4.2. Avaliação comportamental da prole	79
5. Conclusão	88

Referências.....	89
Apêndices	94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Capítulo I – Considerações Gerais	
Quadro1. Classificação botânica da <i>Ipomoea asarifolia</i>	4
Figura 1. <i>Ipomoea asarifolia</i>	5
 Capítulo II - Avaliação Toxicológica Aguda e Subaguda de Extratos Aquoso e Hidroalcoólico de <i>Ipomoea asarifolia</i> (Salsa) em Ratos.	
Tabela 1. Análise de Variância das variáveis de Hemograma	27
Tabela 2. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos	28
Tabela 3. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos	29
Tabela 4. Análise de Variância das variáveis de Hemograma	30
Figura 1. Fotomicrografia de ratos intoxicados com <i>I. asarifolia</i> extrato aquoso - Microvacuolização do neurópilo adjacente aos neurônios de Purkinje no encéfalo, objetiva de 40X.....	33
Figura 2. Fotomicrografia de fígado, hepatócitos tumefeitos da região centrololubular com pobre evidenciação dos sinusóides (degeneração hidrópica), objetiva de 40X	33
Figura 3. Fotomicrografia do rim de rato com túbulos contornados proximais tumefeitos (degeneração hidrópica), objetiva de 40X.....	34
Tabela 5. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos	37

Tabela 6. Análise de Variância das variáveis de Hemograma 40

Tabela 7. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos 42

Tabela 8. Análise de Variância das variáveis de Hemograma 44

Figura 4. Fotomicrografia de cérebro de rato intoxicado com *I. asarifolia* extrato hidroalcoólico. Severa microvacuolização segmentar do neurópilo adjacente aos neurônios de Purkinje no encéfalo, objetiva de 40X..... 47

Figura 5. Fotomicrografia de fígado de rato intoxicado com *I. asarifolia* extrato hidroalcoólico acentuada tumefação de hepatócito, discretos focos com infiltrado inflamatório linfocitário na Região Portal, objetiva de 40X 47

Figura 6. Fotomicrografia do rim de rato com intoxicado com *I. asarifolia* extrato hidroalcoólico com túbulos contornados proximais tumefeitos (degeneração hidrópica) , objetiva de 40X..... 48

CAPÍTULO III - Avaliação da toxidade perinatal em filhotes de ratas, submetidas a administração da *Ipomoea asarifolia* em forma de ração durante a gestação.

Tabela 1. Valores obtidos através da análise das rações de feno e de salsa a fim de que as ratas gestantes do grupo controle e do grupo tratado obtivessem o mesmo ganho protéico 63

Figura 1. Arena de Campo Aberto: avaliação da atividade exploratória..... 70

Figura 2. Labirinto em Cruz Elevado: modelo animal para avaliação da ansiedade 72

Figura 3. Tambor Giratório (Rota-rod): avaliação da coordenação motora e equilíbrio	73
Figura 4. Labirinto Aquático de Morris: modelo experimental para avaliação da aprendizagem e memória.....	75
Tabela 2. Tabela do consumo de ração do grupo tratado durante a gestação	76
Tabela 3. Tabela de ganho de peso de fêmeas gestantes dos grupos Tratado.....	77
Figura 5. Ganho de peso em gramas de ratas alimentadas com ração de salsa (50%) e ração de feno (50%) durante período de gestação	78
Figura 6. Representação gráfica do desenvolvimento físico da prole (esquiva ao abismo)	79
Figura 7. Representação gráfica do tempo médio para a localização da plataforma	81
Figura 8. Representação gráfica no teste de Labirinto em Cruz Elevado	85
Figura 9. Representação gráfica no teste de Rota-rod.....	86
Figura 10. Representação gráfica do tempo médio para a localização da plataforma	87
Apêndice A. Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda com <i>I. asarifolia</i> em extrato aquoso	95

Apêndice B. Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com <i>I. asarifolia</i> em extrato aquoso	96
Apêndice C. Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda com <i>I. asarifolia</i> em extrato aquoso	97
Apêndice D. Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com <i>I. asarifolia</i> em extrato aquoso	98
Apêndice E. Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda com <i>I. asarifolia</i> em extrato hidroalcoólico	99
Apêndice F. Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com <i>I. asarifolia</i> em extrato hidroalcoólico	100
Apêndice G. Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda com <i>I. asarifolia</i> em extrato hidroalcoólico	101
Apêndice H. Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com <i>I. asarifolia</i> em extrato hidroalcoólico	102

AVALIAÇÃO TÓXICOLÓGICA DA *Ipomoea asarifolia* (SALSA) EM RATOS

RESUMO – A *Ipomoea asarifolia* é uma planta tóxica, conhecida como salsa, batata salsa e salsa brava da família convolvulaceae, presente as margens de rios, lagoas e praias marítimas em todo o Brasil, sendo responsável pela intoxicação natural em ruminantes, principalmente no Nordeste brasileiro, causando excitabilidade e alterações no hemograma e perfil bioquímico desses animais, além de pequenas lesões macroscópicas e microscópicas nos órgãos internos (encéfalo, fígado e rins). Pela falta de trabalhos científicos que relatem a sua interferência sobre o desenvolvimento cerebral nas espécies animais o nosso objetivo foi avaliar o potencial tóxico dessa planta, em ratos, um modelo experimental confiável e de fácil repetibilidade, as possíveis alterações hematológicas, bioquímicas e o comportamento perinatal neste modelo. Os resultados obtidos no perfil bioquímico, hemograma e no exame histopatológico dos ratos intoxicados com extrato aquoso e hidroalcoólico nos permitiu constatar alterações significantes no perfil bioquímico para as variáveis glicose, proteína, alanina aminotransferase e bilirrubina direta na intoxicação aguda com os extratos aquoso e hidroalcoólico. Na intoxicação subaguda observamos alterações para as proteínas e creatinina nos dois extratos. Quanto ao hemograma, tanto na intoxicação aguda como na subaguda constatamos alterações para as variáveis plaquetas e monócitos entre o grupo controle e o grupo tratado. No histopatológico foi observado no encéfalo edema intersticial e degeneração hidrópica no fígado e rins dos ratos intoxicados o que caracteriza um quadro de intoxicação. Quanto à avaliação perinatal podemos observar que houve diferenças entre os filhotes de ratas controles daquelas que se alimentaram com ração de salsa durante toda a gestação, no desenvolvimento físico da prole (Esquiva ao Abismo) e na avaliação neurocomportamental (Labirinto Aquático de Morris), o que pode caracterizar uma lesão sobre o desenvolvimento cerebral dos filhotes.

Palavras-chave: *Ipomoea asarifolia*. Ratos. Toxicidade. Avaliação perinatal. Neurotoxicidade

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF *Ipomoea asarifolia* (PARSLEY) IN RATS

ABSTRACT - *Ipomoea asarifolia* is a toxic plant from Convolvulaceae family, known as “parsley” or “salsa”, present on banks of rivers and lakes and seashores throughout Brazil and is responsible for natural poisoning of ruminants, mainly in Brazilian northeast, causing excitability and changes in blood count and biochemical profile of these animals, besides macro and microscopic lesions in internal organs (encephalon, liver and kidneys). From the lack of scientific papers that report its interference on animal species brain development, our aim was to evaluate the toxic potential of this plant in rats, an experimental model reliable and easily repeatable, and possible changes in hematological, biochemical and perinatal behavior in this model. Achieved results in biochemical profile, complete blood count and histopathological exams of rats intoxicated with aqueous and hydroalcoholic extracts, allowed us to observe significant changes in biochemical profile for variables as glucose, protein, alanine aminotransferase and direct bilirubin in acute intoxication with aqueous and hydroalcoholic extracts. In subacute intoxication changes were observed for protein and creatinine on both extracts. According to blood count, changes were found for platelet and monocyte variables between treated and control group, both in acute and in subacute intoxication. In histopathological exam, interstitial edema was observed in encephalon, as hydropic degeneration in liver and kidneys of intoxicated rats, which characterize intoxication. As for perinatal evaluation, it is possible to observe differences between the offspring of animals from control group and those fed with salsa diet throughout pregnancy, in offspring physical development (elude the abyss) and neurobehavioral evaluation (Morris Water Maze), which can indicate lesion on descendants brain development.

Keywords: *Ipomoea asarifolia*. Rats. Toxicity. Perinatal evaluation. Neurotoxicity.

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Planta tóxica é todo vegetal que, ao ser ingerido em condições naturais, é capaz de causar danos que se refletem na saúde e vitalidade dos animais. A intoxicação por plantas é uma das principais causas de mortalidade em bovinos, ovinos e caprinos, sendo motivo de grande preocupação para os pecuaristas do Brasil, principalmente no Nordeste brasileiro (RODRIGUEZ et al., 2005). Desta forma o estudo das plantas cresce anualmente tanto no Brasil quanto no mundo e junto com este aumenta o interesse e o conhecimento sobre os componentes químicos das plantas. São descobertas as plantas medicinais, vegetais úteis para a manutenção da saúde e da qualidade de vida, mas também se estudam as tóxicas (BARG, 2004).

As condições em que ocorrem as intoxicação por estas plantas em animais domésticos são bastante peculiares. Os surtos ocorrem quando animais que desconhecem a planta são transportados para locais onde ela está presente nas pastagens ou quando há escassez de alimentos (ALDA et al., 2009).

O impacto econômico das intoxicações por plantas é difícil de ser estimado, pois inclui perdas diretas e indiretas. As perdas diretas são provocadas pela morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã e aumento da susceptibilidade a outras doenças devido à imunodepressão (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001).

Ipomoea asarifolia popularmente conhecida como salsa, batata salsa, salsa-brava é uma liana perene de hábito rasteiro (KIILL e RANGA, 2003), da família *Convolvulaceae* (Quadro 1). É uma planta nativa na América tropical, que ocorre em regiões da América do Sul e Central (ARAÚJO et al., 2008). No Brasil é muito comum na Amazônia e em todo o litoral da região Norte, estendendo-se até os estados do Rio de Janeiro, São Paulo e região Nordeste (KISSMANN e GROTH, 1992). As mesmas também foram encontradas às margens de rios e lagoas, praias marítimas, em terrenos abandonados e nas margens das estradas (TOKARNIA et al., 2000). No semi-árido

crecem as margens de açudes e rios, em terrenos abandonados, nas margens de estradas, em áreas de baixos e próximos a reservatórios de água (TOKARNIA et al., 2000) (Figura 1).

Quadro.1. Classificação botânica da *Ipomoea asarifolia* (Desr.) Roem. & Schult.

Reino	<u><i>Plantae</i></u>
Sub-reino	<u><i>Tracheobionta</i></u>
Super-divisão	<u><i>Spermatophyta</i></u>
Divisão	<u><i>Magnoliophyta</i></u>
Classe	<u><i>Magnoliopsida</i></u>
Sub-classe	<u><i>Asteridae</i></u>
Ordem	<u><i>Solanales</i></u>
Família	<u><i>Convolvulaceae</i></u>
Gênero	<i>Ipomoea</i>
Espécie	<i>Ipomoea asarifolia</i> (Desr.) Roem. & Schult.

Fonte: http://www.homolaicus.com/scienza/erbario/utility/botanica_sistemica/hypertext/0933.htm



Figura 1. *Ipomoea asarifolia*

Fonte: http://www.homolaicus.com/scienza/erbario/utility/botanica_sistematica/hypertext/0933.htm

1. Efeitos tóxicos em animais

A toxicidade de plantas do gênero *Ipomoea* pode variar de acordo com a espécie animal, sexo e idade. TOKARNIA et al. (2004).

A intoxicação por *Ipomoea sp* ocorre frequentemente em caprinos e ovinos na região Nordeste, principalmente no Vale do Rio São Francisco (OLIVEIRA et al., 2009) e na região Noroeste Maranhense (CHAVES, 2009). Nestas regiões, plantas deste gênero, se conservam verdes durante o período de seca, sendo consideradas plantas tóxicas importantes e bem conhecidas (RODRIGUEZ, 2006).

Devido à escassez de alimentos, vista a baixa disponibilidade de forragem nesta época, onde a maioria das pastagens é formada por campo nativo, estas plantas compõem na grande maioria dos casos, aproximadamente 80% da alimentação disponível para os animais (TORTELLI et al., 2008). A *Ipomoea asarifolia* (salsa), uma das espécies deste gênero, é ingerida como alimento pelos ruminantes, sendo relatados alguns sintomas de intoxicação em ovinos após o consumo natural da mesma (CHAVES et al., 2008). Este último autor ainda relata, em ovinos intoxicados

experimentalmente com sintomas de excitabilidade e alterações em alguns dos constituintes do hemograma e do perfil bioquímico.

A intoxicação ocorre principalmente na época da seca, quando não há mais disponibilidade de forragem, exceto a salsa que, geralmente, continua verde (SILVA et al., 2006).

Os sinais clínicos desta intoxicação e susceptibilidade são diferentes entre os ruminantes. Em ovinos e caprinos os sinais da intoxicação são caracterizados por tremores musculares discretos de membros e cabeça, que se agravam em 2-3 dias, com hipersensibilidade a ruídos ou movimentos, ataxia e permanência com os membros abertos ou decúbito por longos períodos (DÖBEREINER et al., 1960; BARBOSA et al., 2005).

Há relatos de que os ovinos manifestam nistagmo e midríase e os caprinos apresentam pêlos arrepiados, sendo que os animais intoxicados tendem a melhorar significativamente e evoluir para a cura após a interrupção da administração da planta. Os cordeiros alimentados com o leite dos animais intoxicados não apresentaram sinais de intoxicação (ARAÚJO et al., 2008).

Para TORTELLI et al. (2008), os ovinos são as espécies mais afetadas pela intoxicação com a *Ipomoea asarifolia*, sendo os cordeiros mais comumente acometidos. Segundo estes autores há presença de sinais clínicos característicos de uma “doença tremorgênica” e ausência de lesões histológicas significativas.

Guedes et al. (2007) não relataram lesões macroscópicas significantes após realização de necropsia. As lesões histológicas do sistema nervoso central foram caracterizadas por vacúolos na camada granular do cerebelo, com raros esferóides axonais, moderado número de células de Purkinje contendo vacúolos intracitoplasmáticos.

Trabalhando com intoxicação experimental de *I. asarifolia* em caprinos, Medeiros et al. (2003), não relataram lesões histológicas significativas no fígado, rins, pulmões, nodos linfáticos, baço, tireóides, adrenais, pâncreas, intestinos, células cardíacas e nervosas do córtex, tálamo, cerebelo, ponte e medula espinhal.

Em bovinos e bubalinos os sintomas são semelhantes e os sinais são caracterizados principalmente por incoordenação, tremores musculares e balanço de

cabeça, inclusive da parte anterior do corpo. Foi relatado sialorréia, diminuição do tônus da língua e dos reflexos do lábio superior e palatal, com os bubalinos apresentando menor incoordenação motora do que os bovinos, porém com maior perda do tônus lingual (BARBOSA et al., 2005).

As necropsias de bovinos intoxicados naturalmente com plantas deste gênero, não revelaram alterações significativas e, histologicamente, pode-se visualizar tumefação e fina vacuolização de neurônios em diversas áreas do sistema nervoso central, ocasionalmente de células da glia e formações de esferóides axonais. Vacuolizações citoplasmáticas ocorrem também em hepatócitos, células acinares do pâncreas e macrófagos do baço e gânglios linfáticos (ANTONIASSI et al., 2007).

Poucos são os estudos relacionando os sinais clínicos da intoxicação por *I. asarifolia* com alterações laboratoriais.

Inicialmente, esta planta foi classificada como um vegetal que causava armazenamento lisossômico (MEDEIROS et al., 2000), porém, experimentos posteriores demonstraram que é responsável pelo surgimento de uma síndrome tremorgênica (BARBOSA et al., 2005). Estes mesmos autores afirmaram que o seu mecanismo de ação pode estar relacionado à perturbação na neurotransmissão, por interferir nos seus mecanismos bioquímicos.

Outros autores acreditam que a *I. asarifolia*, diferentemente da *I. fistulosa* e *I. riedelii* (que têm sido incriminadas como causadoras da chamada “doença do armazenamento”), induz perturbações na neurotransmissão por interferência, principalmente, na bomba de sódio (ARMIÉN, 2000; RIET-CORRÊA et al., 2002)

2. Métodos de avaliação da toxicidade

Para avaliação de agentes tóxicos vem crescendo a demanda por testes *in vitro*, que não utilizem animais (PEQUENO e SOTO-BLANCO, 2006). Porém, na necessidade da utilização de animais para testes de toxicidade, os ratos são bastante empregados, pois já são modelos consagrados e usados em avaliação de plantas medicinais e tóxicas (BATISTA et al., 2006; GOMES et al., 2006; MELO et al., 2008).

Alguns testes são descritos para avaliação comportamental de ratos frente à exposição de vários agentes. Dentre estes testes, os que avaliam o comportamento motor e cognitivo geralmente são feitos usando estruturas simples que podem ser incrementados com a utilização de sistemas digitais e computadorizados de registro, sendo eles: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Rota Rod (haste giratória) e Labirinto Aquático de Morris (PELLOW ET al., 1985; HANDLEY e McBLANE, 1993; NASELLO et al., 1998; VAN, 2002).

O teste de Campo Aberto ou Open Field descrito por HALL (1941) é amplamente utilizado para quantificar movimentos locomotores e mensurar a emocionalidade e capacidade de exploração dos animais (ROSSATO et al. (2006). Este teste possibilita registrar o medo, através da atividade exploratória do animal, e consiste de uma grande câmara vazia, onde o indivíduo é colocado. Uma vez dentro do campo, a atividade do animal é registrada, o que pode ser feito através de um registrador de atividade automatizado, ou através de linhas dispostas no assoalho da câmara, contando-se o número de vezes que tais linhas são cruzadas durante o teste. Além disso, pode-se contar também o número de pelotas fecais produzidas pelos animais durante o teste (MELO et al., 2008).

Estes últimos autores afirmam que uma baixa atividade motora e altas contagens de pelotas fecais geralmente indicam uma reação de medo. Ratos com medo apresentam um comportamento tigmotático, ou seja, eles procuram não se aventurar para longe das paredes da câmara, além de evitarem ficar sobre as patas traseiras ou se limpar quando introduzidos num campo aberto desconhecido. Este comportamento irá diminuir à medida que o animal se familiarize com a caixa.

Outro teste usado para mensuração da coordenação motora é “Rota Rod”, que

consiste de um cilindro distante 7 cm da superfície da mesa, o qual gira a uma velocidade constante de 6 rpm, movido por um motor. Para manter-se sobre cilindro giratório, o animal necessita locomover-se, de modo que a capacidade locomotora pode ser quantificada, cronometrando-se o tempo de permanência do rato sobre o cilindro. Durante a realização do teste (que tem duração de três minutos por animal), é registrado o tempo que o animal leva para cair pela primeira vez. Após, ele é imediatamente recolocado em cima do cilindro e registra-se o número de quedas durante o tempo de observação do teste (GRAVA et al., 2008).

Segundo OLIVEIRA et al. (2008), este método permite avaliar também a especificidade da ação central de fármacos, verificando se estes promovem incoordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou por relaxamento muscular.

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) instituído por PELLOW et al. (1985), é um dos modelos mais usados no estudo da ansiedade e medo. O aparelho possui quatro braços (comprimento: 50 cm, largura: 10 cm) que se cruzam em uma área comum, elevados a 50 cm do chão. Dois dos braços são fechados (com três paredes de 50 cm de altura) e os outros dois são abertos (sem paredes). Os animais são colocados para explorarem o aparato por cinco minutos. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados são registrados. Este teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos e foi validado para ratos e camundongos (MORATO, 2006).

Outro teste usado para verificação da influência das plantas e fármacos na capacidade de aprendizagem geral e localização espacial em roedores é o Labirinto Aquático de Morris, que é um modelo projetado para se estudar as capacidades espaciais dos ratos. Consiste de uma piscina circular preta (diâmetro de 200 cm, profundidade de 40 cm) preenchida com 30 cm de água na temperatura de aproximadamente 26°C e turvada com 150g de leite em pó. Os ratos são colocados neste ambiente e devem nadar até encontrarem uma plataforma de escape, que está invisível logo abaixo da superfície da água. Desta forma, o animal aprende a triangular as distâncias entre as orientações visuais do ambiente e a posição da plataforma de modo flexível, como em um mapa cognitivo. Mesmo um animal com lesão hipocampal pode aprender a encontrar a plataforma, se ele parte sempre de um mesmo ponto do

labirinto, pois desta forma ele não precisa usar propriedades dedutivas do seu mapa cognitivo para associar as orientações espaciais e, por triangulação, deduzir a posição da plataforma, independente do fato de ser liberado próximo ou distante de um ponto específico (MORRIS et al., 1982).

Considerando-se:

- 1) A importância do conhecimento acerca da intoxicação da *I. asarifolia* (salsa) na região Nordeste;
- 2) A pouca disponibilidade de estudos científicos que fazem referência a possíveis mecanismos de ação toxicológica;
- 3) A carência de trabalhos que abordem modelos farmacológicos de estudo sobre a intoxicação por esta planta;
- 4) A importância do conhecimento de um modelo experimental confiável e de fácil repetibilidade, para avaliações toxicológicas;

Resolveu-se realizar experimentos abordando a intoxicação experimental por *I. asarifolia* (salsa) em ratos, enfocando as possíveis alterações nos exames hematológicos, no perfil bioquímico e no comportamento perinatal de mães submetidas à dieta com o produto em teste, utilizando para isso os modelos do Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Rota Rod e Labirinto aquático de Morris, por acreditar que revestem-se de importância.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade da *I. asarifolia* apresentada na forma de extratos aquoso e hidroalcoólico e de ração, por meio de modelo farmacológico *in vivo*. em ratos Wistar.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Verificar a toxicidade aguda e subaguda da planta *I. asarifolia* apresentada na forma de extratos aquoso e hidroalcoólico em ratos Wistar, analisando-se os constituintes do hemograma, do perfil bioquímico (mensurações de ALT, AST, CREA, GLICO, PROT, BD, BT) e as alterações macroscópicas e microscópicas dos órgãos internos (fígado, rins e encéfalo) ;

✓ Comparar os extratos aquoso e hidroalcoólico, quanto à capacidade de produzirem alterações hematológicas, bioquímicas e na macro/microscopia de órgãos de ratos;

✓ Avaliar as prováveis alterações comportamentais que denotem toxidade perinatal em filhotes de ratas, alimentadas, durante toda a gestação, com ração formulada com *I. asarifolia* (salsa), utilizando os modelos comportamentais: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Tambor Giratório (Rota-rod) e Labirinto Aquático de Morris;

✓ Observar o desenvolvimento físico da prole de ratas tratadas com ração formulada com *I. asarifolia* (salsa).

REFERÊNCIAS

ALDA, J. L.; SALLIS, E. S. V.; NOGUEIRA, C. E. W.; SOARES, M. P.; AMARAL, L.; PEREIRA, C. M.; XAVIER, F.; FREY JR., F.; SCHILD, A. L. Intoxicação espontânea por *baccharis coridifolia* (compositae) em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 409-414, 2009.

ANTONIASSI, N. A. B.; FERREIRA, E. V.; SANTOS, C. E. P.; ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Intoxicação espontânea por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em bovinos no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 415-418, 2007.

ARAÚJO, J. A. S.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; SOARES, M. P.; OLIVEIRA, D. M.; CARVALHO, F. K. L. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (convolvulaceae) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28 n. 10, p. 488-494, 2008.

BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Intoxicações experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 231-234, 2005.

BARG, D. G. **Plantas tóxicas**. 2004. 24 f. Monografia (Trabalho de graduação) - Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BATISTA, C. P.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; MOREIRA, A. T. R. M.; COLMAN, D.; LIMA, J. H. F.; MACRI, M. M.; RAUEN JR, R. J.; FERREIRA, L. M.; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na

cicatrização do estômago em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 3, p. 49-54, 2006.

CHAVES, D. P. **Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* em ovinos: achados clínicos laboratoriais e anatomopatológicos**. 2009. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CHAVES, D. P.; SOBRINHO, A. G.; MAHON, G. V.; CARVALHO, V. H. A; FAGLIARI, J. J. Surto de síndrome tremorgênica causada por *Ipomoea asarifolia* (ders.) Roem. & Schult. (convolvulaceae) em ovinos nos lençóis maranhenses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. v. 1, p. 208.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELA, C. F. C. Intoxicação experimental pela salsa *Ipomoea asarifolia* (r. Et schult) em ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 39-57, 1960.

GOMES, C. S.; CAMPOS, A. C. L.; TORRES, O. J. M.; VASCONCELOS, P. R. L.; MOREIRA, A. T. R.; TENÓRIO, S. B.; TAMBARA, E. M.; SAKATA, K.; MORAES JÚNIOR, H.; FERRER, A. L. S. F Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 2, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S0102-86502006000800003.

GRAVA, A. L. S.; FERRARI, L. F., PARADA, C. A; DEFINO, H. L. A. Modelo experimental para o estudo da hérnia do disco intervertebral. **Revista Brasileira Ortopedia**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 116-125, 2008.

GUEDES, K. M. R.; RIET-CORREA, F. R.; DANTAS, A. F. M.; SIMOES, S.V. D.; MIRANDA NETO, E. G.; NOBRE, V. M. T.; MEDEIROS, R. M. T. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 29-38, 2007.

HALL, C. S. Temperament: a survey of animal studies. **Psychology Bulletin**, Belville, v. 38, p. 909-943, 1941.

KIILL, L. H. P.; RANGA, N. Ecologia da polinização de *Ipomoea asarifolia* (ders.) Roem. & schult. (convolvulaceae) na região semi-árida de Pernambuco. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 355-362, 2003.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. v. 2.

MEDEIROS, R. M. T.; NOBRE, V. M. T.; TABOSA, I. M.; RIET-CORREA, F. Toxic plants for ruminants in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21., 2000, Punta Del Este, Uruguai. p. 10141-10150.

MEDEIROS, R. M. T.; BARBOSA, R. C.; RIET-CORREA, E. F.; LIMA, E. F.; TABOSA, I. M.; DE BARROS, S. S.; GARDNER, D. R.; MOLYNEUX, R. J. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil. **Toxicon**, Kidlington, v. 41, n. 7, p. 933-935, 2003.

MELO, M. M.; VERCOSA JUNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCOL, R.; PAES, P. R. O. intoxicação experimental com extratos de *mascagnia rigida* (malpighiaceae) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 631-640, 2008.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia da USP**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

MORRIS, R. G. M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N. P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, London, v. 297, n. 5868, p. 681-683, 1982.

OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; DE PAULA, J. R.; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. da. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 485-491, 2008.

OLIVEIRA, C. A.; BARBOSA, J. D.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; CORREA, F. R.; TORTELLI, F. P.; CORREA, G. R. Intoxicação por *Ipomoea carnea* subsp. *Fistulosa* (convolvulaceae) em caprinos na Ilha do Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 583-588, 2009.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 149-167, 1985.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 45-48, 2006.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

RODRIGUEZ, C. L.; RIOS, E. E.; MACCIÓ, O. A.; MERLO, W. A.; LECTORA, J. Intoxicación con *ipomoea fistulosa* (aguapá, mandiyurá) en cabras. Efectos sobre el sistema nervioso. **Sitio Argentino de Producción Animal. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Buenos Aires, v.15, 2005.

RODRÍGUEZ, J. L. R. **Expressão da proteína Fos em cérebro de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado na presença e ausência de iluminação**. 2006. Dissertação

(Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ROSSATO, J. I.; ZINN, C. G.; FURINI, C.; BEVILAQUA, L. R. M.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S0001-37652006000300011.

SCHWARZ, A.; HOSOMI, R. Z.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. Rats offspring exposed to *Ipomoea carnea* and handling during gestation: neurochemical evaluation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 425-433, 2007.

SILVA, D. M.; CORREA, F. R.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no seridó ocidental e oriental do rio grande do norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

TOKARNIA, C. H.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C. de; FARIAS BRITO, M. de; OLIVEIRA, R. B. de; BARBAS, L. A. L. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 74-79, 2004.

TORTELLI, F. P. Y.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; OLIVEIRA, C. A.; CORREA, F. R.; CORREA, G. R. Intoxicação por *Ipomoea asarifolia* em ovinos e bovinos na Ilha de Marajó. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 622-626, 2008.

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA E SUBAGUDA DE EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DE *Ipomoea asarifolia* (SALSA) EM RATOS.

RESUMO: Uma grande variedade de plantas tóxicas é encontrada no Brasil, incluindo o gênero *Ipomoea* causando prejuízos à pecuária brasileira. A *Ipomoea asarifolia* também conhecida como salsa, salsa de praia, batata salsa é uma planta desse gênero, pantropical, com ampla ocorrência no Brasil causando intoxicação natural e experimentalmente em ruminantes. Considerando as várias lacunas existentes quanto a compreensão dos efeitos tóxicos dessa planta optou-se em verificar a toxicidade aguda e subaguda com extrato aquoso e hidroalcoólico em ratos wistar, analisando os parâmetros hematológicos, bioquímicos e alterações macroscópicas e microscópicas de encéfalo, fígado e rins. Em algumas variáveis as alterações foram discretas no hemograma e no perfil bioquímico dos ratos do grupo tratado quando comparados aos ratos do grupo controle na intoxicação aguda e subaguda com os extratos. Em relação às alterações histopatológicas tanto na intoxicação aguda e subaguda com os extratos aquoso e hidroalcoólico, os ratos do grupo tratado apresentaram discreta vacuolização intracitoplasmática de neurônios, hepatotoxicidade aguda e degeneração hidrópica difusa do epitélio tubular renal de intensidade moderada sugerindo um quadro de intoxicação.

Palavras-chave: *Ipomoea asarifolia*. Intoxicação. Extrato aquoso. Extrato hidroalcoólico.

ACUTE AND SUBACUTE TOXICOLOGICAL EVALUATION OF AQUEOUS AND HYDROALCOHOLIC EXTRACS OF *Ipomoea asarifolia* (PARSLEY) IN RATS

SUMMARY: A variety of toxic plants is found in Brazil, including the genus *Ipomoea* which cause damage to livestock in Brazil. The *Ipomoea asarifolia* also known as “salsa”, “beach parsley” or “potato parsley” is a plant of this kind. It is a pantropical plant with widespread occurrence in Brazil causing naturally and experimentally poisoning in cattle. Considering the lack of understanding of the toxic effects of this plant it was chosen to verify the acute and subacute toxicity with aqueous and hydroalcoholic extracts in Wistar rats, analyzing the hematological and biochemical parameters and macroscopic and microscopic alterations in brain, liver and kidneys. In some variables the alterations were discrete at the hemogram and biochemical profile of rats in the treated group compared to control group in acute and subacute poisoning with the extracts. Regarding to histopathological changes in both the acute and subacute poisoning with aqueous and hydroalcoholic extracts the treated group showed mild intracytoplasmic vacuolation in neurons, acute hepatotoxicity and diffuse hidropic degeneration of tubular renal epithelium with moderate intensity suggesting a poisoning state.

Keywords: *Ipomoea asarifolia*. Poisoning. Aqueous Extract. Hydroalcoholic Extract.

1. INTRODUÇÃO

Diversas espécies de plantas tóxicas são encontradas no Brasil, incluindo o gênero *Ipomoea* causando grandes prejuízos à pecuária brasileira. Trata-se de um gênero muito amplo, compreendendo entre 450 e 500 espécies, cujas plantas são pequenas, na forma de arbustos e trepadeiras (RODRÍGUEZ et al., 2005), amplamente distribuídas por todo o mundo e bastante conhecidas e cultivadas, por conta do aspecto ornamental que suas flores e cores vibrantes apresentam (SCHWARZ et al., 2004).

Experimentos toxicológicos com este gênero são amplamente encontrados na literatura, porém a *I. asarifolia* ainda é pouco estudada, sobretudo no que se refere aos seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

HUEZA et al. (2005) observaram, em ratos tratados com doses moderadas da fração aquosa do extrato etanólico de *I. carnea*, aumento na fagocitose macrofágica e produção de peróxido de hidrogênio pelas células peritoneais, ao passo que com doses maiores o efeito imunoestimulante não foi observado.

A toxicidade da *Ipomoea fistulosa* também já foi estudada e atribuída à presença de alcalóides inibidores de glicosidases (MOLYNEUX et al., 1995). A *Ipomoea carnea* possui os alcalóides suainsonina e calesteginas como princípios ativos e, possivelmente, responsáveis pelos efeitos tóxicos (DE BALOGH et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007).

A *Ipomoea asarifolia*, popularmente conhecida como salsa, salsa da praia, batatarana, batata-salsa e salsa-brava, é uma planta daninha que ocorre com frequência em áreas cultivadas (BLANCO, 1978; GROTH, 1991; KISSMAN & GROTH, 1992), sendo encontrada também nas margens de lagoas e praias marítimas, de preferência em solos arenosos (BLANCO, 1978; TOKARNIA et al., 1979).

Segundo AUSTIN & CAVALCANTI (1982), esta *Convolvulaceae* é pantropical, com ampla ocorrência no Brasil. A sua toxicidade já foi observada ocorrendo naturalmente e comprovada experimentalmente em bovinos, ovinos e caprinos (DÖBEREINER et al., 1960) e bubalinos (BARBOSA et al., 2005).

Os sintomas da intoxicação por *I. asarifolia* em ovinos, bem como nas outras espécies de ruminantes, ocorrem principalmente em animais jovens e são de ordem nervosa, se caracterizando, por tremores musculares e perturbações na locomoção (TOKARNIA et al., 1979). O apetite é mantido e a sintomatologia se intensifica quando os animais são movimentados. Interrompida a ingestão, os sinais clínicos perduram por vários dias, tendendo a desaparecer. Porém, os animais que continuam a ingerir a planta vêm a óbito. Os achados de necropsia são negativos (TOKARNIA et al., 2000), embora em estudos anteriores realizados em bovinos, ovinos e caprinos (TOKARNIA & DÖBEREINER, 1979) observaram-se hiperemia e hemorragias discretas no sistema nervoso central.

DAMIR et al. (1987) mencionaram que o aparecimento dos sintomas nervosos em carneiros poderia ser consequência indireta das lesões hepáticas provocadas pelo gênero *Ipomoea* e não da ação direta dos constituintes tóxicos da planta sobre o sistema nervoso central.

Segundo RIET-CORREA et al. (2002), as intoxicações por *I. asarifolia* causam uma “síndrome tremorgênica” em eqüinos e ruminantes, que se caracteriza por tremores e incoordenação. Inicialmente os tremores podem afetar a cabeça e o pescoço, mas quando os animais são agitados agravam-se afetando todo o corpo e provocando a queda dos mesmos, que, posteriormente, levantam-se em alguns minutos.

CHAVES (2009) relata, em ovinos intoxicados experimentalmente com esta planta, sintomas de excitabilidade, com discretas alterações no hemograma e no perfil bioquímico e significativas lesões histopatológicas de fígado, rins e sistema nervoso central.

Observando-se que há muitas diferenças na susceptibilidade aos efeitos tóxicos entre as espécies animais à *I. asarifolia* (BUKOWSKA e KOWALSKA, 2004 *apud* PEQUENO e SOTO-BLANCO, 2006) e considerando-se as várias lacunas existentes quanto à compreensão dos efeitos tóxicos que essa planta é capaz de causar, são necessárias mais pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de medidas mais eficientes de manejo e controle dessas intoxicações.

Tendo em vista o significado econômico, a importância ecológica da *I. asarifolia* (salsa) e a necessidade de maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na intoxicação por esta planta, optou-se por estudá-la sob a forma de extratos aquoso e hidroalcoólico, que são preparações concentradas obtidas de vegetais frescos ou secos, por meio de um solvente (água, no caso do aquoso e água mais álcool, no caso do hidroalcoólico), com posterior evaporação total ou parcial deste e ajuste final do concentrado (FERRO, 2006).

O extrato hidroalcoólico tem como vantagem, em relação ao aquoso, a geração de um produto mais homogêneo, conservação das propriedades originais sem perda de qualidade e possibilidade de padronização de princípios ativos com maior concentração (FERRO, 2006).

Testes de toxicidade destinados à avaliação de agentes tóxicos empregam animais de laboratório, embora seja crescente a demanda por testes *in vitro* (PEQUENO e SOTO-BLANCO, 2006). Dentre estes animais, os ratos já são modelos consagrados para avaliação do uso de plantas medicinais e tóxicas em vários estudos (BATISTA et al., 2006; GOMES et al., 2006; MELO et al., 2008).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos variam com a literatura. O Laboratório de apoio à pesquisa do departamento de clínica e cirurgia veterinária-FCAV...da FCAV adota como valores de referência para ratos Wistar:

Desta maneira, a proposta deste estudo foi verificar a toxicidade aguda e subaguda do extrato aquoso e hidroalcoólico da *I. asarifolia* em ratos Wistar, analisando-se os parâmetros hematológicos (número de hemáceas, leucócitos totais, dosagens de Hemoglobina, Hematócrito e contagens diferenciais de Basófilos, Eosinófilos, Neutrófilos bastonete e segmentado, Linfócitos, Monócitos e mensuração das Plaquetas); o perfil bioquímico, pelas análises de ALT, AST, CREA, GLICO, proteínas séricas, bilirrubina direta e bilirrubina total, bem como, observando as alterações macroscópicas e microscópicas dos órgãos parenquimatosos (fígado, rins e encéfalo) dos animais.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Local do experimento

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Campus de Jaboticabal, São Paulo.

2.2. Material botânico e preparação dos extratos

A *Ipomoea asarifolia* utilizada no experimento foi colhida no *Campus* Universitário Paulo VI da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, situado em São Luis-MA. A identificação do vegetal foi realizada pela Prof^a Dra. Francisca Helena Muniz do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da mesma Universidade, em seguida foi acondicionada em sacos plásticos, embalada em isopor e enviada ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

Para a obtenção do extrato aquoso a 25%, a planta foi triturada em liquidificador e o filtrado foi dividido em alíquotas de 10 mL, armazenadas a -20°C, até o momento do uso no experimento.

Para o extrato hidroalcoólico utilizou-se 25% da planta seca moída acondicionada em frasco âmbar e o veículo (composto por álcool e água na proporção de 7:3), que foi guardado em lugar escuro e agitado todos os dias. Após 10 dias, foi coado em papel filtro e colocado em banho-maria (rota vapor) a 75°C, até a evaporação do álcool, restando somente o extrato, que foi dividido em alíquotas de 30 ml, que foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo considerado para o experimento agudo dois tratamentos (animais controle e tratado) e no experimento subagudo seis tratamentos em esquema fatorial 2x3 com dois tratamentos e três coletas com dez repetições.

Os dados foram submetidos a análise de variância (anova) obedecendo as pressuposições de racionalidade dos erros e homogeneidade das variâncias para comparação das amostras pareadas dos grupos foi usada o teste T, para comparação das médias múltiplas utilizou-se o teste Tukey. Para todos os testes a probabilidade usada foi $p < 0,05$.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP/Campus de Jaboticabal (protocolo nº 017024-07). Um total de 160 ratos Wistar machos, provenientes da provenientes do Biotério Central da FMVZ/UNESP-Campus de Botucatu, para a realização dos testes de toxicidade aguda e sub-aguda. O esquema posológico empregado baseou-se em experimento prévio realizado com o objetivo de identificar quais as quantidades que não desencadeavam morte de animal.

3.1 Extrato aquoso

3.1.1 Avaliação da toxicidade aguda

Foram utilizados nessa fase experimental, 20 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 150g, divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo: 1- controle e 2- tratado.

Os animais do Grupo 1 (controle) receberam por gavagem, durante 24 horas, a cada duas horas, doses de 0,5 mL de solução salina por 100g de peso vivo. Os animais

do Grupo 2 (tratado) receberam por gavagem 0,5mL de extrato aquoso de *I. asarifolia* por 100g de peso vivo, pela mesma via e mesmo esquema posológico.

Os animais foram colocados em cuba contendo éter etílico e, imediatamente após a insensibilização, foram colhidas as amostras de sangue por punção intracardíaca, para a realização dos hemogramas e do perfil bioquímico.

Os hemogramas foram processados por contagem automática de células tendo sido determinados: o número de hemácias (He), determinação da Hemoglobina (Hb), dosagem do Hematócrito (Ht), contagem de Leucócitos totais (Lt), número de neutrófilos bastonetes (Nb), Neutrófilo segmentado (Ns), Eosinófilo (Eos), Basófilo (Bas), Linfócitos (Lin), Monócitos (Mon) e Plaquetas (Plaq). Para a determinação do perfil bioquímico, foram feitas as dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina (CREA), glicose (GLICO), proteína sérica (PROT), bilirrubina direta (BD) e bilirrubina total (BT). Decorridas 24 horas do início do experimento, os animais foram eutanasiados após uso de anestésico geral volátil.

3.1.2 Avaliação da toxicidade subaguda

Nessa fase experimental foram utilizados 60 ratos machos divididos em dois grupos experimentais de trinta animais: Grupo 1 - Controle: 30 ratos receberam, por gavagem, solução salina dosagem de 0,5mL para cada 100g de peso vivo, uma vez ao dia, durante trinta dias. Grupo 2 - Tratado - 30 ratos receberam, por gavagem, o extrato aquoso da planta na dosagem de 0,5 mL para cada 100 g de peso vivo, uma vez ao dia, durante trinta dias.

Após 10 dias de administração, 10 animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia com anestésico geral volátil e as amostras de sangue foram colhidas por punção intracardíaca para a realização das análises hematológicas (He, Hb, Ht, Lt, Nb, Ns, Eos, Bas, Lin, Mon, Plaq) e do perfil bioquímico (ALT, AST, CREA, GLICO, PROT, BD, BT).

Aos 20 e 30 dias do início do experimento, os procedimentos da coleta de sangue e realização de análises hematológicas e bioquímicas foram repetidos. Aos 30 dias foi realizada a eutanásia destes animais para exame necroscópico e histopatológico dos principais órgãos (fígado, rins e encéfalo). Os fragmentos de fígado, rins e encéfalo foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos e processados até a inclusão em parafina, cortados a 5 μ m de espessura e corados pela hematoxilina e eosina(HE)

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto às variáveis do hemograma, na intoxicação aguda com o extrato aquoso, observou-se que houve alteração significativa ($p<0,05$), entre os grupos controle e tratado, apenas para o número de plaquetas, que foi mais elevado no grupo tratado (Tabela 2). Como as plaquetas têm uma variação grande no seu número total, este parâmetro isolado não possui um significado característico.

Avaliando as variáveis bioquímicas na intoxicação subaguda com extrato aquoso, durante o tempo (10, 20 e 30 dias), observou-se que para a variável aspartato aminotransferase (Ast) os grupos controle e tratado tiveram comportamento semelhante, com os valores aumentando no decorrer do tempo, porém não proporcionando diferenças na média geral. Para a variável alanina aminotransferase (Alt), tivemos uma diminuição de valores no grupo controle, no tempo 30, entretanto sem significado estatístico ($p>0,05$), em relação ao grupo tratado com as médias gerais, obedecendo ao mesmo padrão. Essa mesma tendência se repete para as demais variáveis, em momentos distintos, todavia sem alteração das médias gerais (Tabela 3). Quanto às variáveis do hemograma, na intoxicação subaguda com extrato aquoso, observamos diferenças nas médias gerais apenas para monócitos ($p<0,05$). Porém somente a alteração dessa variável não é um indicativo que caracterize intoxicação (MESSIAS et al., 2009), porém é sabido que os monócitos tendem a aumentar à medida em que um processo vai passando para a fase crônica (KERR, 2003). Ainda

para estas variáveis, no decorrer do tempo, as tendências de comportamento, se assemelham as descritas para as variáveis bioquímicas, havendo elevação de valores para algumas variáveis (He, Ht, Ns) ou diminuição de outras (Lin), porém sem alteração nas médias gerais (Tabela 4).

Na avaliação da toxicidade aguda, ao serem verificadas as variáveis bioquímicas (AST, ALT, CREA, GLICO, PROT, BD E BT) dos ratos submetidos ao tratamento com o extrato aquoso de *I. asarifolia*, observaram-se diferenças apenas para as variáveis: glicose e proteína, entre os grupos controle e tratado (Tabela 1), sendo os valores do grupo tratado inferiores aos do grupo controle, porém próximos dos valores de referência para a mesma espécie (SILVA et al., 2005). As diferenças em relação à proteína podem ser explicadas pela menor ingestão de ração do grupo tratado, embora não tenham promovido alteração significativa no peso dos animais. Vale ressaltar que esta explicação pode também ser aplicada aos valores menores de glicose nos animais tratados com extrato aquoso em comparação aos não tratados.

Tabela 1. Valores médios de Hemácias (He), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), contagem de Leucócitos totais (L t), valores relativos dos Eosinófilos (Eos), Basófilos (Bas), Neutrófilos Bastonetes (Nb), Neutrófilos segmentados (Ns), Linfócitos (Lin), Monócitos (Mon) e contagens de Plaquetas (Plaq) de ratos submetidos a tratamento com *I. asarifolia* em solução aquosa, na posologia de 125 mk/100 g de peso vivo, por gavagem, de 2 em 2 horas, durante 24 horas.

VARIÁVEIS											
	H (milhões/ μ L)	Le (mil/ μ L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Bas (%)	Eos (%)	Nb (%)	Ns (%)	Lin (%)	Mon (%)	Plaq (mil/ μ L)
C	7698,80 A $\pm$ 411,67	6325 A $\pm$ 3409,96	15,89 A $\pm$ 0,66	46,29 A $\pm$ 2,95	0	0,13 A $\pm$ 0,09	0,03 A $\pm$ 0,05	32,37 A $\pm$ 10,54	66,00 A $\pm$ 10,86	0,06 A $\pm$ 0,05	882,00 A $\pm$ 147,36
T	7724,40 A $\pm$ 339,89	6011 A $\pm$ 1089,09	16,37 A $\pm$ 0,56	46,36 A $\pm$ 1,93	0	0,89 A $\pm$ 0,78	0,04 A $\pm$ 0,07	39,22 A $\pm$ 5,63	65,78 A $\pm$ 6,14	0,07 A $\pm$ 0,50	1014,22 B $\pm$ 98,76
F	0,02	0,07	2,60	0,00	0	1,39	0,05	2,89	0,00	0,03	4,83
CV	4,86	39,96	3,79	5,30	0	75,79	154,83	23,03	13,15	78,55	13,00
R ²	0,001	0,005	0,15	0,0002	0	0,085	0,003	0,16	0,0001	0,001	0,24
P	0,89	0,79	0,13	0,96	0	0,26	0,82	0,11	0,96	0,87	0,04

Nota: * Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste T ($P > 0,05$).

CRAMER-VON MISES ($w = 0,97$; $P > 0,25$); F- calculado; CV- coeficiente de variação; R²- fator de determinação; P- nível de significância.

Tabela 2. Valores médios de Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Creatinina (CREA), Glicose (GLICO), Proteínas séricas (PROT), Bilirrubina direta (BD) e Bilirrubina total (BT) de ratos submetidos a tratamento com *I. asarifolia* em solução aquosa, na posologia de 125 mk/100 g de peso vivo, por gavagem, de 2 em 2 horas, durante 24 horas.

Grupos	Variáveis						
	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	CREA (mg/dL)	GLIC (mg/dL)	PROT (mg/d)	BD (mg/dL)	BT (mg/dL)
Controle	69,44 A	242,65 A	0,62 A	124,58 A	8,29 A	0,10 A	0,36 A
	± 18,57	± 115,81	± 0,09	± 8,04	± 0,77	± 0,05	± 0,44
Tratado	85,82 A	237,24 A	0,61 A	113,12 B	7,20 B	0,36 A	0,30 A
	± 22,87	± 106,68	± 0,08	± 14,92	± 0,69	± 0,96	± 0,49
F	3,09	0,01	0,03	4,57	11,21	2,18	0,45
CV	26,84	46,40	14,19	10,07	9,41	61,29	121,54
R ²	0,15	0,001	0,001	0,20	0,31	0,14	0,03
P	0,09	0,91	0,86	0,04	0,003	0,16	0,51

Nota: CRAMER-VON MISES (W=0, 08; p>0, 19); F- calculado; CV- coeficiente de variação; R²- fator de determinação; P- nível de significância.

* Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste T (P>0,05).

Tabela 3. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos de alanina aminotransferase – UI/L (ALT), aspartato aminotransferase – UI/L (AST), creatinina – mg/dL (CREA), glicose – mg/dL (GLICO), proteína – g/dL (PROT), bilirrubina direta – mg/dL (BD), bilirrubina total – mg/dL (BT) de ratos submetidos à intoxicação subaguda com *I. asarifolia* em solução aquosa grupo controle (C) e grupo tratado (T). Dados apresentados com média $\pm$ DP

		TEMPO DE INTOXICAÇÃO EM DIAS			
		10	20	30	MÉDIA GERAL
AST	C	180,71 $\pm$ 48,71 Aa	295,41 $\pm$ 116,54 Aab	392,34 $\pm$ 196,05 Ab	289,49 $\pm$ 156,91A
	T	125,71 $\pm$ 7,92 Aa	240,41 $\pm$ 97,75 Aab	307,98 $\pm$ 204,12 Ab	224,70 $\pm$ 148,30 A
ALT	C	116,42 $\pm$ 38,21 Ab	112,21 $\pm$ 23,22 Aa	80,22 $\pm$ 22,37 Ab	102,95 $\pm$ 27,94 A
	T	101,21 $\pm$ 24,27 Aa	124,71 $\pm$ 34,12 Aa	128,36 $\pm$ 25,26 Aa	118,09 $\pm$ 27,89 A
CREA	C	0,36 $\pm$ 0,07 Aab	0,34 $\pm$ 0,03 Ab	0,43 $\pm$ 0,07 Aa	0,43 $\pm$ 0,08 A
	T	0,37 $\pm$ 0,07 Aa	0,31 $\pm$ 0,03 Aa	0,46 $\pm$ 0,05 Ab	0,43 $\pm$ 0,09 A
GLIC	C	114,4 $\pm$ 15,31 Aa	121 $\pm$ 9,46 Aa	121,20 $\pm$ 16,05Aa	118,87 $\pm$ 13,81A
	T	109,70 $\pm$ 12,82 Aa	124,40 $\pm$ 15,44 Aab	140,5 $\pm$ 15,67 Ab	124,87 $\pm$ 19,10 A
PROT	C	7,19 $\pm$ 0,49 Aa	6,90 $\pm$ 0,26 Aa	6,30 $\pm$ 0,42 Ab	6,79 $\pm$ 0,54 A
	T	6,97 $\pm$ 0,35 Aa	6,98 $\pm$ 0,28 Aa	6,45 $\pm$ 0,35 Ab	6,80 $\pm$ 0,41 A
BD	C	0,06 $\pm$ 0,05 Aa	0,10 $\pm$ 0,03 Aa	0,07 $\pm$ 0,03 Aa	0,07 $\pm$ 0,04 A
	T	0,04 $\pm$ 0,03 Aa	0,1 $\pm$ 0,02 Ab	0,05 $\pm$ 0,02 Aa	0,06 $\pm$ 0,04 A
BT	C	0,15 $\pm$ 0,04 Aa	0,14 $\pm$ 0,03 Aa	0,14 $\pm$ 0,03 Aa	0,14 $\pm$ 0,04 A
	T	0,16 $\pm$ 0,04 Aab	0,20 $\pm$ 0,05 Ab	0,13 $\pm$ 0,04 Aa	0,16 $\pm$ 0,05 A

* Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 4. Análise de Variância das variáveis de Hemograma – número de hemáceas – milhões/mL (He), Leucócitos – número de leucócitos/mL (Le), Hemoglobina -g/dl (Hb), Hematócrito -% (Ht), Basófilo - % (Bas), Eosinófilo - % (Eos), Bastonete - % (Nb), Neutrófilo segmentado - % (Ns), Linfócito - % (Lin) e Monócito - % (Mon) de ratos submetidos a intoxicação subaguda com *I. asarifolia* (salsa) em solução aquosa - grupo controle (C) e grupo tratado (T). Dados apresentados com média $\pm$ DP

TEMPO DE INTOXICAÇÃO EM DIAS					
		10	20	30	MÉDIA GERAL
HE	C	5185 $\pm$ 798,63 Aa	5612 $\pm$ 697,88 Aab	6229 $\pm$ 219,76 Ab	5675,33 $\pm$ 744 A
	T	5149 $\pm$ 642,31 Aa	6265 $\pm$ 535,13 Ab	6550 $\pm$ 561,63 Ab	5988 $\pm$ 832,41 A
LEU	C	4865 $\pm$ 2067,35 Aa	4070 $\pm$ 1725,66 Aa	6165 $\pm$ 2126,82 Aa	5033,33 $\pm$ 2103,75 A
	T	5440 $\pm$ 1892,21 Aa	4710 $\pm$ 1423,96 Aa	5715 $\pm$ 1723,22 Aa	5288,33 $\pm$ 1687,62 A
HB	C	14,35 $\pm$ 2,27 Aa	14,98 $\pm$ 1,42 Aa	16,53 $\pm$ 0,88 Aa	15,29 $\pm$ 1,83 A
	T	14,63 $\pm$ 1,79 Aa	16,25 $\pm$ 0,98 Aa	22,29 $\pm$ 17,22 Aa	17,72 $\pm$ 10,22 A
HT	C	40,20 $\pm$ 7,24 Aa	43,40 $\pm$ 4,03 Bab	47,5 $\pm$ 3,17Ab	43,70 $\pm$ 5,80 A
	T	41,7 $\pm$ 4,92 Aa	47,70 $\pm$ 2,41 Ab	49,4 $\pm$ 2,22 Ab	46,27 $\pm$ 4,70 A
EOS	C	0,6 $\pm$ 0,97 Aa	0,5 $\pm$ 0,85 Aa	0,4 $\pm$ 0,52 Aa	0,5 $\pm$ 0,78 A
	T	0,3 $\pm$ 0,48 Aa	0,4 $\pm$ 0,84 Aa	0,3 $\pm$ 0,67 Aa	0,33 $\pm$ 0,66 A
NB	C	0,6 $\pm$ 0,84 Aa	0,4 $\pm$ 0,70 Aa	0,9 $\pm$ 0,99 Aa	0,63 $\pm$ 0,85 A
	T	0,7 $\pm$ 0,95 Aa	0,5 $\pm$ 0,53 Aa	0 Aa	0,40 $\pm$ 0,67 A
NS	C	9,90 $\pm$ 7,06 Aa	18,6 $\pm$ 6,28 Aab	24,90 $\pm$ 9,33 Ab	17,80 $\pm$ 9,69 A
	T	15 $\pm$ 6,34 Aa	22,70 $\pm$ 7,69 Aa	21,6 $\pm$ 3,72 Aa	19,77 $\pm$ 6,86 A
LINF	C	88,10 $\pm$ 7,29 Aa	80,40 $\pm$ 6,52 Aab	73,3 $\pm$ 8,73 Ab	80,60 $\pm$ 9,55 A
	T	83,60 $\pm$ 6,34 Aa	76,00 $\pm$ 7,73 Aa	78,00 $\pm$ 3,65 Aa	79,20 $\pm$ 6,77 A
MON	C	0,70 $\pm$ 0,82 Aa	0,20 $\pm$ 0,42 Aa	0,20 $\pm$ 0,41 Aa	0,36 $\pm$ 0,55 A
	T	0,4 $\pm$ 0,70 Aa	0,4 $\pm$ 0,52 Aa	0,1 $\pm$ 0,32 Aa	0,3 $\pm$ 0,53 B

* Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05)

Análise Histopatológica (encéfalo, rins e fígado)

Nos experimentos realizados com extrato aquoso os principais achados microscópicos no encéfalo da maioria dos ratos, tanto do grupo controle ((+): intensidade discreta), quanto do grupo tratado ((++): intensidade moderada) foi edema intersticial, que consiste no aumento do espaço perivascular e pericelular devido ao acúmulo de líquido. A causa mais importante é o dano ao endotélio vascular, alterações circulatórias com aumento da pressão hidrostática e hipoproteinemia (SUMMERS et al., 1985). Os vasos apresentaram tumefação endotelial ou alteração na parede vascular sugestivas de dano endotelial. O aspecto de microvacuolização ou espongiase visto no hipocampo e encéfalo em maior proporção, quando comparado ao tronco e tálamo, são sugestivos de edema, de intensidade moderada no encéfalo dos ratos tratados (figura 1). Muitos neurônios apresentaram vacuolização adjacente ao corpo neuronal ou no próprio corpo. No encéfalo este aspecto não foi difuso, mas segmentar. Esses achados microscópicos não parecem estar relacionados com um quadro de intoxicação, pois não foram vistas alterações celulares, tais como gliose, sateliase ou neuronofagia e nem mesmo alterações vacuolares no citoplasma de células de Purkinje cerebrais, que são descritas nos casos de intoxicação por *I.asarifolia* em ruminantes (TOKARNIA et al., 2000).

Com relação aos achados histopatológicos de fígado as principais alterações observadas, nos órgãos dos animais do grupo tratado são típicas de degeneração hidrópica de intensidade moderada (++) (figura 2), que é um edema intracelular pouco específico, ou seja, pode ocorrer em vários processos patológicos, inclusive em processos tóxicos. Essa degeneração também foi observada nos rins de forma moderada a acentuada no grupo tratado (figura 3). O edema intracelular consiste em uma alteração na bomba de sódio e potássio, que resulta no aumento da osmolaridade citoplasmática e afluxo de líquido para dentro da célula, deixando-a tumefeita ou edemaciada (THOMSON, 1983).

Em intoxicação experimental por *I. asarifolia* em ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos), a evolução da intoxicação em bovinos corresponde ao período em que os animais ingerem a planta; enquanto se alimentavam da mesma eles apresentavam sintomas. Já em ovinos e caprinos, a evolução é subaguda ou crônica; os animais continuam a apresentar sintomas, mesmo após a ingestão da planta ser interrompida. Em ovinos, porém, os sintomas podem gradativamente regredir, enquanto que em caprinos, quase sempre a intoxicação evolui até a morte. O apetite se mantém nestas espécies animais, todavia os achados de necropsia e histopatológico independente do grau de intoxicação, nos rins, fígado e encéfalo foram negativos (DÖBEREINER et al., 1960).

RIET-CORRÊA et al. (2002) não encontraram lesões macroscópicas, histopatológicas ou ultra-estruturais significativas nos rins, fígado e encéfalo, em caprinos intoxicados experimentalmente, bem como não foram evidentes nos desse experimento.

ARMIÓN (2000), RIET-CORRÊA et al. (2002) Acreditam que a *I. asarifolia* não se caracteriza como a *I. fistulosa* e *I. riedelii* ao grupo das plantas que causam doença do armazenamento, e sim induza a perturbações na neurotransmissão por interferência nos seus mecanismos bioquímicos, principalmente na bomba de sódio.

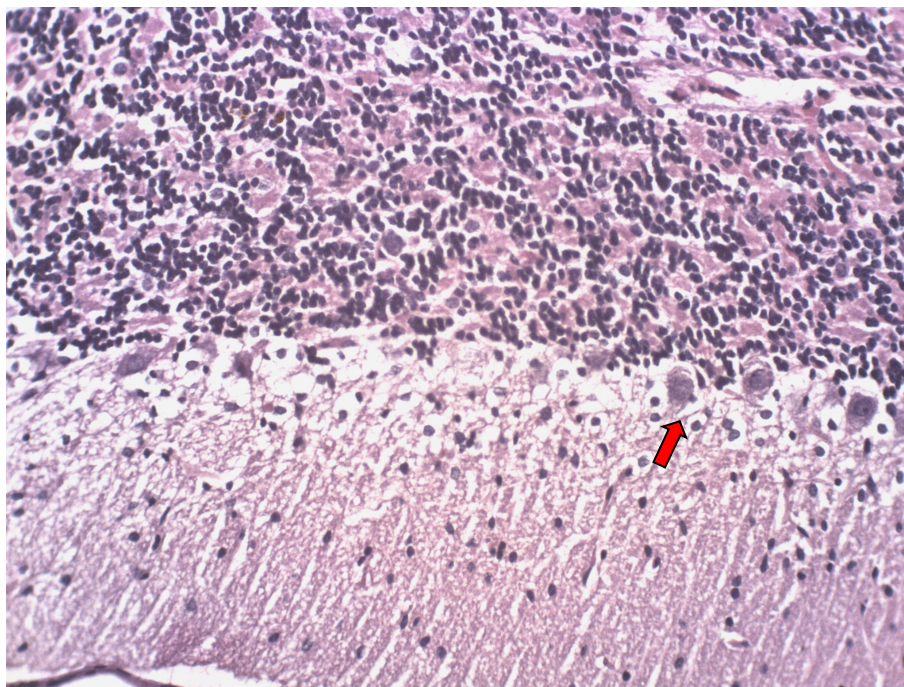


Figura 1. Fotomicrografia de encéfalo de ratos intoxicados com *I. asarifolia* extrato aquoso - Microvacuolização do neuropilo adjacente as células de Purkinje no encéfalo Hematoxilina e eosina, objetiva de 40X

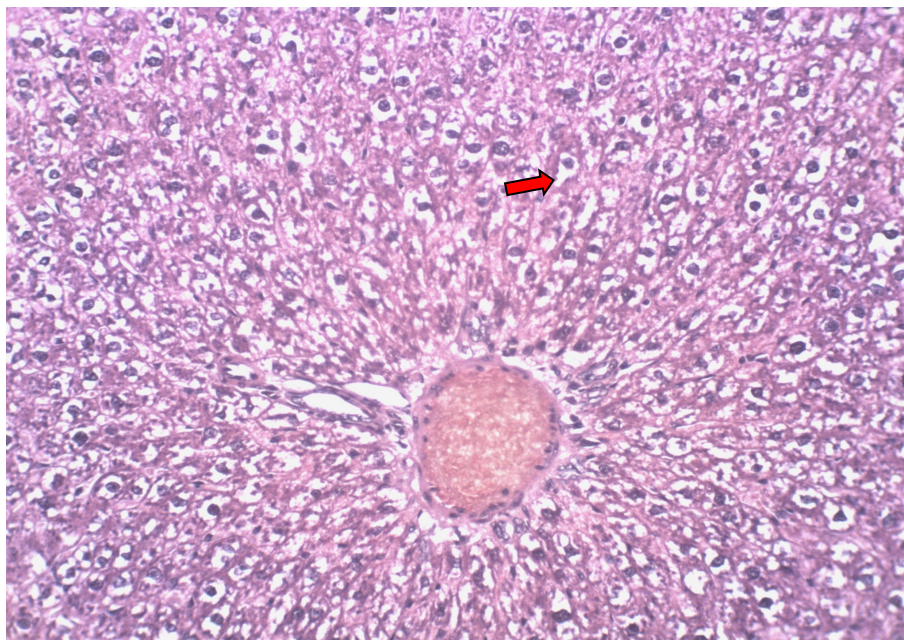


Figura 2. Fotomicrografia de fígado de ratos, hepatócitos tumefeitos da Região centrololubular com pobre evidência dos sinusóides (degeneração hidrópica). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40X.

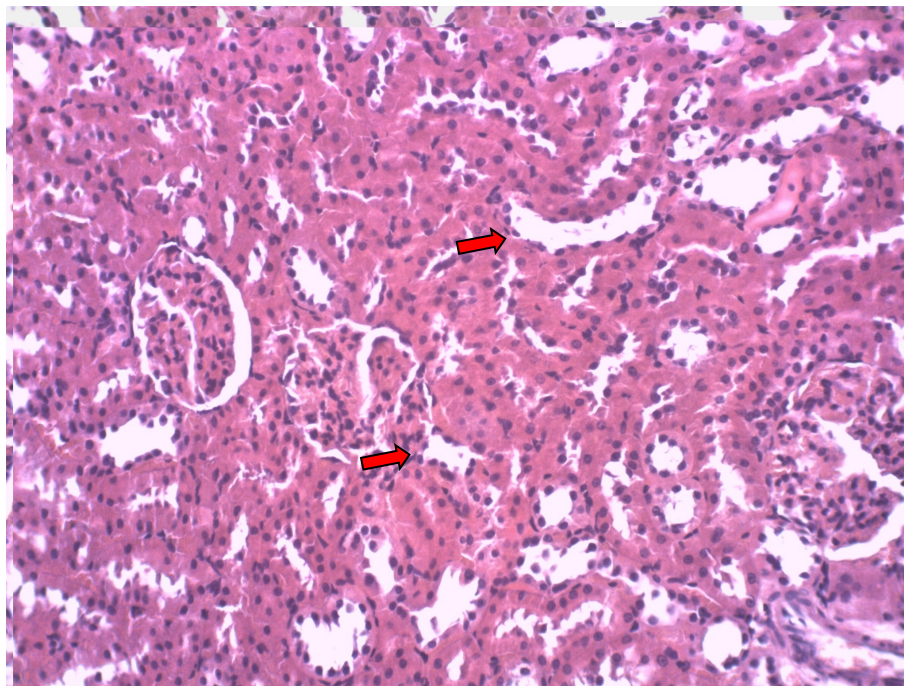


Figura 3. Fotomicrografia do rim de rato com túbulos contornados proximais Tumefeitos (degeneração hidrópica). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40X.

3.3. Extrato hidroalcoólico

3.3.1 Avaliação da toxicidade aguda

Foram utilizados nessa fase experimental, 20 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 150g, provenientes do Biotério Central da FMVZ/UNESP Campus de Botucatu. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1- controle e 2- tratado.

Os animais do Grupo 1(controle) receberam por gavagem, durante 24 horas, a cada duas horas, doses de 0,5 mL de solução salina por 100g de peso vivo. Os animais do Grupo 2 (tratado) receberam por gavagem 0,5mL de extrato hidroalcoólico de *I. asarifolia* por 100g de peso vivo, pela mesma via e mesmo esquema posológico.

Os animais foram anestesiados e as amostras de sangue foram colhidas por punção intracardíaca para realização do hemograma (número de hemáceas – milhões/mL (He), Leucócitos – número de leucócitos/mL (Le), Hemoglobina -g/dl (Hb), Hematócrito -% (Ht), Basófilo - % (Bas), Eosinófilo - % (Eos), Bastonete - % (Nb), Neutrófilo segmentado - % (Ns), Linfócito - % (Lin), Monócito - % (Mon) e Plaquetas – número de plaquetas/mL (Plaq)) e perfil bioquímico,(alanina aminotransferase – UI/L (ALT), aspartato aminotransferase – UI/L (AST), creatinina – mg/dL (CREA), glicose – mg/dL (GLICO), proteína – g/dL (PROT), bilirrubina direta – mg/dL (BD), bilirrubina total – mg/dL (BT) e após 24 horas do início do experimento, sendo os animais eutanasiados ao final por anestésico geral volátil.

3.3.2 Avaliação da toxicidade subaguda

Nessa fase experimental foram utilizados 60 ratos machos divididos em dois grupos experimentais de trinta animais: Grupo 1 - Controle: 30 ratos receberam solução salinana dose de 0,5mL para cada 100g de peso vivo uma vez ao dia, durante trinta dias. Grupo 2: Tratado - 30 ratos receberam, por gavagem, o extrato hidroalcoólico da planta na dose de 0,5 mL para cada 100 g de peso vivo uma vez ao dia durante trinta dias. Todos os animais foram observados no que se refere ao seu comportamento e ganho de peso durante os 30 dias uma vez ao dia pela manhã. Após 10 dias de administração, 10 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com anestésico geral volátil e amostras de sangue foram colhidas por punção intracardíaca para análises hematológicas (He, Le, Hb, Ht, Bas, Eos, Nb, Ns, Lin, Mon, Plaq) e perfil bioquímico (Alt, Ast, Crea, Glico, Prot, Bd, Bt).

Aos 20 e 30 dias do início do experimento, os procedimentos da coleta de sangue foram repetidos, sendo ainda realizados aos 30 dias a eutanásia destes animais para exame necroscópico, e histopatológico dos principais órgãos (fígado, rins e encéfalo). Os fragmentos de fígado, rins e encéfalo foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos e processados até a inclusão em parafina, cortados a 5µm de espessura e corados pela hematoxilina e eosina.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliarmos as variáveis bioquímicas (Ast, Alt, Crea, Glico, Prot, Bd e Bt) dos ratos submetidos à intoxicação aguda com extrato hidroalcoólico de *I. asarifolia*, somente as variáveis Alt, proteína e BD do grupo tratado foram diferentes do grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos de alanina aminotransferase – UI/L (ALT), aspartato aminotransferase – UI/L (AST), creatinina – mg/dL (CREA), glicose – mg/dL (GLICO), proteína – g/dL (PROT), bilirrubina direta – mg/dL (BD), bilirrubina total – mg/dL (BT) de ratos submetidos à intoxicação aguda com *I. asarifolia* com extrato hidroalcoólico - grupo controle (C) e grupo tratado (T). Dados apresentados com média $\pm$ DP

		VARIÁVEIS						
		ALT	AST	CREA	GLIC	PROT	BD	BT
(Agudo)	GRUPOS	70,19 A	256,67 A	0,64 A	125,35 A	8,35 A	0,10 A	0,35 A
		± 18,68	± 115,33	± 0,13	± 7,95	± 0,77	± 0,54	± 0,45
	(Hidroalcoólica)	90,62 B	231,52 A	0,66 A	119,24 A	7,40 B	0,34 B	0,29 A
		± 23,56	± 115,35	± , 11	± 16,44	± 0,70	± 0,93	± 0,53
F	4,62	0,24	0,09	1,12	8,25	5,5	0,44	
CV	26,45	47,25	18,70	10,56	9,36	79,93	120,56	
R²	0,20	0,01	0,005	0,59	0,31	0,33	0,04	
P	0,04	0,63	0,77	0,30	0,01	0,04	0,52	

CRAMER-VON MISES (W=0,04; $p > 0,25$)

F- calculado; CV- coeficiente de variação; R²- fator de determinação; P- nível de significância.

*Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste T (P>0,05).

Resultados semelhantes ao nosso estudo também foram descritos para a mesma espécie por SILVA et al. (2005) com apenas diferenças mais acentuadas para as variáveis Ast e Alt, embora nos estudos de MITRUKA & RAWNSLEY (1977) os valores dessas variáveis estejam, neste trabalho, dentro dos limites para a espécie.

Segundo SILVA et al. (2005) estas três variáveis indicam alterações na função hepática, pois concentrações altas da Alt indicam alterações na permeabilidade ou injúria nos hepatócitos. Ainda segundo esses autores esse resultado está condizente com intoxicação aguda, pois a alanina aminotransferase (Alt) é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade aguda do que a aspartato aminotransferase (Ast), uma vez que a aspartato aminotransferase (Ast) não é liberada tão rapidamente quando comparada a alanina aminotransferase (Alt), pois essa última é essencialmente citoplasmática

Estes achados reforçam que a intoxicação por *I. asarifolia* possa interferir na função hepatobiliar provocando aumento da concentração sérica de bilirrubina. Segundo THRALL et al. (2007) as hiperbilirrubinemias significativas em ruminantes são decorrentes de hemólise. É possível assegurar que não houve hemólise intra ou extravascular ao ponto de ocasionar hiperbilirrubinemia nos animais intoxicados por salsa. Outras plantas, tais como *Brachiaria decumbens* e *Crotalaria retusa* (NOBRE et al., 2005; MENDONÇA et al., 2008), provocam elevação da concentração sérica desse pigmento, causando icterícia de intensidade variada, condição não constatada nos ovinos examinados.

A bilirrubina direta (BT) pode ser um indicativo de uma intoxicação hepática, comum em processos tóxicos (HUEZA et al., 2005). Estes achados reforçam que a intoxicação por *I. asarifolia* possa interferir na função hepatobiliar provocando aumento da concentração sérica de bilirrubina (THRALL et al., 2007). A elevada concentração sérica desse pigmento causa icterícia de intensidade variada, condição não constatada

nos ovinos (NOBRE et al. , 2005; MENDONÇA et al., 2008), resultados não encontrados no nosso experimento.

Os resultados descritos neste estudo, na intoxicação aguda por extrato hidroalcoólico, em relação à variável proteína foram diferentes do grupo controle para o grupo tratado. Nos animais submetidos à intoxicação aguda, os valores do tratado foram menores do que os do controle, porém próximos dos valores de referência (SILVA et al., 2005). Estas diferenças podem ser explicadas pela menor ingestão de ração no grupo tratado.

Tabela 6. Análise de Variância das variáveis de Hemograma – número de hemáceas – milhões/mL (He), Leucócitos – número de leucócitos/mL (Le), Hemoglobina -g/dl (Hb), Hematócrito -% (Ht), Basófilo - % (Bas), Eosinófilo - % (Eos), Bastonete - % (Nb), Neutrófilo segmentado - % (Ns), Linfócito - % (Lin), Monócito - % (Mon) e Plaquetas – número de plaquetas/mL (Plaq) de ratos submetidos a intoxicação aguda com *I. asarifolia* (salsa) com extrato hidroalcoólico - grupo controle (C) e grupo tratado (T). Dados apresentados com média $\pm$ DP.

		VARIÁVEIS								
		He	Le	Hb	Ht	Bas	Eos	Nb	Ns	Lin
GRUPOS	C	7540 A $\pm$ 451,80	6500 A $\pm$ 2704,63	15,81 A $\pm$ 0,71	5,46 A $\pm$ 1,98	0	0,09 A $\pm$ 0,04	0,02 A $\pm$ 0,04	31,11 A $\pm$ 8,19	67,00 A $\pm$ 8,69
	T	7495,60 A $\pm$ 563,05	7400 A $\pm$ 4796,87	15,67 A $\pm$ 0,96	44,30 A $\pm$ 2,64	0	0,78 A $\pm$ 0,08	0,01 A $\pm$ 0,03	39,78 A $\pm$ 15,91	58,67 A $\pm$ 16,72
(Hidroalcoólico)										
(agudo)										
F		0,03	0,24	0,13	1,13	0	0,07	0,36	1,91	1,76
CV		6,79	56,02	5,38	5,20	0	105,83	234,52	37,49	21,20
R ²		0,002	0,15	0,008	0,07	0	0,004	0,02	0,10	0,1
P(sig)		0,86	0,63	0,72	0,30	0	0,79	0,55	0,19	0,20

CRAMER-VON MISES (W= 0,011; P>0,25); F- calculado; CV- coeficiente de variação; R²- fator de determinação; P- nível de significância; * Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste T (P>0,05).

Quanto às variáveis do hemograma na intoxicação aguda com o extrato hidroalcoólico observou-se que houve alteração significativa ($p < 0,05$), entre os grupos controle e tratado, apenas para o número de plaquetas sendo estas mais elevadas para o grupo tratado. Pelo fato do intervalo do parâmetro normal do número de plaquetas ser elevado, não se caracteriza uma intoxicação específica (MELO et al., 2008)(Tabela 6).

Segundo SCHUMACHER-HENRIQUE et al. (2003) as alterações mais comuns de animais intoxicados com *Ipomoea carnea* são o desenvolvimento de anemia normocítica normocrômica, não sendo as variáveis hematológicas úteis para avaliação da intoxicação por esta planta. Para os autores os achados observados nestes parâmetros são devidos a alterações nutricionais durante o longo período de estudo.

Tabela 7. Análise de Variância dos Valores Bioquímicos de alanina aminotransferase – UI/L (ALT), aspartato aminotransferase – UI/L (AST), creatinina – mg/dL (CREA), glicose – mg/dL (GLICO), proteína – g/dL (PROT), bilirrubina direta – mg/dL (BD), bilirrubina total – mg/dL (BT) de ratos submetidos à intoxicação subaguda com *I. asarifolia* com extrato hidroalcoólico - grupo controle (C) e grupo tratado (T). Dados apresentados com média $\pm$ DP.

		TEMPO DE INTOXICAÇÃO EM DIAS			
		10	20	30	MÉDIA GERAL
AST	C	181,92 $\pm$ 74,87 Aa	147,73 $\pm$ 36,36 Aa	126,75 $\pm$ 29,91 Ab	152,13 $\pm$ 47,04 A
	T	187,84 $\pm$ 91,58 Aa	137,36 $\pm$ 37,55 Ab	114,99 $\pm$ 34,63 Ab	146,73 $\pm$ 54,59 A
ALT	C	85,36 $\pm$ 23,47 Aa	118,22 $\pm$ 24,05 Aa	126,35 $\pm$ 28,01 Aa	109,97 $\pm$ 26,17 A
	T	111,45 $\pm$ 29,38 A	142,82 $\pm$ 36,72 Aa	148,42 $\pm$ 32,20 Aa	134,23 $\pm$ 32,77 A
CREA	C	0,47 $\pm$ 0,09 Aa	0,67 $\pm$ 0,05 Ab	0,66 $\pm$ 0,46 Ab	0,60 $\pm$ 0,20 A
	T	0,47 $\pm$ 0,03 Aa	0,55 $\pm$ 0,12 Bb	0,65 $\pm$ 0,08 Ab	0,56 $\pm$ 0,08 B
GLIC	C	112,3 $\pm$ 13,60 Aa	125,3 $\pm$ 8,45 Ab	126,2 $\pm$ 13,5 Ab	121,27 $\pm$ 11,85 A
	T	107,50 $\pm$ 11,22 Aa	126,30 $\pm$ 14,27 Ab	130,5 $\pm$ 15,36 Ab	121,43 $\pm$ 13,62 A
PROT	C	7,71 $\pm$ 0,45 Aa	6,45 $\pm$ 0,29 Ab	8,25 $\pm$ 0,58 Aa	7,47 $\pm$ 0,44 B
	T	7,84 $\pm$ 0,42 Aa	6,47 $\pm$ 0,38 Aa	8,83 $\pm$ 0,41 Aa	7,71 $\pm$ 0,40 A
BD	C	0,05 $\pm$ 0,03 Aa	0,08 $\pm$ 0,04 Ab	0,09 $\pm$ 0,04 Ab	0,07 $\pm$ 0,04 A
	T	0,06 $\pm$ 0,04 Aa	0,08 $\pm$ 0,04 Ab	0,07 $\pm$ 0,03 Ab	0,07 $\pm$ 0,04 A
BT	C	0,16 $\pm$ 0,08 Aa	0,20 $\pm$ 0,03 Aa	0,21 $\pm$ 0,04 Aa	0,19 $\pm$ 0,05 A
	T	0,21 $\pm$ 0,09 Aa	0,19 $\pm$ 0,07 Aa	0,18 $\pm$ 0,02 Aa	0,19 $\pm$ 0,06 A

* Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Na intoxicação subaguda com extrato hidroalcoólico, observamos diferenças significativas nas médias gerais dos grupos controle e tratado, para as variáveis creatinina e proteína ($p < 0,05$). As demais variáveis (Ast, Alt, Glico, Bd e Bt) apresentaram médias gerais semelhantes ($p > 0,05$) (Tabela 7).

O aumento da proteína sérica nos ratos do grupo tratado pode se caracterizar pelo menor consumo de água, assim como nos achados para a mesma espécie por (MESSIAS et al., 2009).

As diferenças observadas dentre os grupos no decorrer do tempo para estas variáveis, embora fossem significativas em alguns dos tempos, não foram capazes de alterar de forma significativa as médias gerais. (SCHWARZ et al., 2007)

Tabela 8. Análise de Variância das variáveis de Hemograma – número de hemáceas – milhões/mL (He), Leucócitos – número de leucócitos/mL (Le), Hemoglobina -g/dl (Hb), Hematócrito -% (Ht), Basófilo - % (Bas), Eosinófilo - % (Eos), Bastonete - % (Nb), Neutrófilo segmentado - % (Ns), Linfócito - % (Lin), Monócito - % (Mon) e Plaquetas – número de plaquetas/mL (Plaq) de ratos submetidos a intoxicação subaguda com *I. asarifolia* (salsa) com extrato hidroalcoólico - grupo controle (C) e tratado (T). Dados apresentados com média $\pm$ DP

TEMPO DE INTOXICAÇÃO EM DIAS					
		10	20	30	MÉDIA GERAL
HE	C	7975 $\pm$ 334 Aa	8720 $\pm$ 501,14 Aa	8362 $\pm$ 415,12 Aa	8352,33 $\pm$ 416,75 A
	T	8230 $\pm$ 464,94 Aa	8792 $\pm$ 592,13 Aa	8330 $\pm$ 686,65 Aa	8450,67 $\pm$ 581,24 A
LEU	C	8510 $\pm$ 3568,52 Aa	11200 $\pm$ 1896,05 Aa	9990 $\pm$ 4012,61 Aa	9900 $\pm$ 3159,06 A
	T	8733,33 $\pm$ 3254,61 Aa	9280 $\pm$ 5004,7 Aa	7950 $\pm$ 2920,5 Aa	8654,44 $\pm$ 3726,60 A
HB	C	16,24 $\pm$ 054 Aa	16,90 $\pm$ 0,53 Aa	16,18 $\pm$ 0,75 Aa	16,44 $\pm$ 0,61 A
	T	16,24 $\pm$ 0,76 Aa	17,40 $\pm$ 1,24 Ab	16,24 $\pm$ 1,14 Aa	16,63 $\pm$ 1,05 A
HT	C	46,93 $\pm$ 1,51 Aa	49,02 $\pm$ 2,02 Aa	48,64 $\pm$ 7,15 Aa	48,19 $\pm$ 3,56 A
	T	46,84 $\pm$ 2,09 Aa	50,06 $\pm$ 3,40 Aa	46,79 $\pm$ 3,56 Aa	47,89 $\pm$ 3,01 A
BAS	C	0	0	0	0
	T				
EOS	C	1,40 $\pm$ 1,26 Aa	1,20 $\pm$ 1,30 Aa	0,80 $\pm$ 1,03 Aa	1,13 $\pm$ 1,96 A
	T	1,00 $\pm$ 1,11 Aa	1,00 $\pm$ 1,00 Aa	1,60 $\pm$ 1,57 Aa	1,20 $\pm$ 1,23 A
NB	C	1,10 $\pm$ 1,59 Aa	0,20 $\pm$ 0,44 Aa	0,70 $\pm$ 0,94 Aa	0,67 $\pm$ 0,99 A
	T	1,22 $\pm$ 1,39 Aa	0,40 $\pm$ 0,54 Aa	0,50 $\pm$ 0,84 Aa	0,71 $\pm$ 0,92 A
NS	C	26,00 $\pm$ 8,47 Aa	27,00 $\pm$ 11,42 Aa	24,60 $\pm$ 6,32 Aa	25,87 $\pm$ 8,74 A
	T	21,77 $\pm$ 10,47 Aa	23,60 $\pm$ 12,66 Aa	25,70 $\pm$ 8,93 Aa	23,69 $\pm$ 10,93 A
LINF	C	71,40 $\pm$ 8,99 Aa	70,80 $\pm$ 11,47 Aa	73,80 $\pm$ 6,05 Aa	72 $\pm$ 8,84 A
	T	76,00 $\pm$ 10,74 Aa	74,60 $\pm$ 12,64 Aa	72,10 $\pm$ 9,69 Aa	74,23 $\pm$ 11,02 A
MON	C	0,10 $\pm$ 0,31 Aa	0,80 $\pm$ 0,83 Ab	0,10 $\pm$ 0,31 Aa	0,33 $\pm$ 0,48 A
	T	0 $\pm$ 0 Aa	0,40 $\pm$ 0,54 Ab	0,10 $\pm$ 0,31 Aa	0,17 $\pm$ 0,28 A
PLAQ	C	964,90 $\pm$ 132,29 Aa	1047,40 $\pm$ 119,48 Ab	896,60 $\pm$ 192,18 Aba	969,6 $\pm$ 147,98 A
	T	826,11 $\pm$ 134,20 Aa	1047,48 $\pm$ 172,66 Ab	730,10 $\pm$ 63,63 Ba	867,9 $\pm$ 123,49 B

* Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P>0,05).

Para as variáveis do hemograma na intoxicação subaguda com extrato hidroalcoólico, não foram observadas diferenças significativas entre as médias gerais e entre os tempos de avaliação, entre os grupos ou dentro do mesmo grupo, entre todas as variáveis, exceto para contagem dos números de plaquetas, onde o grupo tratado apresentou menor quantidade em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 8). Sem significado clínico, considerando os valores de referência para o número de plaquetas no hemograma de ratos (MESSIAS et al., 2009).

Os resultados deste estudo, tanto na intoxicação aguda e subaguda por extrato aquoso quanto por extrato hidroalcoólico na intoxicação aguda e subaguda, caracterizam uma intoxicação inespecífica DANTAS et al. (2006).

Análise Histopatológica (encéfalo, rins e fígado)

Os principais achados microscópicos no encéfalo da maioria dos ratos do grupo tratado foi cromatólise no corpo neuronal na região do tálamo, vacuolização de neurônios do tronco cerebral e em segmentos do cerebelo (células de Purkinje) (figura 4). Severo edema intersticial na transição com as células piramidais do hipocampo. Esses achados caracterizam um quadro de intoxicação inespecífica, pois foram vistas alterações celulares discretas no citoplasma de células de Purkinje cerebrais, que são descritas nos casos de intoxicação por *I.asarifolia* em ruminantes (TOKARNIA et al., 2000).

Com relação aos achados histopatológicos de fígado as principais alterações observadas nos órgãos dos animais do grupo tratado são acentuadas tumefação de hepatócitos e discretos focos com infiltrado inflamatório linfocitário na região portal, típicas de degeneração hidrópica (figura 5), que é um edema intracelular pouco específico, ou seja, pode ocorrer em vários processos patológicos, inclusive em processos tóxicos. Essa degeneração foi observada de forma moderada a acentuada no grupo tratado. O edema intracelular consiste em uma alteração na bomba de sódio e

potássio, que resulta no aumento da osmolaridade citoplasmática e afluxo de líquido para dentro da célula, deixando-a tumefeita ou edemaciada (THOMSON, 1983).

Nos rins, os achados microscópicos predominantes nos animais tratados são típicas de degeneração hidrópica difusa do epitélio tubular renal de intensidade moderada (++) (figura 6).

Não foram evidentes lesões microscópicas típicas de intoxicação nos rins, fígado e encéfalo desses animais, bem como (RIET-CORRÊA et al., 2002), não encontraram lesões macroscópicas, histopatológicas ou ultra-estruturais significativas nos rins, fígado e encéfalo, em caprinos intoxicados experimentalmente.

Poucos são os estudos relacionando os sinais clínicos da intoxicação por *I. asarifolia* com alterações laboratoriais. Classificada como uma planta que causava armazenamento lisossômico (MEDEIROS et al., 2000), experimentos realizados posteriormente demonstraram que na verdade a planta é responsável pelo surgimento de uma síndrome tremorgênica (BARBOSA et al., 2005). Estes mesmos autores afirmaram que ainda não se conhece o mecanismo de ação da *I. asarifolia*, mas é proposto que ela possa induzir uma intoxicação sem lesões microscópicas típicas nos órgãos parenquimatosos (rins, fígado e encéfalo), causando perturbação na neurotransmissão por interferir nos seus mecanismos bioquímicos.

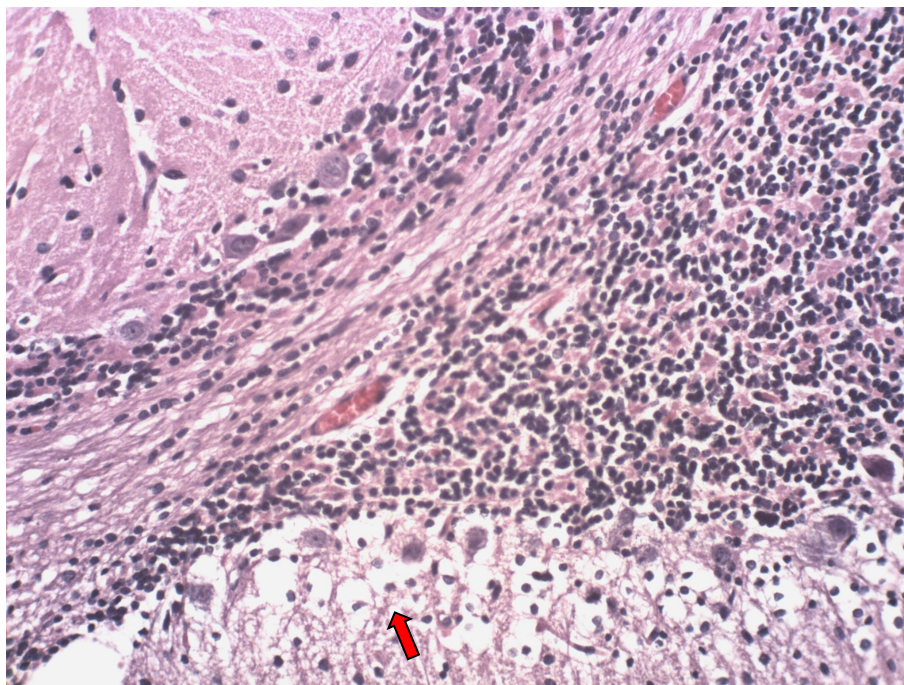


Figura 4. Fotomicrografia de encéfalo de rato intoxicado com *I. asarifolia* extrato hidroalcoólico. Severa microvacuolização segmentar do neurópilo adjacente as células de Purkinje no encéfalo. Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.

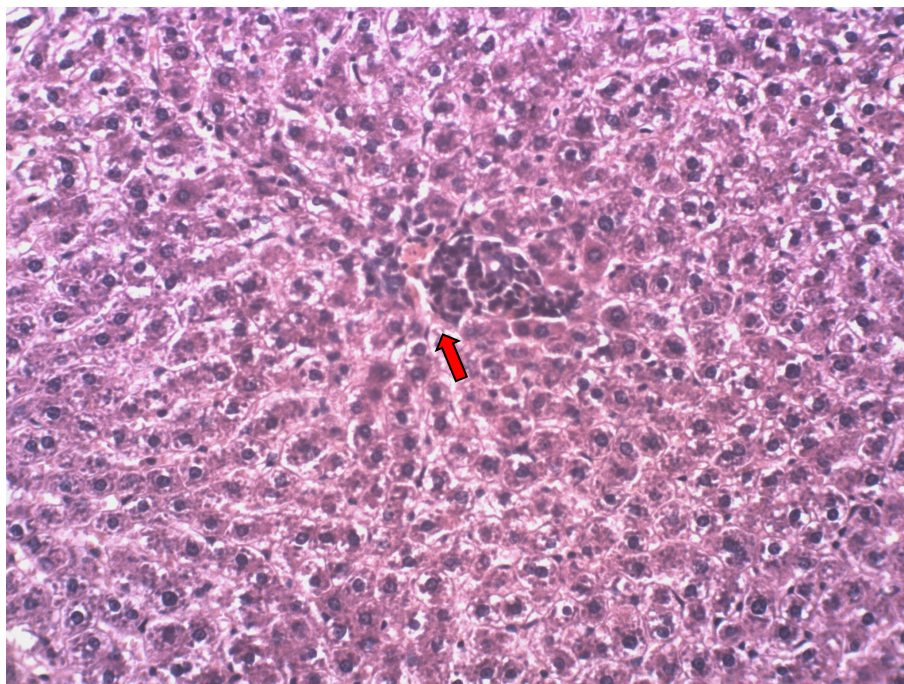


Figura 5. Fotomicrografia de fígado de rato intoxicado com *I. asarifolia* extrato hidroalcoólico. Acentuada tumefação de hepatócito, discretos focos com infiltrado inflamatório linfocitário na Região Portal.

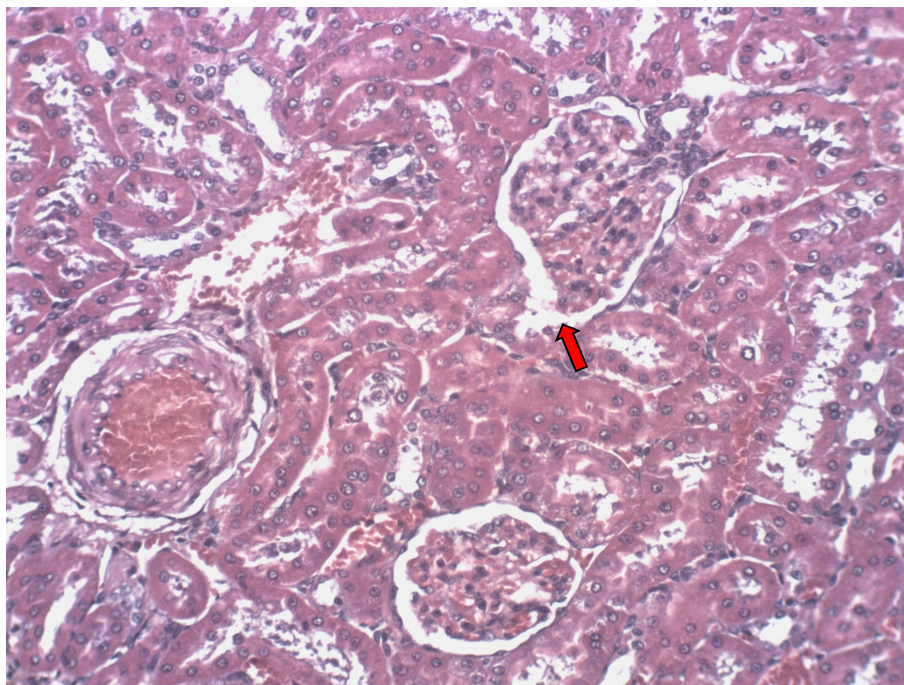


Figura 6. Fotomicrografia do rim de rato com intoxicado com *I. asarifolia* extrato hidroalcoólico com túbulos contornados proximais Tumefeitos (degeneração hidrópica). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40X.

4. CONCLUSÕES

Observando os resultados obtidos nos parâmetros hematológicos e no perfil bioquímico, bem como as lesões histopatológicas no encéfalo, fígado e rins, sendo mais evidenciados com extrato hidroalcoólico em relação ao extrato aquoso, sugere-se que a *Ipomoea asarifolia em ratos* induz intoxicação sem lesões típicas e acreditamos que o principal mecanismo de ação seja a interferência nos mecanismos bioquímicos.

REFERÊNCIAS:

ARMIÉN A. **Vergleichende klinische und morphologische untersuchungen zur spontanen und experimentellen vergiftung durch *Ipomoea fistulosa* (convolvulaceae) bei ziegen.** 2000. Dissertation (MsC) - Justun-Liebig-Universität, Giessen, 2000.

AUSTIN, D. F.; CAVALCANTI, P. B. Convolvuláceas da Amazônia. **Publicações Avulsas Do Museu Goeldi**, Belém, v. 36, p. 1-134, 1982.

BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Intoxicações experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 231-234, 2005.

BATISTA, C. P.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; MOREIRA, A. T. R.; COLMAN, D.; LIMA, J. H. F.; MACRI, M. M.; RAUEN JR, R. J.; FERREIRA, L. M.; FREITAS, A. C .T. Efeito do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização do estômago em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 3, p. 49-54, 2006.

BLANCO, H. G. Catálogo das espécies de mato infestantes de áreas cultivadas no brasil. Família das campainhas (convolvulaceae). **O Biológico**, São Paulo, v. 44 p. 259-278, 1978.

CHAVES, D. P. **Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* em ovinos: achados clínicos laboratoriais e anatomopatológicos.** 2009. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

DAMIR, H. A.; ADAM, S. E.; TARTOUR, G. The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. **Veterinary Human Toxicology**, Manhattan, v. 29, p. 316-319, 1987.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 2, p.165-170, 2006.

DE BALOGH, K. K. I. M.; DIMANDE, A. P.; LUGT, J. J.; MOLYNEUX, R. J.; NAUDÉ, T. W.; WELMAM, W. G. A lisosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 1, p. 266-273, 1999.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELA, C. F. C. Intoxicação experimental pela salsa *Ipomoea asarifolia* (r. Et schult) em ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, Rio de Janeiro, v.3, p. 39-57, 1960.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006. 133 p.

GOMES, C. S.; CAMPOS, A. C. L.; TORRES, O. J. M.; VASCONCELOS, P. R. L.; MOREIRA, A. T. R.; TENÓRIO, S. B.; TAMBARA, E. M.; SAKATA, K.; MORAES JÚNIOR, H.; FERRER, A. L. S. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 2, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S0102-86502006000800003.

GROTH, D. Morphological characterization of seeds and seedlings of seven weed species of convolvulaceae occuring in agricultural seeds in Brazil. **Iheringia, Serie Botânica**, Porto Alegre, v. 41, p. 83-99, 1991.

HUEZA, I. M.; GUERRA, J. L.; HARAGUCHI, M.; NAOKI, A.; GORNIK, S. L. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. **AIMS: experimental and toxicology pathology**, v. 57, p. 53-58, 2005.

KERR, M.G. Exames **Laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. Ed. São Paulo, Roca, 2003, 423 p.

KISSMAN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf, 1992. t. 2.

MALALAVIDHANE, S. M. D. N.; WICKRAMASINGHE, M. S. A.; JANSZ, E. R. Oral hypoglycaemic activity of *Ipomoea aquatica* in streptozotocin-induced, diabetic wistar rats and type ii diabetes. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, p. 1098-1100, 2003.

MEDEIROS, R. M. T.; NOBRE, V. M. T.; TABOSA, I. M.; RIET-CORREA, F. Toxic plants for ruminants in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21., 2000, Punta Del Este, Uruguai. p. 10141-10150.

MEDEIROS, R. M. T.; BARBOSA, R. C.; RIET-CORREA, E. F.; LIMA, E. F.; TABOSA, I. M.; BARROS, S. S. de; GARDNER, D. R.; MOLYNEUX, R. J. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil. **Toxicon**, Kidlington, v. 41, n. 7, p. 933-935, 2003.

MELO, M. M.; VERCOSA JUNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCOL, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (malpighiaceae) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 631-640, 2008.

MENDONÇA, F. S. de; CAMARGO, L. M. de; FREITAS, S. H. de. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Gramineae) no município de Cuiabá: **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1034-1041, 2008

MESSIAS, J. B.; CARACIOLO, M. C. M.; OLIVEIRA, I. M.; MONTARROYIOS, U. R.; GUERRA, M. O.; SOUSA, I. A. Parâmetros hematológicos de *rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. **Medicina Veterinária**, Recife. v. 3, n. 2, p. 1-8, 2009.

MITRUKA, B. M.; RAWNSLEY, H. M. **Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals**. New York: Masson Publishing, 1977. 413 p.

MOLYNEUX, R. J.; MCKENZIE, R. A.; O'SULLIVAN, B. M.; ELBEIN, A. D. Identification of the glycosidase inhibitors swansonine and calystegene b2 in weir vine(*Ipomoea* sp) q6 aaf calobra and correlation with toxicity. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 58, p. 878-886, 1995.

NOBRE, V. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. **Toxicon**, Atlanta, v. 2, n. 45, p. 347-352, 2005.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 45-48, 2006.

RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A. L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 161-168, 2002.

RODRIGUEZ, C. L.; RIOS, E. E.; MACCIÓ, O. A.; MERLO, W. A.; LECTORA, J. Intoxicación con *Ipomoea fistulosa* (aguapá, mandiyurá) en cabras. Efectos sobre el sistema nervioso. **Sitio Argentino de Producción Animal. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Buenos Aires, v. 15, 2005.

SCHUMAHHER-HENRIQUE, B.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z.; SPINOSA, H.S. The clinical biochemical, haematological and pathological effects of long-term administration of *Ipomoea carnea* to growing goats. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 311-319, 2003.

SCHWARZ, A.; HOSOMI, R. Z.; HENRIQUE, B. S.; HUEZA, I.; GARDNER, D.; HARAGUCHI, M.; GORNIK, L. S.; BERNARD, M. M.; SPINOSA, S. H. Identificação dos princípios ativos presentes na *Ipomoea carnea* brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 181-187, 2004.

SCHWARZ, A.; HOSOMI, R. Z.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. Rats offspring exposed to *Ipomoea carnea* and handling during gestation: neurochemical evaluation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, n. 3, p.425-433, 2007.

SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVEA, E. S.; SOUSA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcronico com extrato hidroalcoólico de calendula officinalis L. Sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1985.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 412 p.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SILVA, M. F. da. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1979. p. 33-39.

THRALL, M. A.; BACKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 58 p.

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PERINATAL DE RATAS, SUBMETIDAS A ADMINISTRAÇÃO DA *Ipomoea asarifolia* EM FORMA DE RAÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO.

RESUMO: A *Ipomoea asarifolia* é uma planta tóxica que causa intoxicação em várias espécies animais, principalmente nos ruminantes podendo ocasionar excitabilidade com lesões em diversas áreas do Sistema Nervoso Central. Considerando que este é bastante sensível nos estágios iniciais de desenvolvimento o objetivo foi avaliar a toxicidade desta planta como fonte de alterações persistentes no sistema neuromotor, ansiedade e/ou aprendizagem em ratos, decorrentes da sua interferência sobre o desenvolvimento cerebral. Ratas wistars prenhes foram submetidas a ração de salsa a 50% (grupo tratado) ou ração de feno a 50% (grupo controle) sem a salsa desde o primeiro dia da gestação. O tratamento não afetou a atividade geral dos filhotes avaliados no teste de campo aberto, nem o nível de ansiedade no labirinto em cruz elevado bem como a coordenação motora no tambor giratório, entretanto observou-se diferenças na capacidade de aprendizagem de filhotes do grupo tratado no labirinto aquático de Morris e no desenvolvimento físico da prole, no teste de esquiva ao abismo houve diferença entre os filhotes do tratado com os do grupo controle, sugerindo que a *I. asarifolia* interfere nos parâmetros comportamentais de filhotes de ratas alimentadas com ração de salsa durante a gestação.

Palavras-chave: *Ipomoea asarifolia*. Ração. Toxicidade perinatal.

EVALUATION OF PERINATAL TOXICITY IN THE OFFSPRING OF RATS SUBJECTED TO *Ipomoea asarifolia* GIVEN AS RATION DURING PRENANCY

SUMMARY: *Ipomoea asarifolia* is a poisonous plant that causes intoxication in various animal species, especially in ruminants and may cause excitability with lesions in various areas of the Central Nervous System. Since this is quite sensitive in the early stages of development the aim was to evaluate the toxicity of this plant as a source of persistent changes in the neuromotor system, anxiety and / or learning in rats, caused by its interference on brain development. Pregnant Wistar rats were fed with 50% of parsley (treated group) or fed with 50% of hay (control group) without the parsley since the first day of gestation. The treatment did not affect the general activity of the offspring assessed in open field test, nor the level of anxiety in the elevated cross maze as well as motor coordination in the rotating drum, however we observed differences in learning ability of offsprings treated in Morris water maze and in the physical development of the offspring, there were differences between the treated and the control group only in the abyss dodge test, suggesting that the /. *asarifolia* can interfere with behavioral parameters of the offspring of rats fed with parsley during pregnancy.

Keywords: *Ipomoea asarifolia*. Ration. Perinatal toxicity.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de plantas é crescente no Brasil. No mundo aumenta o interesse pelo conhecimento dos seus efeitos benéficos e maléficos, quer seja das plantas medicinais quanto das tóxicas (BARG, 2004).

Plantas do gênero *Ipomoea*, são descritas como tóxicas, causando intoxicação natural em ruminantes (OLIVEIRA et al., 2009, TORTELLI et al., 2008), sendo a *I. asarifolia*, espécie desse gênero, uma planta que causa excitabilidade, podendo alterar o hemograma e o perfil bioquímico de ovinos quando intoxicados experimentalmente (CHAVES, 2009), pouco se sabe a respeito do seu potencial de modificar a capacidade neurocomportamental, decorrente da sua interferência no desenvolvimento cerebral.

O Sistema Nervoso Central (SNC) é bastante sensível a produtos químicos, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (SPYKER, 1975). Esta sensibilidade do cérebro em desenvolvimento ao insulto tóxico pode se manifestar como distúrbios sutis do comportamento, que são determinados por meio de técnica de psicologia comportamental capaz de registrar e quantificar fenômenos aparentemente imensuráveis como inteligência, ansiedade, aprendizagem e memória.

As provas comportamentais são bastante empregadas na detecção de intoxicações, uma vez que se mostraram sensíveis o suficiente para diagnosticar pequenas alterações no desenvolvimento do SNC, seja de origem neuroanatômica ou neuroquímica reveladas apenas com o passar do tempo (XAVIER, 1999).

Muitos testes de toxidade utilizados empregam animais de laboratório, dentre estes, os ratos já são modelos consagrados e são usados para avaliação do uso de plantas medicinais e tóxicas (BATISTA et al., 2006; GOMES et al., 2006; MELO et al., 2008).

Na avaliação comportamental do rato, onde é mensurado a ansiedade, o comportamento motor e cognitivo frente à exposição a agentes químicos, são descritos testes geralmente realizados em estruturas simples, que podem ser incrementadas com a utilização de sistemas digitais e computadorizados de registro, dentre eles

encontramos: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Tambor Giratório (Rota-rod) e Labirinto Aquático de Morris.

O teste utilizado para avaliar a atividade exploratória (Campo Aberto), foi descrito por HALL (1941). A assertiva envolvida no teste é que um ambiente não familiar marcadamente distinto do seu ambiente usual desencadeia medo e/ou ansiedade no animal.

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é frequentemente empregado em testes comportamentais de ansiedade animal, proposto inicialmente por HANDLEY & MITHANI (1984), sendo validado como modelo fisiológico e farmacológico por PELLOW et al. (1985). Segundo MORATO (2006), o teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos.

Outro teste usado para verificação da influência de substâncias químicas que afetam o SNC, principalmente na capacidade de aprendizagem geral e localização espacial em ratos, é o Labirinto Aquático de Morris (LAM), que consiste de uma piscina circular, com água a 26°C e turva. Os ratos são colocados neste ambiente e devem nadar até encontrarem uma plataforma de escape, que se encontra invisível logo abaixo da superfície da água, orientados por gravuras fixadas na parede próximas à piscina.

Na avaliação da coordenação motora e equilíbrio em ratos o teste de Rota-rod é usado em diversos estudos, GRAVA et al., (2008), citam que os animais são colocados sobre um cilindro giratório de 7cm de diâmetro, de superfície áspera, a uma velocidade constante de 6 rpm. Segundo OLIVEIRA et al. (2008), este método permite avaliar também a especificidade da ação nociceptiva de substâncias químicas, verificando se estas promovem incoordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular.

São também realizados testes de desenvolvimento físico da prole, tais como: reflexo do endireitamento, geotaxia negativa, esquiva ao abismo, preensão palmar, orientação pelas vibrissas, surgimento da resposta de sobressalto e abertura dos ovidutos, a partir de 24 horas após o nascimento dos mesmos. Servem para avaliar

alguns distúrbios psicomotores na fase inicial do desenvolvimento cerebral (SPYKER, 1975).

Em modelos farmacológicos observam-se poucos trabalhos científicos sobre *Ipomoea asarifolia*, apesar de ser uma planta tóxica nativa na América Tropical, que ocorre em regiões da América do Sul e Central. SCHWARZ et al., (2007), não observaram em filhotes de ratas tratadas por gavagem com solução aquosa de *Ipomoea carnea*, em doses que variaram de 0,7 a 15mg/kg, alterações comportamentais na prole em vida adulta, sendo as maiores diferenças observadas entre o grupo controle, que recebeu gavagem de solução salina e o grupo que não recebeu gavagem, sugerindo que o simples fato de manusear as fêmeas prenhes e administrar gavagem é suficiente para promover alterações nas proles.

Portanto, o propósito deste estudo foi verificar a toxicidade dessa planta, avaliando o comportamento perinatal em filhotes de ratas, submetidas à administração de *I. asarifolia* (salsa) em forma de ração durante a gestação, por métodos comportamentais: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Tambor Giratório (Rota-rod) e Labirinto Aquático de Morris.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

2.2. Material botânico e preparação das rações

A *Ipomoea asarifolia* utilizada no experimento foi colhida no *Campus* Universitário Paulo VI da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, situado em São Luís-MA. A identificação do vegetal foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Francisca Helena Muniz do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da mesma Universidade, em seguida foi acondicionada em sacos plásticos, embalada em isopor e remetida para o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

2.3. Preparo da ração de salsa

Para a ração de salsa usa-se a planta estabilizada (caule, folhas e flores) após ser colocada em estufa com circulação de ar a 37° C, em sacos de papel com furos até permanecer com peso constante. Para a confecção dos pelets usa-se 50% de matéria seca de salsa moída, 40% de ração purina moída e 10% de emulsificante em 700 mL de água.

2.4. Preparo da ração de feno

O feno (tifton) utilizado na ração foi pesado e acondicionado em saco plástico depois de moído no Departamento de Tecnologia (FCAV/UNESP/Jaboticabal). Para a confecção dos pelets foi usado 50% de feno, 40% de ração purina moída, 10% de emulsificante em 700 mL de água.

2.5. Análise das rações

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) – Campus de Jaboticabal.

2.6. Análise química e bioquímica da ração de feno e de salsa

Tabela 1. Análise bromatológica da ração comercial de ratos, ração de feno (50%) e ração de salsa (50%) a serem administradas as ratas gestantes do grupo controle e do grupo tratado durante período gestacional.

Parâmetros (%)	ração para ratos	feno	salsa
Matéria Seca	91,01	92,99	89,64
Matéria Mineral	7,42	4,12	8,93
Proteína Bruta	23,99	6,63	21,89
Matéria Fibrosa	4,78	19,90	11,46
Extrato Etéreo	1,93	0,98	2,12
ENN	52,89	61,36	45,24

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados da atividade geral nos testes de avaliação comportamental da prole (Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Rota-rod) e desenvolvimento físico (Reflexo do Endireitamento, Preensão Palmar, Esquiva ao Abismo, Geotaxia Negativa, Orientação pelas vibrissas, Resposta de Sobressalto e Abertura dos ouvidos) foram conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo considerado para o experimento um esquema fatorial 2x2 (dois grupos por sexo), sendo vinte animais do grupo controle (dez machos e dez fêmeas) e vinte animais do grupo tratado (dez machos e dez fêmeas). Os resultados obtidos no Labirinto Aquático de Morris foram analisados utilizando um esquema de parcelas subdivididas no tempo. Assim as parcelas foram formadas pelo fatorial “grupo x sexo” (2x2) e as subparcelas pelo tempo (três sessões), em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (anova) obedecendo às pressuposições de racionalidade dos erros e homogeneidade das variâncias para comparação das amostras pareadas dos grupos foi usada o teste T. Para todos os testes a probabilidade usada foi $p < 0,05$.

3.1. Avaliação da toxicidade perinatal

3.1.1. Animais

Inicialmente foram utilizadas 40 ratas e 20 ratos Wistar, provenientes do biotério central da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu, mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por meio de aparelho de ar condicionado. Foi mantido, artificialmente, um fotoperíodo cíclico de 12 horas (12 horas no claro e 12

horas no escuro), sendo a luz iniciada a partir das 6 horas. Foram alojados em caixas plásticas medindo 16x30x18cm, providas de cama de maravalha, alimentadas *ad libitum* com ração¹ para roedores.

3.1.2. Fases

3.1.2.1. Pré-acasalamento

As ratas, fêmeas nulíparas, e os ratos, com dois meses de idade, foram mantidos em grupos de quatro animais por caixa de polipropileno, sendo os machos colocados em caixas separadas das fêmeas. As ratas a partir dos 120 dias de idade foram examinadas diariamente através de lavados vaginais, durante um período referente a quatro ciclos estrais consecutivos, para verificação da normalidade destes ciclos. As ratas que apresentaram ciclos estrais normais foram selecionadas para o acasalamento.

3.1.2.2. Acasalamento

As fêmeas que apresentaram estro foram acasaladas na proporção de um macho para duas fêmeas. Foram examinadas diariamente, no período da manhã, realizando testes de lavados vaginais para o diagnóstico de prenhez das ratas. O dia zero da gestação foi determinado pela presença de espermatozóides nos lavados observados em microscópio de luz.

3.1.2.2.1 Acasalamento Pré-experimento

¹ Purina Labina, Agribbrands do Brasil Ltda, Paulínea-SP-Brasil

Os animais do grupo feno realmente estavam prenhes, enquanto que os animais do grupo salsa passados 21 dias não apresentavam sinais de prenhez, como por exemplo, aumento do abdômen. Essas fêmeas foram sacrificadas após 28 dias do acasalamento. Duas fêmeas do grupo feno também foram sacrificadas e estavam prenhes, apresentando respectivamente 11 e 8 fetos. A maioria das fêmeas do grupo salsa estavam vazias e sem sinal de implantação

O útero foi classificado em escore de 1 a 3 (1- útero pequeno, 2- médio e 3- grande), os corpos lútel foram contados em ambos os ovários.

Devido a não implantação dos embriões na maioria das fêmeas do grupo salsa surgiu a dúvida se a não implantação era em decorrência da administração de salsa, ou se a causa era a subnutrição (que possui total influencia na reprodução) em decorrência da não ingestão de alimentos.

Por isso, o manejo alimentar dos grupos foi modificado com objetivo de sanar essa questão.

Os animais foram divididos novamente em dois grupos: salsa e feno, porém as fêmeas do grupo salsa tiveram seu consumo mensurado e a ração de salsa foi administrada durante todo o período gestacional intercalando com a administração de ração comercial por 2 dias. Ao grupo feno foi administrada a mesma quantidade que o grupo salsa consumiu (a fim de controlar o consumo). Tabela 2.

Após esse período experimental, todas as fêmeas (ambos os grupos) ficaram prenhes e tiveram o acompanhamento do período gestacional e a avaliação do comportamento dos neonatos, para verificar possível toxicidade da salsa.

3.1.2.3. Gestação

Foram selecionadas aleatoriamente 20 ratas gestantes, mantidas uma semana com ração normal e divididas em dois grupos. Um grupo foi tratado com ração de salsa por três dias, seguido de dois dias de ração normal, mantendo esse esquema durante todo o período de gestação, enquanto o grupo controle foi tratado com ração de feno e ração normal na mesma quantidade e alternância de dias do grupo tratado. As ratas foram mantidas em caixas individuais. As condições ambientais de temperatura e luminosidade foram controladas conforme mencionado anteriormente, e mantidas de maneira uniforme em ambos os cômodos.

3.1.2.4. Nascimento

Quatro dias antes da previsão do parto foi disponibilizada para as ratas prenhes a matéria prima - para a confecção dos ninhos (papel picado, fiapos de algodão). No dia do nascimento foram registrados além do peso das ratas gestantes (tabela 3) dados referentes a alguns parâmetros reprodutivos: período de gestação, tamanho da ninhada, número de recém-nascidos vivos e mortos e presença de malformações. Cada fêmea lactante foi padronizada em oito filhotes, sempre que possível quatro machos e quatro fêmeas, com o intuito de padronizar os testes neurocomportamentais.

3.1.2.5. Pós-desmame

Os filhotes foram separados de suas respectivas mães, aproximadamente aos 26 dias de idade, mantidos separados por sexo, quatro por caixa plástica até o final dos experimentos. Para os testes comportamentais (teste de Campo Aberto – Open Field,

Labirinto em Cruz Elevado, Rota-rod e o Teste do Labirinto Aquático de Morris), foram designados 20 filhotes do grupo controle (sendo 10 machos e 10 fêmeas) e 20 filhotes do grupo tratado (10 machos e 10 fêmeas) selecionados de forma aleatória.

3.2. Avaliação comportamental da prole

3.2.1. Desenvolvimento físico da prole

Com 24 horas após o nascimento dos filhotes, os mesmos foram submetidos aos seguintes testes: reflexo do endireitamento e geotaxia negativa, com três dias pós-natal são realizados testes de esquiva ao abismo e preensão palmar, após oito dias de vida realizou-se o teste da resposta de sobressalto. Os testes orientação pelas vibrissas e abertura dos ouvidos foram realizados aos dez dias pós-natal.

Os testes foram realizados na mesma sala onde estavam as fêmeas paridas, tendo o cuidado no manuseio dos filhotes, principalmente no contato físico com os mesmos, para não haver rejeição por parte das mães.

3.2.2. Avaliação neurocomportamental da prole

Os filhotes dos dois grupos foram submetidos aos seguintes testes:

Medida da Atividade Geral em Ambiente Não-Familiar – Campo Aberto

Este aparelho consiste em uma arena circular de madeira com 70 cm de diâmetro, limitada por uma parede de 32,5 cm de altura, distante 45 cm do chão. A arena é pintada de branco com o fundo subdividido em 19 regiões iguais, demarcadas por três circunferências de raios diferentes (8, 14 e 20 cm) e interceptadas por segmentos de retas radiais pintadas em azul marinho (figura 1).

O teste é realizado com a mensuração dos comportamentos dos indivíduos experimentais, quando estes são colocados em um espaço novo e aberto, do qual a fuga é prevenida por uma parede circundante. O desempenho dos animais no campo foi avaliado aos 26 dias de idade, num mesmo período do dia. Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena, e durante 5 minutos, filmados e observados pelo mesmo indivíduo em uma outra sala, que anotou as seguintes categorias comportamentais definidas segundo BROADHUSRT (1960):

- ✓ Frequência de ambulação ou locomoção (LO): número de unidades de áreas invadidas pelos animais com as quatro patas;
- ✓ Frequência de “levantar-se” ou “rearing” (LE): número de vezes que o animal ergue-se sobre as patas posteriores;
- ✓ Frequência de auto-limpeza corporal ou “grooming” (LI): número de vezes que o animal executa o movimento das patas anteriores em direção à boca e/ou à cabeça, podendo continuar com o passar ou não das patas anteriores atrás dos pavilhões auriculares e/ou por movimentos de lambar dirigidos principalmente às porções laterais do corpo;
- ✓ Frequência de defecação: ao término de cada sessão, é registrado o número de pelotas fecais presentes na arena;
- ✓ Frequência de micção: ao término de cada sessão, é registrado o número de poças de urina presentes na arena;
- ✓ Período de imobilidade: registro do tempo total parado (unidade de tempo: segundo), ou seja, o tempo que o animal permanece sem se locomover, apoiado com as quatro patas no assoalho.

Para minimizar as possíveis funções circadianas dos ratos sobre o seu comportamento em “campo aberto”, os animais controles e tratados foram testados alternadamente ao longo das sessões. Entre um teste e outro, a arena foi limpa com uma solução hidroalcoólica 5% (v/v), a fim de eliminar os possíveis sinais odoríferos deixados pelo animal antecessor.

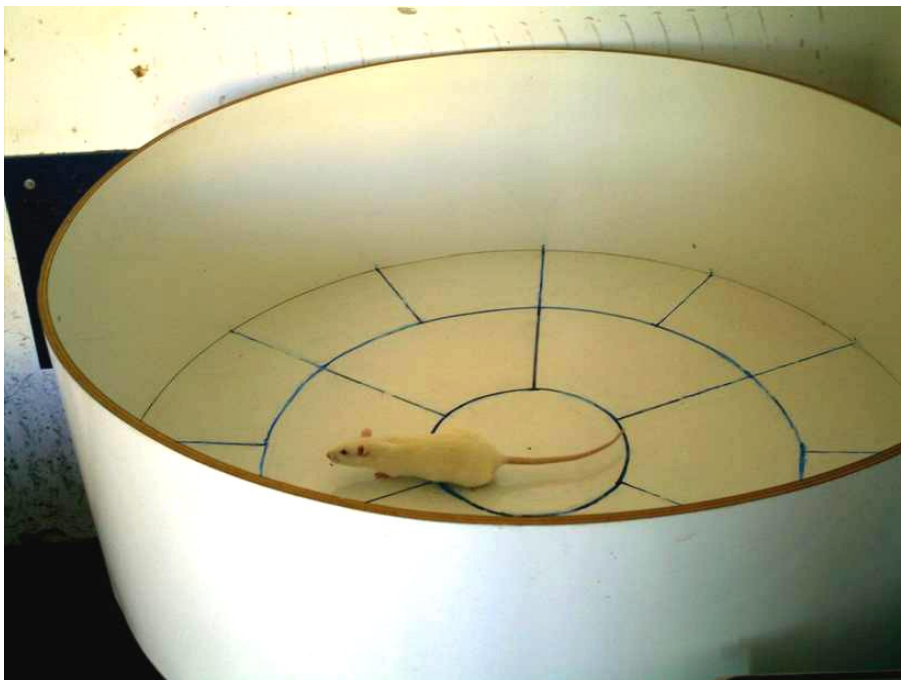


Figura 1. Arena de Campo Aberto. Avaliação da Atividade Exploratória.

Labirinto em Cruz Elevado

Equipamento construído em madeira, seguindo as especificações de PELLOW et al. (1985). Constitui de dois braços abertos e opostos, 50 x 10 cm cada um, sendo cruzados perpendicularmente por outros dois braços fechados do mesmo tamanho. O labirinto apresenta forma de cruz, elevado a 50 cm do solo. Os braços fechados são delimitados por uma parede opaca de 40 cm de altura, enquanto que nos braços abertos há uma borda lateral de 1 cm de altura de acrílico transparente a fim de se evitar a queda dos animais. Os quatro braços delimitam uma plataforma central de 100 cm² (figura 2). Para a mensuração da ansiedade, a avaliação dos animais foi realizada aproximadamente no dia 27 pós-natal. Cada animal foi colocado individualmente no centro do labirinto, sempre de frente para um dos braços fechados, e observado por um período de 5 minutos por um observador situado em outra sala provida de sistema de vídeo.

Foram registradas as seguintes variáveis e categorias:

- ✓ Número de entradas nos braços abertos (BA): foi considerada uma entrada quando o animal colocava as quatro patas dentro deste compartimento do labirinto.
- ✓ Número de entradas nos braços fechados (BF): segue o mesmo critério acima citado.
- ✓ Tempo de permanência nos braços abertos (TBA), em segundos.
- ✓ Tempo de permanência nos braços fechados (TBF), em segundos.

Com os dados obtidos calculou-se, para cada animal, o número total de cruzamentos (soma do número de entradas nos braços abertos com o número de entradas nos braços fechados) e a porcentagem de entradas e de tempo despendido nos braços abertos conforme mostrado a seguir:

$$\% \text{ de entrada em BA} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de entradas BA} \times 100}{\text{Total de entradas BA} + \text{BF}}$$

$$\% \text{ de tempo em BA} = \frac{\text{Tempo em BA} \times 100}{\text{Tempo BA} + \text{BF}}$$

Os animais dos dois grupos foram observados em ordem alternada, tomando-se o cuidado de limpar o labirinto com uma solução hidroalcoólica a 5% (v/v) antes da introdução de cada animal.



Figura 2: Labirinto em Cruz Elevado: Modelo Animal para Avaliação da Ansiedade.

Equilíbrio no tambor giratório (“Rota-rod”)

Este aparelho é um cilindro giratório de superfície áspera distante 7 cm da superfície da mesa, que gira a uma velocidade constante movido por um motor e regulado para o modo de frequência de 6 rpm (figura 3).

Esse teste foi realizado aos 37 dias pós-natal. Onde se avaliou a coordenação motora e a habilidade de equilíbrio dos animais, colocando-os sobre o cilindro. Para manter-se sobre o mesmo o animal necessita locomover-se de modo que a capacidade locomotora pode ser quantificada, cronometrando o tempo que o animal permanece sobre o cilindro. Durante três minutos foram registrados o tempo que o animal leva para cair pela primeira vez (ele é imediatamente recolocado sobre o cilindro) e o número de quedas de cada animal durante o período. Após cada teste, o cilindro é limpo com solução hidroalcoólica a 5% (v/v).

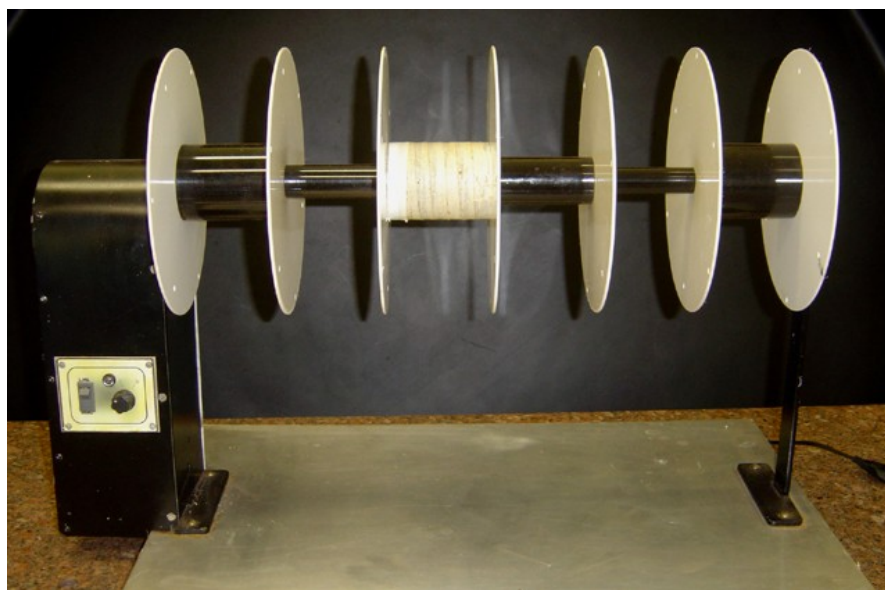


Figura 3: Tambor Giratório (Rota-rod): Avaliação da Coordenação Motora e Equilíbrio.

Labirinto Aquático de Morris

Este aparelho é constituído de uma piscina circular preta (diâmetro de 200 cm, profundidade de 40 cm) preenchida com 30 cm de água na temperatura de aproximadamente 26°C. A opacidade da água foi obtida pela adição de aproximadamente 150g de leite em pó. Em um determinado local da piscina existe uma plataforma (diâmetro de 10 cm) submersa 1 cm abaixo do nível da água. A localização da piscina e dos objetos deverá ser mantida até o término do experimento (figura 4).

Esse teste foi realizado com o intuito de avaliar a aprendizagem e a memorização dos animais aos 40 dias pós-natal. Foram selecionados aleatoriamente 20 animais de cada grupo, que foram submetidos a três sessões diárias de treinamento na piscina, com duração de dois minutos cada sessão. O animal foi colocado na piscina sempre no mesmo local (lado oposto à plataforma) permitido um período de 120 segundos para alcançar a plataforma. Quando o animal não foi capaz de alcançá-la este foi colocado sobre a plataforma e deixado por 30 segundos. Após essa sessão o animal foi retirado da piscina e submetido ao novo treinamento na próxima sessão de treino. Foram realizadas, ao todo, 15 sessões de treinamento. Durante os testes uma outra sala provida de sistema de vídeo foi ferramenta fundamental para a observação e registro dos mesmos.

Todos os testes para avaliação da toxicidade perinatal foram realizados no período da manhã.



Figura 4: Labirinto Aquático de Morris: Modelo experimental para avaliação da aprendizagem e memória. A seta vermelha indica a localização aproximada da plataforma submersa. Observam-se também as marcações nas paredes para ajudar os ratos quanto a sua orientação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela do consumo de ração do grupo tratado

Tabela 2. Tabela do consumo de ração do grupo tratado durante a gestação.

		9 dias de SALSA								TOTAL (g)	4 dias de RAÇÃO				TOTAL (g)
RATA 1	1 2	11	10	3	0	2	17	28	10	93	38	30	33	34	135
RATA 2	1 3	4	10	1	9	9	11	20	10	87	15	25	29	23	92
RATA 3	1 8	10	9	18	14	12	8	6	12	107	23	26	20	23	92
RATA 4	1 0	8	7	0	2	3	3	3	5	41	23	30	36	31	120
RATA 5	0	2	3	1	1	1	11	10	4	33	8	21	35	21	85
RATA 6	2	2	2	0	1	4	0	0	1	12	29	34	35	27	125
RATA 7	1	15	5	1	2	7	2	10	2	45	25	27	34	19	105
RATA 8	7	5	2	0	0	1	0	0	0	15	15	12	35	22	84
RATA 9	6	4	6	4	5	6	9	7	6	53	8	20	31	20	79
RATA 10	6	4	5	12	3	1	7	0	5	43	4	17	30	17	68

Conforme a metodologia do experimento, houve um controle de ração, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado, pois a alternância de dias de consumo de ração com feno e/ou ração com salsa em relação à ração comum possibilitou o consumo da mesma quantidade das duas rações.

Tabela de ganho de peso de fêmeas gestantes dos grupos controle e tratado

	FENO			SALSA			
	PESO INICIAL	PESO FINAL	$\Delta = Pf - Pi$		PESO INICIAL	PESO FINAL	$\Delta = Pf - Pi$
RATA 1	247	304	57	RATA 1	280	308	28
RATA 2	232	285	53	RATA 2	233	276	43
RATA 3	270	330	60	RATA 3	275	282	7
RATA 4	254	312	58	RATA 4	291	314	23
RATA 5	271	325	54	RATA 5	263	280	17
RATA 6	196	209	13	RATA 6	283	306	23
RATA 7	221	256	35	RATA 7	254	283	29
RATA 8	215	276	61	RATA 8	281	239	-42
RATA 9	221	264	43	RATA 9	194	218	24
RATA 10	190	216	26	RATA 10	229	209	-20

Tabela 3. Tabela de ganho de peso de fêmeas gestantes dos grupos.

* Média do ganho de peso: Grupo controle = 46g.

* Média do ganho de peso: Grupo tratado = 13,2g.

Observando a figura 5 de ganho de peso, das fêmeas gestantes do grupo controle com as do grupo tratado, podemos constatar que houve um ganho de peso significativo ($P < 0,05$) das fêmeas controle alimentadas com ração de feno em relação às fêmeas gestantes do grupo tratado, porém sem alterar o período de gestação, tamanho da ninhada, número de recém-nascidos vivos e mortos e presença de mal formações.

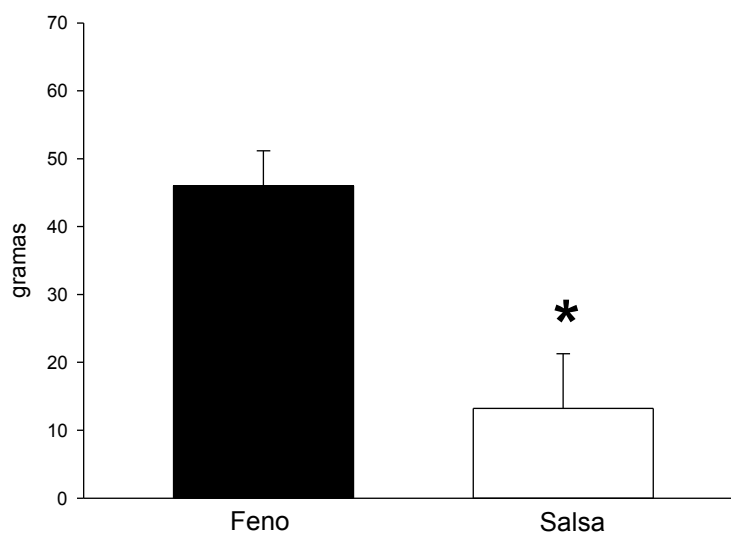


Figura 5. Ganho de peso em gramas de ratas alimentadas com ração de salsa (50%) e ração de feno (50%) durante período de gestação. * Diferença significativa a $P < 0,05$.

4.1 Desenvolvimento físico da prole

Em relação aos testes realizados de desenvolvimento físico da prole, tais como: Reflexo do Endireitamento, Geotaxia Negativa, Esquiva ao Abismo, Preensão Palmar, Orientação pelas Vibrissas, Surgimento da Resposta de Sobressalto e Abertura dos Ovidutos, somente no teste de Esquiva ao Abismo (figura 6), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os filhotes tratados e controles. Este achado pode indicar um comprometimento no aprendizado e memória desses filhotes. Algumas alterações foram observadas também por SANTOS (2001), utilizando camundongos como modelo farmacológico, intoxicou-os por via oral com uma proteína, denominada Lectina Tóxica da Salsa (LTS) da *I. asarifolia*, de natureza glicoprotéica que induziu retardamento no crescimento, alterações hepáticas, renais e no SNC na região do hipocampo nos lactentes e emagrecimento das fêmeas gestantes sugerindo que a intoxicação por *I. asarifolia* leva ao emagrecimento, não afetando o tamanho e peso da ninhada, o que também foi constatado neste trabalho.

Segundo SPYKER (1975), o SNC é muito sensível a produtos químicos, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, sensibilidade que pode se manifestar em distúrbios ao comportamento, porém pouco é conhecido a respeito de seu potencial de modificar a capacidade neurocomportamental decorrente da sua interferência na ansiedade, inteligência, aprendizagem e memória.

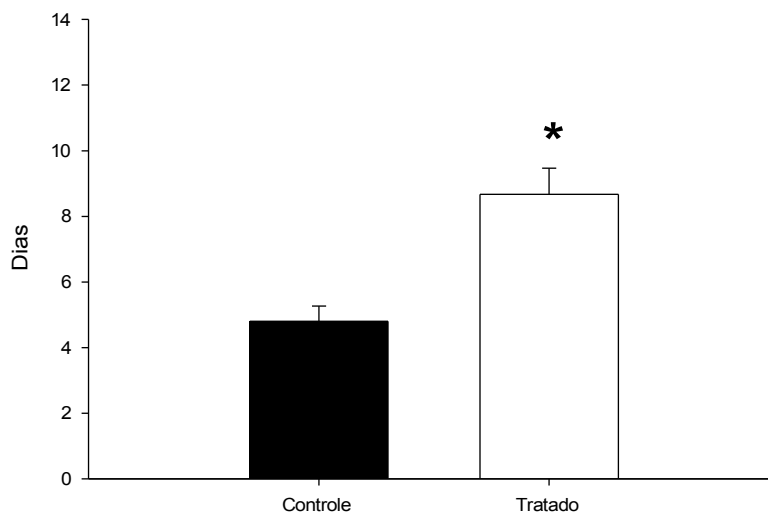


Figura 6. Representação gráfica do desenvolvimento físico da prole (esquiva ao abismo) de filhotes de ratas tratadas com rações de feno (50%) grupo controle e salsa (50%) grupo tratado, durante período de gestação. * Significativo a $P < 0,05$.

4.2 Avaliação comportamental da prole

No teste do Campo Aberto, onde se mensura a atividade exploratória, medo e/ou ansiedade dos animais em teste realizado em local distinto do seu ambiente usual. Observou-se que não houve diferenças significativas entre os animais tratados e controles (figura 7), para a frequência de ambulação, isto sugere que a salsa administrada durante toda a gestação em forma de ração não afeta a atividade locomotora de seus filhotes aos 26 dias de idade.

Nossos resultados contrariam em parte os resultados de SCHWARZ et al. (2007), que relataram em filhotes de ratas alimentadas com *Ipomoea carnea*, alterações neste teste. Para estes autores os alcalóides desta planta podem interferir nos

sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, interferindo no sistema neuromotor e consequentemente na atividade locomotora.

Nesse mesmo teste (Campo Aberto), também não houve diferenças significativas na frequência de levantar-se (rearing), entre os animais do grupo tratado e controle e nem diferenças entre sexos dos dois grupos, apesar de que o comportamento exploratório observado no Campo Aberto tem se mostrado como sendo sexualmente diérgico² DUBOVICKY et al., (1999). As fêmeas de ratos normalmente exibem maior atividade locomotora e uma maior frequência do parâmetro “levantar-se”, quando comparado com os machos ARCHER (1975). Além do mais, elas manifestam um menor nível de emocionalidade revelado por uma menor taxa de defecação NASELLO et al., (1998).

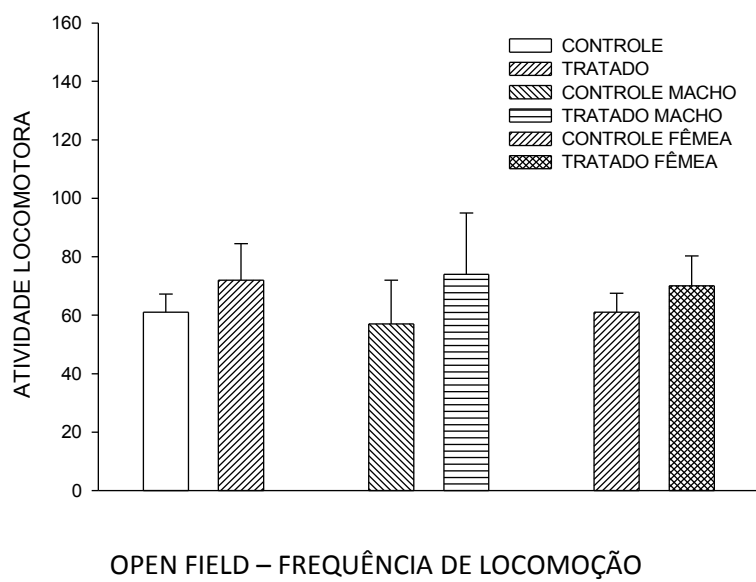
Entretanto, essas diferenças comportamentais entre os sexos observados no campo aberto parecem ser dependentes da idade dos animais, emergindo inicialmente aos 60 dias de idade aproximadamente MASUR et al., (1980).

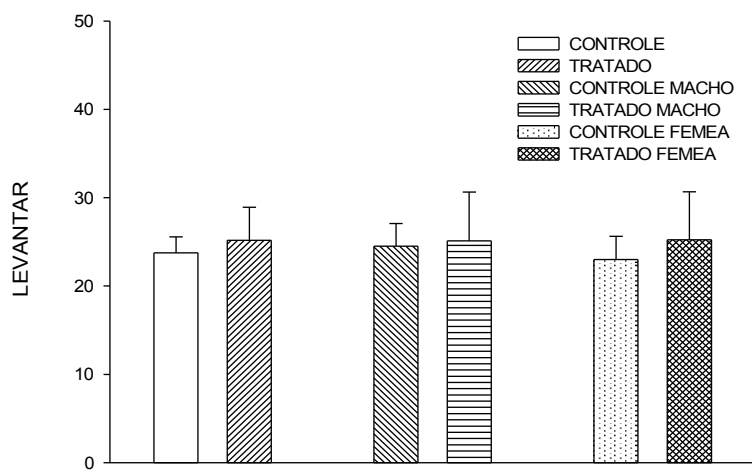
Essa informação pode explicar a inexistência de diérgismo sexual para a frequência de ambulação e defecação observada no presente estudo, uma vez que os animais foram testados aos 26 dias de idade e, portanto, imaturos para esta expressão.

Observou-se no presente estudo que a frequência de auto-limpeza não foi afetada pelo tratamento, bem como a frequência de micção, defecação e período de mobilidade, isso indica que a excitabilidade observada em ovinos intoxicados por esta planta (CHAVES, 2009), não se manifesta em ansiedade nos ratos, realizado no teste do Campo Aberto, e para uma análise mais apurada de modificações de ansiedade empregou-se o teste de Labirinto em Cruz Elevado, modelo animal bastante utilizado

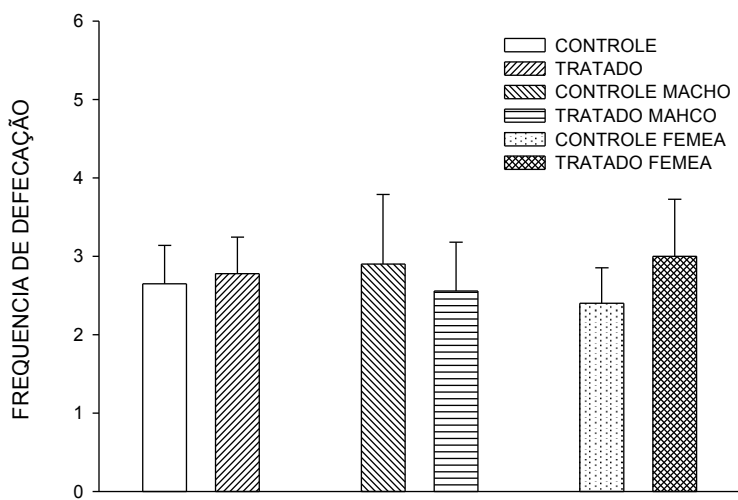
2 - Diferença funcional e/ou comportamental entre os sexos.

nos estudos de novos compostos ansiolíticos (PELLOW et al., 1985).

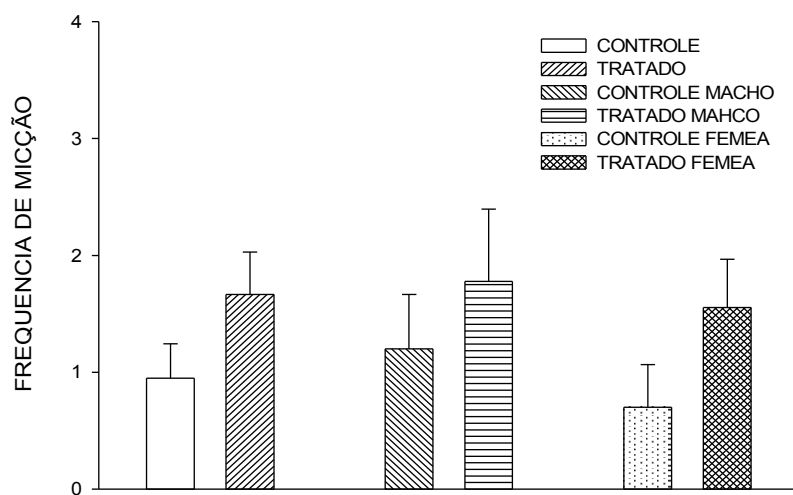




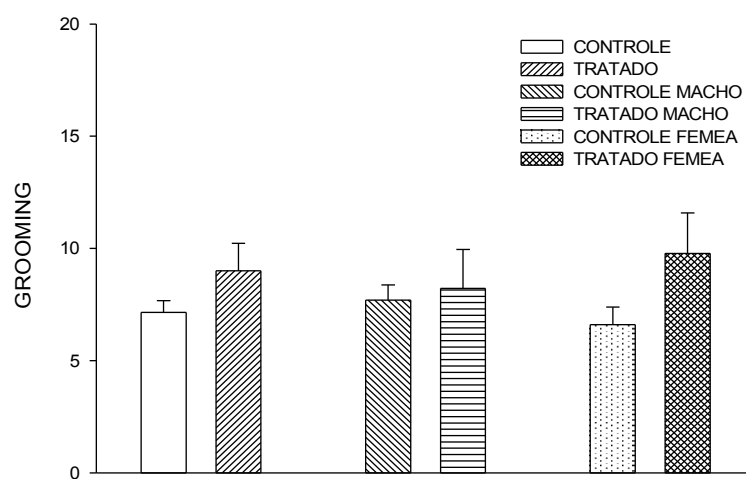
OPEN FIELD – FREQUÊNCIA DE LEVANTAR-SE



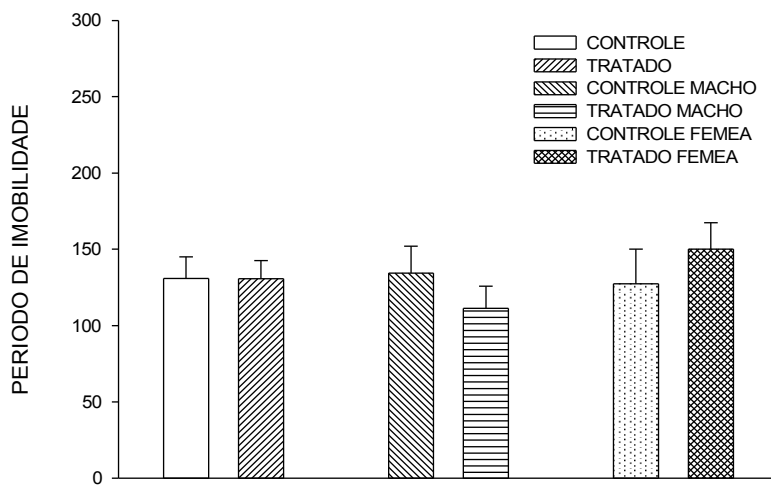
OPEN FIELD – FREQUÊNCIA DE DEFECACÃO



OPEN FIELD – FREQUÊNCIA DE MICÇÃO



OPEN FIELD – FREQUÊNCIA DE AUTO-LIMPEZA



OPEN-FIELD – PERÍODO DE IMOBILIDADE

Figura 7. Representação gráfica no teste de Campo Aberto (Frequência de Locomoção, de Levantar-se, de Defecação, de Micção, de Auto-limpeza (grooming) e Período de Imobilidade) realizado com os filhotes aos 26 dias pós-natal de ratas tratadas com ração de salsa (50%) grupo tratado e feno (50%) grupo controle, durante a fase de gestação.

Ainda nesse estudo, verificou-se que a exposição perinatal a administração da salsa em ratas prenhes durante toda gestação, não modificou o desempenho dos filhotes no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) aos 27 dias de idade, em relação à performance dos filhos das ratas controle (figura 8). Constatou-se também que não houve interação entre os fatores tratamento e sexo, bem como não houve diferença entre os sexos para ambos os parâmetros, porcentagem de entrada e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos, ou seja, o desempenho dos animais experimentais no Labirinto em Cruz Elevado não se modificou em virtude do tratamento, assim como, não foi influenciado pelo sexo desses animais. De fato, desvios comportamentais decorrentes de manipulação do nível de serotonina durante a fase perinatal não tem sido relatados na ausência de desafios com outros tóxicos (BERGER – SWEENEY et al., 1997).

A despeito da complexidade dos mecanismos neuroquímicos implicados na ansiedade, outros fatores estão potencialmente envolvidos nas respostas dos animais observados no LCE, tais como, mecanismos motores e cognitivos (HANDLEY & MCBLANE, 1993). Neste trabalho, podemos desconsiderar as possíveis influências relacionadas com atividade locomotora e comportamento exploratório, pois os resultados obtidos no teste do Campo Aberto indicam que o tratamento não afetou estes fatores.

Segundo PELLOW et al. (1985), o aparelho é farmacologicamente e etologicamente validado na literatura, nesse contexto, é avaliada a aversão natural que os animais têm ao espaço elevado, além disso, eles ficam explorando os braços ansiogênicos (abertos, ou “área aversiva”) ou os braços seguros (fechados). Uma interpretação alternativa para o desempenho dos animais que exploram mais os braços abertos é que eles podem estar mais desinibidos (ALMEIDA, 1996; LALONDE & LUEBCKE, 2003). Do ponto de vista etológico, tendências desinibitórias excessivas podem não ser adaptativas e potencialmente expor o animal a situações de perigo. Além disso, esses paradigmas de alterações comportamentais podem ser interpretados mais em termos de impulsividade do que em termos de alterações no estado de ansiedade.

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

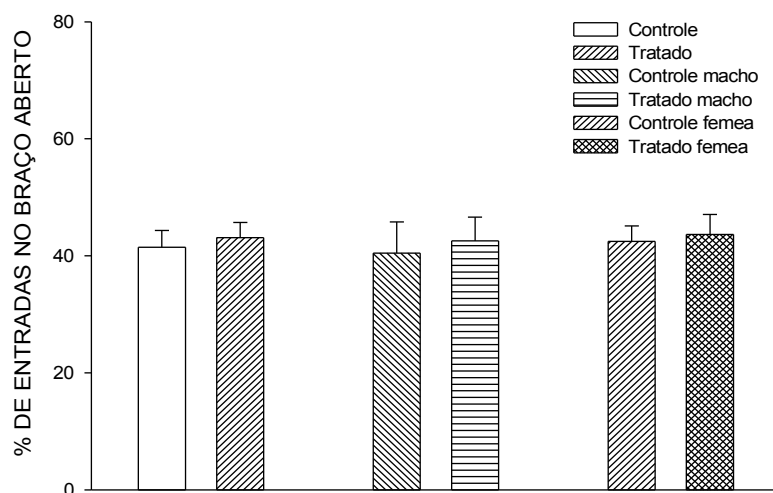


Figura 8. Representação gráfica no teste de Labirinto em Cruz Elevado realizado com os filhotes aos 27 dias pós-natal de ratas tratadas com ração de salsa (50%) grupo tratado e feno (50%) grupo controle, durante a fase de gestação.

Na avaliação da coordenação motora e equilíbrio da prole de ratas alimentadas com ração de salsa durante a gestação, no Tambor Giratório (Rota-rod) verificou-se que não houve diferença com os filhotes de ratas alimentadas com ração de feno durante a gestação (figura 9). Sugere-se que a salsa não interfere na coordenação motora e equilíbrio dos animais em teste, apesar do grau de excitabilidade que essas plantas possam causar em fêmeas gestantes de outras espécies, tais como os ovinos (TORTELLI et al., 2008).

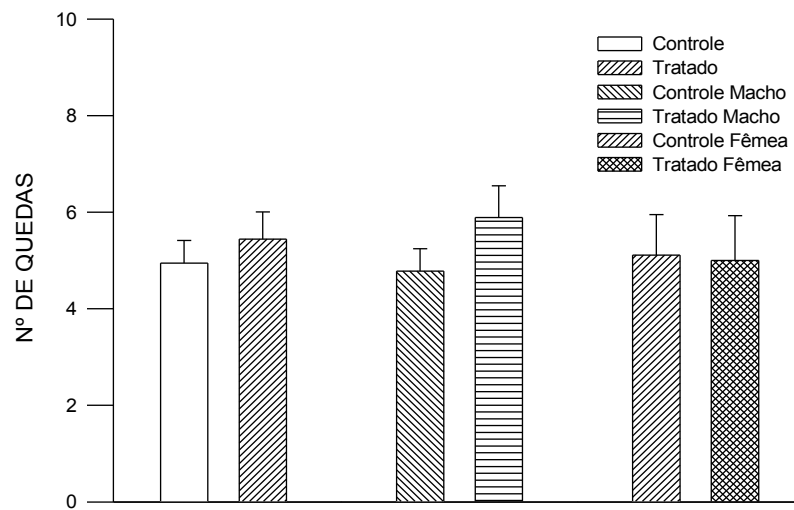


Figura 9. Representação gráfica no teste de Rota-rod realizado com os filhotes aos 37 dias pós-natal de ratas tratadas com ração de salsa (50%) grupo tratado e feno (50%) grupo controle, durante a fase de gestação.

Apesar da complexidade do SNC, eventos importantes deste sistema são elucidados, tais como as conexões a partir do anti-cérebro basal para o neocórtex e o hipocampo, que ocorrem nas duas primeiras semanas pós-natal (BERGER – SWEENEY, 1998). O neocórtex é uma região do cérebro envolvida em processos atencionais, enquanto que o hipocampo é responsabilizado por processo de memória, mais especialmente pela memória espacial e formação de mapas cognitivos (OLTON, 1983). Ambas as funções são bastante requisitadas no teste de Labirinto Aquático de Morris, uma vez que os animais se empenham na aquisição e retenção de informações sobre aprendizagem geral e localização espacial (MORRIS et al., 1982).

No teste do Labirinto Aquático de Morris realizado com os filhotes oriundos de ratas alimentadas com ração de salsa durante toda a gestação, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos filhotes de ratas controle (figura 10). VAN DER STAAY (2002) relata que há uma melhor eficiência na memória de ratos jovens em relação a ratos velhos, no desempenho do Labirinto Aquático. Levando-se

em consideração que o teste foi aplicado aos 40 dias após o nascimento, fase em que a eficiência da memória parece estar mais ativa. Os filhotes de ratas alimentadas com ração de salsa durante a gestação necessitaram de um tempo maior para encontrar a plataforma em relação aos filhotes do grupo controle, sugerindo que nestes animais as regiões do hipocampo e neocórtex foram comprometidas na gestação.

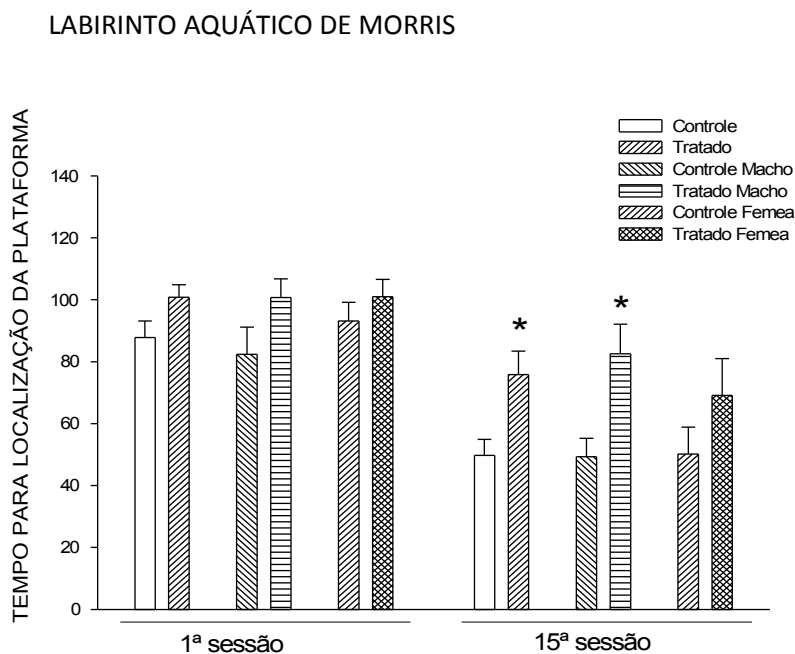


Figura 10. Representação gráfica do tempo médio para a localização da plataforma na primeira e na última sessão com duração de 2 minutos cada em 15 sessões durante 05 dias no Teste do Labirinto Aquático de Morris, realizado com os filhotes, aos 40 dias pós-natal, de ratas tratadas com rações de salsa (50%) grupo tratado e feno (50%) grupo controle, durante a fase de gestação. * Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados aos mesmos animais na primeira sessão.

HUEZA et al.,(2005) relataram em seus estudos com ratas prenhes submetidas à alimentação com *Ipomoea carnea*, que esta planta consegue atravessar a barreira placentária além de serem encontrados resíduos do princípio tóxico no leite, desta forma podemos explicar em parte a intoxicação na fase de gestação em nosso estudo.

Os resultados obtidos neste teste sugerem que nos filhotes de ratas do grupo tratado alimentadas durante toda gestação com ração de salsa, houve alteração na aprendizagem, pois mesmo realizado aos quarenta dias pós-natal podemos observar que os mesmos levaram um tempo maior para encontrar a plataforma em relação aos filhotes do grupo controle, também observado nos testes de desenvolvimento físico da prole (esquiva ao abismo) realizado aos três dias pós-natal. Relacionando assim um comprometimento na capacidade de aprendizagem geral e localização espacial destes filhotes.

5. CONCLUSÃO

Vistos em conjunto, os resultados obtidos, podemos constatar que a administração de *I. asarifolia* (salsa) em forma de ração administrada durante toda a gestação, causa toxicidade perinatal, alterando a capacidade de aprendizagem e memória espacial dos seus filhotes.

REFERÊNCIAS

ARCHER, J. Rodent sex differences in emotional and related behaviour. **Behavioral Biology**, New York, v.14, p. 451-479, 1975.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1996. p. 341.

BARG, D. G. **Plantas tóxicas**. 2004. 24 f. Monografia (Trabalho de graduação) - Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BATISTA, C. P.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; MOREIRA, A. T. R. M.; COLMAN, D.; LIMA, J. H. F.; MACRI, M. M.; RAUEN JR, R. J.; FERREIRA, L. M.; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização do estômago em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 3, p. 49-54, 2006.

BERGER-SWEENEY, J. The effectos of neonatal basal forebrain lesiono on cognition: tonards understanding the deuclopmantal role of the cholinergic basal forebrain. **International Journal Developmental Neuroscience**, Kidlington, v.16, n. 718, p. 603-612, 1998.

BERGER-SWEENEY, J.; HOHMANN C. F. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 121-207, 1997.

BROADHURST, P. L. Experiments in pycogenetics. In: EISENK, H. J. **Experiments in personality**. London: Routledge & Regan Paul, 1960. p. 31-71.

CHAVES, D. P. **Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* em ovinos: achados clínicos laboratoriais e anatomopatológicos**. 2009. 70 f. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária) -. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

DUBOVICKY, M.; SKULTÉTYOVÁ, I.; JEZONA, D. Neonatal stress alters habituation of exploratory behavior in adult male but not female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 64, n. 4, p. 681-686, 1999.

GOMES, C. S.; CAMPOS, A. C. L.; TORRES, O. J. M.; VASCONCELOS, P. R. L.; MOREIRA, A. T. R.; TENÓRIO, S. B.; TAMBARA, E. M.; SAKATA, K.; MORAES JÚNIOR, H.; FERRER, A. L. S. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 2, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI: 10.1590/S0102-86502006000800003 .

GRAVA, A. L. S.; FERRARI, L. F., PARADA, C. A.; DEFINO, H. L. A. Modelo experimental para o estudo da hérnia do disco intervertebral. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 43 n. 4, p. 116-125, 2008.

HALL, C. S. Temperament: a survey of animal studies. **Psychology Bulletin**, Belville, v. 38, p. 909-943, 1941.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, Leipzig, n. 327, p. 1-5, 1984.

HANDLEY, S. L.; McBLANE, J. W. 5ht drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology**, Berlin, n.112, p.13-20, 1993.

HUEZA, I. M.; GUERRA, J. L.; HARAGUCHI, M.; NAOKI, A.; GORNIK, S. L. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. **Aims: experimental and toxicologic pathology**, Amsterdam, v. 57, p. 53-58, 2005.

LALONDE, E. R.; LUEBCKE, R. G. The frequency and distribution of periapical cysts and granulomas: an evaluation of 800 specimens. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, Saint Louis, v. 25, n. 6, p. 861-868, 1968.

MASUR, J.; SCHUTZ, M. T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open field behavior as a function of age. **Development Psychobiology**, New York, v.13, p.107-110, 1980.

MELO, M. M.; VERCOSA JUNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCOL, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (malpighiaceae) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 631-640, 2008.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, São Paulo, v.17, n. 4, p. 159-174, 2006.

MORRIS, R. G. M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N. P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, London, v. 297, n. 5868, p. 681-683, 1982.

NASELLO, A.G.; MACHADO, C; BASTOS, J. F. FELÍCIO, L. F. Sudden darkness induces a high activity low anxiety state in male and female rats. **Physiology & Behavior**, New York, v. 63, n. 3, p.451-54, 1998.

OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; PAULA, J. R. de; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. da. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* pax. e de suas frações em

camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 485-491, 2008.

OLIVEIRA, C. A.; BARBOSA, J. D.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; CORREA, F. R.; TORTELLI, F. P.; CORREA, G. R. Intoxicação por *Ipomoea carnea* subsp. *Fistulosa* (convolvulaceae) em caprinos na Ilha do Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 583-588, 2009.

OLTON, D. S. Memory functions and the hippocampus. In: SEIFERT, W. **Neurobiology of hippocampus**. London: Academic Press, 1983. p. 335-373.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, n. 14, p. 149-167, 1985.

SANTOS, L. F. L. **Toxina da salsa (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.):** aspectos bioquímicos, estruturais, funcionais e potencial biotecnológico. 2001. 142 f. Tese (Doutorado) -Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

SCHWARZ, A.; HOSOMI, R. Z.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. Rats offspring exposed to *Ipomoea carnea* and handling during gestation: neurochemical evaluation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 425-433, 2007.

SPYKER, J. M. Assessing the impact of low level chemicals on development: behavioral and latent effects. **Federations Proceedings**, Bethesda, v. 34, n. 9, p. 1835-1844, 1975.

TORTELLI, F. P. Y.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; OLIVEIRA, C. A.; CORREA, F. R.; CORREA, G. R. Intoxicação por

Ipomoea asarifolia em ovinos e bovinos na Ilha de Marajó. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 622-626, 2008.

VAN, S. Assessment of age-associated cognitive deficits in rats: a tricky business. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 26, p.753-759, 2002.

XAVIER, G. J. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Editora Plêiade, 1999. 238 p.

Apêndices

APÊNDICE A:

Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda com *I. asarifolia* em extrato aquoso.

PARÂMETRO	ESTATÍSTICA			
	F	CV	R ²	P
ALT *1				
BF (F=4,67; P=0,05)	3,15	33,76	0,05	0,08
AST				
BF (F=0,14; P=0,71)	2,70	59,38	0,04	0,11
GLIC				
BF (F=3,01; P=0,09)	1,94	13,68	0,03	0,17
PROT				
BF (F=1,91; P=0,17)	0	7,03	< 0,001	0,97
CREA *2				
BF (F=0,82; P=0,37)	0	- 19,46	< 0,001	0,96
BD				
BF (F=0,18; P=0,67)	1,83	58,26	0,03	0,18
BT				
BF (F=1,04; P=0,31)	1,89	28,75	0,04	0,18

CRAMER-VON MISES (W=0,08; P=0,19).

*1 Dados transformados por 1/ALT

*2 Dados transformados por LOG 10 (CREA)

F- calculado; CV- coeficiente de variação; R²- fator de determinação; P- nível de significância.

APÊNDICE B:

Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com *I. asarifolia* em extrato aquoso.

	F	CV	R²	P
TRATADO	0,15			0,70
ALT TEMPO	11,85	40,13	0,38	<0,01
TRATxTEMP	4,51			0,02
TRATADO	3,55			0,06
AST TEMPO	11,04	51,80	0,32	<0,0001
TRATxTEMP	0,08			0,92
TRATADO	2,63			0,11
GLIC TEMPO	8,67	11,74	0,34	<0,0005
TRATxTEMP	3,64			0,03
TRATADO	0			0,96
PROT TEMPO	20,66	5,40	0,45	<0,0001
TRATxTEMP	1,45			0,24
TRATADO	0,07			0,79
CREA TEMPO	22,91	15	0,47	<0,0001
TRATxTEMP	1,23			0,30
TRATADO	2,05			0,16
BD TEMPO	11,76	49,43	0,36	<0,0001
TRATxTEMP	0,37			0,69
TRATADO	3,44			0,07
BT TEMPO	2,53	26,85	0,23	<0,09
TRATxTEMP	3,09			0,06

F- calculado; CV- coeficiente de variação; R²- fator de determinação; P- nível de significância.

APÊNDICE C:

Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda com *I. asarifolia* em extrato aquoso.

PARÂMETRO	F	CV	R ²	P
HE				
BF (F=0,15;P=0,70)	2,35	13,54	0,04	0,13
LEU				
BF (F=1,42;P=0,24)	0,27	36,95	0,005	0,61
HB				
BF (F=0,80;P=0,37)	1,65	44,50	0,03	0,20
HT				
BF (F=0,84;P=0,36)	3,54	11,74	0,06	0,06
BAS				
BF (F=1,50;P=0,32)	1,50	774,60	0,02	0,32
EOS				
BF (F=0,80;P=0,37)	0,80	173,09	0,01	0,37
NB				
BF (F=1,39;P=0,24)	1,39	148,55	0,02	0,24
NS				
BF (F=1,92;P=0,17)	0,82	44,69	0,01	0,37
LINF				
BF (F=2,24;P=0,14)	0,43	10,36	0,007	0,52
MON				
BF (F=2,09;P=0,15)	2,09	165,04	0,03	0,15

CRAMER – VON MISES (W=0,11; P=0,08)

APÊNDICE D:

Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com *I. asarifolia* em extrato aquoso.

	F	CV	R²	P
TRATADO	4,02	10,35	0,48	0,05
HE TEMPO	20,98			<0,0001
TRATxTEMP	1,63			0,21
TRATADO	0,29			0,59
LEU TEMPO	3,54	35,69	0,14	0,04
TRATxTEMP	0,55			0,58
TRATADO	1,73			0,19
HB TEM	2,58	43,45	0,14	0,08
TRATxTEMP	0,83			0,44
TRATADO	5,22			0,02
HT TEMPO	15,10	9,68	0,40	<0,0001
TRATxTEMP	0,61			0,55
TRATADO	1			0,32
BAS TEMPO	1	774,60	0,08	0,37
TRATxTEMP	1			0,37
TRATADO	0,75			0,39
EOS TEMPO	0,12	178,59	0,02	0,89
TRATxTEMP	0,12			0,89
TRATADO	1,46			0,23
NB TEMPO	0,48	144,98	0,13	0,62
TRATxTEMP	2,97			0,06
TRATADO	1,20			0,28
NS TEMPO	13,17	36,98	0,37	<0,0001
TRATxTEMP	2,18			0,12
TRATADO	0,62			0,44
LINF TEMPO	11,85	8,63	0,36	<0,0001
TRATxTEM	2,93			0,06
TRATADO	2,13			0,15
MON TEMPO	0,63	163,18	0,12	0,53
TRATxTEM	2,03			0,14

APÊNDICE E:

Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda com *I. asarifolia* em extrato hidroalcoólico.

PARÂMETRO	F	CV	R ²	P
ALT BF(F=1,10;P=0,30)	0,10	20,02	0,002	0,75
AST BF(F=0,03;P=0,87)	0,17	40,23	0,003	0,68
GLIC BF(F=0,10;P=0,76)	0,53	2,60	0,009	0,47
PROT BF(F=0,99;P=0,32)	1,16	12,80	0,020	0,29
CREA BF(F=0,58;P=0,45)	1,59	19,73	0,028	0,21
BD BF(F=0,03;P=0,86)	0,01	55,32	0,003	0,90
BT BF(F=0,33;P=0,57)	0,00	33,65	0,000009	0,98

CRAMER-VON MISES ($w=0,075$; $P=0,24$).

*1 Dados transformados por 1/ALT

*2 Dados transformados por LOG 10(CREA)

APÊNDICE F:

Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis bioquímicas de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com *I. asarifolia* em extrato hidroalcoólico.

	F	CV	R ²	P
TRATADO	0,07	20,96	0,66	0,80
ALT TE	0,87			0,42
TRATxTEMP	0,96			0,39
TRATADO	0,14	37,19	0,21	0,71
AST TEMPO	6,68			0,003
TRATxTEMP	0,15			0,86
TRATADO	0,84	2,19	0,35	0,36
GLIC TEMPO	10,85			0,0001
TRATxTEMP	3,04			0,57
TRATADO	4,32	5,69	0,82	0,043
PROT TEMPO	114,22			<0,0001
TRATxTEMP	2,32			0,11
TRATADO	4,40	13,92	0,55	0,041
CREA TEMPO	26,01			<0,0001
TRATxTEMP	2,76			0,073
TRATADO	0,01	53,27	0,14	0,90
BD TEMPO	3,47			0,04
TRATxTEMP	0,65			0,53
TRATADO	0,00	33,77	0,065	0,96
BT TEMPO	0,06			0,94
TRATxTEMP	1,71			0,19

APÊNDICE G:

Teste de Brown and Forsythe (bf) para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda com *I. asarifolia* em extrato hidroalcoólico.

PARÂMETRO	F	CV	R ²	P
HE BF(F=1,29;P=0,26)	0,50	6,54	0,010	0,48
LEU BF(F=0,31;P=0,58)	1,27	38,25	0,026	0,27
HB BF(F=3,67;P=0,06)	0,27	5,53	0,006	0,60
HT BF(F=0,00;P=0,95)	0,22	8,39	0,005	0,64
BAS BF(F=0;P=0)	0	0	0	0
EOS BF(F=0,13;P=0,72)	0,14	103,94	0,003	0,71
NB BF(F=0,00;P=0,96)	0,00	150,95	0,00002	0,98
NS BF(F=1,75;P=0,19)	0,51	36,64	0,108	0,48
LINF BF(F=2,28;P=0,14)	0,48	12,78	0,1003	0,49

CRAMER-VON MISES (w=0,052; P=0,25).

APÊNDICE H:

Estatística análise de variância pelo delineamento fatorial das variáveis do hemograma de ratos submetidos à intoxicação subaguda tratamento X tempo com *I. asarifolia* em extrato hidroalcoólico.

F CV R² P

TRATADO HE TEMPO TRATxTEMP	0,42 5,50 0,40	6,05	0,23	0,52 0,007 0,67
TRATADO LEU TEMPO TRATxTEMP	1,38 0,71 0,58	38,82	0,08	0,25 0,50 0,57
TRATADO HB TEMPO TRATxTEMP	0,54 4,65 0,30	5,20	0,19	0,47 0,01 0,74
TRATADO HT TEMPO TRATxTEMP	0,06 1,43 0,49	8,40	0,09	0,81 0,25 0,62
TRATADO BAS TEMPO TRATxTEMP	0	0	0	0
TRATADO EOS TEMPO TRATxTEMP	0,03 0,03 1,23	105,61	0,06	0,86 0,97 0,30
TRATADO NB TEMPO TRATxTEMP	0,01 2,22 0,14	149,85	0,09	0,91 0,12 0,87
TRATADO NS TEMPO TRATxTEMP	0,60 0,11 0,43	37,83	0,04	0,44 0,89 0,65
TRATADO LINF TEMPO TRATxTEM	0,60 0,05 0,58	13,17	0,04	0,44 0,96 0,56
TRATADO MON TEMPO TRATxTEM	1,98 7,10 0,87	214,91	0,28	1,17 0,002 0,43
TRATADO PLAQ TEMPO TRATxTEM	5,83 9,28 1,23	15,69	0,41	0,02 0,0004 0,30

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](#)