

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS NO TRATO REPRODUTIVO DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*) SUBMETIDOS AO USO DE SANGUE DE DRAGÃO.

MARIAH DA SILVEIRA SCHUCH¹; CARLOS EDUARDO RANQUETAT FERREIRA¹; MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE²; THIAGO VAZ LOPES²; MARIANA TEIXEIRA TILLMANN²; CARINE DAHL CORCINI³

¹ReproPEL, Universidade Federal de Pelotas-UFPeI – mariah_schuch@hotmail.com, c_ranquetat@hotmail.com,

²Clinpet, UFPeI - marciaonobre@gmail.com, thiagovlopes@hotmail.com, mariana.teixeira.tillmann@gmail.com

³ReproPEL, UFPeI orientadora – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização de extratos de produtos naturais com finalidade terapêutica é de origem popular e vem sendo utilizada há muitos anos, entretanto, o estudo científico dessas plantas vem crescendo consideravelmente, objetivando o conhecimento dos benefícios e malefícios desses agentes medicinais (MOLINA et al, 2008).

Um dos extratos utilizados no Brasil e que se aplica a esse contexto, é o sangue de dragão, que é uma seiva de cor avermelhada extraída de árvores de 4 gêneros distintos: *Croton* (*Euphorbiaceae*), *Dracaena* (*Dracaenaceae*), *Daemonorops* (*Palmaceae*) e *Pterocarpus* (*Fabaceae*). Esta seiva pode ser utilizada de forma terapêutica, pois apresenta atividade antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarreica, analgésica, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante (GUPTA et al, 2008). A potente ação cicatrizante do Sangue de Dragão é possível devido à presença das proantocianidinas, que estimulam a contração da ferida, formação de colágeno, regeneração da camada epitelial e precipitação de proteínas para a formação de uma crosta (PIETERS, 1995).

Embora tanto o Sangue de Dragão, como outros extratos naturais possam apresentar efeitos terapêuticos sobre o organismo dos animais, pouco se sabe sobre sua toxicidade. Portanto, são de extrema importância que sejam realizados estudos a respeito, visto que os extratos naturais são de acesso relativamente fácil e são muito utilizados na automedicação, além de serem usados baseados somente no conhecimento popular pré estabelecido (TUROLLA, 2006). O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do sangue de dragão no trato reprodutivo de ratos wistar (*Rattus norvegicus*).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados como modelo experimental 36 animais da espécie *Rattus norvegicus* provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram colocados em plano anestésico e sofreram lesões na pele. Após, foram divididos em 3 grupos constituídos de 12 animais cada e receberam 3 diferentes tratamentos: tratamento controle constituído por solução fisiológica, e 2 tratamentos com adição de sangue de dragão nas concentrações de 0,1% e 0,001%, utilizando creme não iônico como veículo. Os tratamentos foram realizados diariamente com 0,1 ml de solução por animal durante 21 dias. Os animais foram eutanasiados conforme Resolução nº 1000 do CFMV e de cada um foram coletados os epidídimos e ductos deferentes direito e esquerdo, que foram colocados em placas com 24 poços com PBS (Phosphate-buffered saline) pré-

aquecido a 37°C. Os epidídimos e ductos deferentes foram dilacerados com agulhas descartáveis e mantidos aquecidos por 10 minutos para obtenção das células espermáticas.

As amostras com PBS e células espermáticas foram encaminhadas ao Laboratório de Reprodução Animal para a realização das análises de integridade de membrana espermática, integridade de acrossoma e viabilidade celular. Para análise de integridade de membrana foram usadas as sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP). Para a análise integridade do acrossoma foi feito esfregaço em lâmina com 20 µL de sêmen e depois de seca, foi colocado IP (iodeto de propídeo). Após, as lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto 95,55% por 5 minutos e lavadas novamente em PBS. Em uma sala escura, adicionaram-se às amostras, por 10 minutos, 20 µL de Lectin from *Arachis hypogaea* FITC Conjugate (20 mg/mL). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e colocou-se sobre a lâmina uma lamínula. Para ambas as análises, foi utilizado microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), por meio de excitação em filtro WU. Foram contados 200 espermatozoides em uma mesma lâmina e classificados conforme sua coloração. Para integridade de membrana foi utilizado aumento de 400x e os espermatozoides foram classificados em íntegros (corados em verde em toda sua extensão) e lesados (corados em vermelho). Para integridade de acrossoma foi utilizado aumento de 1000x e as células que apresentavam fluorescência verde no acrossoma foram consideradas íntegras, enquanto que as lesadas apresentavam a cabeça corada de vermelho. Para a avaliação da viabilidade celular, foi realizado esfregaço com uma alíquota de 10 µl de sêmen e uma alíquota de 10 µl da combinação de corantes eosina e nigrosina (E/N). Contaram-se 200 espermatozoides em microscópio óptico com aumento de 1000x, diferenciando células vivas (não coradas) das mortas (coradas). As análises foram realizadas por um único técnico treinado. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistix 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos nas duas concentrações (0,1% e 0,001%) de sangue de dragão causaram efeitos negativos sobre a integridade de acrossoma, integridade de membrana e viabilidade celular comparados com o controle de solução fisiológica. Entre as duas concentrações dos tratamentos com adição de sangue de dragão não se observou diferenças estatísticas. (Tabela 1).

Tabela 1. Médias (\pm erro padrão) das porcentagens de acrossoma, membranas e viabilidade espermática íntegra após tratamento por 21 dias com Sangue de Dragão.

Tratamento	Acrossoma (%)	Int. Membrana(%)	Viabilidade celular (%)
Sol. Fisiológica	82,1 \pm 2,8 A	57,9 \pm 5,0 A	56,2 \pm 3,9 A
Sangue de dragão 0,1%	40,0 \pm 3,7 B	21,7 \pm 1,8 B	33,7 \pm 2,4 B
Sangue de dragão 0,001%	47,7 \pm 4,7 B	35,0 \pm 2,7 B	33,2 \pm 2,3 B

Letras diferentes na coluna demonstram diferença estatística por Tukey (P<0,05)

As escassas informações sobre efeitos tóxicos de extratos naturais, principalmente em relação ao trato reprodutivo dificultam as comparações dos resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, sabe-se que espécies como *Passiflora incarnata*, podem causar eventos adversos cardiovasculares e gastrintestinais, os quais poderiam estar relacionados aos seus alcalóides e flavonóides presentes, (FISHER PURCELL; LE COUTEUR, 2000) substâncias que também fazem parte da formulação do sangue de dragão. VIEIRA FILHO et al (2002), relatou que o uso de *Austroplenckia populnea* reduz significativamente a quantidade de espermatozoides presentes no epidídimo. Logo, é de extrema importância que novas pesquisas sejam feitas para avaliar a toxicidade do uso tópico do cicatrizante sangue de dragão no trato reprodutivo, tanto de animais quanto de humanos, para que não ocorram problemas na espermatogênese ou infertilidade quando submetidos ao tratamento.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o uso de sangue de dragão como cicatrizante nas concentrações de 0,1% e 0,001% causaram efeitos negativos sobre o trato reprodutivo de Ratos Wistar, pois causam diminuição nos valores de integridade de membrana, acrossoma e viabilidade celular dos espermatozoides.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FISHER, A.A.; PURCELL, P.; LE COUTEUR, D.G. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Clin. Toxicol.**, New York, v.38, n.1, p.63-66, 2000.
- GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R.K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**. v.115 p.361-380, 2008
- MOLINA, F.P.; MAJEWSKI, M.;PERRELA, F.A. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. **Ciência Odontológica Brasileira**. São José dos Campos: v.11 n.2 p.86-93, 2008.
- PIETERS, L. *In vivo* wound healing activity of Dragon's Blood (*Croton* spp.), a traditional South American drug, and its constituents. **Phytomedicine**. v.2 n.1 p.17-22, 1995.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42 n.2 p.289-306, 2006.
- VIEIRA FILHO, A.S; DUARTE, L.P; SILVA, G.D.F; MAZARO, R.; DIS STASI, L. C. Constituintes químicos e atividade antiespermatogênica em folhas de *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2002.