

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

Diretor: Prof. Dr. Euclides Onofre Martins

COLESTEROLEMIA NA INTOXICAÇÃO CRÔNICA DA COBAIA  
PELO *HOLICALIX BALANSAE*, MICH.

(CHOLESTEROL BLOOD LEVEL IN CHRONIC INTOXICATION BY  
*HOLICALIX BALANSAE*, MICH. IN GUINEA PIGS)

J. A. SOUZA  
Prof. Assistente Doutor

ANGELO J. COLOMBO \*

A ocorrência de fitointoxicação entre herbívoros de interesse pecuário, representa assunto de alto significado econômico, pelas repercussões diretas na exploração pastoril. É consideravelmente grande o número de plantas reconhecidas como tóxicas que se desenvolvem de permeio às pastagens naturais. Algumas delas apresentam o máximo de sua toxicidade no período de floração (5), enquanto que outras, acentuam sua ação tóxica no período correspondente ao aparecimento de novos brotos (1). É de se observar, que tanto num como no outro caso, há uma coincidência do ciclo vegetativo da planta no período de sua máxima toxicidade, com a escassez de gramíneas nos campos naturais, onde os animais normalmente retiram sua maior quota alimentar.

O "Alecrim dos campos", como vulgarmente é conhecido o *Holocalix balansae*, Mich., é reconhecidamente tido como planta tóxica, tendo sido estudado entre nós por ROCHA e SILVA (7) e SOUZA e CAMARGO (9, 10, 11) e por SOUZA (12). O primeiro autor, a quem devemos as referências iniciais sobre seus efeitos tóxicos em bovinos e em animais de laboratório, considerou-a apenas como planta cianogética, muito embora a tenha envolvido no intrincado fenômeno da fotosensibilização, que integra o quadro clínico da "peste das queimadas" (7). Orientados pelos trabalhos realizados por Rocha e Silva, Souza e Camargo desenvolveram pesquisas de natureza farmacológica e toxicológica com extratos totais da planta, livre de cianeto; visando esclarecer alguns aspectos da intoxicação experimental pelo "alecrim" (9, 10, 11). Concluíram êstes auto-

\* Instrutor de Tecnologia Geral e Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo.

res, pela existência de outros componentes, além do cianeto, capazes de serem responsabilizados por efeitos tóxicos desenvolvidos em animais de laboratório, pelo extrato da planta.

Sabe-se que os níveis normais de colesterol do sangue total, dependem entre outros fatores, da integridade do tecido hepático. GRAS (2), admite que a colesterolemia é regulada pelo fígado, e que variações de colesterolemia são observadas em diversos processos patológicos. Assim, uma hipocolesterolemia é encontrada nas anemias, enfermidades caquetizantes, cirroses e tirotóxicoses. GRIMBER (3), verificou hipercolesterolemia em casos de icterícias dos tipos mecânico e hepatógenos produzidas por hepatites. SPELLBERG (13), observou que os níveis de colesterol sanguíneo apresentam-se diminuídos nas lesões do parênquima hepático. OTTENBERG e SPIEGEL (6), verificaram que cães intoxicados pelo clorofórmio apresentam aumento do colesterol livre e diminuição do colesterol total.

O presente trabalho objetivou provocar a intoxicação experimental em cobais, pelo extrato total do *Holocalix balansae*, Mich., livre de cianeto e, determinar as alterações da colesterolemia, visando admitir mais um elemento de diagnóstico laboratorial para o esclarecimento da intoxicação pelo "Alecrim".

#### MATERIAL E MÉTODOS

Fôlhas e brotos de *Holocalix balansae*, Mich., provenientes dos viveiros do Instituto Biológico de São Paulo, coletadas na mesma época do ano (Junho e Setembro), classificadas pela Seção de Fanerógamos do Instituto de Botânica de São Paulo, foram estabilizadas a 110°C, durante 30 minutos, secas em estufa com ar circulante a 60°C, durante 24 horas e, em seguida, trituradas em moinho a martelo. O pó obtido foi tratado, segundo técnicas preconizadas por SOUZA e CAMARGO (9), a fim de eliminar o cianeto. Em seguida, o pó de planta, livre de cianeto, foi misturado com água destilada, na proporção de 1:1 e submetido a extração mecânica, a frio, através de uma prensa hidráulica, a pressão de 24.000 libras.

O extrato aquoso recolhido foi filtrado, seu pH corrigido para 7,0 com NaOH a 0,1 N e conservado em frasco escuro. A determinação do pH da solução obtida, foi realizada em potenciômetro Methron, modelo E-396. Amostra de 10,0 ml desse extrato aquoso, correspondente a 20 g de pó de planta, foram distribuídas em frascos estéreis, modelo W-2 (Tipo embalagem de antibióticos liofilizados), com capacidade para 30,0 ml, colocadas em liofilizador automático "Eward High Vacuum-modelo Speed Vac" e submetidas a liofilização durante 22 horas (8).

Após êsse tratamento, os frascos foram fechados automaticamente, à vácuo, com rôlhas butílicas fresadas e estocados à temperatura ambiente, para posterior utilização nos ensaios que constituem objetivo dêste trabalho.

No momento do emprêgo nos ensaios toxicológicos, o produto liofilizado foi dissolvido em solução de cloreto de sódio a 0,15 M, através de rôlha butílica.

Empregamos 20 cobaias adultas de ambos os sexos, pesando de 300 a 400 gramas, aparentemente em boas condições físicas. Os animais foram distribuídos em dois grupos, respectivamente "A" e "B".

O grupo "A" (testemunhos), constituído por 10 animais, foi submetido a injeções subcutâneas diárias de 3,0 ml de solução fisiológica de cloreto de sódio, durante o período de 30 dias consecutivos. O grupo "B" (intoxicado), reunia 10 animais que foram submetidos a injeções subcutâneas diárias do extrato aquoso total de planta, correspondente a 10 gramas do pó, veiculado em 3,0 ml de solução fisiológica de cloreto de sódio, durante 30 dias consecutivos.

As amostras de sangue eram obtidas por punção cardíaca transdiafragmática. A primeira sangria era praticada no dia anterior ao início da experimentação, a fim de fornecer elementos referentes às condições pré-experimentais. A segunda e última sangria praticada no dia imediato à última administração do agente tóxico.

Estas condutas eram extensivas aos dois grupos de animais, "A" e "B". Após a última sangria, os animais foram sacrificados. Todos os animais de ambos os grupos, foram submetidos a quatro pesagens, sendo a primeira praticada no dia anterior ao início das administrações e as demais no 10.º, 20.º e 30.º dias de experimentação. A todos os animais dos lotes "A" e "B", foi oferecido alimento "ad libitum", nas mesmas condições.

A determinação quantitativa do colesterol foi realizada no sôro sangüíneo de conformidade com o método descrito por ZAK e col. (14). As leituras colorimétricas foram praticadas no espectrofotômetro marca Coleman Universal — modelo 14.

## RESULTADOS

*Colesterolemia* — Os animais intoxicados cronicamente com extrato de *Holocallis balansae*, Mich., revelaram no sangue, considerável diminuição do colesterol livre e total. A hipocolesterolemia atingiu cifra de 8,2% para o colesterol livre e 34,2% para o colesterol total, em relação aos animais do grupo "A". Prática-

mente, não se observaram alterações dignas de destaque na coles-terolemia dos animais pertencentes ao grupo "A" (Tabela 1).

*Curva ponderal* — O extrato de *Holocallix balansae*, Mich. provocou apreciável queda no pêso dos animais submetidos à intoxicação experimental. (Figura 1).

A diminuição de pêso foi constatada em todos os animais do grupo "B", sendo evidente no 20.º dia e muito pronunciada no 30.º dia de experimentação. (Tabela 2). A curva ponderal dos animais intoxicados desenvolveu-se, obedecendo relação inversamente proporcional ao tempo de duração da experiência (Figura 3).

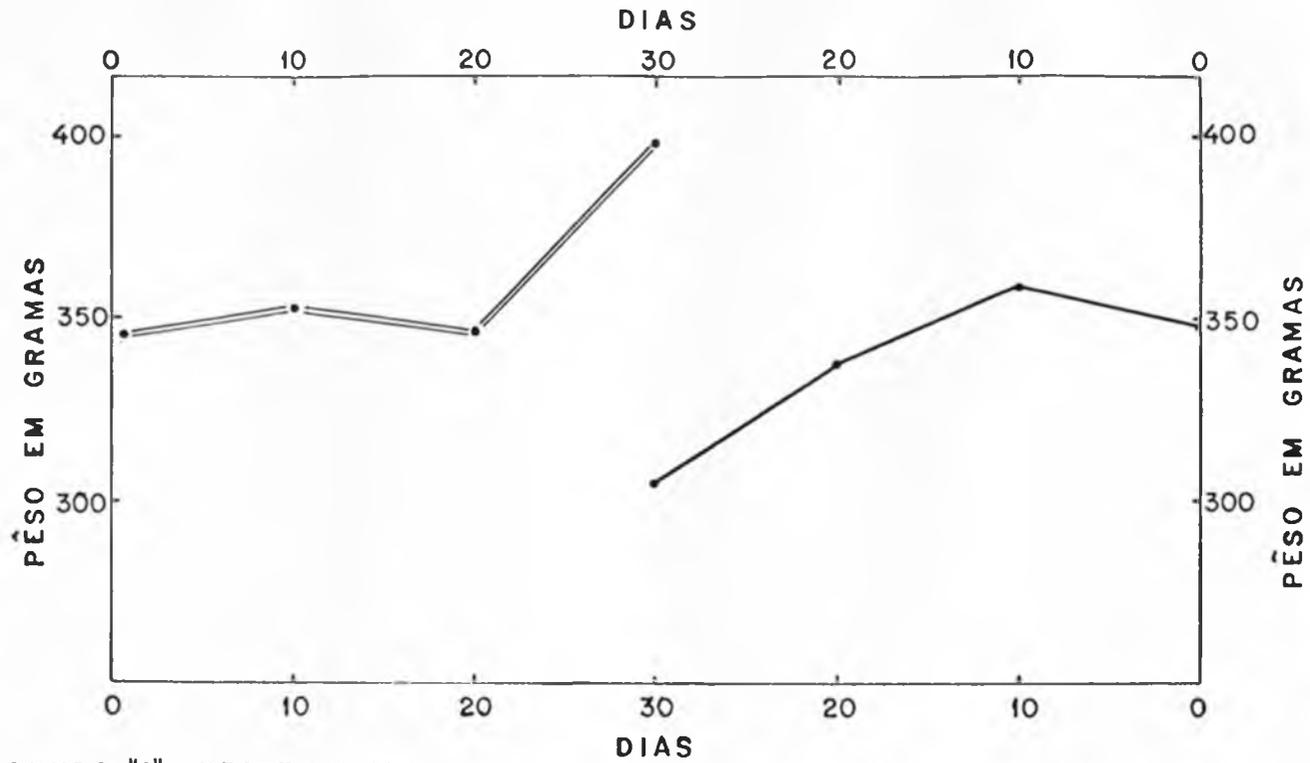
#### DISCUSSÃO

Os estudos pioneiros da intoxicação bovina pelo "Alecrim" (7), atribuíam ao íon cianeto a integral responsabilidade etiológica do quadro da fotosensibilização. Trabalhos farmacológicos e toxicológicos (9, 10, 11 e 12), com o extrato da planta, livre de cianeto, continuaram porém, a revelar atividade toxicológica, sugerindo a existência de outros componentes além do cianeto. JUBB e KENNEDY (4), estudando a fotosensibilização dos animais domés-

#### VALORES MÉDIOS EM mg/100 ml. DE SÔRO DE COBAIAS TESTEMUNHAS E INTOXICADAS

GRUPOS	COLESTEROL TOTAL		COLESTEROL LIVRE	
	ANTES DO TRATAMENTO	APOS AO TRATAMENTO	ANTES DO TRATAMENTO	APOS AO TRATAMENTO
TESTEMUNHA "A"	145,00	145,02	14,26	14,24
INTOXICADO "B"	145,64	12,27	14,36	4,84

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CURVAS PONDERAIS DE COBAIAS  
 "TESTEMUNHAS" E "INTOXICADAS"



GRUPO "A" - TESTEMUNHAS  
 GRUPO "B" - INTOXICADAS



TABELA II — Variações individuais nas pesagens de cobaias dos lotes "Testemunho" e "Intoxicado"

Grupo "A"					Grupo "B"				
Animal	Pesagens em gramas				Animal	Pesagens em gramas			
N.º	Inicial	10.º dia	20.º dia	30.º dia	N.º	Inicial	10.º dia	20.º dia	30.º dia
1	342	346	345	355	11	318	320	315	290
2	312	316	316	335	12	325	326	318	300
3	360	366	365	375	13	300	300	285	250
4	300	309	310	325	14	385	387	375	350
5	340	343	342	350	15	355	357	340	320
6	300	305	305	315	16	345	348	340	298
7	380	385	385	415	17	310	314	300	290
8	385	390	389	400	18	398	400	372	310
9	360	361	360	398	19	393	396	380	315
10	380	388	389	415	20	370	375	370	300
Médias	345,9	350,9	350,4	398,3	Médias	349,9	352,3	339,5	302,3

ticos, consideraram essencialmente, três fatores predisponentes ao seu aparecimento: fotosensibilidade primária, aumento da concentração de pigmentos e fotosensibilidade hepatogena.

Quando a capacidade excretora do fígado é alterada, a filoe-ritrina (pigmento resultante do metabolismo da clorofila), acumula-se no sangue, tornando o animal fotosensível.

A hipocolesterolemia constatada na intoxicação experimntal da cobaia, sugere a participação de lesões hepáticas que poderão responder pelo fenômeno da fotosensibilização, importante constituinte do quadro clínico da "peste das queimadas", resultantes da intoxicação bovina pelo *Holoclix balansae*, Mich. É óbvio que se impõem um levantamento mais amplo das constantes bioquímicas, bem como um estudo anatomopatológico detalhado das alterações hepáticas que o "Alecrim dos campos", livre de cianeto, venha a provocar nos animais submetidos aos experimentos. Todavia, a acentuada queda dos níveis sorológicos de colesterol livre e total, apresentados pelos animais do grupo "B", nos conduz a admitir que o fígado desses animais apresentou profundas alterações em suas funções relacionadas ao metabolismo lipídico.

A análise dos resultados obtidos em cobaias intoxicadas experimentalmente com extrato do *Holocalix balansae*, Mich., livre de cianeto, durante 30 dias consecutivos, revela que o "Alecrim dos campos", além do cianeto, apresenta em sua constituição, substâncias capazes de provocarem uma hipocolesterolemia considerável. Sendo a colesterolemia, considerada também como uma das provas bioquímicas de função hepática, cabe-nos concluir que o "Alecrim dos campos", livre de cianeto, é capaz de provocar alterações funcionais hepáticas relacionadas ao metabolismo lipídico.

#### SUMÁRIO

Os autores administraram às cobaias, durante 30 dias consecutivos, por via subcutânea, extrato aquoso de *Holocalix balansae*, Mich., em solução isotônica, correspondente a 10 gramas de pó de planta, livre de cianeto.

Amostras de sangue dos animais submetidos à intoxicação crônica, recolhidas por punção cardíaca, foram tratadas pela técnica de ZAK *e col.* (14).

Os resultados revelaram consideráveis alterações da colesterolemia desses animais, permitindo concluir-se que o extrato da planta, isenta de cianeto, poderá ser considerada como um dos fatores responsáveis pelo fenômeno de fotosensibilização que acomete os bovinos intoxicados pelo "Alecrim dos campos".

#### SUMMARY

A water extract of *Holocalix balansae*, Mich., in isotonic solution (3 ml), corresponding to 10 g of plant leaf powder, free from cyanide, was administered subcutaneously to guinea pigs during 30 days.

Immediately after the treatment period, blood samples were collected by cardiac puncture, and treated the method of ZEK *et al* for cholesterol.

The results obtained showed marked variations in the blood levels of cholesterol. The authors then conclude that this cyanide free plant extract, can be considered as one of the factors responsible for the photosensibilisation that develops in cattle after *Holocalix balansae*, Mich., ingestion.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNANDES, M. S. & MACRUZ, R. — 1964 — Toxicidade da Corona (Mascagnia pubiflora Juss). *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 31:1-4.
2. GRAS, J. — 1964 — Fundamentos de bioquímica médica. 3.<sup>a</sup> ed. Barcelona, Ediciones Toray, S.A.

3. GRIMBER, J. — 1952 — Hígado-diagnostico funcional y tratamiento de la insuficiencia hepatica. 3.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Gráficas Saraiva.
4. JUBB, K. V. F. & KENNEDY — 1963 — Pathology of domestic animals. New York, Academic Press, v. 2.
5. MOREIRA, E. A. — 1966 — Sôbre a presença de alcalóides em *Bacharis coridifolia* DC — Esparação por cromatografia em camada delgada. *Trib. farm.*, Curitiba, 26:5.
6. OTTENBERG, R. & SPINGEL, R. — 1943 — The present Status of Non-obstructive Jaudice due to infections and chemical agents. *Medicine, New York*, 22:27.
7. ROCHA E SILVA, M. — 1940 — Fotosensibilização em bovinos. A peste das queimadas, doenças causada pelo *Holocalix glaziovii*, Taub. *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 11:461-488.
8. SILVA, P. — 1961 — Liofilização. Salvador. Tese-cátedra. Faculdade de Farmácia da Universidade da Bahia.
9. SOUZA, J. A. & CAMARGO, W. V. A. — 1966 — Alguns efeitos farmacodinâmicos do *Holocalix glaziovii*. Taub. *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 33:1-10.
10. SOUZA, J. A. & CAMARGO, W. V. A. — 1966 — Ação cardioativa do *Holocalix glaziovii*, Taub. na pressão arterial de ratos adrenalectomizados. *Rev. Med. Vet.*, São Paulo, 1:164-169.
11. SOUZA, J. A. & CAMARGO, W. V. A. — 1966 — Ação cardioativa do *Holocalix glaziovii*, Taub. *Arch. Inst. Biol.*, São Paulo, 33:157-168.
12. SOUZA, J. A. — 1967 — Propriedades farmacodinâmicas e toxicológicas de extratos totais e de uma fração quimicamente pura do *Holocalix balansae*, Mich. Tese. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
13. SPELLBERG, A. M. — 1954 — Diseases of the liver. New York, Grune & Stratton.
14. ZAK, B.; DICKENMAN, R. C.; WHITE, E. G.; BURNETT, H.; CHENEY, P. J. — 1954 — Cholesterol. *Amer. J. clin. Path.*, 24:1307.