



**Catarina
Pereira Oliveira**

**Ação de polissacarídeos de *Sarcocornia perennis*
em ratinhos**



**Catarina
Pereira Oliveira**

**Ação de polissacarídeos de *Sarcocornia perennis*
em ratinhos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Helena Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado, pelo apoio incansável e carinho de todos.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
Professora Associada, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

vogal

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho
Investigadora em Pós-Doc, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e Silva
Professora Auxiliar Convidada, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

orientadora

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia,
Universidade de Aveiro

co-orientadora

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Às minhas orientadoras, Professora Maria de Lourdes Pereira e Professora Helena Silva pela disponibilidade em ajudar, pela paciência, orientação e apoio ao longo do trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Coimbra, à Doutora Elisabete Coelho e ao Dr. Mickael Santos, do Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela disponibilidade, pela indispensável ajuda e orientação durante uma etapa importantíssima deste trabalho.

À Dr^a. Teresa Raposo, ao Dr. António Rodrigues, ao Dr. António Ferreira Neves, ao Dr. Alberto Ferreira Neves e ao Dr. Américo Freitas, do Laboratório de Análises Clínicas AVELAB (Aveiro), por autorizarem e disponibilizarem a utilização do equipamento adequado, necessário à realização dos ensaios bioquímicos.

À Técnica Almerinda Felizardo, e aos Técnicos Júlia Araújo e José Lamas pelo seu auxílio, disponibilidade e orientação com o equipamento da área da Bioquímica e com as técnicas de hematologia, respetivamente. E a todos os funcionários do AVELAB que, direta ou indiretamente, me foram acompanhando e apoiando ao longo do trabalho.

À Professora Doutora Etelvina Figueira, do Departamento de Biologia, pela sua disponibilidade em esclarecer algumas dúvidas.

Aos Técnicos Aldiro Pereira e Rui Marques pela disponibilidade e ajuda nalguns procedimentos.

Às colegas de laboratório Sónia Oliveira, Ana Gomes e Elsa Dias pelo seu apoio, disponibilidade e ajuda na realização de algumas técnicas.

À minha amiga Joana Pinto pelo seu companheirismo, pela sua amizade e apoio, sem os quais teria sido ainda mais difícil a realização deste trabalho.

palavras-chave

Sarcocornia perennis subsp. *perennis*, polissacarídeos, fígado, baço, rim, testículo, epidídimo, sistema imunitário, proteção, imunoestimulação, tetracloreto de carbono

resumo

Os polissacarídeos são constituintes das plantas, podendo apresentar diversas propriedades, nomeadamente anti-tumorais, anti-virais, anti-fúngicas, anti-parasitárias e anti-bacterianas. Na literatura consultada, nenhuma reportou para as potencialidades de *S. perennis* subsp. *perennis*. Como tal, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as características dessa planta, incidindo na sua composição química e nos seus efeitos em vários órgãos e no sistema imunitário de ratinhos. Neste trabalho também se pretendeu avaliar os seus efeitos protetores após a agressão de CCl₄. Para tal, realizaram-se análises histopatológicas, bioquímicas e hematológicas, comparando-os com os grupos controlo, negativo e positivo (CCl₄). Foram usadas duas doses de extrato de polissacarídeos (400 mg/kg e 800 mg/kg), as quais foram, administradas aos ratinhos, por via oral, dissolvidos em água.

Observaram-se alterações apenas nos órgãos reprodutores masculinos. Nos restantes órgãos em estudo constatou-se uma ténue proteção no rim e baço. Verificou-se, através da análise histológica e da determinação de enzimas hepáticas, que os efeitos do CCl₄ no fígado, quando administrado *a posteriori*, foram atenuados pelo extrato de polissacarídeos. Este mostrou-se eficaz ao nível do sistema imunitário, tal como demonstrado pela análise histológica do baço e pela contagem diferencial de leucócitos no sangue de ratinho.

Conclui-se assim que os polissacarídeos presentes em *S. perennis* subsp. *perennis*, maioritariamente polissacarídeos pécticos, apresentaram efeitos protetores para o fígado, baço e rim, e ainda imunoestimuladores. As potencialidades desta planta deverão ser objeto de estudos futuros.

keywords

Sarcocornia perennis subsp. *perennis*, polysaccharides, liver, spleen, kidney, testis, epididymis, immune system, protection, immunostimulation, carbon tetrachloride

abstract

Polysaccharides are constituents of plants with different biological activities, including anti-tumor, anti-viral, anti-fungal, anti-parasitic and anti-bacterial features.

In literature, no potentials of applications of *S. perennis* subsp. *Perennis* were reported. For this reason, this study aimed to determine some features of this plant, focusing on the chemical composition, and effects on some organs and immune system of mice. This work also aimed to evaluate the protective effects of this plant after CCl₄ exposure. Histopathological, biochemical and hematological assays were conducted comparing them with control groups, negative and positive (CCl₄). Two doses of polysaccharides extract were orally dissolved in water and administered in mice (400 mg/kg and 800 mg/kg). Several changes were observed on male reproductive organs. However, a slight protection was observed in other organs, such as kidney and spleen. It was verified. The effects of CCl₄ in the liver when administered *a posteriori*, were attenuated by the polysaccharides extract, as confirmed by histological analysis and determination of liver enzymes. This proved to be effective at the level of the immune system, as revealed by histology of the spleen and the leukocyte count in the blood of mice.

It is concluded that the polysaccharides present in *S. perennis* subsp. *perennis*, mainly pectic polysaccharides, demonstrated protective effects to the liver, spleen and kidney, and also immunostimulatory activity. The potential of this plant should be investigated in further studies, through different assays.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I – INTRODUÇÃO | 15 |
| I.1 – Importância das plantas medicinais | 15 |
| I.1.1 Principais contaminantes e modo de conservação das plantas medicinais | 16 |
| I.1.2 Constituintes ativos das plantas medicinais | 17 |
| I.1.3 Atividade biológica dos polissacarídeos..... | 18 |
| I.2 – <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> | 20 |
| I.3 – Órgãos em estudo | 21 |
| I.3.1 Fígado..... | 21 |
| I.3.2 Rim | 22 |
| I.3.3 Testículo e Epidídimo..... | 22 |
| I.4 – Tetracloreto de Carbono e Citocromo P450..... | 23 |
| I.5 – Sistema Imunitário | 23 |
| I.6 – Objetivos | 24 |
| II – MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| II.1 Colheita e preparação de <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> | 25 |
| II.2 Extração dos compostos com etanol | 25 |
| II.3 Extração dos polissacarídeos com água..... | 25 |
| II.4 Análise de açúcares neutros..... | 26 |
| II.5 Análise dos ácidos urônicos..... | 27 |
| II.6 Determinação dos compostos fenólicos..... | 27 |
| II.7 Animais e tratamento | 28 |

| | |
|---|----|
| II.8 Técnica histológica | 29 |
| II.9 Análise bioquímica e hematológica..... | 29 |
| II.10 Análise semi-quantitativa | 30 |
| II.11 Tratamento estatístico | 31 |
| III – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| III.1 Análise química de <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> | 32 |
| III.2 Sobrevivência e comportamento dos animais..... | 35 |
| III.3 Aspeto macroscópico dos órgãos | 35 |
| III.4 Análise da massa dos ratinhos e respectivos órgãos | 35 |
| III.5 Análise histológica | 37 |
| III.5.1 Fígado..... | 37 |
| III.5.2 Baço..... | 41 |
| III.5.3 Rim | 45 |
| III.5.4 Testículo e Epidídimo..... | 48 |
| III.6 Análises bioquímicas | 56 |
| III.7 Análise dos esfregaços sanguíneos | 59 |
| IV – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 63 |
| V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: A – Sapal de Verdemilho (40° 37' 22 N, 8° 39' 40 W) da Ria de Aveiro; B – <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> | 20 |
| Figura 2: Evolução do peso corporal dos ratinhos, dos diferentes grupos, ao longo do tempo de estudo..... | 36 |
| Figura 3: Cortes histológicos de fígado de ratinho (HE 100x e 400x). [A e B] Controlo negativo; [C e D] Controlo positivo. (V) Veia hepática; (N) Necrose centrolobular; (C) Congestão dos vasos; (➡) Extensas hemorragias; (➡) Vacuolização..... | 38 |
| Figura 4: Cortes histológicos de fígado de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (C) Congestão dos vasos; (*) Aglomerado de infiltrado inflamatório; (➡) Leve hemorragia..... | 39 |
| Figura 5: Cortes histológicos de fígado de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl ₄ ; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl ₄ . (N) Necrose centrolobular; (C) Congestão dos vasos; (*) Infiltrado inflamatório; (+) Tumefação hidrópica; (➡) Hemorragia; (➡) Vacuolização | 40 |
| Figura 6: Cortes histológicos de baço de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controlo negativo: Polpas bem definidas, presença de trabéculas e de alguns macrófagos; [C e D] Controlo positivo: Atrofia da polpa branca, hipoplasia das células e infiltrado inflamatório na cápsula. (B) Polpa branca; (R) Polpa vermelha; (➡) Cápsula; (➡) Trabéculas; (➡) Macrófagos; (➡) Dilatação dos espaços sinusóides. | 42 |
| Figura 7: Cortes histológicos de baço de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg: Hiperplasia da polpa branca; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg: Hiperplasia da polpa branca. (➡) Trabéculas; (➡) Macrófagos; (➡) Cápsula | 43 |
| Figura 8: Cortes histológicos de baço de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl ₄ ; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl ₄ . Em ambos os grupos é nítida a hiperplasia moderada da polpa branca e aumento de macrófagos. (➡) Trabéculas; (➡) Macrófagos; (➡) Cápsula..... | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 9: Cortes histológicos de rim de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controlo negativo; [B e C] Controlo positivo. (G) Glomérulo; (N) Necrose tubular; (→) Alteração do glomérulo; (*) Infiltrado inflamatório | 46 |
| Figura 10: Cortes histológicos de rim de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (→) Hemorragia; (*) Infiltrado inflamatório; (G) Alteração glomerular..... | 47 |
| Figura 11: Cortes histológicos de rim de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl ₄ ; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl ₄ . (→) Hemorragia; (N) Necrose tubular; (G) Alteração glomerular; (*) Infiltrado inflamatório | 48 |
| Figura 12: Cortes histológicos de testículo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controlo negativo; [C e D] Controlo positivo. (E) Células germinativas; (S) Lúmen do túbulo seminífero; (→) Células em degenerescência; (→) Vacuolização do epitélio do túbulo; (→) Desorganização do epitélio do túbulo; (*) Espermatozóides..... | 49 |
| Figura 13: Cortes histológicos de testículo de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (→) Vacuolização; (→) Desorganização do epitélio; (→) Células em degenerescência; (→) Células germinativas | 51 |
| Figura 14: Cortes histológicos de testículo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl ₄ ; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl ₄ . (→) Células em degenerescência; (→) Desorganização do epitélio do túbulo seminífero; (→) Vacuolização; (→) Células germinativas no lúmen..... | 52 |
| Figura 15: Cortes histológicos de epidídimo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controlo negativo; [C e D] Controlo positivo. (E) Espermatozóides; (→) Células em degenerescência; (→) Vacuolização do epitélio do túbulo; (→) Células germinativas | 53 |
| Figura 16: Cortes histológicos de epidídimo de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (→) Vacuolização; (→) Células em degenerescência; (→) Células germinativas | 54 |

Figura 17: Cortes histológicos de epidídimo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl₄; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl₄. (➡) Células degeneradas; (→) Vacuolização; (➡) Células germinativas no lúmen do túbulo..... 55

Figura 18: Esfregaço sanguíneo de ratinho, coloração de Wright. [A] Linfócitos (1000x); [B] Neutrófilo (1000x); [C] Células polimórficas (400x). (➡) Linfócito; (➡) Neutrófilo; (→) Célula polimórfica 61

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Critérios para a análise semi-quantitativa das lesões, nos diferentes órgãos em estudo. | 30 |
| Tabela 2: Resultados da análise de açúcares e de compostos fenólicos obtidos do AIR e EE de <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> . | 32 |
| Tabela 3: Resultados obtidos da análise de açúcares no EP e AR de <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> . | 33 |
| Tabela 4: Rácio e análise estatística dos pesos dos órgãos dos diferentes grupos de tratamento. | 37 |
| Tabela 5: Principais lesões observadas no fígado de ratinhos, dos diferentes grupos. | 39 |
| Tabela 6: Principais alterações histopatológicas encontradas no baço de ratinhos, dos diferentes grupos. | 43 |
| Tabela 7: Principais lesões encontradas no rim dos ratinhos, nos diferentes grupos de tratamento. | 45 |
| Tabela 8: Principais alterações histopatológicas observadas no testículo de ratinhos, nos diferentes grupos de tratamento. | 50 |
| Tabela 9: Principais alterações histopatológicas observadas no epidídimo de ratinhos, nos diferentes grupos. | 53 |
| Tabela 10: Resultados obtidos da análise bioquímica efetuada no soro dos ratinhos, nos diferentes grupos de tratamento. | 56 |
| Tabela 11: Análise estatística da determinação de enzimas de função hepática, nos diferentes grupos. | 57 |
| Tabela 12: Contagem diferencial de leucócitos nos diferentes grupos. | 60 |

ABREVIATURAS

AIR: Resíduo insolúvel em álcool

ALT: Alanina aminotransferase

AR: Resíduo obtido da segunda filtração, na segunda extração

AST: Aspartato aminotransferase

CCl₃: Triclorometil

CCl₄: Tetracloreto de carbono

CYP: Enzimas citocromo P450

EE: Extrato etanólico

EP: Filtrado obtido da extração com água

EP1/ EP2: Filtrados obtidos durante a extração com água, na primeira e segunda extração, respetivamente

FALCS: Fosfatase alcalina

GC-FID: Cromatografia em fase gasosa com detetor de Ionização de Chama

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HE: Hematoxilina e Eosina

IgM: Imunoglobulina M

Na₂CO₃: Carbonato dissódico

NaBH₄: Borohidreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH₃: Amónia

I – INTRODUÇÃO

I.1 – Importância das plantas medicinais

A informação disponível sobre as plantas medicinais e, nomeadamente do seu emprego em determinadas doenças, derivam da sua utilização prática. Várias civilizações foram experimentando e selecionando as plantas com maior interesse, transmitindo esses conhecimentos de geração em geração, dando-se assim origem à fitoterapia (Cunha et al. 2006). A partir do século XIX, nos países desenvolvidos, o uso direto das plantas medicinais diminuiu, devido ao isolamento de componentes com atividade farmacológica e com o início da síntese química na obtenção de novas moléculas, embora nos países em desenvolvimento se tenha continuado a recorrer a este tipo de terapia. Contudo, o consumo de medicamentos tem vindo a aumentar em todo o mundo e, por isso, nos últimos anos assiste-se a um crescente interesse pelas plantas medicinais, com o aumento da automedicação com produtos fitoterápicos. Nos anos 60, foram introduzidos novos fármacos, devido ao aumento de informação sobre os componentes ativos e farmacologia dos fármacos vegetais, assim como novas formas farmacêuticas e diferentes tipos de administração, como por exemplo os comprimidos e as cápsulas. Contudo, as infusões, cozimentos e tinturas continuam em uso. O aumento dos ensaios clínicos e o desenvolvimento dos métodos analíticos, garantiu um maior controlo de qualidade destes medicamentos à base das plantas, assim como a sua eficácia e segurança. Contudo, o uso deste tipo de terapêutica requer uma vigilância apropriada. Como tal, existe uma legislação que se adequa aos diferentes medicamentos de origem vegetal, na maioria dos países desenvolvidos, como por exemplo em Singapura (Koh e Woo 2000; Cunha et al. 2006). Tem-se vindo a verificar um grande interesse por esta área da saúde, estando muitas instituições de investigação, como por exemplo universidades, empenhadas na descodificação da constituição e das ações farmacológicas das plantas medicinais.

No entanto, o uso terapêutico das plantas pode provocar diversos efeitos secundários (Koh e Woo 2000), como acontece com a colheita espontânea. Dentro da mesma espécie, nas diferentes estações do ano, nas diferentes regiões, ocorrem variações na constituição da planta, assistindo-se a uma grande variedade química. Desta forma, é de extrema importância a realização de estudos de toxicidade. O uso destas plantas passou a necessitar de critérios de qualidade, segurança e eficácia das mesmas. Assim, evita-se o uso inadvertido de determinadas substâncias e a ocorrência de efeitos adversos (Langmead e Rampton 2001; Cunha et al. 2006; Daniel 2006). Outra forma de controlo consiste no cultivo seletivo, normalizando o mais possível, os componentes ativos

presentes, a sua variabilidade química e ainda a estação em que estes compostos bioativos se encontram em maior quantidade. O material vegetal que se pode utilizar da planta é diverso, desde fragmentos ao pó das mesmas, sumos, tinturas, gomas, extratos, óleos e essências (Cunha et al. 2006). Cada extrato é único nas suas propriedades, podendo mesmo apresentar efeitos diferentes, dependendo dos componentes e ainda do tipo de método utilizado para a extração dos mesmos. Por essa razão, a padronização deste é importante para que os extratos sejam o mais semelhante entre si. Normalmente, é usado sinergicamente com outros medicamentos, para complementar o tratamento, tendo assim efeitos benéficos para a saúde. Contudo, pode conter substâncias desconhecidas, as quais podem conferir alguma toxicidade ao extrato (Beer 2011). Assim, torna-se mais evidente a necessidade da realização dos estudos de toxicidade.

I.1.1 Principais contaminantes e modo de conservação das plantas medicinais

O principal tipo de cultura de plantas medicinais requer, normalmente, o uso de pesticidas e herbicidas em grande escala. Estes, contaminam as plantas conferindo-lhes efeitos tóxicos, a longo ou curto prazo. A localização das plantas também vai condicionar a presença de contaminantes e, muitas vezes, os terrenos encontram-se perto de auto-estradas, locais ricos em metais pesados como o chumbo, cádmio e mercúrio. Microrganismos como a *Escherichia coli*, são outros dos contaminantes que se pode detetar, muitas vezes, estando presentes devido à incorreta secagem das plantas. Desta forma, mantém-se uma grande percentagem de água, o que propicia o desenvolvimento de microrganismos. Tal como os metais pesados, também a carga microbiana deve obedecer a critérios máximos de admissão. Caso contrário, os produtos nos quais se encontram em excesso não podem ser utilizados pelo Homem e animais (Koh e Woo 2000; Cunha et al. 2006).

Após o fármaco estar devidamente preparado, pronto a administrar, é necessário ter em consideração vários fatores, para que este mantenha as suas propriedades terapêuticas inalteradas. Para isso, é necessário respeitar algumas condições principalmente no que diz respeito à temperatura, à exposição à luz, à humidade e o respeito pelo prazo de validade. Estes, quando desrespeitados, alteram a composição dos constituintes do fármaco, podendo dar origem a efeitos adversos (Cunha et al. 2006).

I.1.2 Constituintes ativos das plantas medicinais

Quando ingerimos produtos vegetais não recebemos apenas os nutrientes contidos na planta. Uma grande variedade de outros componentes entra no nosso organismo e, a maioria dos seus efeitos são ainda desconhecidos. Mais uma razão da importância da realização dos estudos de toxicidade neste tipo de plantas (Daniel 2006). Para além dos componentes que fazem parte da sua constituição, as plantas são capazes de produzir metabolitos secundários com o objetivo de se protegerem ou tornarem-se mais resistentes (Cunha et al. 2006; Daniel 2006). São inúmeros os compostos orgânicos presentes num extrato de ervas, usado na medicina tradicional. Encontram-se, por exemplo, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, ácidos gordos, compostos fenólicos, vitaminas e sais minerais. Os mesmos apresentam diferentes ações biológicas como por exemplo, regulação do organismo, atividade antioxidante e antimicrobiana (Daniel 2006).

Os hidratos de carbono (monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos), proteínas e lípidos estão incluídos nos metabolitos primários. Estes são continuamente sintetizados e utilizados pela planta, mas muitos encontram-se armazenados em vários tecidos, podendo por isso também ser considerados metabolitos secundários. Por sua vez, estes últimos dividem-se em três grandes grupos: alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos. Todos estes compostos não estão envolvidos no metabolismo primário das plantas e o seu mecanismo e funções só agora começam a ser compreendidos. Não são considerados resíduos do metabolismo das plantas mas sim produtos originados para manter a funcionalidade e sobrevivência da planta, face às inúmeras adversidades que podem enfrentar. Ou seja, muitos destes metabolitos secundários possuem várias ações e, a proteção da planta contra o ataque de microrganismos é uma delas. Podem ainda funcionar como feromonas, atraindo os vários insetos para que a polinização ocorra. Outros componentes, por exemplo os compostos fenólicos, são descritos como tendo uma grande atividade antioxidante, protegendo os tecidos e membranas celulares da oxidação dos lípidos (Daniel 2006). Tal como a planta usa estes compostos para resistir melhor ao ambiente que a rodeia, também o organismo dos animais/humanos pode adaptar-se a esses mesmos componentes, atuando estes da mesma forma e apresentando as mesmas ações. Estes metabolitos secundários das plantas medicinais têm sido objeto de estudo de diversas investigações, sendo descritas as várias potencialidades biológicas (Daniel 2006). Contudo, os polissacarídeos também possuem atividade benéfica na saúde em geral, estando referidas em várias publicações (Xie et al. 2008; Thakur et al. 2010). Assim sendo, o presente trabalho visa explorar as potencialidades dos polissacarídeos de *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, *in vivo*, com ratinhos.

I.1.3 Atividade biológica dos polissacarídeos

Os polissacarídeos derivados das plantas são um grupo diversificado de polímeros de hidratos de carbono, encontrando-se distribuídos por todos os tecidos vegetais. Estes, sempre de elevado peso molecular, derivam das oses e resultam da condensação destas. O exemplo mais comum de uma ose é a glucose. Estes compostos podem ser constituídos apenas por um tipo de monossacarídeo (polissacarídeos homogéneos), como o caso da celulose e do amido ou, apresentarem uma estrutura mais complexa com diferentes oses ligadas entre si (polissacarídeos heterogéneos) (Harborne e Turner 1984; Mauseth 2003; Cunha et al. 2006). Alguns exemplos são as gomas, as mucilagens e as pectinas. Estas últimas, são polímeros que têm como base ácidos α -galacturónicos associados a arabinanas e a galactanas. Encontram-se, principalmente, na camada média da parede das células vegetais, estando também presentes em elevadas concentrações em frutos por amadurecer. Devido à sua capacidade de reter água e de gelificar rapidamente, são utilizadas como reguladoras do sistema gastrointestinal e na indústria alimentar, como estabilizantes e gelificantes. As suas ações biológicas foram visíveis no controlo da glicemia, da colesterolémia e na prevenção de doenças cardiovasculares (Cunha et al. 2006).

Os polissacarídeos possuem características que os tornam biológica e farmacologicamente ativos. Os seus efeitos são inúmeros estando também associados à supressão do apetite pois, sendo de digestão mais lenta e de aumentarem o volume pela absorção de água, dão a sensação de saciedade. Uma vez que diluem e reduzem o tempo de permanência de substâncias carcinogénicas e diminuem a quantidade de ácidos biliares no intestino, ajudam a prevenir o aparecimento de cancro do cólon e do recto (Cunha et al. 2006). Os polissacarídeos modificam ainda a resposta do organismo face a um processo de inflamação, imunidade e hematopoiese, ativando ou suprimindo a resposta das células do sistema imunitário. Devido à sua ação imunoestimulante (Cunha et al. 2006), são compostos biológicos com propriedades anti-tumorais, anti-virais, anti-fúngicas, anti-parasitárias, anti-bacterianas, entre outras. Diversos estudos relatam que, polissacarídeos de *Salicornia herbacea* e de raízes de *Chlorophytum borivillianum* podem atuar como modificadores da resposta imunitária (Im et al. 2006; Thakur et al. 2010).

Os polissacarídeos extraídos de *Artemisia tripartita*, de *Calophyllum brasiliense*, de *Matayba elaeagnoides* e de outras plantas, apresentaram atividade imunomoduladora, estimulando a produção e a atividade fagocítica de macrófagos, no baço de animais ou de humanos (Xie et al. 2008; Philippi et al. 2010; Ramberg et al. 2010; Holderness et al. 2011). Um outro estudo refere que polissacarídeos extraídos das raízes de *Chlorophytum borivillianum* também possuem efeitos

imunomoduladores, estimulando a atividade das células natural-killer (Thakur et al. 2010). Nas Chenopodiaceae, vários estudos foram realizados com *Salicornia*, género taxonomicamente muito próximo a *Sarcocornia*. Um deles salienta o efeito anti-proliferativo dos polissacarídeos de *Salicornia herbacea* em células cancerígenas humanas (Deok-Seon et al. 2009). Num outro estudo, igualmente com esta espécie, os resultados referem que o efeito imunoestimulador dos polissacarídeos ativou monócitos, em sinergismo com pequenas doses de interferon- γ (Im et al. 2006). A ativação de macrófagos pelos polissacarídeos extraídos de *Salicornia herbacea* foi referida por Lee e colaboradores (2005), referindo-se mais uma vez a estes compostos como agentes imunoestimuladores. Pesquisas efetuadas com outras plantas, incluindo algumas da família Chenopodiaceae, revelaram um efeito anti-viral moderado, contra o *Herpes simplex*, nomeadamente *Arthrocnemum indicum*, *Atriplex inflata* e ainda *Salicornia europaea* var. *fruticosa* (Sassi et al. 2008). Estudos com *Atriplex confertifolia* demonstraram que os extratos obtidos provocaram morte de células cancerígenas, verificando-se uma atividade seletiva destes compostos para células cancerígenas, nomeadamente no cancro da mama e do colo do útero (Capua et al. 2010). Para além do efeito imunomodulador, já foi relatado que polissacarídeos sulfatados, extraídos de *Sargassum wightii*, demonstraram proteção hepática (Josephine et al. 2008). Um outro estudo descrito por Kadarian e colaboradores (2002) refere que extratos de polissacarídeos de *Achyrocline satureioides* administrados a ratinhos, após lesão causada por bromobenzeno, têm um efeito auto-regenerador do fígado. *Beta vulgaris* var. *cicla* (Chenopodiaceae) apresenta efeito hepatoprotetor em ratinhos com diabetes mellitus (Ozsoy-Sacan et al. 2004). O sinergismo entre vários componentes de diferentes plantas pode, muitas vezes, ser mais eficaz do que o uso de uma planta isolada. Said e colaboradores (2007) tentaram provar este facto, demonstrando que *Juglans regia*, *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae), *Olea europaea* e *Urtica dioica*, podem ser administradas em conjunto, com segurança, atuando de forma diferente, mas sinérgica, na regulação da homeostase da glucose. Uma outra publicação, faz referência à atividade antioxidante dos polissacarídeos provenientes da parede celular das plantas, sugerindo que o uso destes compostos na dieta humana pode ser benéfico, atuando como agente de anti-peroxidação dos lípidos, proteção contra úlceras e outros efeitos benéficos (Pristov et al. 2011).

Contudo, os polissacarídeos possuem algumas reações adversas e alguma interação com outros medicamentos. Podem causar dores abdominais, náuseas e flatulência pois são compostos que, aquando da ação das bactérias, dão origem a produtos gasosos, podendo ainda complexarem-se a alguns minerais (zinco, ferro e cálcio) e vitaminas (C e B₁₂). A ação de todos os medicamentos

de absorção intestinal fica comprometida pelos polissacarídeos heterogêneos, pois estes últimos retardam a sua absorção (Cunha et al. 2006).

I.2 – *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*

S. perennis (Miller) A. J. subsp. *perennis* (figura 1), pertencente à família Chenopodiaceae, é um subarbusto até 20 cm de estatura, ramificado e prostrado-radicante. Os caules, na parte inferior são lenhosos, e nas porções mais apicais carnudos-articulados e ereto-ascendentes. As folhas são opostas, reduzidas a escamas hialinas, soldadas entre si e com o caule com o qual formam um artículo carnudo. As inflorescências, em forma de espiga com 2,5-4,5 mm de diâmetro, são constituídas por três flores hermafroditas que frutificam entre agosto a novembro. As flores apresentam perianto carnudo, esponjoso na frutificação. O fruto é um aquénio com semente parda a qual possui pelos curtos e gancheados. Encontra-se em salgadiços, sapais e margens das salinas, zonas banhadas pela água do mar, até 10 m de altitude. Distribui-se pela Europa e região mediterrânica.

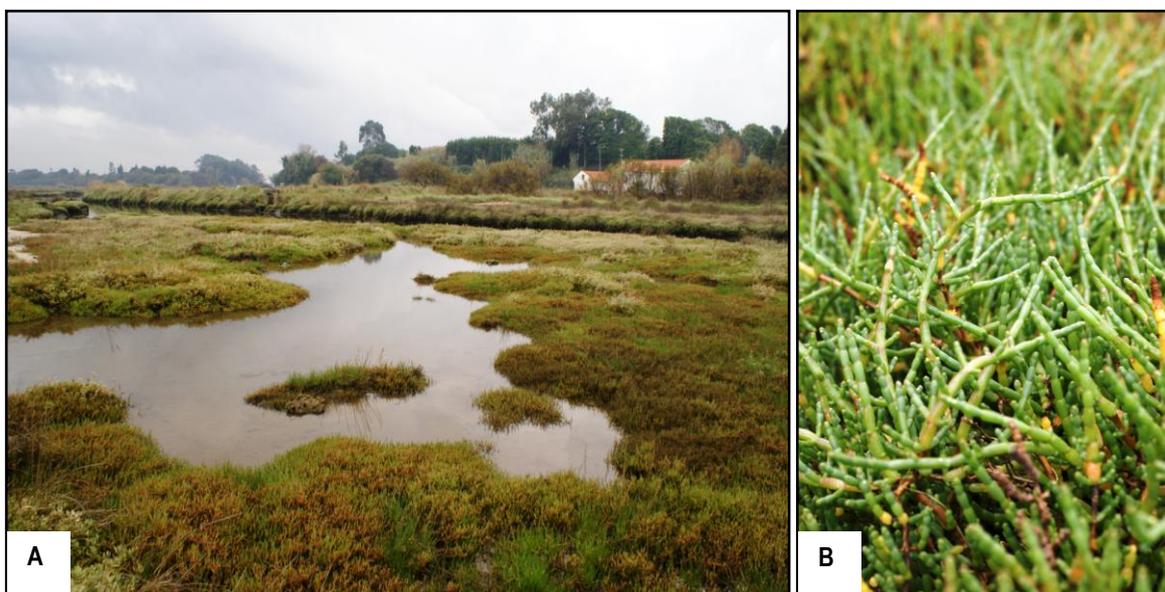


Figura 1: A – Sapal de Verdemilho (40° 37' 22 N, 8° 39' 40 W) da Ria de Aveiro; B – *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*.

Pelo facto de não existirem, na literatura disponível, referências sobre a atividade biológica de *S. perennis* subsp. *perennis*, e também por ser um dos taxa com mais representatividade nas zonas salgadas da Ria de Aveiro (Figura 1 A), motivou a escolha desta planta para a realização do presente trabalho. Pretende-se ainda dar continuidade a trabalhos anteriores, realizados no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, no âmbito das potencialidades medicinais de plantas características da flora da Ria de Aveiro, usando estudos *in vivo* com ratinhos (Oliveira 2009; Silva 2009; Lopes 2010; Rodrigues et al. 2011).

I.3 – Órgãos em estudo

No Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro têm sido realizados estudos sobre as potencialidades de algumas plantas como por exemplo, *Inula crithmoides* e *Cichorium intybus* em estudos *in vivo* com ratinhos, visando o seu efeito em vários órgãos (fígado, baço, rim, testículo e epidídimo) (Oliveira 2009; Lopes 2010), com injeção prévia ou após agressão com CCl₄. Nesta sequência, o presente trabalho, pretendeu analisar diversos órgãos do ratinho que a seguir se apresenta.

I.3.1 Fígado

As principais funções do fígado são atribuídas às unidades estruturais, os hepatócitos, sendo elas 1) armazenamento e metabolismo de hidratos de carbono; 2) metabolismo de hormonas, detritos endógenos, substâncias tóxicas e de lípidos; 3) síntese de algumas proteínas séricas e fatores de coagulação e ainda, a 4) formação de ureia e bÍlis (Haschek e Rousseaux 1998; Roberts et al. 2000). Localiza-se estrategicamente no sistema circulatório, tendo a capacidade de processar e armazenar os nutrientes absorvidos durante a digestão, sendo posteriormente distribuídos pelos restantes órgãos. O fígado neutraliza e elimina as substâncias tóxicas através de um processo de biotransformação (fase I e fase II), no qual reduz a atividade da maioria dos compostos endógenos e xenobióticos, preparando-os, desta forma, para a sua eliminação na bÍlis. Contudo, o mesmo mecanismo usado na inativação e eliminação de tóxicos pode dar origem a substâncias ainda mais reativas (Haschek e Rousseaux 1998). O solvente orgânico tetracloreto de carbono (CCl₄), o paracetamol e o bromobenzeno são exemplos característicos (Roberts et al. 2000; Leblanc 2004).

Assim sendo, a análise histológica e funcional deste órgão é indispensável em estudos de toxicidade, e o presente trabalho não é exceção.

I.3.2 Rim

As funções descritas para os rins são inúmeras, sendo 1) a regulação da homeostase do meio interno, através do controlo do volume do fluido extracelular, assim como do balanço de eletrólitos; 2) a excreção na urina, de resíduos produzidos aquando do metabolismo de substâncias endógenas ou de xenobióticos, após a filtração do sangue, e ainda 3) a síntese de algumas hormonas (Haschek e Rousseaux 1998; Middendorf e Williams 2000; Hodgson e Levi 2004; Junqueira e Carneiro 2010). A quantidade de sangue presente é elevada e, o aumento da concentração dos resíduos, devido à absorção de água nos túbulos renais, expõem uma grande superfície do rim aos tóxicos circulantes no sangue, fazendo deste um órgão muito vulnerável (Hodgson e Levi 2004). É essencial ao bom funcionamento de todo o organismo, sendo esta a razão pela qual é importante a existência de estudos de toxicidade neste órgão. O tetracloreto de carbono é dos tóxicos conhecidos que mais afeta o rim, nomeadamente os glomérulos e os túbulos proximais (Haschek e Rousseaux 1998; Hodgson e Levi 2004).

I.3.3 Testículo e Epidídimo

Os testículos possuem função dupla: sintetizar hormonas e formar espermatozóides. Este órgão possui a barreira hemato-testicular, com o objetivo de proteger as células germinativas de eventuais agentes nocivos presentes no sangue (Haschek e Rousseaux 1998; DeMott e Borgert 2000; Junqueira e Carneiro 2010). Os espermatozóides são libertados para o lúmen do túbulo seminífero e posteriormente transportados para o epidídimo. Este tem como principal função armazenar os gâmetas masculinos, onde terminam a sua maturação até serem libertados. O seu epitélio tem ainda o papel de absorver e digerir os corpos residuais resultantes da espermatogénese (Haschek e Rousseaux 1998; Junqueira e Carneiro 2010). Estes órgãos reprodutores são muito vulneráveis a tóxicos. Apesar da presença de uma barreira hemato-testicular, alguns xenobióticos conseguem transpô-la. Deste modo, afetam ambos os órgãos, desenvolvendo-se várias alterações que podem comprometer a função destes, principalmente a espermatogénese. Por outro lado, a proliferação celular no testículo é um processo contínuo, expondo a tóxicos, moléculas delicadas como o ADN (Haschek e Rousseaux 1998; DeMott e Borgert 2000). Assim, um estudo de toxicidade

nestes é, igualmente, de extrema importância, uma vez que se trata de órgãos com funções relevantes, nomeadamente a reprodução das espécies.

I.4 – Tetracloreto de Carbono e Citocromo P450

Muitos hepatotóxicos são capazes de provocar lesões degenerativas irreversíveis. O tipo de tóxico, a duração e o modo da exposição, assim como fatores fisiológicos dos indivíduos afetados, determinam o grau e o tipo de alterações (Roberts et al. 2000). Um dos xenobióticos mais usados nos testes de toxicidade é o CCl_4 , razão pela qual se utilizou no presente estudo. É um hidrocarboneto halogenado alifático e metabolizado principalmente no fígado, onde sofre uma biotransformação (fase I e II) pela ação das enzimas de citocromo P450 (CYP). Deste processo obtém-se um radical livre, o triclorometil ($\text{CCl}_3\cdot$), um composto muito reativo. Assim, a zona centrolobular, região onde é metabolizado, corresponde à mais afetada. No túbulo proximal do rim, a concentração destas enzimas é muito menor. No entanto, apresenta ação elevada (Roberts et al. 2000; Hodgson e Levi 2004; Rose e Hodgson 2004; Ismail et al. 2009).

I.5 – Sistema imunitário

A principal função do sistema imunitário é a defesa do organismo contra a invasão de microrganismos patogénicos ou substâncias estranhas. Mas, é também importante na regulação e manutenção do meio interno através, por exemplo, do reconhecimento e eliminação de células malignas. Os leucócitos intervêm no sistema imunitário, sendo os linfócitos envolvidos numa resposta imune mais específica. Estes têm origem em células-tronco pluripotentes e, posteriormente, sofrem diferenciação e maturação em células B e células T. A sua formação ocorre na medula óssea (linha linfocítica). Após a agressão de xenobióticos esta pode sofrer lesões, podendo mesmo ocorrer uma supressão (Roberts e Adams 2000). Desta forma, a sua função está comprometida, podendo verificar-se a perda de controlo da proliferação dos leucócitos, dando origem a leucemias ou linfomas, assim como das outras linhas germinativas (Budinsky 2000).

A interação dos compostos tóxicos com o sistema imunitário pode provocar efeitos adversos, podendo estes ser manifestados por 1) uma reação de hipersensibilidade; 2)

imunossupressão e ainda 3) autoimunidade. O sistema imunitário é complexo, dado que requer a interação de vários tipos de células e de órgãos e a ação de xenobióticos neste, pode levar à perda da sua capacidade de resposta (Roberts e Adams 2000). Assim, o desenvolvimento de estudos de toxicidade são de extrema importância, dado que o sistema imunitário é essencial para o bom funcionamento de todo o organismo e para garantir que este se encontra saudável (Selgrade 2004).

O baço é um dos órgãos que intervêm no sistema imunitário. Nele estão presentes células da linhagem linfóide, que possuem funções imunológicas para o sistema circulatório e fazem parte da primeira barreira de defesa contra microrganismos que penetram no sangue periférico. A polpa branca é o principal local de síntese de linfócitos e de células dendríticas, que retêm e processam os inúmeros antígenos provenientes do sangue circulante, e ainda produção de anticorpos, principalmente IgM. Neste órgão ocorre filtração do sangue onde, pela ação fagocítica dos macrófagos, ocorre a separação e eliminação de eritrócitos senescentes e danificados. Com a predominância de macrófagos com elevada atividade fagocítica, o baço tem um papel fundamental na defesa rápida do organismo, sendo o precursor da resposta imunitária (Haschek e Rousseaux 1998; Junqueira e Carneiro 2010). Como tal, a análise histológica deste órgão é também indispensável para o estudo do efeito imunoestimulador dos polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* (Budinsky 2000).

I.6 – Objetivos

Este trabalho experimental teve como principais objetivos os seguintes:

- 1- Determinar a composição química de *S. perennis* subsp. *perennis* a partir de extratos;
- 2- Avaliar o efeito dos componentes do extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* em órgãos (fígado, baço, rim, testículo e epidídimo) e sistema imunitário dos ratinhos;
- 3- Avaliar eventuais efeitos protetores do extrato de polissacarídeos nos referidos órgãos, e no sistema imunitário, quando sujeitos a agressão por CCl₄.
- 4- Explorar as potencialidades dos polissacarídeos em *S. perennis* subsp. *perennis*, *in vivo*, com ratinhos.

II – MATERIAL E MÉTODOS

II.1 Colheita e preparação de *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*

Porções aéreas de *S. perennis* subsp. *perennis*, na fase vegetativa, foram colhidas no dia 17 de Janeiro de 2011 no sapal de Verdemilho (40° 37' 22 N, 8° 39' 40 W) da Ria de Aveiro. Após a colheita, procedeu-se à separação dos segmentos carnudos dos caules, os quais foram lavados em água corrente com uma última passagem em água destilada.

Procedeu-se à avaliação da composição de *S. perennis* subsp. *perennis*, efetuando-se assim a análise dos açúcares neutros, dos ácidos urónicos e dos compostos fenólicos, no Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

II.2 Extração dos compostos com etanol

Foi preparado o resíduo insolúvel em álcool (AIR) a partir dos segmentos carnudos do caule. Desta forma, foram macerados cerca de 900 g, com o auxílio de um triturador, e posteriormente submetidos a uma extração com etanol. Para tal, adicionou-se à amostra etanol quente (5x o volume de amostra) e aqueceu-se a amostra deixando-a ferver durante 10 min. Após arrefecimento, efetuou-se a filtração da mesma com um pano de nylon. Obtiveram-se duas frações, o filtrado (extrato etanólico, EE) que foi submetido a uma concentração num evaporador rotativo (Rotavapor R-114, Buchi conjugado com o banho Waterbath B-4800), e o AIR. Ambas foram liofilizadas e posteriormente analisadas. Para o estudo em causa, foi usado o resíduo insolúvel em álcool.

II.3 Extração dos polissacarídeos com água

Realizada a análise de açúcares e de ácidos urónicos no AIR, procedeu-se a uma extração com água quente em refluxo (para cada 35 g de amostra foram adicionados 2 L de água destilada), ficando em ebulição durante 2 h. Decorrido esse tempo procedeu-se à filtração por vácuo com um filtro de placa porosa G3, e repetiu-se o passo anterior para o resíduo obtido desta filtração (AR).

Os filtrados do processo de purificação (EP) sofreram ainda uma concentração, num evaporador rotativo (Rotavapor R-114, Buchi conjugado com o banho Waterbath B-4800). Seguiu-se

a liofilização no equipamento adequado (Virtis Benchtopk), durante 7 dias. A análise dos açúcares neutros e dos ácidos urônicos foi efetuada nas amostras liofilizadas. Trataram-se as duas extrações purificadas (EP1 e EP2) como se fossem amostras independentes apenas para a realização da análise química. Contudo, efetuou-se a mistura de ambas as porções para a administração aos ratinhos, ficando armazenadas num exsiccador com sílica gel.

II.4 Análise de açúcares neutros

A análise de açúcares neutros foi efetuada no EE e no AIR e, posteriormente no resíduo (AR) e no EP1 e EP2, seguindo-se o protocolo descrito na literatura (Selvendran et al. 1979; Coimbra et al. 1996). Pesou-se entre 2 a 3 mg, em triplicado, e procedeu-se à hidrólise (Selvendran et al. 1979). Às amostras AIR e AR adicionou-se 200 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 72% e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 3 h e agitou-se algumas vezes, adicionando-se depois 2,2 mL de água destilada. Nas restantes frações (EE e EP1 e EP2) colocou-se 200 μL de H_2SO_4 a 72% e, logo de seguida, 2,2 mL de água destilada. Colocaram-se todas as amostras a 100°C durante 2,5 h. Mas, após uma hora, colocaram-se os tubos num banho de água e retirou-se 0,5 mL de hidrolisado para a análise de ácidos urónicos.

Arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e seguiu-se para a fase de redução e acetilação (Coimbra et al. 1996). Adicionou-se 200 μL de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL) e transferiu-se 1,0 mL para novos tubos, neutralizando-se com 200 μL de NH_3 a 25%. Para a reação de redução, adicionou-se 100 μL de NaBH_4 (15% (m/v) em NH_3 3M, solução preparada imediatamente antes da adição) e colocou-se a 30°C durante 1 h. Arrefeceu-se num banho de gelo e adicionou-se 2 x 50 μL de ácido acético glacial. Transferiu-se 300 μL para tubos SOVIREL e, ainda no banho de gelo, adicionou-se 450 μL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, agitou-se muito bem e colocou-se a incubar num bloco de aquecimento a 30°C durante 30 min. Adicionou-se 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, tendo o cuidado de o fazer no banho de gelo e de se agitar muito bem sem a utilização do vórtex. Centrifugou-se cerca de 30 s a 3000 rpm, obtendo-se a separação de duas fases: a fase orgânica e a aquosa (extração líquido-líquido). Esta última, foi aspirada por sucção com o auxílio de um sistema de vácuo de água e uma pipeta de Pasteur. Este passo foi repetido mais uma vez. Procedeu-se à dupla lavagem da fase orgânica, com mais 3 mL de água destilada, agitou-se, centrifugou-se e retirou-se totalmente a fase aquosa. Na última lavagem, certificou-se de que se retirou toda a água existente no tubo.

Transferiu-se a fase orgânica para tubos apropriados para o evaporador centrífugo (UNVAPO 100H) com vista à evaporação do diclorometano. Adicionou-se 1mL de acetona anidra e evaporou-se no evaporador centrífugo, sendo este passo repetido mais uma vez. Finalmente, procedeu-se à análise por cromatografia em fase gasosa (GC-FID). Para esse efeito, dissolveu-se os acetatos de alditol, provenientes da amostra, em 50 µL de acetona anidra e analisou-se por CG-FID, usando uma coluna capilar DB-225 no Cromatógrafo Perkin Elmer – Claus 400 (CR1).

II.5 Análise dos ácidos urónicos

A análise de ácidos urónicos foi efetuada no AIR, no EE, no AR, no EP1 e EP2, com base na literatura existente (Selvendran et al. 1979; Coimbra et al. 1996). A parte inicial desta análise foi realizada em simultâneo com a análise de açúcares neutros retirando-se, após uma hora de hidrólise, 0,5 mL de hidrolisado. Diluiu-se com 3 mL de água destilada e retirou-se 0,5 mL, fazendo-se 3 réplicas de cada amostra, colocou-se num banho de gelo e adicionou-se 3 mL de borato de sódio 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se muito bem, tapou-se e colocou-se num banho a 100°C durante 10 min. Decorrido o tempo, deixou-se arrefecer num banho de gelo e, no escuro, adicionou-se 100 µL de *m*-fenilfenol [0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH] em 2 dos 3 tubos, tanto nas amostras como nos padrões. Foi necessário efetuar uma curva de calibração com padrões de ácido galacturónico (200 µg/mL), com concentrações compreendidas entre 0 e 80 µg/mL. Agitou-se e colocou-se no escuro deixando-se reagir durante 30 min. Procedeu-se à leitura das absorvâncias, a um comprimento de onda de 520 nm, no espectrofotómetro (Spectrophotometer 6405 UV/VIS, JenWay).

II.6 Determinação dos Compostos Fenólicos

A determinação dos compostos fenólicos foi baseada no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu 1927). Preparou-se uma solução do EE e uma suspensão do AIR, das quais uma porção foi dissolvida em água destilada perfazendo uma concentração de 1 mg/mL. Dessa solução, retirou-se 0,125 mL, adicionou-se 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Homogeneizou-se no vórtex e reagiu durante 5 min. Decorrido o tempo, adicionou-se 1,125 mL de Na₂CO₃ (75 g/L) e 1,0 mL de água destilada. Agitou-se novamente no vórtex e ficou a reagir durante 90 min à temperatura ambiente.

Foi necessário preparar uma curva de calibração, usando o ácido gálico como padrão. Prepararam-se várias soluções-padrão compreendidas entre 12,7 e 101,8 mg/L. Por fim, procedeu-se à leitura das absorvâncias num comprimento de onda de 760 nm de todas as amostras e respetivas soluções-padrão, cada uma com 3 réplicas, no espectrofotómetro (Spectrophotometer 6405 UV/VIS, JenWay).

II.7 Animais e tratamento

Foram usados 30 ratinhos machos da estirpe ICR-CD1, com cerca de 2 semanas, com pesos compreendidos entre os 28-35 g, adquiridos ao Laboratório Harlan (Espanha). Até ao início da experiência, estiveram em ambientação durante 5 dias e mantiveram-se em gaiolas de polietileno, no biotério do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, sob condições ambientais *standard* com uma temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo luz/escuridão de 12/12 h e ainda humidade relativa 40 – 60%, em conformidade com as diretivas comunitárias respeitantes ao acondicionamento temporário de pequenos mamíferos (Decreto-Lei n.º 129/92, de 23 de Outubro). Formaram-se 6 grupos cada um com 5 elementos:

Grupo I: Controlo negativo (água via oral)

Grupo II: Controlo positivo (administração de CCl_4 no dia anterior ao sacrifício, por injeção subcutânea)

Grupo III: Extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* 400 mg/kg (via oral)

Grupo IV: Extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* 800 mg/kg (via oral)

Grupo V: Extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* 400 mg/kg + CCl_4 (via oral, injeção subcutânea de CCl_4)

Grupo VI: Extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* 800 mg/kg + CCl_4 (via oral, injeção subcutânea de CCl_4)

No início do estudo, procedeu-se à pesagem dos ratinhos, e efetuaram-se várias pesagens ao longo do ensaio, com intervalos de 4 a 5 dias, até ao dia do sacrifício. Tiveram acesso à água e alimento *ad libitum*, mas nos grupos de tratamento, o extrato foi administrado oralmente, dissolvido na água. O estudo durou 30 dias, e no dia anterior ao sacrifício administrou-se CCl_4 (0,5 mg/kg/0,25 mL), utilizando azeite como veículo, nos Grupos II, V e VI. A dosagem e o tempo de duração do ensaio foram baseados na literatura existente (Selgrade 2004; Ramberg et al. 2010).

O sacrifício dos animais foi efetuado através da deslocação da cervical e, posteriormente, efetuou-se a colheita dos seguintes tecidos e órgãos (sangue, fígado, rins, baço, testículo e

epidídimo) para estudos histológicos, bioquímicos e hematológicos. Procedeu-se ainda à determinação do peso desses órgãos e à análise macroscópica dos mesmos.

II.8 Técnica histológica

Os fragmentos recolhidos foram colocados em frascos contendo os fixadores (formol para fígado, baço e rim esquerdo; solução de Bouin para os testículo esquerdo e epidídimo esquerdo). O tempo de fixação em solução de Bouin e formol foi de 24 h, seguindo-se a etapa de desidratação numa série crescente de álcoois (etanol a 70, etanol a 90, etanol a 100, etanol a 100 e Benzol). Seguiu-se a impregnação e inclusão dos órgãos em parafina (ponto de fusão 56-58°C).

Efetuaram-se os cortes dos diferentes órgãos, utilizando o micrótomo Leitz 1512, com espessura de 4 µm, nos quais se procedeu à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), desidratação e posterior montagem em meio Eukit®, para a observação ao microscópio óptico (Olympus Bx41, com máquina fotográfica incorporada). Foram registadas as imagens mais representativas de cada um dos órgãos dos diferentes grupos.

II.9 Análise bioquímica e hematológica

Procedeu-se à colheita de sangue dos ratinhos para a determinação de enzimas hepáticas, nomeadamente as transaminases (AST: aspartato aminotransferase e ALT: alanina aminotransferase) e ainda a fosfatase alcalina (FALCS). As amostras de sangue foram posteriormente centrifugadas (centrífuga Hettich Zentrifugen Rotina) 35 a 3000 rpm durante 10 min. Colheu-se o sobrenadante para células de plástico, com vista às subseqüentes análises bioquímicas. A realização destas foi feita em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas AVELAB, utilizando equipamento adequado (Olympus AU2700). Os resultados foram expressos em U/L.

Efetuu-se ainda um esfregaço sanguíneo, corado pela técnica de Wright, e foram analisados 10 campos aleatoriamente, na zona do corpo do esfregaço e numa objetiva de 400x, procedendo-se à contagem diferencial dos leucócitos observados nesses campos.

II.10 Análise semi-quantitativa

Procedeu-se a uma análise semi-quantitativa das alterações histológicas nos diferentes órgãos, dos diferentes grupos, tendo como base a literatura existente (Carvalho et al. 2002). A codificação para cada um dos símbolos nos diferentes órgãos e grupos está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Critérios para a análise semi-quantitativa das lesões, nos diferentes órgãos em estudo.

| <u>Órgãos/ Alterações Histopatológicas</u> | <u>Critérios da análise semi-quantitativa</u> |
|--|--|
| Fígado | |
| Necrose Centrolobular | (-) Ausência; (+++) Necrose centrolobular extensa, afetando todos os lóbulos |
| Congestão dos vasos | (-) Ausência; (+) Apenas em alguns vasos; (++) Na maioria dos vasos |
| Hemorragia | (-) Ausência; (+) Leve Hemorragia; (++) Hemorragia; (+++) Hemorragia extensa |
| Vacuolização | (-) Ausência; (+) Vacuolização moderada; (++) Vacuolização em todo o parênquima |
| Tumefação Hidrópica | (-) Ausência; (+) Afeta entre 25 a 75% dos cortes; (++) Afeta mais de 75% dos cortes |
| Infiltrado inflamatório | (-) Ausência; (+) Leve infiltrado inflamatório; (++) Infiltrado inflamatório moderado |
| Baço | |
| Hiperplasia da polpa branca | (-) Ausência; (+) Leve Hiperplasia; (++) Hiperplasia moderada |
| Hipoplasia das polpas | (-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo |
| Dilatação do espaço sinusóide | (-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo |
| Ausência de trabéculas e de macrófagos | (-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo |
| Infiltrado inflamatório na cápsula | (-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo |
| Aumento de macrófagos | (-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo |
| Rim | |
| Necrose dos Túbulos | (-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo |
| Hemorragia | (-) Ausência; (+) Hemorragia moderada; (++) Hemorragia extensa |
| Infiltrado inflamatório | (-) Ausência; (+) Infiltrado inflamatório Leve; (++) Infiltrado inflamatório moderado |
| Alterações no glomérulo | (-) Ausência; (+) Afeta entre 25 a 75% dos cortes; (++) Afeta mais de 75% dos cortes |
| Testículo | |
| Presença de células em degenerescência | (-) Ausência; (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maior parte os túbulos |
| Presença de células germinativas no lúmen | (-) Ausência; (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maioria dos túbulos |
| Vacuolização dos túbulos | (-) Ausência; (+) Afeta menos de 25% dos túbulos; (++) Afeta entre 25 a 75% dos túbulos; (+++) Afeta mais de 75% dos túbulos |
| Alterações heterogêneas | (X) Alterações apresentaram-se divididas por toda a lâmina |
| Epidídimo | |
| Presença de células em degenerescência | (-) Ausência; (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maior parte os túbulos |
| Presença de células germinativas | (-) Ausência; (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maioria dos túbulos |
| Vacuolização | (-) Ausência; (+) Afeta menos de 25% dos túbulos; (++) Afeta entre 25 a 75% dos túbulos; (+++) Afeta mais de 75% dos túbulos |
| Alterações heterogêneas | (X) Alterações apresentaram-se divididas por toda a lâmina |

II.11 Tratamento Estatístico

Os dados foram tratados com o programa SPSS, submetendo-os ao teste Mann-Whitney para a comparação dos vários parâmetros entre os diferentes grupos. Os dados foram apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão, para o número de animais referido para cada determinação. Estabeleceu-se como nível de significância $p \leq 0,05$.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 Análise química de *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*

Os polissacarídeos possuem uma estrutura complexa, devido ao facto de as suas subunidades, os monossacarídeos, apresentarem a capacidade de se interligarem através de uma ligação éter, combinando-se de várias formas (Harborne e Turner 1984; Mauseth 2003). Alguma da informação sobre o tipo de polissacarídeos pode ser obtida através da determinação da composição dos açúcares, pela ação da hidrólise de uma amostra rica em vários polímeros, como por exemplo a parede celular das plantas (Mauseth 2003), após uma extração com etanol quente (Harborne e Turner 1984).

Os valores obtidos da análise de açúcares neutros, de ácidos urónicos e de compostos fenólicos, nas duas frações obtidas da extração com etanol (EE e AIR), encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da análise de açúcares e de compostos fenólicos obtidos do AIR e EE de *S. perennis* subsp. *perennis*.

| Concentração (mg/g) | AIR | EE |
|------------------------|---------------|----------------|
| Ramnose | 7,80 ± 0,27 | 0,95 ± 1,64 |
| Fucose | 1,85 ± 0,12 | - |
| Arabinose | 123,13 ± 6,29 | 0,69 ± 1,19 |
| Xilose | 19,25 ± 0,65 | 0,25 ± 0,44 |
| Manose | 3,37 ± 3,89 | 5,99 ± 5,36 |
| Galactose | 35,31 ± 0,17 | 1,88 ± 3,25 |
| Glucose não celulósica | 89,80 ± 3,89 | 104,39 ± 7,06 |
| Glucose celulósica | 68,05 ± 2,44 | |
| Ácidos urónicos | 322,03 ± 3,51 | 2,82 ± 4,88 |
| Total de açúcares | 670,58 ± 1,35 | 116,97 ± 12,04 |
| Compostos fenólicos | 8,90 ± 1,04 | 24,30 ± 2,43 |

Valores apresentados como média ± desvio-padrão; (-) Ausência

Pela Tabela 2, verificou-se uma grande quantidade e variedade de açúcares no AIR, principalmente de ácidos urónicos (322,03 ± 3,51 mg/g) e de arabinose (123,13 ± 6,29 mg/g), alguns dos componentes dos polissacarídeos pécnicos (Caffall e Mohnen 2009).

Ao AIR foi adicionado o H_2SO_4 a 72% e deixou-se incubar durante 3 h. A água destilada foi colocada posteriormente (Selvendran et al. 1979), para que fosse possível distinguir a glucose celulósica da não celulósica. Entende-se como glucose celulósica o monossacarídeo que faz parte da constituição da celulose. Esta última é um polissacarídeo de estrutura fibrosa presente na parede celular das plantas, responsável pela sua rigidez (Harborne e Turner 1984; Mauseth 2003; Nguema-Ona et al. 2006). A glucose não celulósica provém de outros polissacarídeos menos resistentes, como por exemplo o amido. Este é composto exclusivamente por monossacarídeos de glucose, assim como a celulose, sendo a principal fonte de energia das plantas (Harborne e Turner 1984; Mauseth 2003). Assim, verificou-se a presença de ambas, sendo que a glucose não celulósica se encontrava ligeiramente mais elevada ($89,80 \pm 3,89$ mg/g). No EE não fez sentido proceder a essa distinção uma vez que, a celulose sendo um polímero insolúvel não se dissolve em etanol (Graff et al. 2009). Desta forma, a elevada concentração de glucose ($104,39 \pm 7,06$ mg/g) encontrada pode ser explicada quer pela presença na forma livre, quer também ligada a compostos fenólicos e, desta forma, os glicoconjugados tenham ficado dissolvidos no etanol aquando da extração (Harborne e Turner 1984).

Verificou-se que o EE continha mais compostos fenólicos (Tabela 2) uma vez que estes são bastante solúveis em álcool, tendo-se observado apenas vestígios destes componentes no AIR. Na Tabela 2 confirma-se, que a maior percentagem de açúcares está presente no AIR, embora cerca de 20% da constituição de *S. perennis* subsp. *perennis*, ficou por determinar.

Através da extração com água do resíduo insolúvel em álcool pretendia-se garantir uma maior pureza em polissacarídeos na amostra a administrar aos ratinhos, e como tal foi necessário proceder a nova determinação dos açúcares das frações obtidas, o EP e o AR. Na Tabela 3 encontram-se os resultados da análise de açúcares neutros e ácidos urónicos.

Tabela 3: Resultados obtidos da análise de açúcares no EP e AR de *S. perennis* subsp. *perennis*.

| Concentração (mg/g) | EP1 | EP2 | AR |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Ramnose | $8,87 \pm 0,59$ | $7,96 \pm 1,18$ | $7,07 \pm 0,60$ |
| Fucose | $1,50 \pm 0,48$ | $1,41 \pm 0,14$ | $2,57 \pm 0,19$ |
| Arabinose | $54,62 \pm 1,95$ | $93,95 \pm 11,94$ | $207,43 \pm 10,89$ |
| Xilose | $6,66 \pm 0,09$ | $7,39 \pm 0,87$ | $37,54 \pm 12,02$ |
| Manose | $15,64 \pm 0,74$ | $8,83 \pm 1,72$ | $8,71 \pm 0,81$ |
| Galactose | $36,19 \pm 0,83$ | $26,49 \pm 4,28$ | $60,53 \pm 3,93$ |
| Glucose não celulósica | $146,24 \pm 3,77$ | $104,99 \pm$ | $47,28 \pm 51,24$ |
| Glucose celulósica | | $23,65$ | $85,63 \pm 11,52$ |
| Ácidos urónicos | $682,25 \pm 126,45$ | $612,17 \pm 33,29$ | $256,67 \pm 13,79$ |
| Total de açúcares | $951,98 \pm 133,94$ | $863,21 \pm 77,09$ | $713,43 \pm 79,34$ |

Valores apresentados como média \pm desvio-padrão

Pelos valores obtidos (Tabela 3) verificou-se que a concentração da maior parte dos açúcares na segunda extração (EP2) sofreu uma ligeira diminuição, à exceção da arabinose ($54,62 \pm 1,95$ mg/g no EP1 e $93,95 \pm 11,94$ mg/g no EP2). O aumento verificado pode dever-se ao facto de ocorrer uma maior dissolução de polissacarídeos de maior peso molecular e muito ramificados, sendo a arabinose um dos principais monossacarídeos que formam as ligações das ramificações dos polissacarídeos pécticos. A presença deste açúcar deve-se ainda à hidrólise de alguns polissacarídeos, por norma encontrados nas plantas, como por exemplo, as glucoronoarabinosilanas, de onde também tem origem a xilose e os ácidos urónicos (Harborne e Turner 1984; Xie et al. 2008).

Verificou-se uma grande concentração de ácidos urónicos (Tabela 3), sendo explicada pelo facto de esses açúcares terem ainda origem nos polissacarídeos pécticos. Estes últimos, são polímeros abundantes no reino vegetal, dado que fazem parte da lamela média das paredes celulares (Pérez et al. 2003). Como estes compostos são facilmente extraídos com água, os extratos EP1 e EP2 foram enriquecidos nestes polissacarídeos pécticos ($682,25 \pm 126,45$ mg/g no EP1, $612,17 \pm 33,29$ mg/g no EP2 e, por fim $256,67 \pm 13,80$ mg/g no AR) (Harborne e Turner 1984). A porção EP apresentava-se praticamente pura. Contudo, podiam estar ainda presentes outros constituintes do AIR, como os vestígios de compostos fenólicos (Tabela 2). Os compostos que não foram quantificados, nomeadamente sais minerais, como por exemplo o cloreto de sódio, característico destas plantas halófitas, podem também ter conferido alguma toxicidade ao extrato de polissacarídeos administrado.

Os resultados obtidos são semelhantes aos discutidos na literatura consultada. Plantas da mesma família de *S. perennis* subsp. *perennis*, como por exemplo *Beta vulgaris*, possuem na constituição da parede celular um grande teor de polissacarídeos pécticos (Majewska-Sawka et al. 2002). O mesmo foi referido para a *Salicornia ramosissima*, onde, igualmente num extrato insolúvel em álcool, foram detetados açúcares como a arabinose, o ácido galacturónico e glucose (Renard et al. 1993). Vários autores sugerem que estes compostos poderiam ser utilizados em pacientes com cancro, após tratamento com quimioterapia, e ainda como suplemento nutricional na dieta humana (Thakur et al. 2010; Ramberg et al. 2010). Um outro estudo confirma que polissacarídeos pécticos, os constituintes do extrato administrado, possuem atividade imunomoduladora (Kadarian et al. 2002).

Apesar de algumas diferenças na concentração de açúcares de EP1 e EP2, a sua constituição é semelhante, sendo essa a razão pela qual se efetuou a junção de ambas para a

obtenção do extrato de polissacarídeos. Sendo um extrato rico em polissacarídeos pécnicos era muito solúvel em água. Por esta razão, selecionou-se a via oral, para administração aos ratinhos.

III.2 Sobrevivência e comportamento dos animais

No presente trabalho verificou-se uma taxa de sobrevivência de 100%. O comportamento dos ratinhos durante o estudo manteve-se constante, mostrando desde o início alguma hiperatividade, à exceção dos Grupos II, V e VI que revelaram uma diminuição da atividade, ficando praticamente imóveis. Verificaram-se ainda alterações na pelagem destes ratinhos.

III.3 Aspeto macroscópico dos órgãos

Relativamente a este estudo de proteção dos órgãos, e comparando com o Grupo I, controlo negativo, verificou-se que os grupos administrados apenas com o extrato de polissacarídeos (Grupo III e IV) apresentaram órgãos de coloração e morfologia macroscópicas normais. No controlo positivo observaram-se alterações na coloração do fígado, que se apresentava castanho-avermelhado e um pouco hemorrágico, com alguma fragilidade ao toque, aspeto macroscópico esperado após administração com CCl₄, dado que afeta todos os órgãos em estudo, principalmente o fígado (Oliveira 2009). O fígado dos animais dos Grupos IV e V aparentava também uma coloração castanho-avermelhada e sinais de alguma hemorragia. Nos restantes órgãos observou-se uma coloração e morfologias normais.

III.4 Análise da massa dos ratinhos e respetivos órgãos

A evolução do peso corporal dos ratinhos ao longo do estudo está representada na Figura 2. No Grupo I observou-se um aumento constante ao longo do ensaio, assim como no controlo positivo, à exceção da última pesagem, onde se verificou uma ligeira queda na média dos pesos, provocada pela administração do tóxico CCl₄ (Oliveira 2009). Em todos os grupos tratados com o extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis*, observaram-se algumas oscilações nos pesos, sendo a descida comum a todos eles ao 27º dia. Nos Grupos III, IV, V e VI ocorreu um aumento nos pesos, sendo o aumento da massa final média de 4,02 g, 2,14 g, 1,09 g e 3,92 g,

respetivamente. De notar que no Grupo VI, para além da descida ao 27º dia, também se verificou uma diminuição das médias dos pesos, correspondente à 17ª pesagem. Não se encontrou, na literatura existente, explicações para estas oscilações de peso.

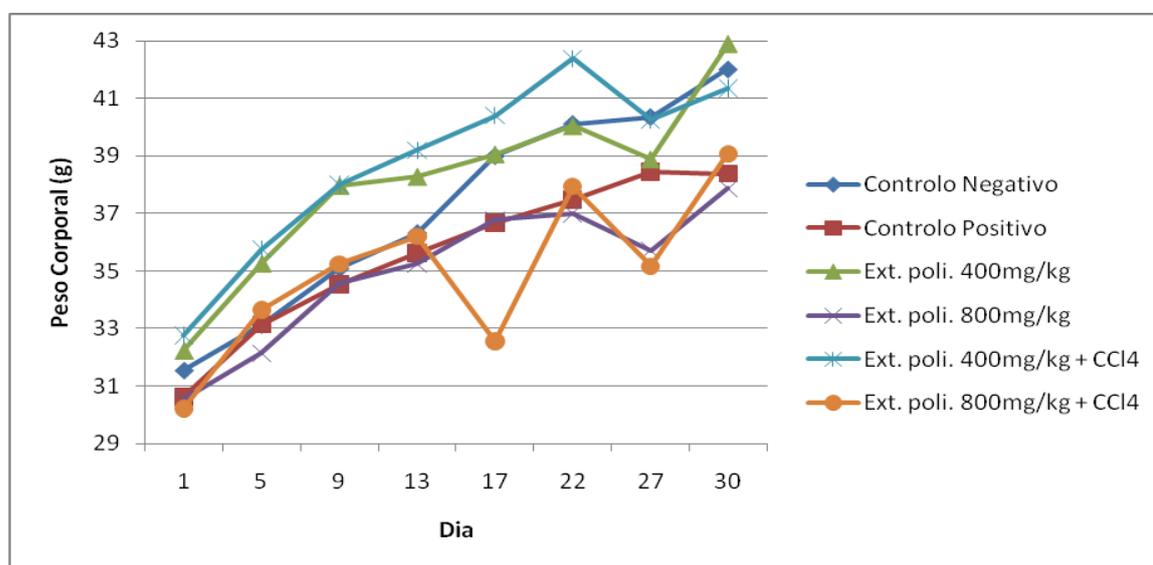


Figura 2: Evolução do peso corporal dos ratinhos, dos diferentes grupos, ao longo do tempo de estudo.

Relativamente ao peso dos órgãos e comparando com o controlo negativo, verificou-se apenas um aumento significativo ($p \leq 0,05$) do peso dos rins no controlo positivo e, no Grupo VI um aumento do fígado, do rim esquerdo e do baço (Tabela 4). Além destas diferenças, observou-se ainda, neste último grupo, um aumento significativo ($p \leq 0,05$) do baço em relação ao controlo positivo e ao Grupo V. Este aumento dos pesos dos órgãos deve-se ao efeito que o CCl_4 provoca nos diferentes tecidos, verificando-se que, a dose mais alta de polissacarídeos não permitiu a manutenção do peso dos órgãos mais expostos ao tóxico: o fígado, o rim e o baço.

Comparando os Grupos III e V verificou-se uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) da média dos pesos do baço, testículo direito e epidídimo esquerdo, no grupo com extrato de polissacarídeos de 400 mg/g. Contudo, estes valores não revelaram diferenças significativas quando comparados com o controlo negativo (Tabela 4). Não se pode afirmar que, em relação ao peso dos órgãos, se verificou alguma proteção com esta dose de polissacarídeos uma vez que, de entre todos os parâmetros analisados, o peso dos órgãos não é o parâmetro mais fiável para correlacionar o efeito dose-resposta. Entre os Grupos IV e VI apenas se verificou um aumento significativo do rim direito.

Tabela 4: Rácio (m/m) dos pesos dos órgãos e respetiva análise estatística, dos diferentes grupos de tratamento.

| Órgãos | Grupos de tratamento | | | | | |
|--------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV | Grupo V | Grupo VI |
| Fígado | 4,72 ± 0,35 | 5,15 ± 1,01 | 5,17 ± 0,45 | 5,08 ± 0,15 | 5,35 ± 0,70 | 5,28 ± 0,0,31 ^{a)} |
| Rim Direito | 0,76 ± 0,10 | 0,97 ± 0,10 ^{a)} | 0,80 ± 0,08 ^{b)} | 0,78 ± 0,06 ^{b)} | 0,74 ± 0,12 ^{b)} | 0,87 ± 0,05 ^{e)} |
| Rim Esquerdo | 0,72 ± 0,08 | 0,94 ± 0,11 ^{a)} | 0,78 ± 0,10 ^{b)} | 0,77 ± 0,06 ^{b)} | 0,79 ± 0,09 ^{b)} | 0,86 ± 0,08 ^{a)} |
| Baço | 0,25 ± 0,06 | 0,24 ± 0,05 | 0,39 ± 0,15 | 0,31 ± 0,09 | 0,23 ± 0,04 ^{c)} | 0,41 ± 0,0,13 ^{a); b); d)} |
| Testículo Direito | 0,26 ± 0,09 | 0,30 ± 0,05 | 0,35 ± 0,04 | 0,33 ± 0,05 | 0,29 ± 0,05 ^{c)} | 0,31 ± 0,03 |
| Testículo Esquerdo | 0,29 ± 0,06 | 0,30 ± 0,04 | 0,30 ± 0,07 | 0,30 ± 0,05 | 0,26 ± 0,04 | 0,31 ± 0,03 |
| Epidídimo Direito | 0,15 ± 0,05 | 0,14 ± 0,04 | 0,12 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 |
| Epidídimo Esquerdo | 0,11 ± 0,02 | 0,13 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 ^{c)} | 0,12 ± 0,01 |

Valores correspondem a média ± desvio-padrão com n=5. a) Significativamente diferente do controlo negativo ($p \leq 0,05$); b) Significativamente diferente do controlo positivo ($p \leq 0,05$); c) Significativamente diferente do Grupo III ($p \leq 0,05$); d) Significativamente diferente do Grupo V ($p \leq 0,05$); e) Significativamente diferente do Grupo IV ($p \leq 0,05$)

III.5 Análise histológica

III.5.1 Fígado

Em todos os estudos de toxicidade, o fígado é dos órgãos mais estudados, dada a sua enorme capacidade de metabolismo e um grande fornecimento de sangue. Vinda através da veia-porta, uma variedade de compostos, incluindo as substâncias tóxicas, entra em contacto com os hepatócitos, onde ocorre a biotransformação. Com este processo, estas células ficam expostas aos metabolitos, sendo muitos deles ainda mais tóxicos do que o tóxico em si, como acontece com o CCl_4 , induzindo lesões (Haschek e Rousseaux 1998; Bishayi et al. 2002; Shyamal et al. 2010).

As porções de fígado do controlo negativo apresentaram estrutura e morfologia normais (Figuras 3, A e B). No controlo positivo observaram-se diversas alterações, entre as quais extensas hemorragias com congestão dos vasos sanguíneos, necrose centrolobular, afetando todos os lóbulos, e ainda vacuolização difusa em todo o parênquima (Figura 3, C e D).

Todas as lesões observadas no Grupo II são características de exposição ao CCl_4 , tendo sido também descritas por vários autores (Ismail et al. 2009; Oliveira 2009; Silva 2009; Lopes 2010; Nishikawa et al. 2010). A necrose centrolobular é uma das principais patologias encontradas, explicando-se pelo facto de ser nesta zona a localização de uma grande concentração de CYP,

responsável pelo metabolismo no fígado e, como tal participa na biotransformação do CCl_4 (Haschek e Rousseaux 1998; Roberts et al. 2000; Hodgson e Levi 2004).

As alterações histológicas observadas estão relacionadas com o aspeto macroscópico deste órgão. A gravidade destas lesões (Tabela 5) permite afirmar que este órgão, nos ratinhos do Grupo II, se encontrava numa fase de perda de funcionalidade, facto evidenciado pela grande extensão de hemorragia e da necrose centrolobular, afetando todos os lóbulos. Por esta razão, a congestão dos vasos poderá ter causado o bloqueio de nutrientes, conduzindo à falência hepática. Estes dados são confirmados ainda com os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos (Tabela 10).

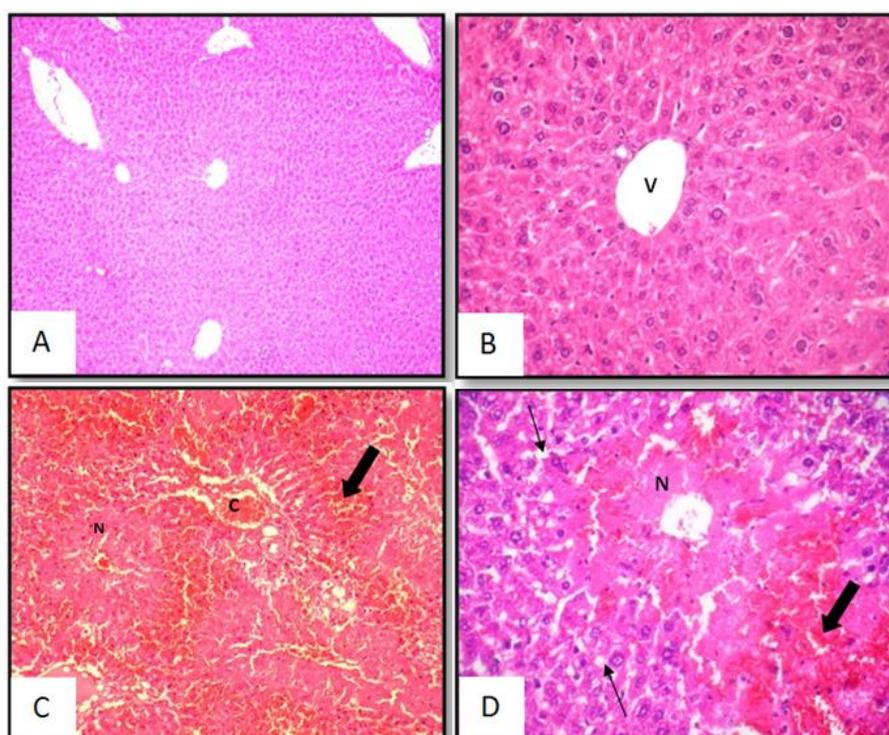


Figura 3: Cortes histológicas de fígado de ratinho (HE 100x e 400x). [A e B] Controlo Negativo; [C e D] Controlo Positivo. (V) Veia hepática; (N) Necrose centrolobular; (C) Congestão dos vasos; (➡) Extensas hemorragias; (➡) Vacuolização

O estudo semiquantitativo das lesões hepáticas observadas nos diferentes grupos (Tabela 5), revela que o fígado dos animais tratados com o extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* (Grupo III e IV), apresentaram uma estrutura e morfologia normais.

Tabela 5: Principais lesões observadas no fígado de ratinhos, dos diferentes grupos.

| Alterações histopatológicas | Grupos de tratamento | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|----------|-----------|----------|---------|----------|
| | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV | Grupo V | Grupo VI |
| Necrose centrolobular | - | +++ | - | - | +++ | +++ |
| Congestão dos vasos | - | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Hemorragia | - | +++ | - | + | +++ | ++ |
| Vacuolização | - | ++ | - | - | ++ | + |
| Tumefação hidrópica | - | - | - | - | + | ++ |
| Infiltrado inflamatório | - | - | + | + | ++ | ++ |

(-) Ausência; **Necrose centrolobular:** (+++) Necrose centrolobular extensa, afetando todos os lóbulos; **Congestão dos vasos:** (+) Apenas em alguns vasos; (++) Praticamente em todos os vasos; **Hemorragia:** (+) Leve Hemorragia; (++) Hemorragia; (+++) Hemorragia extensa; **Vacuolização:** (+) Vacuolização moderada; (++) Vacuolização em todo o parênquima; **Tumefação hidrópica:** (+) Afeta entre 25 a 75% dos cortes; (++) Afeta mais de 75% dos cortes; **Infiltrado inflamatório:** (+) Leve infiltrado inflamatório; (++) Infiltrado inflamatório moderado

Nos Grupos III e IV apenas se verificaram alguns aglomerados de infiltrado inflamatório e de algum congestionamento dos vasos (Figura 4, A-F). Com estes resultados verificou-se que o extrato de polissacarídeos, administrado aos animais, não provocou alterações no fígado, mantendo a estrutura típica do parênquima, distinguindo-se os cordões hepáticos.

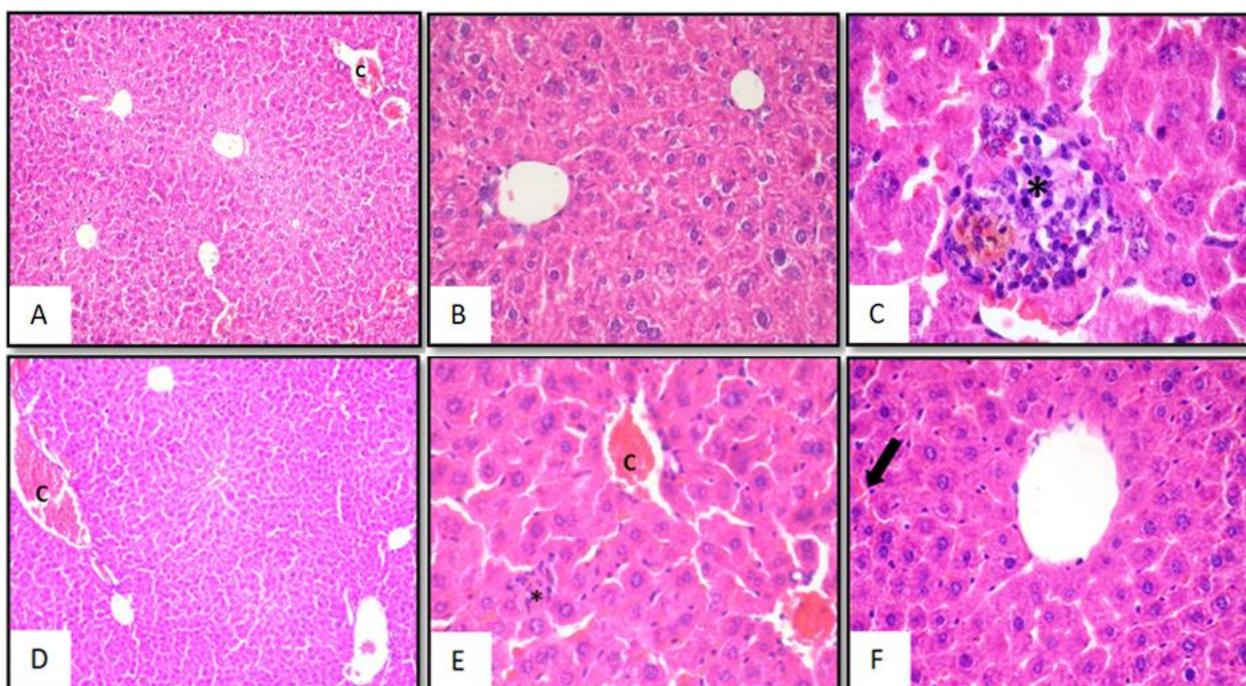


Figura 4: Cortes histológicos de fígado de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (C) Congestão dos vasos; (*) Aglomerado de infiltrado inflamatório; (➡) Leve hemorragia

O fígado dos ratinhos do Grupo V é muito semelhante ao do controlo positivo, apresentando uma grande extensão de hemorragia e de necrose centrolobular, vacuolização dos hepatócitos e congestão dos vasos (Figura 5, A-C). Observou-se também a presença de infiltrado inflamatório por todo o parênquima e ainda alguma tumefação hidrópica, em redor da necrose. No Grupo VI foram visíveis o mesmo tipo de lesões descritas no Grupo V, embora a vacuolização dos hepatócitos e a hemorragia aparentaram ser em menor quantidade do que no Grupo II (Figura 5, D-F).

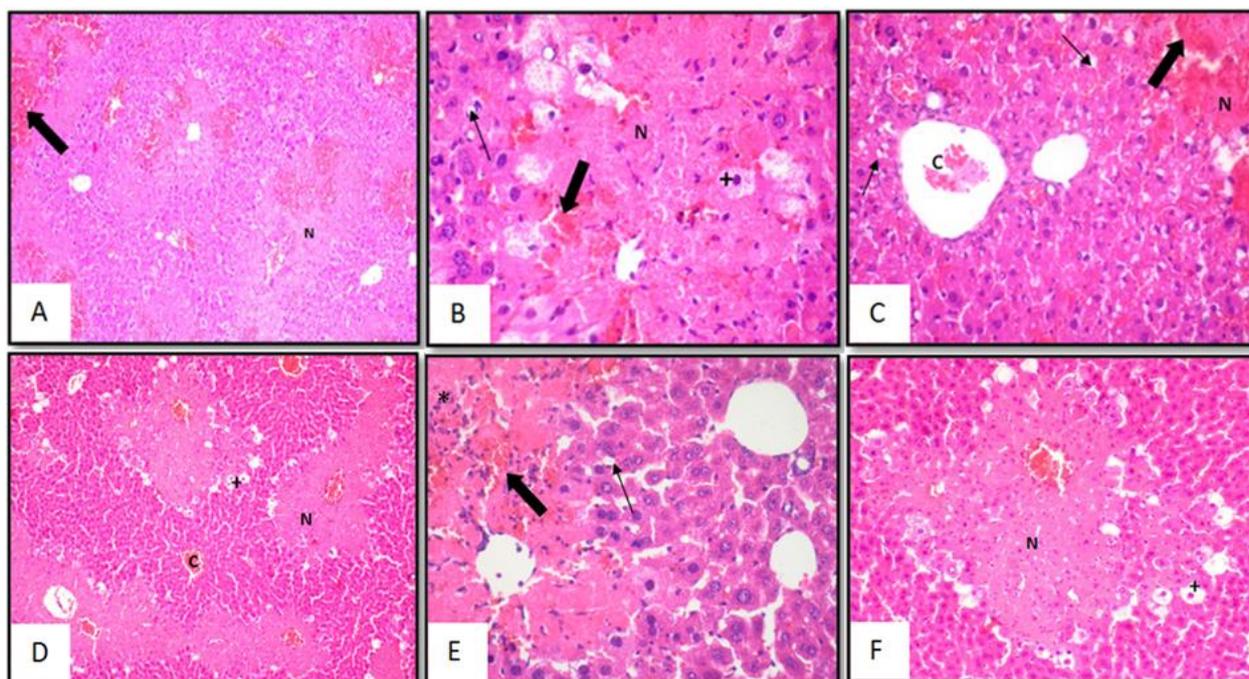


Figura 5: Cortes histológicas de fígado de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl₄; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl₄. (N) Necrose centrolobular; (C) Congestão dos vasos; (*) Infiltrado inflamatório; (+) Tumefação hidrópica; (➡) Hemorragia; (➤) Vacuolização

A presença de infiltrado inflamatório e de tumefação hidrópica são duas das alterações histopatológicas descritas noutros estudos, após a administração de CCl₄ (Haschek e Rousseaux 1998; Nishikawa et al. 2010). No entanto, no controlo positivo não se verificou a presença de nenhuma delas. A ocorrência do infiltrado inflamatório nos Grupos V e VI e não no Grupo I pode indicar que, neste último, todo o organismo já estava afetado, incluindo o sistema imunitário. Os animais dos Grupos V e VI ainda possuem células de defesa, nomeadamente macrófagos, que migram para o fígado, ou outros órgãos, a fim de combater o agressor (Budinsky 2000; Selgrade 2004). Outros dados, discutidos no subcapítulo III.6, foram os resultados obtidos na determinação

enzimática, onde os valores da atividade das enzimas estavam elevados, embora com diferenças em relação ao controlo positivo (Tabela 10). Neste contexto, o extrato de polissacarídeos administrado conferiu alguma proteção ao órgão, estando este efeito de hepatoproteção descrito por outros autores, relativos a polissacarídeos sulfatados e pectinas, de outras plantas (Bishayi et al. 2002; Kadarian et al. 2002; Josephine et al. 2008).

III.5.2 Baço

O baço é um dos órgãos essenciais do sistema imunitário, sendo um dos locais onde predominam macrófagos. Estes derivam dos monócitos, células precursoras da medula óssea que circulam na corrente sanguínea onde, nos tecidos, sofrem um processo de maturação, dando origem aos macrófagos com atividade fagocítica bem desenvolvida. Estas células têm um papel fundamental na defesa do organismo e, nos tecidos, podem proliferar-se (Junqueira e Carneiro 2010).

No grupo controlo negativo, o baço dos ratinhos apresentava-se normal (Figura 6, A e B). No entanto, observou-se uma desorganização das polpas, com clara atrofia da polpa branca e hipoplasia das células em geral, assim como a ausência de macrófagos, no grupo controlo positivo. Também no Grupo II foi nítida a presença de infiltrado inflamatório na cápsula, a dilatação dos espaços sinusóides e a ausência de trabéculas (Figura 6, C e D). Estas alterações na morfologia do baço também foram discutidas noutros estudos, sendo frequentemente visíveis após o tratamento com CCl₄ (Nishikawa et al. 2010).

A ausência de macrófagos em todo o órgão é um indicador de que ocorreu a supressão do sistema imunitário, incluindo a produção dos monócitos na medula óssea (Budinsky 2000). Este facto foi ainda confirmado pelos resultados obtidos no esfregaço sanguíneo do Grupo II, onde ocorreu um decréscimo total na produção da linha leucocitária (Tabela 12). Na Tabela 6 encontram-se resumidas todas as lesões observadas no baço, nos diferentes grupos.

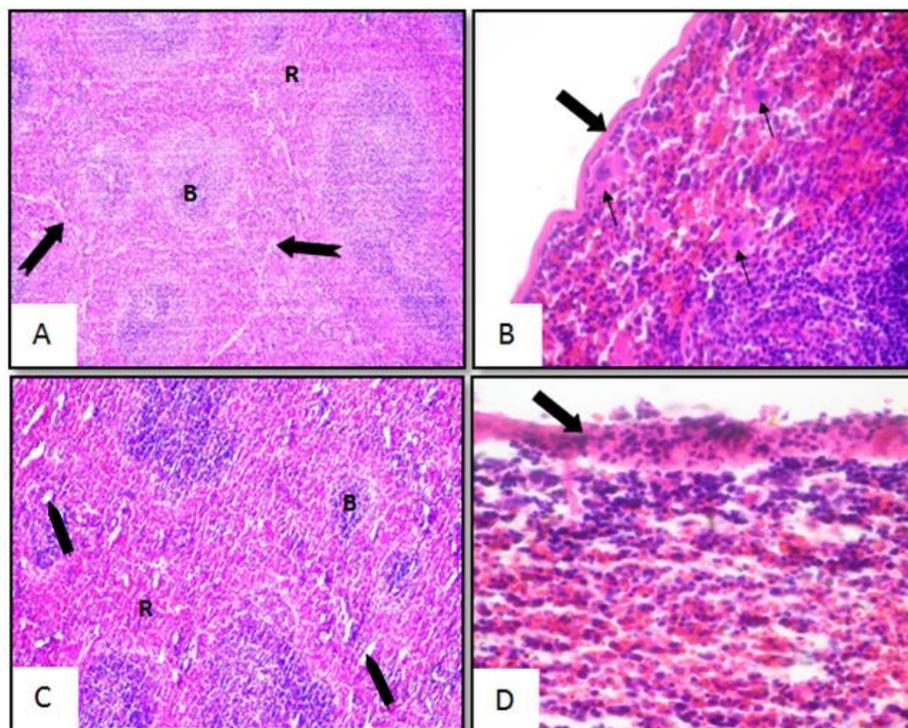


Figura 6: Cortes histológicos de baço de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controlo negativo: Polpas bem definidas, presença de trabéculas e de alguns macrófagos; [C e D] Controlo positivo: Atrofia da polpa branca, hipoplasia das células e infiltrado inflamatório na cápsula. (B) Polpa Branca; (R) Polpa vermelha; (➡) Cápsula; (➡) Trabéculas; (➡) Macrófagos; (➡) Dilatação dos espaços sinusóides.

Na Figura 7 (A-F) observou-se uma leve hiperplasia da polpa branca, e ainda um aumento de macrófagos nos grupos tratados com extrato de polissacarídeos (Grupos III e IV). A hiperplasia é caracterizada pelo aumento do número de células, neste caso de linfócitos. Este aumento pode estar relacionado com a estimulação do sistema imunitário e, conseqüentemente, com a produção dos leucócitos na medula óssea, principais responsáveis pela defesa do organismo. O aumento de macrófagos é mais uma prova de que ocorreu uma estimulação a este nível, facto evidenciado noutros estudos com extratos de polissacarídeos de outras plantas, em que foi nítido o aumento destas células verificando-se ainda uma maior ativação das mesmas (Kumazawa et al. 1982; Bishayi et al. 2002; Sakagami et al. 2005; Im et al. 2006; Xie et al. 2008; Lee et al. 2009; Philippi et al. 2010; Sakagami et al. 2010). Ainda nos Grupos III e IV, foi visível a presença de trabéculas e a cápsula manteve-se intacta, não se observando infiltrado inflamatório.

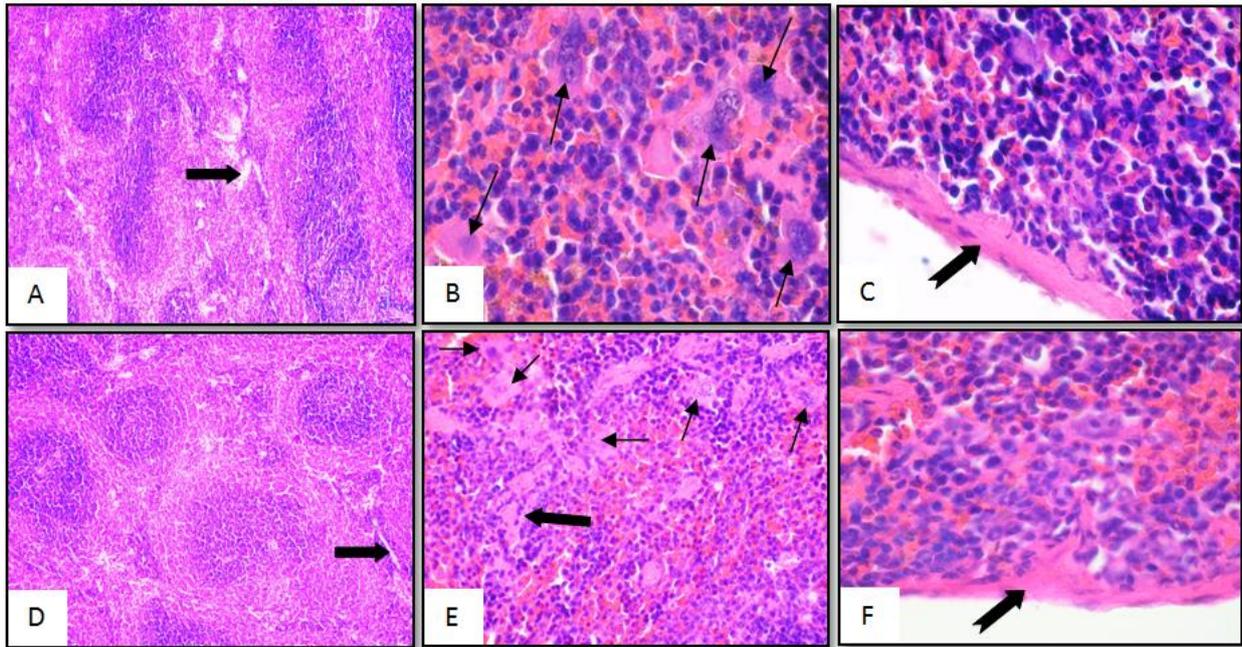


Figura 7: Cortes histológicos de baço de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg: Hiperplasia da polpa branca; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg: Hiperplasia da polpa branca. (⇒) Trabéculas; (→) Macrófagos; (⇨) Cápsula

Pela Tabela 6 e Figura 8 (A-F), verificou-se que as alterações observadas nos Grupos V e VI foram uma moderada hiperplasia da polpa branca, estando a polpa vermelha quase imperceptível, e um grande número de macrófagos tanto nos Grupos III e IV.

Tabela 6: Principais alterações histopatológicas encontradas no baço de ratinhos, dos diferentes grupos.

| Alterações histopatológicas | Grupos de Tratamento | | | | | |
|--|----------------------|----------|-----------|----------|---------|----------|
| | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV | Grupo V | Grupo VI |
| Hiperplasia da polpa branca | - | - | + | + | ++ | ++ |
| Hipoplasia das polpas | - | X | - | - | - | - |
| Dilatação do espaço sinusóide | - | X | - | - | - | - |
| Ausência de trabéculas e de macrófagos | - | X | - | - | - | - |
| Infiltrado inflamatório na cápsula | - | X | - | - | - | - |
| Aumento de macrófagos | - | - | X | X | X | X |

(-) Ausência; (X) Visível em todo o grupo; **Hiperplasia da polpa branca:** (+) Leve hiperplasia; (++) Hiperplasia moderada.

Uma hiperplasia exagerada de qualquer tipo de polpa, branca ou vermelha, compromete o funcionamento do órgão. Além disso, foi visível uma grande desorganização destas, estando a polpa branca bastante evidenciada, embora com perfil irregular, o que não se verificou no controle negativo, onde as polpas se apresentaram bem definidas e arredondadas. Constatou-se alguma relação entre o rácio do peso do órgão (Tabela 4) e o corte histológico.

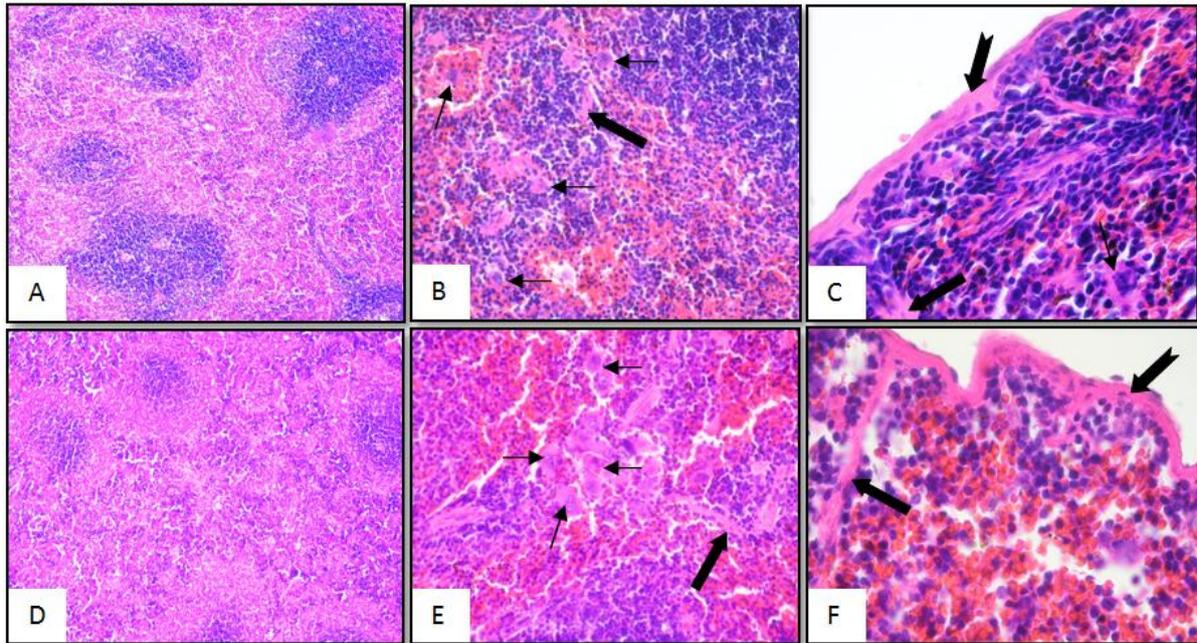


Figura 8: Cortes histológicos de baço de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl₄; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl₄. Em ambos os grupos é nítida a hiperplasia moderada da polpa branca e aumento de macrófagos. (➡) Trabéculas; (←) Macrófagos; (➡) Cápsula

O aumento da média dos pesos do baço no Grupo VI pode dever-se à extensão da hiperplasia observada, havendo referência de que este parâmetro é verificado em diagnósticos de leucemias (Haschek e Rousseaux 1998). Em paralelo com os resultados obtidos no Grupo II (Figura 6, Tabela 6), apesar de se verificar a alteração das polpas, observou-se alguma proteção, uma vez que, o número de macrófagos foi aumentado, a cápsula aparentou estar normal sem infiltrado inflamatório e, foi clara a presença de trabéculas. No controlo positivo não se verificou este tipo de resultados. Na literatura, apenas se verificou o aumento da quantidade e atividade dos macrófagos, como resultado do efeito imunoestimulador dos polissacarídeos, não havendo referências em relação à proteção do baço (Im et al. 2010).

III.5.3 Rim

O rim é responsável pela filtração do sangue e, como consequência, participa na excreção de substâncias originadas do metabolismo endógeno ou no metabolismo de xenobióticos, sendo este órgão indispensável para a homeostasia. Assim, juntamente com o fígado, é dos mais suscetíveis à ação dos compostos tóxicos, sendo as suas unidades excretoras, os nefrônios, as zonas mais afetadas, devido à presença de um metabolismo, igualmente pelo CYP, embora com menor atividade do que a observada no fígado, que efetua a biotransformação do CCl₄, principalmente no túbulo proximal (Haschek e Rousseaux 1998; Ganie et al. 2011). A elevada quantidade de sangue que entra no rim é muito superior do que a observada em qualquer outro órgão, sendo esta outra das razões que confere ao rim uma grande suscetibilidade à lesão causada por tóxicos, nomeadamente o CCl₄ (Middendorf e Williams 2000; Hodgson e Levi 2004).

Os rins dos ratinhos do controlo negativo apresentaram uma estrutura e morfologia normais (Figura 9, A e B). No Grupo II observaram-se várias patologias, nomeadamente necrose tubular em praticamente todo o órgão, extensas hemorragias, infiltrado inflamatório moderado e alterações no glomérulo (Tabela 7; Figura 9, C e D).

Tabela 7: Principais lesões encontradas no rim dos ratinhos, nos diferentes grupos de tratamento.

| Alterações histopatológicas | Grupos de Tratamento | | | | | |
|--------------------------------|----------------------|----------|-----------|----------|---------|----------|
| | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV | Grupo V | Grupo VI |
| Necrose dos túbulos | - | X | - | - | X | X |
| Hemorragia | - | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Infiltrado inflamatório | - | ++ | + | + | ++ | + |
| Alterações no glomérulo | - | ++ | + | + | ++ | ++ |

(-) Ausência; **Necrose dos túbulos:** (X) Visível em todo o grupo; **Hemorragia:** (+) Hemorragia moderada, (++) Hemorragia extensa; **Infiltrado inflamatório:** (+) Infiltrado inflamatório leve, (++) Infiltrado inflamatório moderado; **Alterações no glomérulo:** (+) Afeta entre 25 a 75% dos cortes; (++) Afeta mais de 75% dos cortes

Estas lesões são características após a administração de um tóxico tão forte, como é o caso do CCl₄, sendo descritas por outros autores (Haschek e Rousseaux 1998; Nishikawa et al. 2010; Ganie et al. 2011).

Uma vez que a filtração do sangue ocorre no glomérulo, este é a primeira porção do órgão a estar em contacto com o tóxico, seguindo-se os túbulos renais, onde a quantidade de CCl₄ vai ficando cada vez mais concentrada, devido à reabsorção de água e outras substâncias essenciais

para o organismo ao longo dos túbulos, causando por isso mais danos nos nefrônios (Leblanc 2004). Alterações no glomérulo condicionam a filtração do sangue, reduzindo a quantidade de filtrado que entra nos túbulos. A necrose tubular observada confirma que, nos túbulos, a ação do tóxico é maior e, como consequência, a permeabilidade dos túbulos renais é afetada podendo comprometer a filtração do sangue (Middendorf e Williams 2000). Um dos efeitos de lesão renal é o aumento ou diminuição do peso do órgão (Middendorf e Williams 2000) e, comparando as lesões observadas no Grupo II e o peso do rim esquerdo, verificou-se uma relação idêntica uma vez que este órgão apresentou um aumento significativamente diferente do controle negativo (Tabela 4).

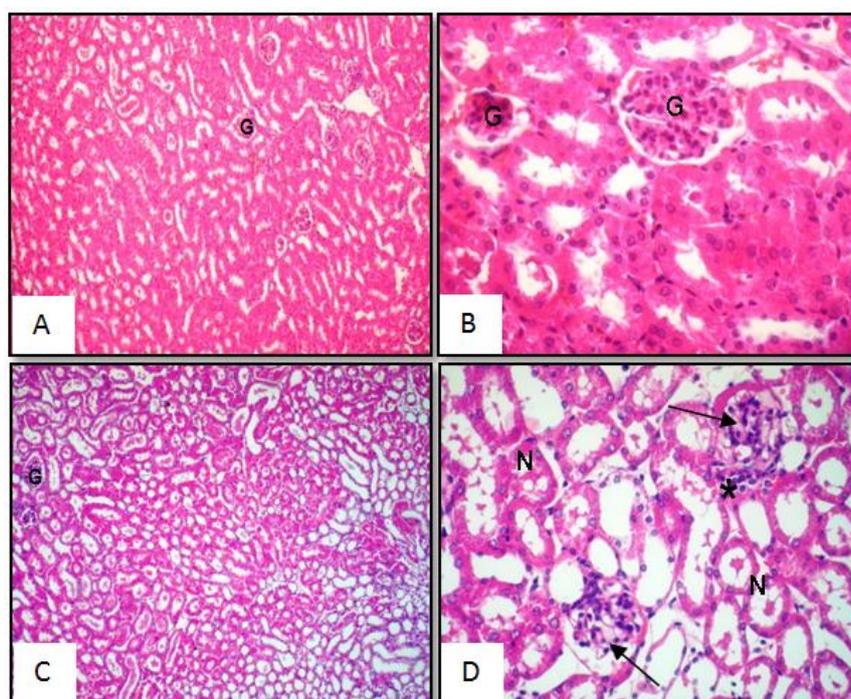


Figura 9: Cortes histológicas de rim de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controle negativo; [B e C] Controle positivo. (G) Glomérulo; (N) Necrose tubular; (→) Alteração do glomérulo; (*) Infiltrado inflamatório

Os Grupos III e IV, ratinhos tratados apenas com o extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis*, apresentaram uma morfologia tubular normal, observando-se apenas alterações em alguns glomérulos, uma leve hemorragia e ainda a presença de infiltrado inflamatório (Figura 10, A-F). A presença destas lesões pode indicar que, alguns compostos presentes no extrato de polissacarídeos, como por exemplo os vestígios de compostos fenólicos e sais minerais,

comprometeram de alguma forma a morfologia do rim, principalmente a nível glomerular. Contudo, não foram encontrados estudos sobre a ação adversa dos polissacarídeos neste órgão. No entanto, a integridade dos túbulos manteve-se, não se tendo observado necrose e, é de notar que, a gravidade das lesões descritas não se compara com a registada no Grupo II.

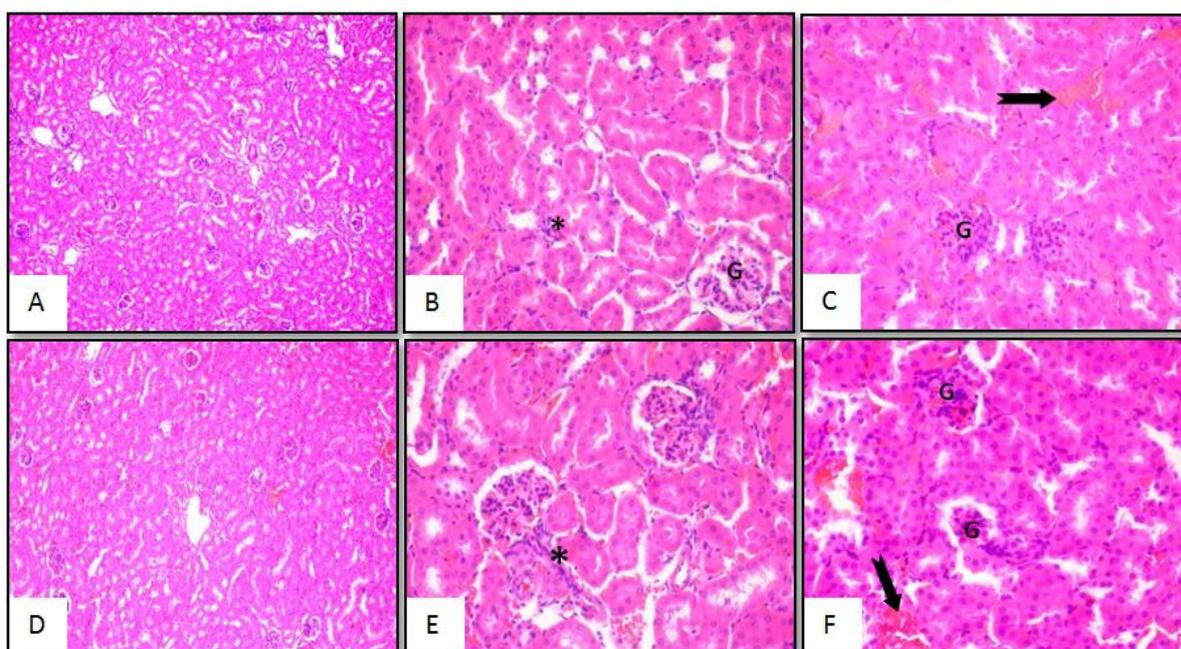


Figura 10: Cortes histológicos de rim de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (➡) Hemorragia; (*) Infiltrado inflamatório; (G) Alteração glomerular

O Grupo V, tratado com extrato de polissacarídeos e posteriormente administrado com CCl_4 , não apresentou melhorias em relação ao controlo positivo, tendo sido observada necrose tubular, hemorragias extensas, infiltrado inflamatório moderado e alterações em praticamente todos os glomérulos (Figura 11, A-C). A diferença entre o Grupo V e VI é o facto de neste último se ter verificado hemorragias e alterações glomerulares um pouco menos agressivas (Figura 11, D-F).

Com os dados acima referidos, e comparando com o controlo positivo, verificou-se necrose nestes grupos mas, comparando as imagens mais representativas de cada grupo (Figuras 9 e 11) constatou-se que a necrose nos Grupos V e VI é mais ténue do que a observada no Grupo II. Neste último, é nítida a lesão em praticamente todos os túbulos, enquanto que nos tratados com o extrato de polissacarídeos, e posteriormente administrados com CCl_4 , houve túbulos renais sem qualquer

lesão ou indícios de necrose. Assim, pode afirmar-se que, apesar de se terem verificado lesões nestes grupos, os polissacarídeos conferiram alguma proteção ao rim contra o CCl₄, principalmente a dose de 800 mg/kg, tornando o efeito menos agressivo. Este assunto não foi discutido na literatura consultada.

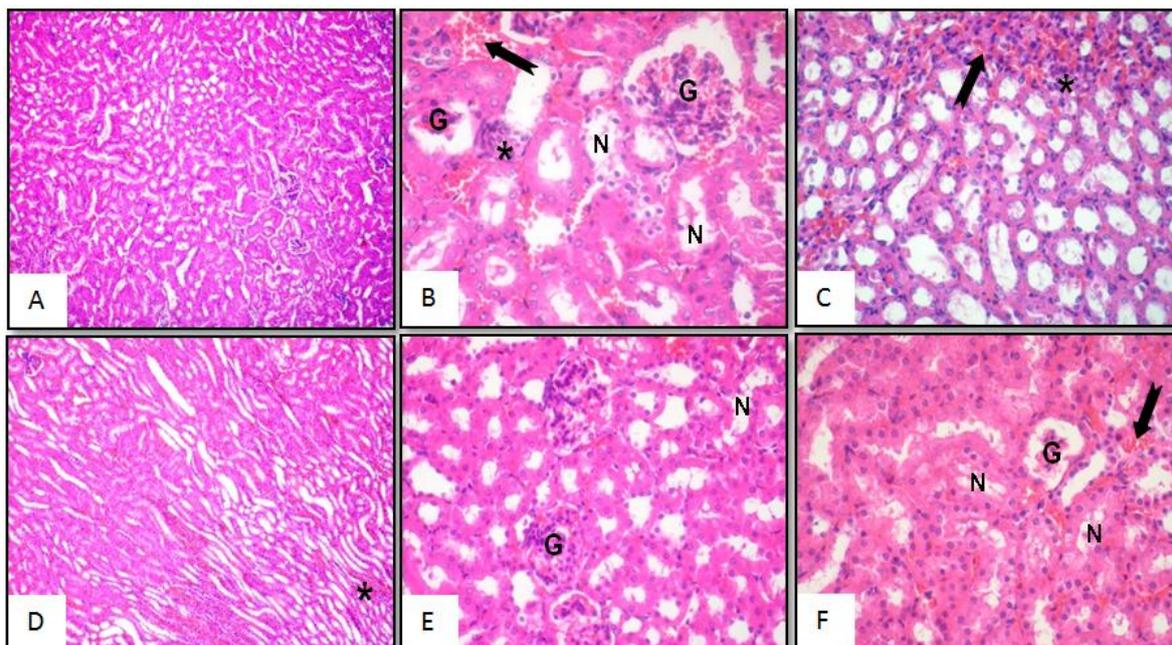


Figura 11: Cortes histológicos de rim de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl₄; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl₄. (➡) Hemorragia; (N) Necrose tubular; (G) Alteração glomerular; (*) Infiltrado inflamatório

III.5.4 Testículo e Epidídimo

O testículo é dos órgãos mais importantes de todos os seres animais, dado que é dele que depende a continuidade das espécies. Por esta razão, alterações neste órgão interferem na reprodução e na origem das gerações seguintes. Como deste depende a formação dos espermatozoides, é um local de grande duplicação de material genético e de divisão celular, durante a espermatogénese, sendo por esta razão um órgão suscetível à ação de substâncias tóxicas que podem alterar e atravessar a barreira hemato-testicular, ficando o ADN mais exposto a alterações. Todo o órgão fica afetado, direta ou indiretamente. Contudo, se os danos ocorrerem principalmente

nas células germinativas, toda a espermatogênese fica comprometida (Haschek e Rousseaux 1998; DeMott e Borgert 2000).

As seções de testículo de ratinho do controlo negativo apresentaram-se com estrutura normal (Figura 12, A e B). No controlo positivo, lesões como a presença de vacúolos nos túbulos, presença de células germinativas e células em degenerescência no lúmen, foram as mais observadas (Figura 12, C e D). Verificou-se heterogeneidade entre as lesões, apresentando-se pontualmente em todo o órgão, em todos os grupos de tratamento.

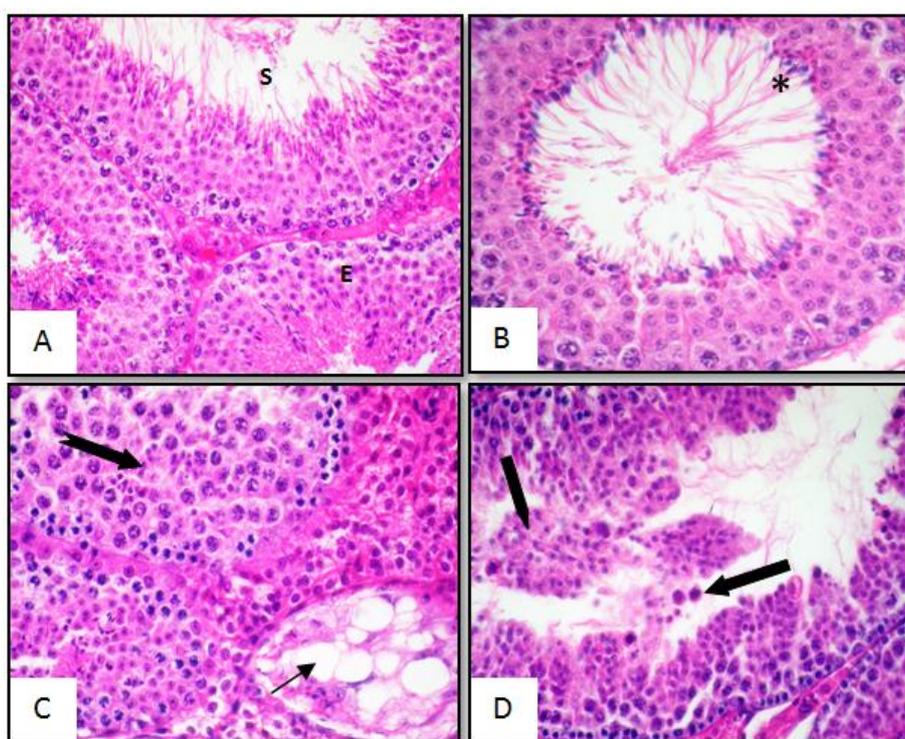


Figura 12: Cortes histológicos de testículo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controlo negativo; [C e D] Controlo positivo. (E) Células germinativas; (S) Lúmen do túbulo seminífero; (➡) Células em degenerescência; (→) Vacuolização do epitélio do túbulo; (➡) Desorganização do epitélio do túbulo; (*) Espermatozóides

Noutros estudos, após a administração de CCl_4 , também foram visualizadas alterações histológicas semelhantes, havendo concordância no facto de não serem lesões difusas (Castilla-Cortazar et al. 2004; Horn et al. 2006; Nishikawa et al. 2010; Rodrigues et al. 2011). A análise semi-

quantitativa das patologias no testículo dos ratinhos, nos diferentes grupos, encontra-se descrita na Tabela 8.

Tabela 8: Principais alterações histopatológicas observadas no testículo de ratinhos, nos diferentes grupos.

| Alterações Histopatológicas | Grupos de tratamento | | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV | Grupo V | Grupo VI |
| Presença de células em degenerescência | - | ++ | + | + | + | ++ |
| Presença de células germinativas no lúmen | - | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Vacuolização do epitélio dos túbulos | - | +++ | + | ++ | + | ++ |
| Alterações heterogêneas | - | X | X | X | X | X |

(-) Ausência; **Presença de células em degenerescência:** (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maior parte dos túbulos; **Presença de células germinativas no lúmen:** (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maioria dos túbulos; **Vacuolização dos túbulos:** (+) Afeta menos de 25% dos túbulos; (++) Afeta entre 25 a 75% dos túbulos; (+++) Afeta mais de 75% dos túbulos; **Alterações heterogêneas:** (X) Todas as alterações visíveis apresentaram-se divididas por toda a lâmina

Os Grupos III e IV são muito semelhantes, correspondendo as alterações encontradas às do controlo positivo, embora num menor grau (Tabela 8). Verificou-se uma desorganização no epitélio seminífero com alguma vacuolização, uma grande quantidade de células em degenerescência e células imaturas no lúmen dos túbulos (Figura 13, A-C).

Não foi encontrada literatura que reportasse estes danos em testículos de ratinhos expostos apenas ao extrato de polissacarídeos. Contudo, há dados da literatura que referem a ação protetora dos mesmos (Qiong et al. 2011).

Um outro trabalho experimental a decorrer em simultâneo no Departamento de Biologia, em que foi administrado um extrato etanólico de *S. perennis* subsp. *perennis*, demonstrou diversas lesões no sistema reprodutor masculino (Pinto, em preparação). Como o extrato administrado no presente trabalho não foi submetido a uma diálise, poderá apresentar na sua constituição alguns compostos dessa fração tóxica, que poderão explicar as lesões no testículo e epidídimo, nos Grupos III e IV.

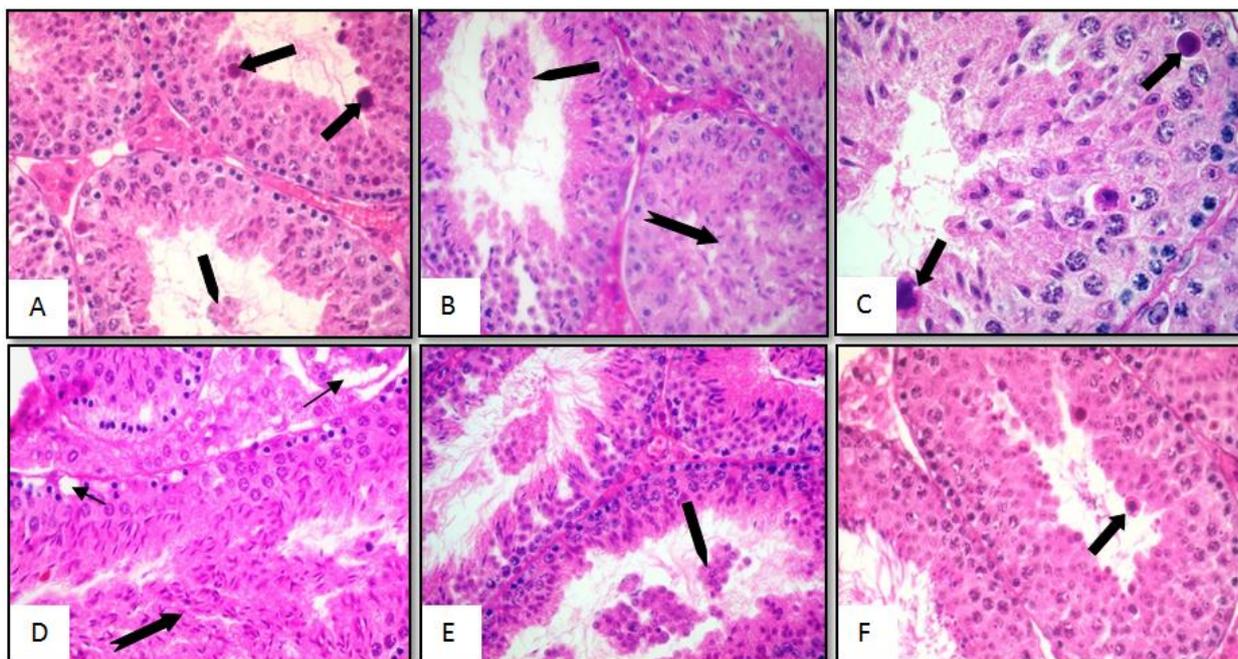


Figura 13: Cortes histológicos de testículo de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (→) Vacuolização; (➡) Desorganização do epitélio; (➡) Células em degenerescência; (➡) Células germinativas no lúmen

Nos cortes de testículo de animais dos Grupos V e VI, observou-se a presença de um grande número de células em degenerescência e de células germinativas imaturas no lúmen. Verificou-se ainda a presença de vacuolização nos túbulos e uma grande alteração na morfologia dos mesmos, ou seja, todo o epitélio apresentou desorganizado não se distinguindo o lúmen do túbulo seminífero (Figura 14, A-F).

Uma vez que os Grupos III e IV, apenas submetidos ao extrato de polissacarídeos, mostraram lesões nos túbulos seminíferos, era de esperar que os Grupos V e VI, expostos ao CCl_4 , apresentassem diversas lesões histopatológicas. Contudo, comparando com o controlo positivo, a vacuolização nos Grupos V e VI surgiu em menor grau. Neste órgão, não foi visível o efeito de proteção do extrato de polissacarídeos, talvez por ser mais sensível, devido à grande taxa de divisão celular, como referido anteriormente.

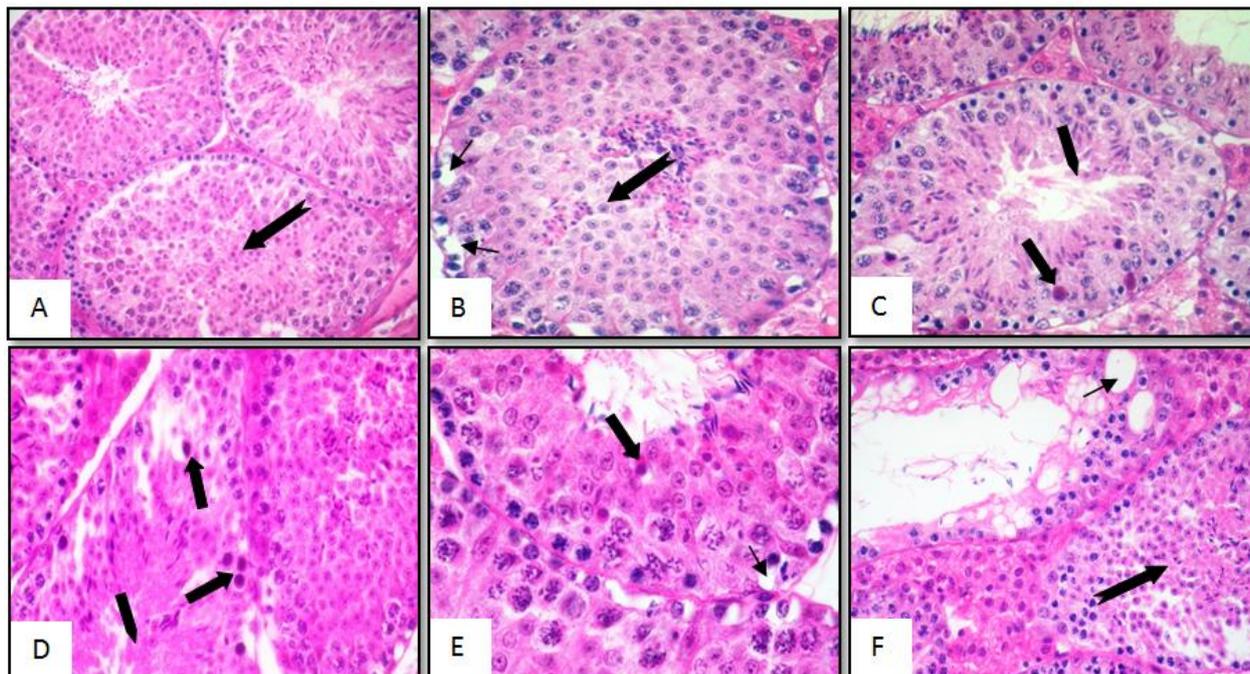


Figura 14: Cortes histológicos de testículo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl₄; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl₄. (➡) Células em degenerescência; (➡) Desorganização do epitélio do túbulo seminífero; (➡) Vacuolização; (➡) Células germinativas no lúmen

O epidídimo, por ser um ducto extratesticular tem que ser analisado em paralelo com os testículos. É nele que os espermatozóides ficam armazenados e terminam a sua maturação, até serem libertados durante a ejaculação (Haschek e Rousseaux 1998).

Porções de epidídimo dos ratinhos do Grupo I apresentavam morfologia e estrutura normais (Figura 15, A e B). Por outro lado, no controlo positivo observou-se a presença de células em degenerescência e de células germinativas no lúmen dos túbulos do epidídimo. Verificou-se ainda vacuolização dos mesmos (Figura 15, C e D). Algumas das lesões descritas, principalmente no que diz respeito à vacuolização, são idênticas às mencionadas na literatura consultada, verificando-se também a relação entre o testículo e o epidídimo (Nishikawa et al. 2010; Rodrigues et al. 2011).

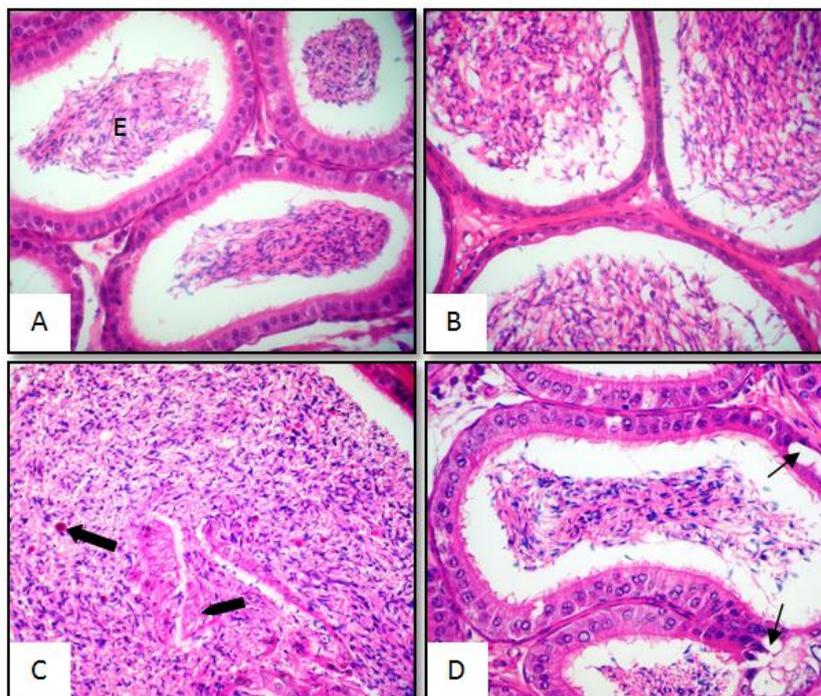


Figura 15: Cortes histológicos de epidídimo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A e B] Controle negativo; [C e D] Controle positivo. (E) Espermatozoides; (→) Células em degenerescência; (---) Vacuolização do epitélio do túbulo; (→) Células germinativas

O epidídimo pode ser afetado pelos tóxicos de diversas formas, ocorrendo uma perturbação nas suas funções. Dada a sua forte ligação com o testículo, quando ocorre uma alteração hormonal neste, vai interferir diretamente com o epidídimo (Haschek e Rousseaux 1998). A análise semi-quantitativa de todos os danos observados neste órgão, nos diferentes grupos de tratamento, está descrita na Tabela 9.

Tabela 9: Principais alterações histopatológicas observadas no epidídimo de ratinhos, nos diferentes grupos.

| Alterações Histopatológicas | Grupos de tratamento | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----------|-----------|----------|---------|----------|
| | Grupo I | Grupo II | Grupo III | Grupo IV | Grupo V | Grupo VI |
| Presença de células degeneradas | - | + | + | + | + | ++ |
| Presença de células germinativas | - | + | + | + | ++ | ++ |
| Vacuolização | - | +++ | + | + | + | ++ |
| Alterações heterogêneas | - | X | X | X | X | X |

(-) Ausência; **Presença de células em degenerescência:** (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maior parte dos túbulos; **Presença de células germinativas:** (+) Visível em alguns túbulos; (++) Visível na maioria dos túbulos; **Vacuolização:** (+) Afeta menos de 25% dos túbulos; (++) Afeta entre 25 a 75% dos túbulos; (+++) Afeta mais de 75% dos túbulos; **Alterações heterogêneas:** (X) Alterações visíveis apresentaram-se divididas por todo o corte

Os grupos expostos ao extrato de polissacarídeos foram muito semelhantes entre si, apresentando as mesmas lesões observadas no Grupo II (Tabela 9 e Figura 16, A-F) tais como a presença de células em degenerescência e de células germinativas no lúmen, sendo idênticas às observadas nos testículos, e ainda vacuolização no epitélio dos túbulos, afetando menos de 25% dos cortes. Estas lesões não se apresentavam de forma difusa, verificando-se uma heterogeneidade. Tendo em atenção as patologias descritas nos testículos de ratinhos dos Grupos III e IV (Tabela 8, Figura 13), os resultados obtidos para o epidídimo foram um pouco óbvios, confirmando-se assim a relação entre os dois órgãos reprodutores.

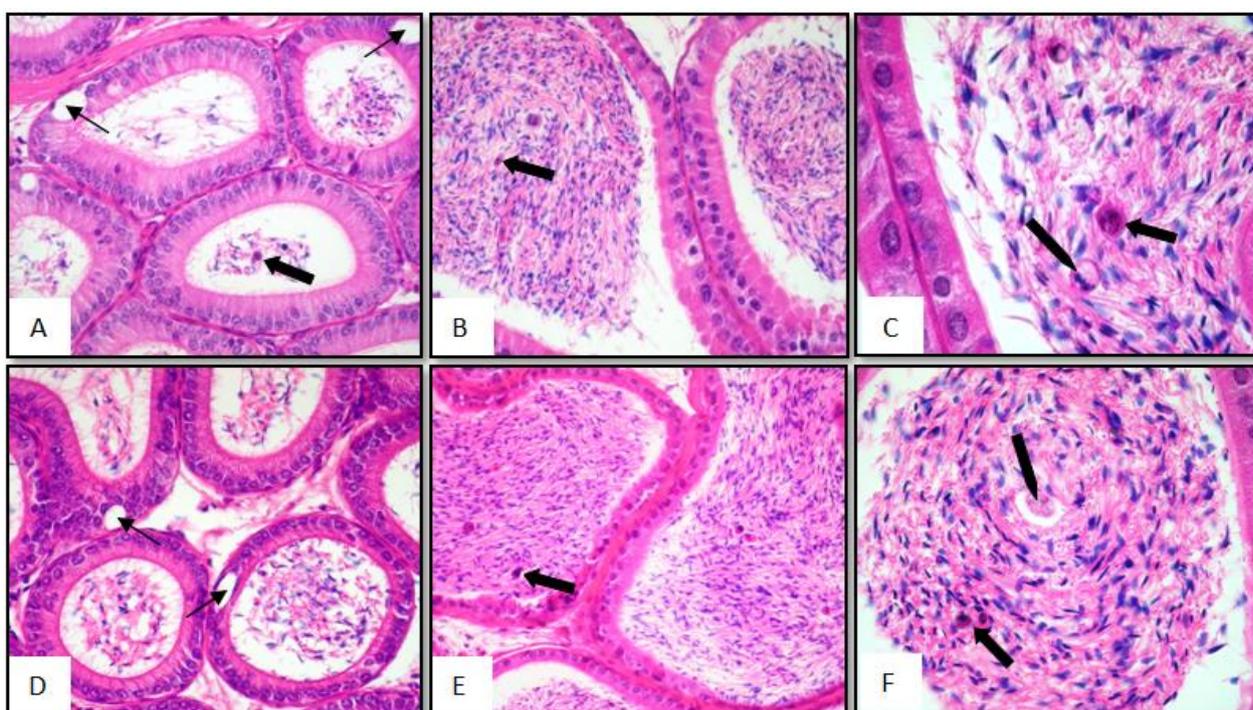


Figura 16: Cortes histológicos de epidídimo de ratinho (HE, 100x, 400x, 1000x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg. (→) Vacuolização; (▬) Células em degenerescência; (▬) Células germinativas

Nas porções de epidídimo dos Grupos V e VI foram tidas em consideração alterações histológicas tais como, a presença de células em degenerescência e de células germinativas, assim como a vacuolização do epitélio colunar do epidídimo (Figura 17, A-F).

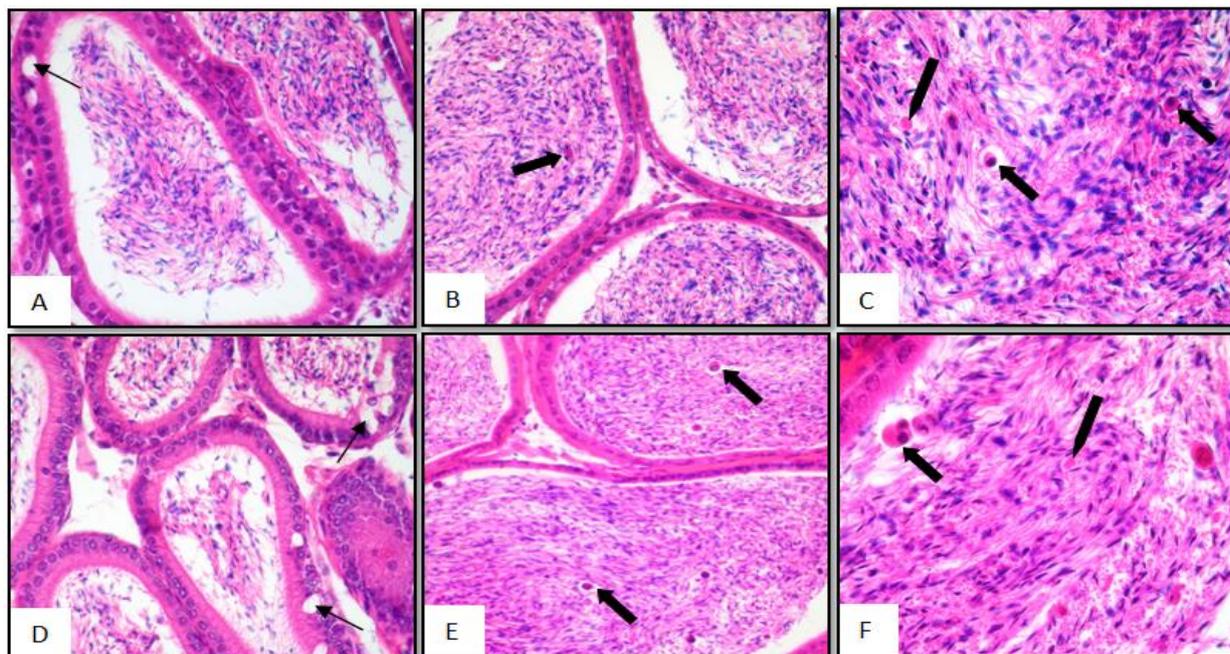


Figura 17: Cortes histológicos de epidídimo de ratinho (HE, 100x, 400x). [A-C] Extrato de polissacarídeos 400 mg/kg + CCl₄; [D-F] Extrato de polissacarídeos 800 mg/kg + CCl₄. (→) Células degeneradas; (→) Vacuolização; (→) Células germinativas testiculares no lúmen do túbulo

Comparando com o controlo positivo (Tabela 9 e Figura 15, C e D) verificou-se que o epidídimo nos ratinhos sujeitos ao extrato de polissacarídeos e CCl₄ apresenta-se mais alterado, uma vez que se observou uma grande percentagem de células em degenerescência e de células germinativas no lúmen dos túbulos, provenientes dos túbulos seminíferos. Da literatura consultada, nenhuma fazia referência ao facto de os polissacarídeos conferirem proteção aos epidídimos. No entanto, pode afirmar-se que com a administração deste extrato, a funcionalidade dos testículos e, consequentemente dos epidídimos, poderá ter ficado comprometida, devendo-se em estudos posteriores, determinar a origem das lesões descritas. Estas poderão ser causadas pelos vestígios de compostos fenólicos existentes ou dos sais minerais ou ainda pelos polissacarídeos presentes no extrato administrado.

III.6 Análises Bioquímicas

As transaminases e a fosfatase alcalina são das principais enzimas que permitem analisar a funcionalidade e o grau de lesão no fígado (Kadarian et al. 2002; Shyamal et al. 2010). Tanto a AST como a ALT são enzimas intracelulares e, por essa razão, apresentam-se em baixas concentrações no sangue (Carvalho et al. 2002). A aspartato aminotransferase está presente, principalmente na mitocôndria do hepatócito, enquanto a alanina aminotransferase se encontra no citoplasma. Estas diferenças entre as transaminases permitem o diagnóstico de doenças hepáticas. As lesões mais leves apresentam valores de ALT mais elevados, e em situações de elevado grau de destruição do parênquima hepático, ambas as enzimas se encontram em elevadas concentrações no soro (Roberts et al. 2000). A FALCS é uma enzima que se encontra predominantemente nas membranas celulares que fazem a ligação da superfície sinusoidal dos hepatócitos aos ductos biliares. Desta forma, ocorre em teores elevados na colestase hepática, caracterizada pela diminuição ou interrupção do fluxo biliar (Roberts et al. 2000). Os valores obtidos da determinação das enzimas hepáticas encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados obtidos da análise bioquímica efetuada no soro dos ratinhos, nos diferentes grupos.

| Ratinhos e Grupos Tratamento | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------|---------|------|------|------|----------|----------|------|------|------|
| Enzimas (U/L) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | | Grupo I | | | | | Grupo II | | | |
| AST | 4575 | 975 | 2135 | 4763 | 5380 | 7454 | < 3 | < 3 | 8402 | 3041 |
| ALT | 402 | 120 | 277 | 807 | 631 | 1061 | 15 | 8 | 4755 | 6 |
| FALCS | < 5 | < 5 | 21 | < 5 | 20 | 70 | 44 | 31 | 14 | < 5 |
| | Grupo III | | | | | Grupo IV | | | | |
| AST | 2027 | 3380 | 3294 | 2126 | 1161 | 3054 | 2147 | 3261 | 3072 | 1184 |
| ALT | 350 | 519 | 662 | 262 | 230 | 326 | 291 | 406 | 409 | 282 |
| FALCS | < 5 | < 5 | < 5 | 10 | < 5 | 61 | 69 | < 5 | < 5 | < 5 |
| | Grupo V | | | | | Grupo VI | | | | |
| AST | 4463 | 7777 | 2664 | 8583 | - | 4914 | 8393 | 7911 | 5256 | 8407 |
| ALT | 7169 | 177 | 41 | 983 | - | 4436 | 15 | 4665 | 6735 | 1252 |
| FALCS | 18 | 60 | 69 | 56 | - | 49 | 34 | 23 | 47 | 57 |

(-) Ausência de dados devido a quantidade insuficiente de soro

Os resultados registados da atividade enzimática não permitiriam a sua análise estatística devido à presença de valores muito baixos, nomeadamente no controlo positivo e nos Grupos III e IV. Por esta razão, estes valores foram rejeitados, tendo sido realizada a análise estatística dos restantes (Tabela 11).

Através da análise estatística acima referida, comparando com o controlo negativo, verificou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da fosfatase alcalina no Grupo V e VI e, neste último, o aumento das transaminases. Observou-se que, em relação ao controlo positivo, apenas o Grupo III mostrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$), apresentando valores idênticos ao controlo negativo. Comprovou-se ainda a diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os Grupos III e V e os Grupos IV e VI, verificando-se o aumento da FALCS e das transaminases nos grupos de ratinhos administrados com CCl_4 . Verificou-se com estes dados que a administração apenas do extrato de polissacarídeos não provocou grandes alterações na funcionalidade hepática, sendo confirmada pelo facto de os cortes de fígado nos Grupos III e IV se apresentarem com estrutura, morfologia e ainda valores enzimáticos normais (Figura 4, Tabelas 10 e 11).

Tabela 11: Análise estatística da determinação de enzimas de função hepática, nos diferentes grupos.

| Grupos de Tratamento | Enzimas (U/L) | | |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | AST | ALT | FALCS |
| Grupo I | 3565 ± 1904 | 447 ± 274 | 8 ± 11 |
| Grupo II | 6299 ± 2861 | 2918 ± 2626 | 31 ± 27 |
| Grupo III | 2577 ± 934 | 404 ± 182 | 2 ± 4 ^{b)} |
| Grupo IV | 2543 ± 874 | 342 ± 61 | 26 ± 35 |
| Grupo V | 5871 ± 2784 | 2776 ± 3825 | 50 ± 22 ^{a); c)} |
| Grupo VI | 6977 ± 1743 ^{a); c); d)} | 4272 ± 2263 ^{a); c); d)} | 42 ± 13 ^{a); c)} |

Valores correspondem a média ± desvio-padrão com Grupo II: n=3 para AST, n=2 para ALT; Grupo V: n=4 para AST, n=3 para ALT e n=4 para FALCS; Grupo VI: n=4 para ALT. a) Significativamente diferente do controlo negativo ($p \leq 0,05$); b) Significativamente diferente do controlo positivo ($p \leq 0,05$); c) Significativamente diferente do Grupo III ($p \leq 0,05$); d) Significativamente diferente do Grupo IV ($p \leq 0,05$);

Com os resultados obtidos na Tabela 11, muito pouco se pôde concluir. Ainda assim, verificou-se que nos grupos tratados com o extrato de polissacarídeos e posteriormente administrados com CCl_4 , ocorreu um aumento da FALCS (50 ± 22 U/L no Grupo V e 42 ± 13 U/L no

Grupo VI), indicando a lesão colestática (Roberts et al. 2000). O aumento das transaminases nestes grupos, V e VI, evidenciaram uma grande extensão de lesão hepática, dado que ambas as enzimas apresentaram concentrações muito elevadas (Kadarian et al. 2002; Shyamal et al. 2010), sendo a da AST maior (6977 ± 1743 U/L). Noutros estudos também foi descrito o aumento destas enzimas hepáticas, provocado pela administração de CCl_4 (Bishayi et al. 2002).

Através da comparação da análise bioquímica das enzimas e da análise histológica do fígado, obtiveram-se resultados muito reveladores. Na análise estatística da determinação da atividade enzimática não se verificou nenhuma diferença significativa entre os grupos controlo (Tabela 11), o que não era esperado uma vez que, ao controlo negativo apenas foi dado alimento apropriado e água *ad libitum* e ao controlo positivo foi injetado o CCl_4 , um tóxico muito forte que provoca grandes alterações na estrutura e funcionamento do fígado. Contudo, ao analisar em paralelo os cortes histológicos de ambos os grupos foram nítidas as divergências. Os fragmentos deste órgão no Grupo II encontravam-se repletos de lesões, como por exemplo a necrose extensa, afetando todos os lóbulos e extensas hemorragias (Figura 3). Estas lesões, levam ao aumento da presença destas enzimas no soro dos ratinhos, embora apenas até certo ponto, ocorrendo seguidamente, um decréscimo. Este facto deve-se à incapacidade de resposta do organismo, comprometendo a atividade das enzimas (Roberts et al. 2000; Josephine et al. 2008). Foi comprovado com a observação, por exemplo, dos resultados das análises do ratinho 3 do Grupo I e do ratinho 5 do Grupo II (Tabela 10), com os quais se verificou valores de AST semelhantes (2135 U/L e 3041 U/L, respetivamente). Contudo, os cortes histológicos foram discordantes, estando o ratinho 5 do controlo positivo com graves lesões hepáticas e o ratinho 3 do Grupo I apresentava morfologia normal.

Outro dado importante foi a existência da discrepância de valores dentro do grupo controlo positivo. Pela Tabela 10 verificou-se que alguns ratinhos apresentaram valores mais baixos, alguns dos quais abaixo do limite de deteção do método (< 3 U/L) e noutros, concentrações superiores. Foram observados os cortes de fígado de todos os ratinhos do Grupo II e verificou-se que todos apresentavam lesões como as representadas na Figura 3, embora dois apresentassem uma maior área afetada. Esses ratinhos correspondem aos valores abaixo do limite de deteção (< 3 U/L), descritos na Tabela 10 tanto para a AST como para a ALT, indicando que não possuíam mais mecanismos de resposta à lesão, conduzindo a alterações na atividade das enzimas.

Observou-se pela Tabela 10 que o Grupo V apresentou uma descida dos valores de ALT, nomeadamente em três ratinhos (177 U/L, 41 U/L e 983 U/L). Verificou-se que esta diminuição não

foi tão acentuada como no controlo positivo e, através das análises bioquímica e histológica do ratinho 3 (2664 U/L de AST e 41 U/L de ALT), pode-se confirmar que as lesões provocadas aparentavam ser mais graves, encontrando-se já numa fase inicial de redução da atividade enzimática. Pela quantificação da atividade das enzimas hepáticas e da análise histológica do fígado do Grupo VI, verificou-se que as lesões observadas correspondem aos valores determinados. Verificou-se que, em lesões hepáticas como as observadas neste trabalho, o mecanismo de resposta é reduzido com consequente diminuição da atividade enzimática. Foram observados valores num intervalo de 8500 U/L a 4000 U/L para a AST, entre 6000 U/L e os 15 U/L para a ALT e ainda, a fosfatase alcalina apresentou concentrações semelhantes às do Grupo II.

No Grupo IV, outra situação em que a análise estatística não revelou diferenças significativas, em relação à FALCS verificou-se que dois dos ratinhos deste grupo apresentaram concentrações mais elevadas, sendo estas semelhantes às dos Grupos II, V e VI (61 U/L e 69 U/L). Estes animais podiam, de alguma forma, ser mais suscetíveis à ocorrência de colestase, uma vez que, no mesmo grupo, todos os animais possuem e reagem com mecanismos diferentes.

Com os resultados acima descritos, pode-se afirmar que o extrato de polissacarídeos confere alguma proteção hepática, não havendo diferenças significativas entre as duas doses.

III.7 Análise dos Esfregaços Sanguíneos

Os leucócitos são células indispensáveis ao bom funcionamento do organismo, sendo eles os principais atores que desencadeiam a resposta imune. Sempre que um antigénio entra no organismo este é detetado, numa primeira defesa, de forma rápida mas insuficiente pelos neutrófilos e macrófagos (resposta inata). A ação dos linfócitos é mais tardia (resposta imune adaptativa) e, para além de ser mais específica é responsável pela criação de anticorpos e das chamadas “células de memória”. A contagem diferencial de leucócitos constitui um dos parâmetros relevantes para a avaliação do sistema imunitário pois, desta forma, determina-se o estado geral da produção de leucócitos (Haschek e Rousseaux 1998; Roberts e Adams 2000; Selgrade 2004).

Efetuada essa contagem nos 10 campos aleatórios nos esfregaços sanguíneos dos diferentes grupos, procedeu-se à soma do total de leucócitos observados em cada ratinho. As médias \pm desvio-padrão da contagem de cada grupo estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12: Contagem diferencial de leucócitos nos diferentes grupos.

| Grupos de tratamento | Leucócitos | |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | Linfócitos | Neutrófilos |
| Grupo I | 5,6 ± 1,5 | 0,6 ± 0,9 |
| Grupo II | 0 ^{a)} | 0 |
| Grupo III | 14,4 ± 9,4 ^{a); b)} | 2,2 ± 1,6 ^{b)} |
| Grupo IV | 18,4 ± 8,6 ^{a); b)} | 1,8 ± 1,6 ^{b)} |
| Grupo V | 15,8 ± 4,9 ^{a); b)} | 10,2 ± 7,7 ^{a); b); c)} |
| Grupo VI | 20,6 ± 12,9 ^{a); b)} | 4,6 ± 3,4 ^{a); b)} |

Valores correspondem a média ± desvio-padrão com n=5. a) Significativamente diferente do controlo negativo ($p \leq 0,05$); b) Significativamente diferente do controlo positivo ($p \leq 0,05$); c) Significativamente diferente do Grupo IV ($p \leq 0,05$).

Pela Tabela 12, verificou-se um aumento significativo em todos os grupos, tanto nos linfócitos (Figura 18-A) como nos neutrófilos (Figura 18-B), quando comparados com o controlo negativo, à exceção dos neutrófilos dos Grupos II, III e IV. Todos os grupos de tratamento, como era de esperar, diferem significativamente do controlo positivo uma vez que neste, nos 10 campos analisados, não se observou nenhum leucócito. Este resultado deve-se ao facto de um tóxico tão forte como o CCl_4 ser capaz de suprimir a produção destas células na medula óssea e, como consequência, a presença destas na corrente sanguínea diminui ou é mesmo inexistente (Haschek e Rousseaux 1998). O decréscimo da quantidade de granulócitos presentes no sangue, nomeadamente os neutrófilos, torna ineficaz a primeira linha de defesa contra possíveis infeções, estando assim o organismo mais exposto a todo o tipo de antigénios (Budinsky 2000). O mesmo se verifica com um número insuficiente de linfócitos, leucócitos responsáveis por uma defesa mais específica, tornam o organismo vulnerável e o sistema imunitário incapaz de reagir contra vírus e células tumorais (Roberts e Adams 2000). No Grupo II verificou-se a presença de um grande número de células polimórficas, como as representadas na Figura 18-C. Todas as células encontradas no sangue têm origem na medula óssea e só são libertadas para a corrente sanguínea quando se encontram morfológica e funcionalmente maduras (Budinsky 2000). As células polimórficas encontradas no controlo positivo podem corresponder às da linhagem linfóide ou granulóide, ou seja, células imaturas que foram libertadas da medula óssea, consequência da ação do tóxico na supressão desta (Budinsky 2000). No entanto, não foi possível confirmar estes dados, uma vez que não foram efectuados estudos para identificar a origem destas células.

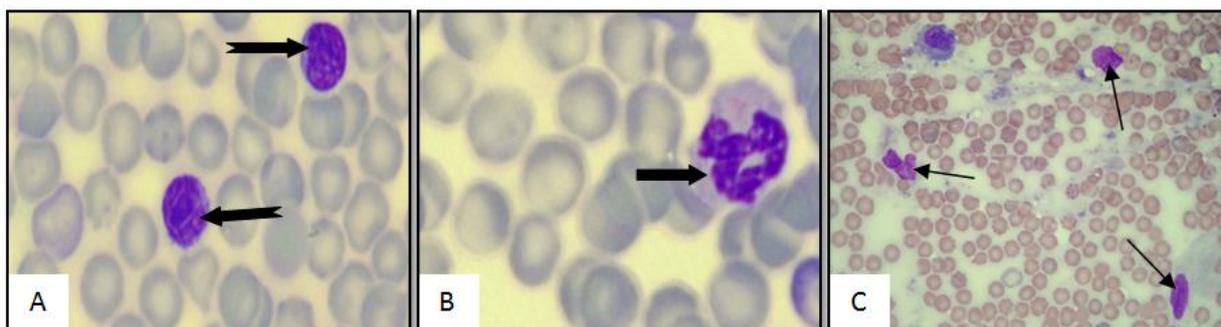


Figura 18: Esfregaço sanguíneo de ratinho, coloração de Wright. [A] Linfócitos (1000x); [B] Neutrófilo (óleo de imersão); [C] Células polimórficas (400x). (→) Linfócito; (→) Neutrófilo; (→) Célula polimórfica

Verificou-se um ligeiro aumento do número de linfócitos nos grupos de tratamento, sendo os Grupos IV e VI com os valores mais altos, o que corresponde à dose mais concentrada do extrato de polissacarídeos. Em relação aos neutrófilos, o Grupo V é o que apresenta a maior média, sendo significativamente diferente do Grupo IV, grupo com menor contagem de neutrófilos, à exceção do controlo negativo e positivo. O aumento destas células sanguíneas também foi verificado noutros estudos (Kumazawa et al. 1982; Philippi et al. 2010; Holderness et al. 2011). Ainda nestes grupos, foram visualizadas células polimórficas, tendo-se observado uma maior quantidade nos Grupos V e VI. Com todos estes resultados constatou-se que ocorreu uma estimulação na produção dos leucócitos, principalmente de linfócitos e neutrófilos. No entanto, a presença de células polimórficas é um indicador de alterações, possivelmente na medula óssea. Mas, futuramente, dever-se-á proceder ao mesmo ensaio mas com doses mais baixas, na tentativa de evitar ocorrência destas células. Contudo, a quantidade das células polimórficas é muito inferior à encontrada no controlo positivo pelo que se pode afirmar que, os polissacarídeos contidos no extrato administrado, para além de estimularem a produção de alguns leucócitos, mantiveram a produção destes apesar de sujeitos a exposição ao tóxico.

Juntamente com estes resultados, os obtidos na análise histológica do baço confirmam a estimulação do sistema imunitário, uma vez que também neste órgão a quantidade de macrófagos foi superior à encontrada no controlo negativo. No entanto, é de referir que um aumento brusco destas células não é o mais recomendado e, estas doses de polissacarídeos apresentaram algumas células polimórficas o que, para um bom funcionamento do organismo, não deverão estar presentes na corrente sanguínea. Estes factos não foram discutidos na literatura existente. Contudo, polissacarídeos de outras plantas também se apresentaram como sendo estimuladores do sistema

imunitário (Kumazawa et al. 1982; Bishayi et al. 2002; Sakagami et al. 2005; Im et al. 2006; Mitchell e Ahmad 2006; Xie et al. 2008; Lee et al. 2009; Du et al. 2010; Ramberg et al. 2010; Sakagami et al. 2010; Holderness et al. 2011), tal como verificado no extrato obtido de *S. perennis* subsp. *perennis*.

IV – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente trabalho teve como preocupação a resposta aos objetivos traçados. Verificou-se que, da composição de *S. perennis* subsp. *perennis*, fazem parte compostos fenólicos e vários polissacarídeos, estando uma grande percentagem de polissacarídeos pécnicos no extrato administrado. Numa tentativa de complementar este estudo, poder-se-á efetuar a diálise da amostra a administrar, para que esta seja ainda mais pura, não contendo substâncias desconhecidas que possam conferir toxicidade.

Da avaliação do efeito dos componentes do extrato de polissacarídeos de *S. perennis* subsp. *perennis* sobre os diferentes órgãos, concluiu-se que estes compostos não interferiram com a estrutura dos órgãos, à exceção do testículo e epidídimo, onde foram observadas alterações morfológicas. Nos restantes, foram visíveis ténues alterações, sendo a ação dos efeitos da funcionalidade do fígado confirmados pela atividade enzimática. Nos testículos e epidídimo não foi observada a diminuição dos espermatozóides. Uma vez que este extrato afetou os órgãos reprodutores masculinos, seria interessante realizar o mesmo teste, usando fêmeas. Futuramente, será pertinente efetuar uma análise bioquímica no soro e na urina, para avaliar a funcionalidade dos rins. O efeito do extrato de polissacarídeos no sistema imunitário foi avaliado pela contagem diferencial de leucócitos, os quais se encontravam elevados, e pela análise histológica do baço, observando-se um aumento da polpa branca e de macrófagos. Assim, ocorreu uma estimulação na produção de linfócitos e monócitos, respetivamente. Uma forma de determinar com mais precisão a imunoestimulação do extrato de polissacarídeos poderá ser através da avaliação da função dos linfócitos, neutrófilos e macrófagos, dos diferentes órgãos interligados ao sistema imunitário, complementando com o estudo da produção hematopoiese.

Na avaliação dos eventuais efeitos protetores do extrato administrado, concluiu-se que os polissacarídeos presentes conferiram alguma proteção no fígado, complementando-se com a determinação de enzimas hepáticas, no rim e no baço. Os testículos e epidídimo apresentaram lesões estruturais, não se tendo observado grande proteção nestes órgãos.

A determinação exata dos compostos que causam o efeito desejado, proteção e/ou imunoestimulação, pode ser útil para que, futuramente, a amostra a administrar seja mais específica. Uma vez que estes componentes de *S. perennis* subsp. *perennis* conferiram alguma proteção e, tal como foi referido neste estudo, pectinas, como as determinadas, possuem atividade antioxidante, seria pertinente para este trabalho determiná-la.

Com o presente estudo, foram notáveis os efeitos dos polissacarídeos no ratinho, tanto na proteção dos órgãos como na estimulação do sistema imunitário. Contudo, como já foi referido, outros autores sugerem que estes compostos são muito benéficos para a saúde e que interferem em doenças mais complexas, como o cancro. Por esta razão, será pertinente no futuro realizar estudos para inserir estes compostos em suplementos nutricionais.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beer A.M. (2011). Herbal medicines used in kidney diseases in Europe. **Indian Journal of Kidney Diseases** 5(2): 82-85.
- Bishayi, B., Roychowdhury, S., Ghosh, S., Sengupta, M. (2002). Hepatoprotective and immunomodulatory properties of *Tinospora cordifolia* in CCl₄ intoxicated mature albino rats. **The Journal of Toxicological Sciences** 27(3): 139-146.
- Budinsky Jr, R. A. J. (2000). Hematotoxicity: Chemically Induced Toxicity of the Blood. *In: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. P. L.,Williams, R. C.,James, S. M., Roberts (Eds.). **John Wiley and Sons, Inc.**, New York pp: 87-109.
- Caffal, K. H., Mohnen, D. (2009) The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research** 344: 1879-1900.
- Capua, C. J., Hopson, N. P., Stewart, C. M. M., Johnston, G. R., O'Neill, K. L., Schaalje, G. B., Lee, C. M., Booth, G. M. (2010) Cytotoxicity of *Atriplex confertifolia*. **Journal of Toxicology**. 2010: 976548.
- Carvalho, M., Carvalho, F., Remião, F., Pereira, M. L., Pires-das-Neves, R., Bastos, M. L. (2002). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. **Archives of Toxicology** 76: 166-172.
- Castilla-Cortázar, I., Diez, N., García-Fernández, M., Puche, J. E., Diez-Caballero, F., Quiroga, J., Díaz-Sánchez, M., Castilla, A., Casares, A. D., Varela-Nieto, I., Prieto, J., González-Barón, S. (2004). Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: Effect of insulin-like growth factor 1. **World Journal of Gastroenterology** 10(17): 2529-2534.
- Castroviejo S. (1990) *Sarcocornia* A. J. Scott *In: Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J., Villar, L. (Ed.). Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares (Vol. II)*. **Real Jardín Botánico, C.S.I.C.** Madrid. pp 528-531.
- Coimbra, M. A., Deldadillo, I., Waldron, K. W., Selvendran, R. R. (1996). Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. **Modern Methods of Plant Analysis** 17: 19-44.
- Cunha, A. P., Silva, A. P., Roque, O. R. (2006). Plantas e Produtos vegetais em Fitoterapia. **Fundação Calouste Gulbenkian**. Lisboa. 702 pp.
- Daniel, M. (2006). Medicinal Plants - Chemistry and Properties. **Science Publishers**. New Hampshire. 250 pp.

- DeMott, R. P., Borgert, C. J. (2000). Reproductive Toxicology. *In: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. P. L., Williams, R. C., James, S. M., Roberts (Eds.). **John Wiley and Sons, Inc.**, New York pp: 209-238.
- Deok-Seon, R., Kim, S., Lee, D. (2009) Anti-proliferative Effect of Polysaccharides from *Salicornia herbacea* on Induction of G2/M Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 19(11): 1482-1489.
- Folin, O., Ciocalteu, U. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry** 73(2): 627-650.
- Ganie, S. A., Haq, E., Hamid, A., Qurishi, Y., Mahmood, Z., Zargar, B. A., Masood, A., Zargar, M. A. (2011). Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine** 11: 17.
- Graff, J. C., Kimmel, E. M., Freedman, B., Schepetkin, I. A., Holderness, J., Quinn, M. T., Jutila, M. A., Hedges, J. F. (2009). Polysaccharides derived from Yamao™ (*Funtumia elastica*) prime $\gamma\delta$ T cells *in vitro* and enhance innate immune responses *in vivo*. **International Immunopharmacology** 9(11): 1313-1322.
- Harborne, J. B., Turner, B. L. (1984). Polysaccharides. *In: Plant Chemosystematics*. **Academic Press Inc.**, London pp: 461-474.
- Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. (1998). Fundamentals of Toxicologic Pathology. **Academic Press**. London pp: 563.
- Hodgson, E., Levi, P. E. (2004). Hepatotoxicity. *In: A Textbook of Modern Toxicology*. E.Hodgson (Ed). **John Wiley and Sons, Inc.**, New Jersey pp: 263-272.
- Hodgson, E., Levi, P. E. (2004). Nephrotoxicity. *In: A Textbook of Modern Toxicology*. E., Hodgson (Ed). **John Wiley and Sons, Inc.**, New Jersey pp: 273-278.
- Holderness, J., Schepetkin, I. A., Freedman, B., Kirpotina, L. N., Quinn, M. T., Hedges, J. F., Jutila, M. A. (2011). Polysaccharides Isolated from Açai Fruit Induce Innate Immune Responses. **Public Library of Science ONE** 6(2): e17301.
- Horn, M. M., Ramos, A. R., Winkelmann, L., Matte, U. S., Goldani, H. A., Silveira, T. R. (2006). Seminiferous Epithelium of Rats with Food Restriction and Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. **Official Journal of the Brazilian Society of Urology** 32(1): 94-99.
- Im, S-A, Kim, K., Lee, C-K (2006). Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*. **International Immunopharmacology** 6: 1451-1458.

- Im, S-A, Lee, Y-R, Lee, Y-H, Oh, S-T, Gerelchuluun, T., Kim, B-H, Kim, Y., Yun, Y-P, Song, S., Lee, C-K (2007) Synergistic activation of monocytes by polisaccharides isolated from *Salicornia herbacea* and interferon- γ . **Journal of Ethnopharmacology** 111: 365-370.
- Ismail, R. S. A., El-Megeid, A. A. A., Abdel-Moemin, A. R. (2009). Carbon tetrachloride-induced liver disease in rats: the potential effect of supplement oils with vitamins E and C on the nutritional status. **German Medical Science** 7: 1-10.
- Josephine, A., Nithya, K., Amudha, G., Veena, C. K., Preetha, S. P., Varalakshmi, P. (2008). Role of sulphated polysaccharides from *Sargassum Wightii* in Cyclosporine A-induced oxidative liver injury in rats **BioMed Central Pharmacology** 8: 1-9.
- Junqueira, L. C., e Carneiro, J. (2010) *Histologia Básica, texto e atlas* (11ª edição). **Editores Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro. 488 pp.
- Kadarian, C., Broussalis, A. M., Miño, J., Lopez, P., Gorzalczany, S., Ferraro, G., Acevedo, C. (2002). Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. **Pharmacological Research** 45(1): 57-61.
- Koh H.L., Woo S.O. (2000). Chinese proprietary medicine in Singapore, regulatory control of toxic heavy metals and undeclared drugs. **Drug Safety** 23(5):351-362.
- Kumazawa, Y., Mizunoe, K., Otsuka, Y. (1982). Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Yamato Tohki). **Immunology** 47(1): 75-83.
- Langmead, L., Rampton, D. S. (2001). Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease--benefits and dangers. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** 15(9): 1239-1252.
- Leblanc, G. A. (2004). Elimination of Toxicants. In: *A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson (Ed). **John Wiley and Sons, Inc.**, New Jersey pp: 203-210.
- Lee, K Y., Lee, M. H., Chang, I. Y., Yoon, S. P., Lim., D. Y., Jeon, Y. J. (2006) Macrophage activation by polisaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*. **Journal of Ethnopharmacology** 103: 372-378.
- Lee, H. H., Lee, J. S., Cho, J. Y., Kim, Y. E., Hong, E. K. (2009). Study on Immunostimulating Activity of Macrophage Treated with Purified Polysaccharides from Liquid Culture and Fruiting Body of *Lentinus edodes*. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 19(6): 566-572.
- Lopes, L. A. T. (2010) Efeitos terapêuticos de Inula em ratinhos expostos ao CCl₄. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, 77pp.
- Majewska-Sawka, A., Münster, A., Rodríguez-García (2002) Guard cell wall: immunocytochemical detection of polysaccharide components. **Journal of Experimental Botany** 53(371): 1067-1079.

- Mauseth, J. D. (2003). Introduction to the Principles of Chemistry. *In: Botany: an introduction to plant biology*. 3rd Ed. **Jones and Bartlett Publishers**. London pp 18-51.
- Middendorf, P. J., Williams, P. L. (2000). Nephrotoxicity: Toxic Responses of the Kidney. *In: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. P. L., Williams, R. C., James, S. M., Roberts (Eds). **John Wiley and Sons, Inc.**, New York pp: 129-143.
- Mitchell, S. A., Ahmad, M. H. (2006). A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948-2001. **The West Indian Medical Journal** 55(4): 243-269.
- Nguema-Ona, E., Andeme-Onzighi, C., Aboughe-Angone, S., Bardor, M., Ishii, T., Lerouge, P., Driouich, A. (2006). The reb1-1 mutation of Arabidopsis. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. **Plant Physiology** 140: 1406-1417.
- Nishikawa, S., Yamashita, T., Imai, T., Yoshida, M., Sakuratani, Y., Yamada, J., Maekawa, A., Hayashi, M. (2010). Thesaurus for histopathological findings in publically available reports of repeated-dose oral toxicity studies in rats for 156 chemicals. **The Journal of Toxicological Sciences** 35(4): E1-E8.
- Oliveira, S. M. R. (2009) Efeitos das ceipselas de Cichorium intybus em ratinhos expostos a CCl₄. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro. 75pp.
- Ozsoy-Sacan, O., Karabulut-Bulan, O., Bolkent, S., Yanardag, R., Ozgey, Y. (2004) Effects of Chard (*Beta vulgaris* L. var cicla) on the Liver of the Diabetic Rats: A Morphological and Biochemical Study. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** 68(8) 1640-1648.
- Pérez, S., Rodriguez-Carvajal, M. A., Doco, T. (2003) A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. **Biochimie** 85: 109-121.
- Philippi, M. E., Duarte, B. M., Da Silva, C. V., De Souza, M. T., Niero, R., Cechinel Filho, V., Bueno, E. C. (2010). Immunostimulatory activity of Calophyllum brasiliense, Ipomoea pes-caprae and Matayba elaeagnoides demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells proliferation. **Acta Polonae Pharmaceutica** 67(1): 69-73.
- Pinto, J. S. R. O., Ação do extrato etanólico de Sarcocornia perennis, em ratinhos. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro. 71pp.
- Pristov, J. B., Mitrović, A., Spasojević, I. (2011) A comparative study of antioxidant activities of cell-wall polysaccharides. **Carbohydrate Research** 346: 2255-2259.
- Qiong, L., Jun, L., Jun, Y., Yin Zhu, Z., Xiaoyan, C., Mingliang, Y. (2011). The effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on the recovery of the male rat reproductive system and mating function damaged by multiple mini-doses of ionizing radiations. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 31(2): 286-294.

- Ramberg, J. E., Nelson, E. D., Sinnott, R. A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition Journal** 9: 54.
- Renard, C. M. G., Crépeau, M., Thibault, J-F (1999) Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. **European Journal of Biochemistry** 266: 566-574.
- Roberts, S. M., Adams, L. (2000). Immunotoxicity: Toxic Effects on the Immune System. *In: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. P. L. Williams, R. C. James, S. M. Roberts. **John Wiley and Sons, Inc.** New York pp: 189-206.
- Roberts, S. M., James, R. C., Franklin, M. R. (2000). Hepatotoxicity: Toxic Effects on the Liver. *In: Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. P. L. Williams, R. C. James, S. M. Roberts. **John Wiley and Sons, Inc.**, New York pp: 111-127.
- Rodrigues, S., Silva, H., Pereira, M. L. (2011). Avaliação terapêutica de *Inula crithmoides* L. em órgãos reprodutores de ratinhos expostos a tetracloreto de carbono. **CAPTAR** 3(1): 15-29.
- Rose, A. L., Hodgson, E. (2004). Metabolism of Toxicants. *In: A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson. **John Wiley and Sons, Inc.**, New Jersey pp: 111-148.
- Said, O., Fulder, S., Khalil, K., Azaizeh, H., Kassis, E., Saad, B. (2007) Maintaining a Physiological Blood Glucose Level with "Glucoselevel", A Combination of Four Anti-diabetes Plants Used in the Traditional Arab Herbal Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 5(4):421-428.
- Sakagami, H., Kushida, T., Oizumi, T., Nakashima, H., Makino, T. (2010). Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine. **Pharmacology and Therapeutics** 128: 91-105.
- Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., Fujisawa, S. (2005). Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. **Phytochemistry** 66: 2108-2120.
- Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., Bourgougnons, N., Aouni, M., (2008) Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. **Natural Product Research** 22(1): 53-65.
- Selgrade, M. K. (2004). Immunotoxicity. *In: A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson. **John Wiley and Sons, Inc.** New Jersey pp: 327-342.
- Selvendran, R. R., March, J. F., Ring, S. G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. **Analytical Biochemistry** 96(2): 282-292.
- Shyamal, S., Latha, P. G., Suja, S. R., Shine, V. J., Anuja, G. I., Sini, S., Pradeep, S., Shikha, P., Rajasekharan, S. (2010). Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. **Singapore Medical Journal** 51(4): 326-331.

Silva, V. A. M. (2009) Acção de extractos de *Pterospartum tridentatum* em ratinhos expostos a CCl₄. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro. 84pp

Thakur, M., Connellan, P., Deseo, M. A., Morris, C., Dixit, V. K. (2010) Immunomodulatory Polysaccharide from *Chlorophytum borivilianum* Roots. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2011: 1-7.

Xie, G., Schepetkin, I. A., Siemsen, D. W., Kirpotina, L. N., Wiley, J. A., Quinn, M. T. (2008). Fractionation and Characterization of Biologically-active Polysaccharides from *Artemisia tripartita*. **Phytochemistry** 69(6): 1359-1371.