



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ABORDAGEM FITOQUÍMICA, ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E ANATOMOPATOLÓGICOS DA
ATIVIDADE DE *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae)
EM CAPRINOS (*Capra hircus* L.1758).

KÉSIA ALCÂNTARA QUEIROZ PONTUAL

RECIFE - PERNAMBUCO
2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E ANATOMOPATOLÓGICOS DA
ATIVIDADE DE *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae)
EM CAPRINOS (*Capra hircus* L.1758).**

KÉSIA ALCÂNTARA QUEIROZ PONTUAL

**RECIFE - PERNAMBUCO
2006**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E ANATOMOPATOLÓGICOS DA
ATIVIDADE DE *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae)
EM CAPRINOS (*Capra hircus* L.1758).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor.

DOUTORANDA: Késia Alcântara Queiroz Pontual
ORIENTADOR: Francisco Feliciano da Silva – Dr. – DMV/UFRPE
CO-ORIENTADOR: Haroudo Satiro Xavier – PhD – DCF/UFPE

RECIFE - PERNAMBUCO
2006

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

P818a Pontual, Késia Alcântara Queiroz
Abordagem fitoquímica, aspectos clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos da atividade *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae) em caprinos (*Capra hircus* L., 1758) / Késia Alcântara Queiroz Pontual - 2006.
110 f. : il.

Orientador: Francisco Feliciano da Silva
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.390 896

1. Patologia animal
2. Caprino
3. Toxicologia animal
4. *Indigofera suffruticosa*
- I. Silva, Francisco Feliciano da
- II. Título

Marleide Guedes
Bibliotecária
CRB 1135



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ABORDAGEM FITOQUÍMICA, ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS E ANATOMOPATOLÓGICOS DA
ATIVIDADE DE *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae)
EM CAPRINOS (*Capra hircus* L.1758).

Tese de Doutorado elaborada por
KÉSIA ALCÂNTARA QUEIROZ PONTUAL
Aprovada pela
COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Feliciano da Silva – UFRPE/DMV - ORIENTADOR

Prof. Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira – UFBA/EMV/CLÍNICA E PATOLOGIA

Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier – UFPE/DCF/FARMACOGNOSIA

Prof^a. Dra. Míriam Nogueira Teixeira – UFRPE/DMV/CLÍNICA MÉDICA

Prof. Dr. Mário Martins Menezes – UFRPE/DMV/PATOLOGIA ANIMAL

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos – UFRPE/DMV/PATOLOGIA ANIMAL

*“...mas os que esperam no SENHOR renovam suas forças, sobem com asas como águias,
correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.”*

Isaias 40:31

*Dedico este trabalho àqueles que, por amor, foram
e são fonte constante de apoio e estímulo em todos
os momentos, minha família; especialmente à
minha mãe, Auristela Alcântara Queiroz, meu
exemplo de vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, que tem conduzido toda a história da minha vida com terna paciência e amor inesgotável, ensinando-me diariamente a ser sempre aprendiz.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária**, agradeço a oportunidade concedida para o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES**, pelo incentivo financeiro fornecido por meio da bolsa de estudos.

À **Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas**, pela cessão do Laboratório de Farmacognosia, para o processamento e análise fitoquímica do material vegetal.

Ao Professor Dr. **Francisco Feliciano da Silva**, que gentilmente aceitou o encargo da orientação, agradeço a confiança em mim depositada e os conhecimentos compartilhados.

Ao Professor PhD. **Haroudo Satiro Xavier**, que novamente contemplou-me com sua atenção, conhecimentos e amizade, proporcionando inestimável apoio na concretização de uma idéia.

Aos Professores da Área de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dr. **Mário Martins Menezes**, Dr. **Fernando Leandro dos Santos** e MSc. **Márcia de Figueiredo Pereira** pelo companheirismo, apoio e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa e nas análises histopatológicas.

Ao Professor Dr. **Carlos Hübinger Tokarnia**, que incentivou a realização desse trabalho sugerindo o estudo da *Indigofera suffruticosa* Mill. na economia animal.

Ao Professor Dr. **Glênio Cavalcanti de Barros**, pela oportunidade de orientação concedida, fundamental para meu ingresso neste Programa de Pós-Graduação.

À Professora Dra. **Míriam Teixeira Nogueira**, pela cessão do Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco e ajuda nos exames relativos à Patologia Clínica.

À Professora Dra. **Isabelle Meunier**, pela orientação do tratamento estatístico do trabalho e pelo carinho e atenção dispensados.

Aos Médicos Veterinários **Clécio Florêncio de Queiroz, Cícero Petrônio Lima e Adriano da Silva Carneiro** e aos acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, **Itamar Alves Torquato, Élton Figueirôa Medeiros de Souza e Rafaella Alves de Araújo Silva**, pelo cuidado, presteza e dedicação durante a fase experimental e laboratorial.

Aos amigos da Área de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, **Clébio Ferreira, Cristiana, Evani Araújo, Janaína Melo, José Guedes, Jovita Braga, Laurimar Thomé, Luciana Ramos e Marcos**, pelo afeto e companheirismo.

À todos, meus sinceros agradecimentos.

“O que nós aprendemos na vida, nós aprendemos dos outros”.

Gracian

SUMÁRIO

Páginas	
• RESUMO.....	xiv
• ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Índigo.....	21
2.2 <i>Indigofera suffruticosa</i> .Mill. (Fabaceae).....	28
2.2.1 Toxicologia.....	30
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Material vegetal.....	35
4.1.1 Abordagem fitoquímica de <i>Indigofera suffruticosa</i> .Mill.....	35
4.1.1.1 Pesquisa de açúcares redutores.....	39
4.1.1.2 Pesquisa de alcalóides.....	39
4.1.1.3 Pesquisa de cumarinas.....	39
4.1.1.4 Pesquisa de derivados cinâmicos.....	40
4.1.1.5 Pesquisa de fenilpropanoglicosídeos.....	40
4.1.1.6 Pesquisa de flavonóides.....	41
4.1.1.7 Pesquisa de glicosídeos cianogênicos.....	41
4.1.1.8 Pesquisa de indican.....	41
4.1.1.9 Pesquisa de de iridóides.....	41
4.1.1.10 Pesquisa de proantocianidinas.....	42
4.1.1.11 Pesquisa de saponósidos.....	42
4.1.1.12 Pesquisa de triterpenos esteróides.....	42
4.1.1.13 Pesquisa da atividade hemolítica de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.....	43
4.2 Animais e instalações.....	43
4.3 Protocolo de experimentação.....	44
4.4 Coleta das amostras biológicas.....	45
4.5 Análise cromatográfica de amostras biológicas (urina).....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Abordagem fitoquímica de <i>Indigofera suffruticosa</i> .Mill. (Fabaceae).....	50
5.2 Aspectos clínicos.....	53
5.2.1 Urinálise.....	54
5.2.2 Achados hematológicos.....	68
5.3 Alterações anatomopatológicas.....	87
5.3.1 Macroscopia.....	87
5.3.2 Microscopia.....	88
5.4 Análise cromatográfica das amostras biológicas (urina).....	95
6 CONCLUSÕES.....	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

Lista de quadro e tabelas

Quadro 01:	Demonstrativo das plantas que causam Anemia hemolítica..	25
Tabela 01:	Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a Abordagem fitoquímica da <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	37
Tabela 02:	Delineamento geral das doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> , administradas experimentalmente a caprinos (<i>Capra hircus</i> L. 1758), PE/Brasil, 2006.....	45
Tabela 03:	Demonstrativo da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos de folhas (EMF) e caule (EMC) de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. das Cidades de Passira, Recife e Venturosa PE/Brasil, 2006.....	50
Tabela 04:	Demonstrativo das médias dos parâmetros clínicos obtidos de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758) tratados experimentalmente com diferentes doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. (Fabaceae) PE/Brasil, 2006.....	54
Tabela 05:	Resultados da urinálise do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 01, tratado experimentalmente com extrato aquoso (10g/kg) de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	59
Tabela 06:	Resultados da urinálise do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 02, tratado experimentalmente com extrato aquoso (20g/kg) de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	60
Tabela 07:	Resultados da urinálise do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 03, tratado experimentalmente com extrato aquoso (30g/kg) de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	61
Tabela 08:	Resultados da urinálise do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 04, tratado experimentalmente com extrato aquoso (40g/kg) de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em dose única. PE/Brasil, 2006.....	62

Tabela 09:	Resultados da urinálise do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 05, tratado experimentalmente com <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. recém coletada (10g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	62
Tabela 10:	Resultados da sedimentoscopia do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 01, tratado experimentalmente com extrato aquoso de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. (10g/kg) pelo período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	64
Tabela 11:	Resultados da sedimentoscopia do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 02, tratado experimentalmente com o extrato aquoso de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. (20g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	65
Tabela 12:	Resultados da sedimentoscopia do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 03, tratado experimentalmente com extrato aquoso de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. (30g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	66
Tabela 13:	Resultados da sedimentoscopia do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 04, tratado experimentalmente com extrato aquoso de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. (40g/kg) em dose única. PE/Brasil, 2006.....	67
Tabela 14:	Resultados da sedimentoscopia do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 05, tratado experimentalmente com <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. recém coletada (10g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.....	67
Tabela 15:	Valores das médias dos eritrogramas referentes aos cinco caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758) antes do tratamento com diferentes doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	68
Tabela 16:	Valores do eritrograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 01, tratado com 10g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso por oito dias PE./Brasil, 2006.....	72
Tabela 17:	Valores do eritrograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 02, tratado com 20g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso por oito dias PE/Brasil, 2006.....	72

Tabela 18:	Valores do eritrograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso por oito dias PE./Brasil, 2006.....	73
Tabela 19:	Valores do eritrograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 04, tratado com 40g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso em dose única PE/Brasil, 2006.....	73
Tabela 20:	Valores do eritrograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 05, tratado com 10g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. recém coletada por oito dias. PE/Brasil, 2006.....	74
Tabela 21:	Valores das médias dos leucogramas referentes aos cinco caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758) antes do tratamento com diferentes doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	75
Tabela 22:	Valores do leucograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 01, tratado com 10g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.....	75
Tabela 23:	Valores do leucograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 02, tratado com 20g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.....	76
Tabela 24:	Valores do leucograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.....	76
Tabela 25:	Valores do leucograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 04, tratado com 40g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso em dose única. PE/Brasil, 2006.....	77
Tabela 26:	Valores do leucograma referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 05, tratado com 10g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. recém coletada por oito dias. PE/Brasil, 2006.....	77
Tabela 27:	Valores das médias da análise bioquímica referentes aos cinco caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758) antes do tratamento com diferentes doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	78

Tabela 28:	Valores da análise bioquímica referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 01, tratado com 10g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006.....	82
Tabela 29:	Valores da análise bioquímica referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 02, tratado com 20g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006.....	83
Tabela 30:	Valores da análise bioquímica referente ao caprino(<i>Capra hircus</i> L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006.....	83
Tabela 31:	Valores da análise bioquímica referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 04, tratado com 40g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso na dose única. PE/Brasil, 2006.....	84
Tabela 32:	Valores da análise bioquímica referente ao caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 05, tratado com 10g/kg de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. recém coletada durante oito dias. PE/Brasil, 2006.....	84
Tabela 33:	Demonstrativo da frequência dos corpúsculos de Heinz em hemácias de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados experimentalmente com diferentes doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill., em extrato aquoso e “in natura”. PE/Brasil, 2006.....	86
Tabela 34:	Demonstrativo das lesões microscópicas observadas em caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados experimentalmente com <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso e “in natura” . PE/Brasil, 2006.....	91

Lista de Gráficos

Gráfico 01: Demonstrativo dos valores das densidades urinárias obtidas nas primeiras coletas, durante oito dias, de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	56
Gráfico 02: Demonstrativo dos valores referentes ao pH urinário obtidos das primeiras coletas, durante oito dias, de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	57
Gráfico 03: Demonstrativo dos níveis de hemácias em hemogramas de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	69
Gráfico 04: Demonstrativo dos níveis de hemoglobina em hemogramas de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	70
Gráfico 05: Demonstrativo dos valores de hematócritos em hemogramas de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	70
Gráfico 06: Demonstrativo dos níveis de Volume Globular Médio (VGM) em hemogramas de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	71
Gráfico 07: Demonstrativo dos valores das Concentrações Hemoglobínicas Globulares Médias (CHGM) em hemogramas de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	71
Gráfico 08: Demonstrativo dos níveis séricos de uréia de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	79
Gráfico 09: Demonstrativo dos níveis séricos de creatinina de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	80

Gráfico 10: Demonstrativo dos níveis séricos da Gama Glutamil Transferase (GGT) de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	80
Gráfico 11: Demonstrativo dos níveis séricos da Aspartato Amino Transferase (AST) de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	81
Gráfico 12: Demonstrativo dos níveis séricos da Proteína Total (PPT) de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	81
Gráfico 13: Demonstrativo dos níveis séricos de albumina de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758), tratados com diversas doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. PE/Brasil, 2006.....	82

Lista de figuras

Figura 01:	Moléculas referentes ao indican (A), isatan A (B), isatan B (C), índigo (D) e indirubina (E).....	23
Figura 02:	Desenho esquemático de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.....	29
Figura 03:	Hábito de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill., Recife (Campus da UFRPE) PE/Brasil.....	36
Figura 04-A	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. com flores e sementes. PE/Brasil, 2006.....	49
Figura 04-B	Desenho esquemático de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill., coletada no Campus da UFRPE, demonstrando a disposição das folhas e frutos. PE/Brasil, 2006.....	49
Figura 05:	Co-cromatograma demonstrando a presença de glicose em EMF e EMC de <i>I. suffruticosa</i> Mill., oriundas dos municípios de Venturosa, Passira e campus da UFRPE, utilizando rhaminose e glicose como padrão. PE/Brasil, 2006.....	51
Figura 06:	Co-cromatograma demonstrando a presença de indican em EMF de <i>I. suffruticosa</i> Mill., oriundas dos municípios de Passira, campus da UFRPE e Venturosa, utilizando rhaminose e glicose como padrão. PE/Brasil, 2006.....	52
Figura 07:	Placa de petri com agar-sangue de caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) com fragmentos de papel de filtro embebidos em extratos hexânicos, AcOHt, metanólico e aquoso de <i>Indigofera suffruticosa</i> oriundos de Venturosa, Passira, Campus da UFRPE e amostra de saponina. PE/Brasil, 2006...	53
Figura 08	Amostras de urina de coloração esverdeada a amarelada, de caprinos (<i>Capra hircus</i> L., 1758) tratados com diferentes doses de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill. em extrato aquoso. PE/Brasil, 2006.....	55
Figura 09:	Corpúsculos de Heinz em hemácias do caprino (<i>Capra hircus</i> L., 1758) 02, tratado experimentalmente com 20g/kg/p.v. de <i>Indigofera suffruticosa</i> em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.....	85

- Figura 10: Ascite em caprino (*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de *Indigofera suffruticosa* na forma de extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006..... 87
- Figura 11: Tumefação, degeneração e necrose de hepatócitos em fígado de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 30g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006. 32x..... 92
- Figura 12: Tumefação, degeneração, necrose de hepatócitos e dissociação dos cordões hepáticos em fígado de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 30g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006. 40x..... 92
- Figura 13: Glomeruloesclerose e presença de cilindro hialino em rim de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 10g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006. 40x..... 93
- Figura 14: Reatividade do endotélio vascular em rim de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 20g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006. 40x..... 93
- Figura 15: Discreta hemossiderose em baço de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 10g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006. 40x... 94
- Figura 16: Degeneração testicular caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 10g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* “in natura” durante oito dias. PE/Brasil, 2006. 40x..... 94
- Figura 17: Co-cromatograma das amostras das urinas dos caprinos (*Capra hircus* L., 1758) 01, 02, 03, 04 e 05, relativas as coletas do 2^o, 5^o e 8^o dia em comparação com o padrão (extrato metanólico de *Indigofera suffruticosa* Mill) demonstrando mancha vermelho-tijolo referente ao derivado do indican. PE/Brasil, 2006..... 95

Lista de abreviaturas e siglas

μg	Micrograma
μl	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Centígrado
AcOEt	Acetato de etila
ACOH	Ácido acético
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
EMC	Extrato metanólico de caules
EMF	Extrato metanólico de folhas
g/kg/p.c.	Gramas por quilograma por peso corporal
H_2O	água
HCOOH	Ácido fórmico
IPA	Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
N-PROH	n-propanol
pc	Por campo
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UV	Ultra-violeta

Resumo

Realizou-se um estudo experimental sobre a atividade de *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae), administrando doses de 10, 20, 30, e 40g/kg/p.v., sob a forma de extrato aquoso a quatro caprinos (*Capra hircus* L.) e 10g/kg/p.v. da planta in natura" ao quinto animal. Todos os caprinos eram machos, sem raça definida, com cerca de um ano de idade. Os espécimes vegetais utilizados foram provenientes dos municípios de Venturosa, Recife e Passira, após análise fitoquímica, demonstraram semelhança sendo positiva a presença de indican, glicose e traços de proantocianidinas condensadas. Não houve manifestação de sinais clínicos ou ocorrência de óbito pela ingestão da planta. À urinálise, observou-se coloração esverdeada; aumento da densidade (>1040); presença discreta de proteína, sangue, e bilirrubina. Na sedimentoscopia, verificou-se principalmente, leucocitúria. No eritrograma pôde-se constatar anemia microcítica, ainda que discreta. As alterações necroscópicas consistiram de ascite, e discreta palidez renal. O exame histopatológico revelou as seguintes alterações: no fígado, tumefação e vacuolização de hepatócitos, necrose focal, dissociação de cordões hepáticos e congestão e destruição de sinusóides. Nos rins houve, degeneração e necrose do epitélio tubular, glomeruloesclerose e reatividade do endotélio vascular. No baço, discreta hemossiderose e nos testículos, degeneração. A leguminosa *Indigofera suffruticosa* foi hepatotóxica, nefrotóxica e causou degeneração testicular em caprinos (*Capra hircus* L., 1758).

ABSTRACT

An experimental study about the activity of *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae), was conducted, by administering doses of 10, 20, 30, and 40g/kg/p.v., of watery extract the of the plant to four goats (*Capra hircus* L.) and 10g/kg/p.v. of the plant “*in natura*” to the fifth animal. All the goats were male, with no specific race (NSR), and about one year old. Vegetal specimens were brought from the town of Venturosa, Recife and Passira, in after phytochemical analysis, plant from different sites showed similarities and were positive to indicant, glycosis and also had traces of condensed proanthocyanidins. There was neither manifestations of clinical signs not the occurrence of any death due to the plant ingestion. A greenish coloration was observed the urinalysis; as well as the increase in density (>1040); discrete presence of protein, blood and bilirubin. By the sedimentoscopy, leucocidin, haematuria, besides the presence of renal, urethral cells, cylinders and calcium and phosphate crystals were verified. By the erythroanalysis discrete microcitic anemia, was exhibited. necroscopy alterations consisted of ascites and discrete renal paleness. Histopathological examination the liver, had swelling tumefaction, and vacuolization of hepatocytes, necrotic areas, dissociation of hepatic cords and destruction of sinusoids, areas of congestion and sinusoidal congestion. In the kidneys, there was tubular lesion, degeneration and necrosis of tubular epithelium, glomerulosclerosis, and reactivity of vascular endothelium. The spleen showed discrete hemossiderosis and testicles had testicular degeneration. The leguminosae *Indigofera suffruticosa* was hepatotoxic, nephrotoxic and caused testicular degeneration in goat (*Capra hircus* L., 1758).

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem se firmado no mercado internacional como um importante produtor comercial de bovinos, porém, no senso agropecuário de 2004, o efetivo caprino alcançou a maior variação positiva do País em relação ao ano anterior, sendo que, 93% de um efetivo de 10.046.888 dos caprinos registrados no País está concentrado no Nordeste, principalmente nos Estados da Bahia e Pernambuco (IBGE, 2006). Em nosso Estado, o rebanho caprino encontra-se em maior concentração na região do sertão e, a despeito das pesquisas desenvolvidas no sentido de oferecer diversidade de vegetais forrageiros adaptáveis às condições edafoclimáticas que expressem resultado na produtividade, a maioria dos animais é cotidianamente exposta à vegetação nativa. Algumas espécies de *Indigofera* têm sido usadas para a alimentação animal pelo potencial forrageiro, dentre estas, *I. suffruticosa*, popularmente conhecida como anil, anil de bode, bananinha é uma leguminosa muito bem adaptada e difundida no sertão pernambucano. De boa palatabilidade, é comumente ingerida por bovinos e caprinos, especialmente quando há escassez de pasto. A informação de que a ingestão desta planta por bovinos induz à anemia hemolítica despertou o interesse de alguns pesquisadores sobre o seu potencial tóxico. Assim, foi comprovada nessa espécie, a toxicidade de *I. suffruticosa* através do tratamento experimental feito por Barbosa Neto et al. (2001). Não há, contudo, relatos bibliográficos sobre qualquer tipo de atividade deste vegetal na espécie caprina, dessa forma, desenvolveu-se esse estudo com o intuito de avaliar em caprinos, as possíveis alterações clínicas, laboratoriais e anatomopatológicas deflagradas pela ingestão experimental de *I. suffruticosa* nesta espécie e assim contribuir com o acervo de informações sobre as plantas que são naturalmente ingeridas por estes animais no sertão pernambucano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas são seres vivos complexos e seu formidável metabolismo desencadeia a produção de uma grande variedade de substâncias químicas (OLIVEIRA et al. 2003). Elas produzem metabólitos primários ou macromoléculas (lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos), essenciais a todos os seres vivos para a manutenção das células, e secundários ou micromoléculas, os quais são encontrados, geralmente, em baixas concentrações e atuam na defesa do vegetal como dissuasórios alimentares, sendo um bom exemplo os taninos, presentes em frutos verdes até o seu completo desenvolvimento e depois desaparece; saponinas, cumarinas, limonóides, quassinóides, lactonas sesquiterpênicas e iridóides, que devido ao sabor amargo desestimulam os herbívoros (STASI, 1996; SIMÕES et al., 2003).

Para Vickery & Vickery (1981), Osweiler (1998) e Oliveira et al. (2003), as toxinas parecem ser adjuvantes no mecanismo de sobrevivência da planta, por isso, muitas delas têm sabor amargo e desagradável (alcalóides) que induzem os herbívoros a evitar essas plantas que as contêm ou induzem acentuadas alterações fisiológicas que reduzem o desenvolvimento ou a sobrevivência de seus predadores.

Também ocorre a alelopatia, quando um vegetal compete com outro pelo fornecimento de água, luz e nutrientes e este fenômeno ocorre entre indivíduos da mesma espécie, notadamente quando há falta de água e/ou nutrientes e é denominado autotoxicidade ou autopatia (VON POSER et al., 1996). Sobre a quimiotaxonomia vegetal, foi observado que plantas diferentes nascidas em solos idênticos continham produtos diferentes, enquanto que, plantas análogas nascidas em solos diferentes formavam produtos análogos, o que significa que a composição química é também um caráter taxonômico (SIMÕES et al., 2003).

O metabolismo secundário diferencia-se do primário basicamente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo específico de determinados grupos, sendo a expressão da individualidade química e diferem

entre espécies qualitativa e quantitativamente. Estas substâncias podem estar presentes na planta o tempo inteiro ou apenas são produzidas mediante estímulos específicos, por isso, a regulação do metabolismo secundário depende da capacidade genética da planta em responder a estímulos internos ou externos e da existência desses estímulos no momento apropriado (SIMÕES et al., 2003).

Sob o ponto de vista pecuário, Melo (1998) e Tokarnia et al. (2000b), definiram planta tóxica como sendo aquela que, ao ser ingerida por animais domésticos de fazenda, em condições naturais, causa danos à saúde ou a morte, e Oliveira & Akisue (1997), acrescentam que todo vegetal é potencialmente tóxico (STASI, 1996; SIMÕES et al., 2003).

Embora muitas plantas sejam citadas como tóxicas, a margem de certeza sobre a toxicidade de uma planta é limitada porque há a interferência de diversos fatores como, estações do ano, condições ambientais, variedades e cultivares, além disso, para que um quadro tóxico seja estabelecido, é necessário que os mecanismos próprios de defesa de cada organismo sejam vencidos e, neste contexto, uma planta pode ser potencialmente tóxica e não provocar intoxicação, o que pode ser interpretado como ausência de toxicidade (RIET-CORREA et al., 1993; CHEEKE, 1998; TOKARNIA, et al., 2000a).

Com relação às condições que levam à intoxicação de animais, Riet-Correa et al. (1993) e Bastos et al. (1994) afirmam que, esta situação depende de fatores como variações de palatabilidade, já que algumas forrageiras, leguminosas e plantas invasoras são muito palatáveis e normalmente consumidas por animais, embora existam outras que, por sua pouca palatabilidade sejam ingeridas apenas em condições especiais. A fome é determinante para a indução a ingestão de plantas, mesmo aquelas com menor palatabilidade, quando há carência de forragem ou privação de alimentos, especialmente, porque alguns vegetais tóxicos permanecem verdes em épocas de estiagem. Vegetais podem ser ingeridos por desconhecimento, durante o transporte e acomodação em regiões onde há espécimes que não são habituais. Além disso, há o vício pelo gosto especial de

alguns vegetais; outros são ingeridos por estarem muito próximos ou associados, ou até mesmo fenados junto àqueles palatáveis (TOKARNIA et al., 2000b).

O acesso à plantas tóxicas, a dose e o período de ingestão fazem parte da toxicologia das plantas, uma vez que essas precisam ser ingeridas em quantidades suficientes para causar a toxicose e, em alguns casos, é necessário que esta ingestão seja contínua ou periódica. (TOKARNIA et al., 2000b).

Embora a possibilidade da existência de substâncias tóxicas em um vegetal seja limitada e a intoxicação ocorra sob determinadas condições, existe um elevado número de plantas com toxicidade documentada (CHEEKE, 1998). Várias dessas substâncias podem causar envenenamentos graves em animais domésticos quando ingeridas ou expostas ao contato com a pele (OLIVEIRA et al. 2003).

Quando, porém, uma planta é muito tóxica, rapidamente ela é identificada e erradicada. O mesmo não acontece com as plantas que contêm princípios com efeitos tóxicos de ação lenta e cumulativa no organismo dos animais. Neste último caso, a ingestão poderia levar os animais ao emagrecimento, aparecimento de lesões e morte ocasional, cuja ocorrência poderia ser atribuída a outras causas (BARBOSA et al., 1983).

Desta forma, a toxicidade de toda planta suspeita, deverá, conforme explicam Tokarnia & Döbereiner (1986), Tokarnia et al. (1989) e Tokarnia et al. (2000b), ter sua toxicidade comprovada experimentalmente na espécie animal que espontaneamente a ingere, e os resultados não devem ser extrapolados para outra espécie animal. A administração do material vegetal deverá ser feita por via oral, em virtude da variação da ação das substâncias tóxicas de acordo com a via de introdução no organismo.

Algumas vezes, diagnósticos incorretos têm sido aplicados, principalmente, quando ocorrem óbitos relacionados a etiologias obscuras e/ou na falta de uma causa justificável, dificultando a adoção de medidas profiláticas adequadas (TOKARNIA et al., 2000b). É importante diagnosticar correta e especificamente, isto é possível através da identificação do espécime, feita por médico veterinário que

conheça sobre plantas tóxicas e os quadros clínico-patológicos relacionados a cada uma delas, baseando-se no maior número de dados possível, na epidemiologia, presença da planta e na ocorrência dos fatores estresse e fome. Deve-se considerar, sobretudo o histórico, uma vez que, alguns animais morrem antes de manifestarem claramente os sintomas da doença, além da verificação de exames clínicos e achados necroscópicos (RIET-CORREA et al., 1993; TOKARNIA et al., 1979 e TOKARNIA et al., 2000b).

Tokarnia & Döbereiner (1986) concluíram que, para se chegar ao diagnóstico de intoxicação por plantas em bovinos e outros herbívoros, por vezes, é necessário recorrer a procedimentos laboratoriais para diferenciar de doenças causadas por outros agentes que promovem ação e sintomatologia semelhantes às das causadas pela planta tóxica.

Quanto ao conhecimento sobre plantas tóxicas, os seguintes aspectos são importantes: as perdas econômicas decorrentes das mortes ou a queda de produtividade dos animais (temporária ou permanente), e o domínio das informações básicas, dados, erros e confusões que existem sobre o tema intoxicações por plantas (TOKARNIA et al., 2000a).

Raiva, Botulismo e intoxicação por plantas são, no Brasil, as causas mais importantes de morte para bovinos, embora haja carência de dados sobre a frequência das causas de mortalidade de animais (TOKARNIA et al., 2000b). Riet-Correa & Medeiros (2001) afirmam que, é difícil estimar as perdas por morte de animais intoxicados por plantas, porém, sabe-se que, as perdas econômicas ocorrem de forma direta, por óbito, diminuição dos índices reprodutivos por abortos, infertilidade e malformações, redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações resultantes de doenças transitórias, como o aumento da susceptibilidade a outras doenças devido a depressão imunológica; e as perdas indiretas comportam os custos do controle de plantas nas pastagens, medidas de manejo para evitar intoxicações, utilização de cercas e pastoreio alternativo, aquisição de gado para reposição dos mortos, gastos relacionados ao

diagnóstico e tratamento dos animais afetados (RIET-CORREA et al., 1993; JAMES, 1994).

Alcântara & Butarah (1999) comentam que, nossos rebanhos normalmente alimentam-se de gramíneas tropicais, embora essas possuam baixo valor protéico e sofram estacionalidade, por isso, é aceitável que, em épocas críticas do ano, esta alimentação seja suplementada com leguminosas, as quais crescem em períodos secos por mais tempo que as gramíneas, possuem teores mais altos de proteínas por unidade e por área, apesar da massa seca ser bem menos expressiva que a das gramíneas e por isso, recomenda-se o uso de leguminosas arbustivas na formação de pastos mistos. Dentre essas forrageiras, alguns gêneros já são utilizados como *Cajanus*, *Desmanthus*, *Leucaena*, *Indigofera* e outros. As leguminosas do gênero *Indigofera* possuem altos teores de proteína, tolerância à seca, inundações e à salinidade dos solos e por isso foram consideradas promissoras como forrageiras ou como suplemento protéico na alimentação de ruminantes e não ruminantes (AYLWARD et al, 1987).

A *Indigofera endecaphylla* Jacq. ou *spicata*, tem sido utilizada como adubo verde, cobertura de solo, forragem verde, concentrado e pasto; a *Indigofera hirsuta*, desenvolve-se bem em solos arenosos e moderadamente pobres, vegetam em solos ácidos e em regiões baixas, pode estar presente como planta nativa e abundante em pastos naturais e de forma invasiva em pastos artificiais, como também é encontrada nos limites de cerrados e ladeando estradas (Alcântara e Butarah, 2004). Aylward (2005) ressalva que, a presença de substâncias deletérias em muitas espécies pertencentes ao gênero *Indigofera* tem limitado o uso dessas espécies como alimento.

2.1. Índigo

Espécies de *Indigofera* são conhecidas como produtoras de um pigmento denominado índigo (Figura 01 - D), considerado a mais importante tintura azul

para a humanidade desde a época pré-histórica (SIMON et al., 1984; KUN LESTARI, 1998; CLARK et al. 1993).

Os povos no mundo têm usado durante séculos o índigo de fontes naturais (*Indigofera*, *Polygonum*, *Lonchocarpus*, *Marsdenia*, *Strobilanthes* e *Isatis*) para colorir produtos têxteis e roupas. Na Europa medieval, uma grande indústria cresceu em torno da produção desse pigmento a partir da *Isatis tinctoria* (CLARK et al. 1993; FERREIRA et al., 2004), no entanto, no início do século XVII, esta a indústria declinou porque o índigo importado, obtido de espécies de *Indigofera*, especialmente a *I. tinctoria* L. e *I. suffruticosa* Mill., tinham superior qualidade e baixo preço. Este fato desencadeou o desaparecimento completo da *Isatis tinctoria*., mas, até a introdução do índigo sintético no mercado, este tipo de pigmento era obtido de plantas (KOKUBUN, 1998). A completa substituição comercial do índigo derivado de plantas pelo produto sintético ocorreu em meados de 1890 e demonstrou que houve pouco investimento em estudos científicos para a produção do índigo natural (HURRY, 1930; SCHMIDT, 1997; OBERTHÜR, 2004a).

Conforme Minami et al. (1996) e Minami et al. (1997) o índigo é um pigmento natural derivado do glicosídeo incolor da forma enólica do indoxil, o indican (Figura 01-A) sendo a *Isatis tinctoria* (nativa da Índia e Ásia) e a *Indigofera suffruticosa* (nativa da América Central e do Sul) as espécies mais conhecidas por contê-lo (PLANTS & TEXTILES, 2005).

Na busca dos precursores do índigo, em 1855, foi descrito um composto considerado idêntico ao precursor do índigo em *Indigofera* sp e *Polygonum tinctorium*, mas, só em 1900 foi estabelecida a estrutura do indican em *Indigofera* como indoxyl- β -D-glicosídeo (OBERTHÜR et al., 2004a).

Em 1967 foi relatado que, em *Isatis tinctoria*, o precursor do índigo era o indoxil-3-(5-ketogliconato), presente em maior quantidade, e o nome proposto para esta nova estrutura foi isatan B (Figura 01- c); em menor proporção, o indican também é um precursor na planta. Recentemente, isolou-se um precursor adicional, o isatan C, o qual ainda não tem uma estrutura definitiva proposta

(KOKUBUN, 1998; OBERTHÜR et al., 2004b). Lu (1986), Xia & Zenk (1992) consideram que o indol é o precursor na biossíntese do índigo.

Sabe-se que o material vegetal colhido em estado fresco contém precursores do índigo como o isatan B (*Isatis tinctoria* L.) e o indican (*Polygonum tinctorium* Ait.), os quais têm uma distinta sensibilidade às condições de estocagem e extração (SIMON et al. 1984; KUN LESTARI, 1998).

Independente do material vegetal, a química da extração do pigmento e preparação é similar. Após a coleta da planta, durante o estágio de fermentação, o glicosídeo do indoxil é convertido por hidrólise enzimática a indoxil que é oxidado pela exposição ao ar para “leuco-índigo” e então a indigotina (em *Isatis indigotica*). Como uma reação paralela durante a fermentação, o indoxil em excesso é oxidado a isatan que se condensa com mais indoxil para fornecer o pigmento rosa avermelhado, a indirubina (Figura 01 - E), cuja presença dá às tinturas do índigo um tom roxo (SIMON et al. 1984; KUN LESTARI, 1998; FERREIRA et al., 2004).

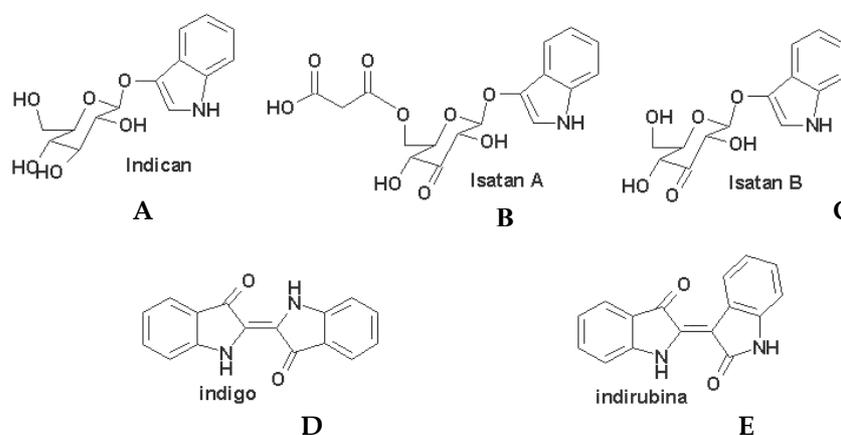


Figura 01: Moléculas referentes ao indican (A), Isatan A (B), Isatan B (C), índigo (D) e indirubina (E).

Chanayath et al. (2002), analisando a separação e estrutura química dos componentes do índigo, compararam aqueles predominantes nos pigmentos obtidos de *Indigofera tinctoria* Linn. e *Baphicacanthus cusia* Bremk. (BEN, 1981; TANG, 1987) e constataram que a maceração de folhas frescas destas plantas, por 24 horas, é a condição ótima para a extração efetiva do índigo. Os maiores componentes do extrato de índigo bruto dos dois tipos de plantas são os pigmentos azul (índigo) e seu isômero, o vermelho (indirubina), similar ao índigo azul na estrutura. A

Indirubina, também foi obtido de *Polygonum tinctoria* (MAIER et al., 1990; SHIN & LEE, 1993).

A indirubina tem aplicações terapêuticas. Em estudos experimentais, inibiu o carcinoma do pulmão de Lewis e o carcinosarcoma 256 de Walker em ratos. Em um estudo clínico, o tratamento de pacientes com Leucemia mielocítica crônica com indirubina e doses de magnésio 300-450 mg observou-se, diariamente, 26% de remissões completas e 33,4% de remissões parciais (INDIRUBIN COOPERATIVE GROUP, 1980). Também foi relatado que a indirubina obtida da *Indigofera tinctoria* pode ativar a imunidade celular e a adenosina monofosfato cíclica de leucócitos em pacientes com leucemia mielocítica crônica (HAN, 1994), embora o mecanismo de como a indirubina atua nas células imunocompetentes para regular funções fisiológicas não tenha sido esclarecido ainda (KUNIKATA et al., 2000).

Apesar das aplicações terapêuticas, sabe-se que o gênero *Indigofera* sp. também apresenta atividade tóxica. Hoehne (1939) descreve as *Indigoferas* brasileiras como “pequenos arbustos pluriramificados que medram em quase todos os recantos e, especialmente, nas imediações das cidades e vilas”. À época, se acreditava que o índigo ou indican era um alcalóide, insolúvel em água que podia ser facilmente obtido.

Na *Indigofera spicata* (*endecaphylla*), foi encontrado um componente tóxico, o ácido β -nitroprôpionico (COOKE, 1955). Atualmente, sabe-se que este espécime contém um aminoácido tóxico, a indospicina, que é estruturalmente similar à arginina e atua inibindo a incorporação da arginina às proteínas dos tecidos e causa lesões hepáticas como necrose e cirrose nodular em bezerros e ovelhas que consomem a planta (CHRISTIE et al., 1971; DEMUNK et al., 1972; CHEEKE, 1998). Também pode levar bovinos e outros animais ao óbito (FINNEGAN & MUELLER, 1965; MILLER & SMITH, 1973), tendo ainda atividade teratogênica (PEARN & HEGARTY, 1970).

Segundo Finnegan & Mueller (1965), Majak et al. (1992) e Garcez et al. (2003), o gênero *Indigofera* também contém ésteres de glucose de ácido 3-nitropropanóico (*I. oblongifolia*, *I. linnaei*, *I. suffruticosa*, *I. spicata* ou *endecaphylla*). Na *Indigofera*

linnaei, foram isolados três ésteres 3-nitropropanoila da β -D-glucose, a 1,2,6-tri-O-3-nitropropanoila- β -D-glucopyranose (karakin) e 2,3,4,6-tetra-O-3-nitropropanoila- α -D-glucopyranose, e 3, 4, 6-tri-O-3-nitropropanoila- α -D-glucopyranose. No estudo feito Garcez et al. (2003), foi descoberta a ocorrência dos compostos 2-4-nitropropanoico neste gênero. Esses compostos são conhecidos como tóxicos para animais de fazenda e insetos devido à sua conversão para ácido 3-nitropropanóico, uma toxina respiratória que inibe enzimas mitocondriais (ANDERSON et al., 1998).

Barbosa Neto et al. (2001), estudando a espécie *Indigofera suffruticosa* constataram que, em bovinos, a planta determina anemia hemolítica e hemoglobinúria, sendo esta enfermidade também determinada por outros vegetais. Cheeke (1998), relacionou as plantas que reconhecidamente causam anemia hemolítica em animais (Quadro 01).

Quadro 01 - Demonstrativo das plantas que causam Anemia hemolítica.

Nome científico	Nome popular	Princípio ativo	Referência bibliográfica
Acer rubrum	Ácer vermelho	não identificado	Osweiler (1998)
<i>Allium sp.</i>	Cebola	Dissulfeto de N-propila	Munday & Mans (1994) Osweiler (1998)
<i>Brassica sp.</i>	Repolho Nabo Couve-flor	Glucosinolatos e o aminoácido sulfoxido de s-metil cisteína	Eyre et al., 1983 Blood (1991)

No Brasil, além da *Indigofera suffruticosa*, a *Brachiaria radicans* e *Ditaxis desertorum* são conhecidas por causar a enfermidade hemolítica (TOKARNIA et al., 1997, BARBOSA NETO et al., 2001). Riet-Correa et al. (2001) relataram que *Brachiaria radicans* e *Ditaxis desertorum* afetam bovinos, ovinos, eqüinos e bubalinos e acrescentam que bovinos jovens parecem ser menos suscetíveis, sendo que os primeiros casos podem ocorrer 5 a 10 dias após o início do pastejo.

Anemia hemolítica é uma doença crônica, na qual se observa-se urina escura, micção freqüente e intermitente, taquipnéia, fezes escuras, pastosas ou semi-líquidas, mucosas pálidas, emagrecimento progressivo, andar cambaleante com perda de equilíbrio e ocasionalmente sialorréia. No hemograma e urinálise,

observa-se anemia hemolítica e hemoglobinúria respectivamente (RIET-CORREA et al., 2001).

A *Brachiaria radicans* é uma gramínea que além do princípio ativo responsável pela anemia hemolítica também possui alto teor de nitrato (ANDRADE et al., 1971), os achados de necropsia consistem em rins tumefeitos e de coloração marrom e a histopatologia revela congestão do tufo glomerular com ruptura de alguns capilares e presença de material eosinófilo de origem hemoglobínica nos espaços de Bowman e nos túbulos; nestes, há destruição do epitélio e deposição de pigmento sob forma de grânulos.

A *Ditaxis desertorum* (Euphorbiaceae) não tem nome popular e causou em caráter experimental, segundo Tokarnia et al. (1997), hemoglobinúria e anemia com doses diárias de 1,0 a 2,5g/kg/p.v. da planta fresca, a partir do quarto ao oitavo dia do início da administração. Três a cinco dias após a crise hemoglobinúrica, os sintomas desapareceram em alguns animais, embora esses continuassem a ingerir a planta, o fenômeno implicou numa rápida recuperação dos valores hemáticos. No animal que veio a óbito, observou-se à necropsia, mucosas esbranquiçadas, sangue aquoso, bexiga com urina cor de vinho tinto, rins aumentados de volume de coloração marrom-escura, esplenomegalia moderada e fígado de cor alaranjada com aspecto mosqueado. Na histopatologia, verificou-se nefrose hemoglobinúrica e distrofia hepática com necrose centrolobular e degeneração vacuolar periférica.

O diagnóstico da Anemia hemolítica deve ser baseado na constatação da hemoglobinúria, anemia e pela presença da planta. Não há tratamento específico, mas podem ser realizadas transfusões de sangue e soroterapia. Se os animais são retirados das pastagens, recuperam-se rapidamente (RIET-CORREA et al., 2001).

Carlton & McGavin (1998), relataram que as anemias podem ser induzidas por substâncias que inibem o metabolismo dos eritrócitos ou que causem desnaturação e precipitação da hemoglobina. O eritrócito, sendo uma célula anucleada, sobrevive pela produção contínua de ATP produzido pelo metabolismo da glicose e essa energia é necessária para manter o conteúdo de cátions do

eritrócito, o ferro na forma divalente, os grupos sulfidrila da hemoglobina, as enzimas na forma reduzida e a integridade da membrana. Essa última compreende uma camada dupla de lipídio onde certas proteínas estão ligadas, possui resistência e flexibilidade, ainda assim, um distúrbio nesse arcabouço complexo, pode provocar hemólise.

O metabolismo dos eritrócitos é capaz de neutralizar radicais tóxicos de oxigênio, pelo glutatión reduzido que impede a desnaturação da hemoglobina. A ingestão da substância deletéria agride oxidativamente os eritrócitos de animais pela sobrecarga desse ambiente de redução. A precipitação da hemoglobina instável no eritrócito é manifestada na forma de agregados densos e irregulares denominados corpúsculos de Heinz e a formação de metemoglobina parece ser um pré-requisito no desenvolvimento e precipitação de hemoglobina desnaturada. O resultado final é lesão eritrocitária com perda de cátions, da maleabilidade e fixação de imunoglobulinas à proteínas de membranas alteradas. Ocorre destruição eritrocitária mediada por macrófagos e hemólise intravascular (CHEVILLE, 1993; CARLTON & MCGAVIN, 1998).

Um aspecto importante no diagnóstico dessas anemias é a constatação da presença de corpúsculos de Heinz em eritrócitos, os quais são visíveis em esfregaços de sangue como protruções das células (CARLTON & MCGAVIN, 1998).

2.2 *Indigofera suffruticosa* Mill.

A *Indigofera suffruticosa* Mill. é uma Fabaceae, família com cerca de 12.000 espécies distribuídas em 482 gêneros presentes nas regiões tropicais e subtropicais, dos quais há descritos no Brasil, 88 gêneros nativos ou subespontâneos e 19 cultivados (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984).

Habita solos arenosos ao longo dos rios ou costa marítima associada a prados úmidos da planície. As espécies dessa família estão bem adaptadas as regiões semi-áridas, são pouco exigentes e crescem em solos pobres, ladeando estradas, em terras aráveis, solos com pH e fertilidade baixos, vegetando espontaneamente em quase toda parte, principalmente nas imediações de cidades. (BRAGA, 1976; ALLEN & ALLEN, 1981; BARROSO, 1984; IZAGUIRRE & BEYHAUT, 1998).

Etimologicamente *Indigofera* vem do grego *Indikon* (da Índia) e do latim *fera* (planta), segundo Genaust (2005). Essa leguminosa tem como sinonímia *Indigofera anil*, *Anila tinctoria Vera* Kuntze, *I. comezuelo* Moç. & Sessé ex DC, *I. divericata* Jacq., *I. drepanocarpa* Berg, *I. Guatemala* Lunan, *I. tinctoria* Mill., *I. uncinata* G. Don, sendo popularmente conhecida, em inglês, como wild índigo, guatemala índigo, leaved índigo (Sierra Leone), west. Indian índigo, em francês é chamada de indigotier sauvage, em alemão, westin discher índigo, hindi-vilaitinil (Malay-tarum), em espanhol, añil, añil amarrón (Antilhas - América Central), azul azulejo (Antilhas - América Central), azul de hoja, jiquelite (Antilhas - América Central), na Colômbia é platanito de tinto e em português, anil, anil de pasto, anil-dos-tintureiros, Anileiro. (BAHIA, 1979; HOWARD, 1988 e LIOGIER, 1990).

É descrita como um arbusto perene que alcança 1 a 2 m de altura e 1 a 2 cm em diâmetro no caule (Figura 02). O arbusto pode ter talos múltiplos, especialmente, se foi agredido por pastejo ou fogo. Os caules são cinza-marrons, as folhas verdes claras, são pinadas, com 7 a 15 folíolos oblongos ou ovais glabros na face e no verso, 1,5 a 2,5 cm de comprimento e aproximadamente 9 mm de largura. As flores são miúdas, numerosas, albo-róseas ou amareladas, em ráceros axilares.

Possui pequenas vagens encurvadas com 6 - 10 sementes. Não tolera sombra nem cresce em matas fechadas (BRAGA, 1976; HOWARD, 1988; LIOGIER, 1990).

Em regiões temperadas, cresce da primavera ao outono, produzindo flores na primavera e frutos maduros no verão (ALLEN & ALLEN, 1981; IZAGUIRRE & BEYHAUT, 1998).



Indigofera suffruticosa Mill.
Image processed by Thomas Schoepke
www.plant-pictures.de

Figura 02: Desenho esquemático de Indigofera suffruticosa Mill.

É nativa nos Estados Unidos meridional, na América do Sul tropical, subtropical e nas ilhas caribenhas. Foi naturalizada no Havaí e está presente na Samoa americana, em Guam, grupos de ilhas no pacífico. Está distribuída na América tropical, Argentina subtropical, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, foi encontrada em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul (GARCEZ et al, 2003), é reconhecida como planta invasora bem adaptada às condições do Nordeste e, há relatos que no Estado da Bahia, *I. suffruticosa* está difundida, sendo utilizada como suplemento protéico por produtores rurais (NEAL, 1965; HOWARD, 1988; BATATINHA et al., 1994; BARBOSA et al, 2001).

A planta tem sido utilizada como fitoterápico no tratamento de infecções (ALI et al., 1999 e DAHTO, 1999), inflamação (BHASKAR et al., 1982; LEITE et al., 2003) e

outras enfermidades como a epilepsia humana (ROIG, 1974; ANAND et al, 1979) e modelos animais (MC NAMARA, 1984; ALEJO et al., 1996 e WONG et al, 1999). Na medicina tradicional da Índia e China, o índigo foi usado no tratamento de epilepsia, bronquite, hepatites e doenças psiquiátricas, embora não haja evidência científica real para estas aplicações (ANAND et al, 1979). No Brasil, a planta tem sido usada como infusão ou decoção (MATOS, 1999). Alejo et al. (1998), acrescentam ainda que um dos metabólitos mais abundantes do extrato aquoso de *I. suffruticosa* são os flavonóides os quais têm atividade antiinflamatória. Dominguez et al. (1978), estudando a fitoquímica de *I. suffruticosa* no México, encontrou uma flavona denominada louisfieserone, a qual demonstrou atividade antibiótica para bactérias gram-positivas e negativas.

Em anos de boa pluviosidade, *Indigofera suffruticosa* aparece em quantidade suficiente para provocar surtos de intoxicação, a qual determina em bovinos, anemia hemolítica e hemoglobinúria. Há prejuízo econômico relacionado com a perda de peso, queda na produção de leite dos animais acometidos e com o tratamento. Muitos criadores mencionaram que alguns animais abortam, mas este fato ainda não foi comprovado (BARBOSA et al., 1983).

2.2.1 Toxicologia

Leite (2003) fez um ensaio preliminar de toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa* utilizando doses de 50, 150, 300, 600, 1.200 e 2.000 (mg/kg/p.v.) em camundongos, por via intra-peritoneal e não conseguiu determinar a DL_{50} , porque não houve índice de mortalidade durante as 72 horas de observação. Nessas condições, a autora considerou o extrato aquoso de *I. suffruticosa* praticamente atóxico. Porém, Ferraz et al. (1998) ressalta que, o mecanismo de ação das substâncias encontradas nesses vegetais não foi totalmente elucidado e há poucos estudos desenvolvidos no sentido de avaliar os efeitos desses extratos e princípios ativos, especialmente com relação à toxicidade.

Ribeiro et al. (1991) observaram efeito hepatotóxico em camundongos expostos intraperitonealmente ao extrato aquoso dos frutos de *I. suffruticosa*. Em relação ao efeito toxicogenético, apenas o grupo tratado com 12,5% da dose tóxica demonstrou significância estatisticamente, em virtude do incremento a frequência de células com aberrações cromossômicas. Por isso, o autor recomenda que antes da utilização da planta como alimento para gado, seja feita uma avaliação cuidadosa.

Barbosa Neto et al. (2001), investigando a informação de que a *I. suffruticosa* Mill era incriminada por criadores de diversas áreas do Nordeste como causadora da uma doença caracterizada por hemoglobinúria em bovinos, fizeram um estudo experimental nessa espécie animal, utilizando partes aéreas da planta, administrando doses de 10, 20, 30 e 40g/kg/p.v. em doses diárias e constataram que, apesar da continuidade da administração da planta, a hemoglobinúria é transitória, mas acompanhada de apatia, mucosas visíveis de coloração esbranquiçada, pelos arrepiados, anorexia, diminuição da frequência e intensidade dos movimentos ruminais, taquicardia, pulso venoso positivo e dispnéia. Acrescentaram ainda que, antes da crise hemolítica, a urina apresentava coloração verde azulada e, a despeito da crise hemoglobinúrica, nenhum animal veio a óbito durante o experimento.

Blankenship (2001), também intoxicou experimentalmente um bezerro com 40g/kg/p.v. de partes aéreas da *Indigofera suffruticosa*. Vinte e duas horas após a ingestão, o animal desenvolveu hemoglobinúria que persistiu até o quinto dia. Outros sinais clínicos incluíram apatia, mucosas pálidas, anorexia, decréscimo da frequência e intensidade dos movimentos ruminais, marcada taquicardia com distúrbios na frequência e intensidade dos movimentos respiratórios. Antes da crise hemolítica, a urina apresentou cor azul ou verde e tornou-se vermelho-vinho após deflagrada a hemólise. A mucosa prepucial ficou azulada por causa da excreção do pigmento azul presente na planta.

Dos animais eutanasiados no estudo de Barbosa Neto et al. (2001), observou-se à necropsia palidez, bexiga com urina cor de vinho tinto, rins aumentados de

volume de coloração marrom-escuro, fígado com parênquima de coloração azulada e lobulação perceptível. Blankenship (2001), também verificou achados semelhantes em seu experimento, acrescentando que o fígado tinha coloração azulada na superfície capsular e ao corte.

A histologia revelou alterações no fígado sob a forma de necrose coagulativa e predominou a tumefação e/ou microvacuolização citoplasmática dos hepatócitos. No rim, acentuada nefrose associada a grande quantidade de filtrado e/ou hemoglobina nos espaços de Bowman dentro de túbulos e do citoplasma das células epiteliais (BARBOSA NETO et al., 2001). Blankenship (2001) observou que os principais achados histopatológicos estavam nos rins e fígado, onde se encontrou necrose coagulativa centrolobular caracterizada pelo citoplasma acidófilo e picnose e cariorrexia. Também foi observada estase biliar. As lesões hepáticas e degenerativas foram atribuídas a anoxia decorrente da anemia. Nos rins degeneração do epitélio tubular, proteinose (hemoglobina) e gotas hialinas no citoplasma do epitélio tubular (nefrose hemoglobinúrica). Nos rins existiam degeneração e necrose das células do epitélio tubular associadas com grandes quantidades de filtrado proteináceo (hemoglobina) no espaço urinário e luz tubular. Grande número de depósitos hialinos foi observado no citoplasma das células epiteliais.

Ao final do experimento, Barbosa Neto et al. (2001) concluíram que *I. suffruticosa* causa enfermidade hemolítica não fatal para bovinos, verificaram queda acentuada no hematócrito (até 8%), hemoglobina em torno de 2g/dl e o número de hemácias abaixo de $2,0 \times 10^6 / \text{mm}^3$. Ficou evidente a recuperação dos animais apesar dos mesmos continuarem a receber a planta e Blankenship (2001), pôde constatar que *Indigofera suffruticosa* em bovinos é caracterizada pela anemia macrocítica hipocrômica com sinais de intensa regeneração medular. Os sinais clínicos descritos para a intoxicação são compatíveis com um processo hemolítico intravascular.

Após a descoberta do índigo sintético, o interesse sobre esta planta reduziu bastante, havendo poucos dados sobre a sua fitoquímica. Atualmente, sabe-se que

Indigofera suffruticosa Mill. tem sido utilizada na medicina chinesa, suscitando assim o interesse de alguns pesquisadores. No que concerne à Medicina Veterinária, os relatos existentes a incriminam como tóxica para bovinos, por isso, a proposta desse estudo foi verificar a atividade da planta em caprinos, uma vez que, como planta invasora, adaptada ao clima e solo pernambucano, é uma leguminosa prolifera, participando do pasto nativo ao qual esta espécie animal está exposta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as alterações clínicas, laboratoriais e anatomopatológicas resultantes da atividade de *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae) em caprinos (*Capra hircus* L. 1758) experimentalmente tratados.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar, através da prospecção fitoquímica, os espécimes de *Indigofera suffruticosa* Mill., originários dos municípios de Venturosa, Passira e Recife, todos em Pernambuco;
- Verificar os sintomas, alterações urinárias e hematológicas evidenciadas na espécie caprina advindas da ingestão de *Indigofera suffruticosa* Mill.;
- Detalhar as alterações morfológicas macroscópicas e microscópicas resultantes da atividade de *Indigofera suffruticosa* sobre os tecidos dos caprinos experimentais;
- Averiguar se *Indigofera suffruticosa* Mill., administrada na forma de extrato aquoso e “in natura”, tem atividade tóxica sobre a espécie caprina;
- Constatar, através da cromatografia em camada delgada, se ocorre a presença do indican ou de seus derivados na urina dos animais experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foi feita a análise fitoquímica de *Indigofera suffruticosa*; a experimentação animal com a administração de diferentes doses da planta na forma de extrato aquoso e “in natura” a caprinos (*Capra hircus* L. 1758), e a coleta de amostras biológicas dos animais quando em experimentação (urina e sangue) e fragmentos de órgãos obtidos após o óbito, para análises laboratoriais, além de análise cromatográfica da urina dos animais experimentais.

4.1 Material vegetal

As análises fitoquímicas foram efetuadas com material originário dos municípios de Venturosa, Passira e Recife (*campus* da UFRPE), Pernambuco, Brasil, constituindo-se das sumidades floridas recentemente coletadas de indivíduos adultos. Amostras testemunhas dos espécimes foram processados consoante técnica usual de herborização (MORI et al., 1986). Encaminhou-se um exemplar do espécime vegetal, contendo partes aéreas (caule, folha, flor e fruto) ao herbário Dárdano de Andrade Lima na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), o qual foi registrado sob o nº 25/2005 sendo identificado como *Indigofera suffruticosa* Mill., (Figura 3).

As análises fitoquímicas da planta foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1.1 Abordagem fitoquímica de *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae).

O material vegetal foi processado de acordo com os procedimentos do Laboratório de Farmacognosia, os quais estão fundamentados nos estudos de Markham (1982), Wagner (1996) e Harborne (1998) e consistiram da extração por infusão metanólica (20ml) de aproximadamente cinco gramas de folhas e caules de

Indigofera suffruticosa Mill. recentemente coletadas, finamente fragmentadas em microprocessador doméstico, aplicando-se alíquotas (15 µl) dos extratos em placas prontas de gel de sílica¹, empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores apropriados (Tabela 01), conduzindo à prospecção de alcalóides, polifenóis (cumarinas, glicosídeos de fenilpropanóides, flavonóides, proantocianidinas, derivados cinâmicos e taninos gálicos), terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides), esteróides, iridóides, saponósidos, glicosídeos cianogênicos e açúcares redutores, utilizando-se reveladores adequados e observação em câmara ultra-violeta² (UV), para a visualização das manchas cromatográficas referentes às substâncias de interesse.

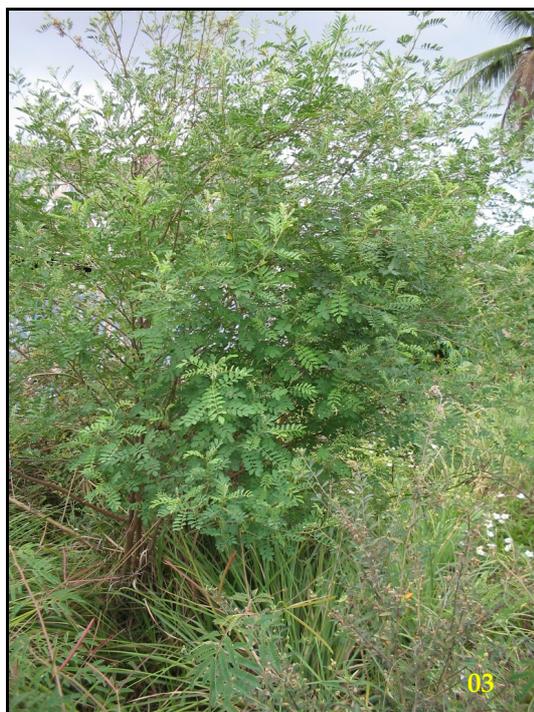


Figura 03: Hábito de *Indigofera suffruticosa* Mill., Recife (Campus da UFRPE) PE/Brasil, 2006.

¹ Alugram® SIL G/UV254 art. nr 818133. Germany.

² Chromato – v.h. Ultra-Violet products, inc, USA

Tabela 01. - Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a Abordagem fitoquímica da *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

Metabólitos	Fase móvel	Reagente	Referência
Açúcares redutores	ACOEt - N-PROH - H ₂ O (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v)	NEU	Wallenfels (1950)
Alcalóides	ACOEt - N-PROH - H ₂ O (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v)	Dragendorff	Wagner (1996)
Cumarinas	Éter-tolueno- ACOH (50 : 50 : 50 v/v)	U.V.	Robertson (1956)
Derivados cinâmicos	ACOEt - HCOOH - ACOH - H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	NEU	Wagner (1996)
Fenilpropanoglicosídeos	ACOEt - HCOOH - ACOH - H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	NEU	Wagner (1996)
Flavonóides	ACOEt - HCOOH - ACOH - H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	NEU	Markhan (1982) Neu (1956)
Glicosídeos cianogênicos	Reação com tiras de picrato de Na sob aquecimento		Harborne (1998)
Indican	ACOEt - HCOOH - ACOH - H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	HCl a 5%	Öbertur (2004a)
Iridóides	ACOEt - HCOOH - ACOH - H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	Vanilina sulfúrica	Wagner (1996)
Proantocianidinas	ACOEt - HCOOH - ACOH - H ₂ O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	Vanilina clorídrica	Robertson (1956)
Saponósidos	afrogenicidade	-	Costa (2000)
Triterpenóides e Esteróides	ACOEt - C ₇ H ₈ (20 : 80 v/v)	Lieberman Burchard	Sharma (1991)

Drogas e reagentes usados na abordagem fitoquímica

- ✓ β Amirina P.A. (MERCK)
- ✓ β Sitosterol P.A. (MERCK)
- ✓ Acetato de etila P.A. (MERCK)
- ✓ Acetona P.A. (REAGEN)
- ✓ Ácido acético P.A. (MERCK)
- ✓ Ácido clorídrico P.A. (REAGEN)
- ✓ Ácido fórmico P.A. (MERCK)
- ✓ Ácido gálico P.A. (MERCK)
- ✓ Ácido ursólico (EXTRASYNTESE)
- ✓ Ácido sulfúrico P.A. (MERCK)
- ✓ Água destilada P.A. (MERCK)
- ✓ Anidrido acético P.A. (MERCK)
- ✓ Anisaldeído (FLUKA)

- ✓ Benzeno P.A. (MERCK)
- ✓ Butanol P.A. (MERCK)
- ✓ Clorofórmio P.A. (MERCK)
- ✓ Difenil Boriloxietilamina P.A. (FLUKA)
- ✓ Éter Dietílico P.A. (MERCK)
- ✓ Formol P.A. (MERCK)
- ✓ Metanol P.A. (MERCK);
- ✓ N-propanol P. A. (MERCK)
- ✓ Saponina (MERCK);
- ✓ Tampão fosfato pH = 5 P.A. (MERCK);
- ✓ Tolueno P.A. (MERCK);
- ✓ Vanilina P.A. (CARLO ERBA);

Equipamentos

- ✓ Balança eletrônica de precisão GEHAKA mod. BG 1000;
- ✓ Balança Semi-analítica FILIZOLA mod. p/ 5 Kg;
- ✓ Bomba de vácuo;
- ✓ Câmara fotográfica digital Sony Cyber shot DSC P43
- ✓ Câmara Ultra-violeta (250 - 365 nm) CHROMATO-VUE;
- ✓ Estufa Precision Thelco Model 18;
- ✓ Multiprocessador ARNO;
- ✓ Rotavapor BUCHI INSTRUMENTS 5060 – CV.

Outros

- ✓ Borrifadores para revelação em CCD;
- ✓ Colunas cromatográficas;
- ✓ Cubas cromatográficas para CCD;
- ✓ Placas cromatográficas MERCK Art. 015533;

4.1.1.1 Pesquisa de açúcares redutores

Alíquotas de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia com glicose e fucose, empregando-se uma mistura de ACOEt - n-PROH - H₂O (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v). A revelação do co-cromatograma foi efetuada com aplicação de cloreto de Trifeniltetrazólio, seguido de aquecimento em estufa (100 °C) durante 5 minutos. O surgimento de manchas com coloração vermelha evidenciaria a presença de açúcares redutores, utilizando-se como padrão glicose e rhaminose.

4.1.1.2 Pesquisa de alcalóides

Frações dos extratos metanólicos das folhas (EMF) e caules (EMC), foram submetidas à co-cromatografia em camada delgada (CCD), tendo como fase móvel uma mistura de ACOEt - N-PROH - H₂O (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v), os cromatogramas foram revelados com o reagente de Dragendorff. A detecção da presença de alcalóides está relacionada ao surgimento de fortes manchas de coloração alaranjada semelhantes a pilocarpina, usada como padrão (WAGNER, 1996).

4.1.1.3 Pesquisa de cumarinas

As amostras de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia, empregando-se uma mistura de éter-tolueno-AcOH 10 % (50 : 50 : 50 v/v), em seguida, observando-se em câmara de U.V.(365 nm). Manchas de fluorescência azul foram usadas como critério de evidência da presença de cumarinas em comparação com o padrão utilizado, a umbeliferona.

4.1.1.4 Pesquisa de Derivados cinâmicos

As amostras de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia com verbascosideo empregando-se uma mistura de ACOET - HCOOH - ACOH - H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) como fase móvel, revelando-se o cromatograma por observação em câmara ultra-violeta (UV a 365 nm) seguindo-se de aplicação do reagente NEU, e nova observação sob luz UV, utilizando-se o ácido clorogênico como padrão, onde as manchas de fluorescência azul claro que passam a azul intenso após a aplicação do reagente, eram consideradas a evidência da presença de derivados cinâmicos.

4.1.1.5 Pesquisa de fenilpropanoglicosídeos

As amostras de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia (CCD) com verbascosideo empregando-se uma mistura de ACOET - HCOOH - ACOH - H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v) como fase móvel, revelando-se o cromatograma por observação em câmara ultra-violeta (UV a 365 nm) seguindo-se de aplicação do reagente NEU, e nova observação sob luz UV, onde as manchas de fluorescência azul claro que passam a verde-limão após a aplicação do reagente, eram consideradas a evidência da presença de glicosídeos de fenilpropanóides.

4.1.1.6 Pesquisa de flavonóides

Alíquotas de EMF e EMC foram submetidas à CCD, empregando-se uma mistura de ACOET - HCOOH - ACOH - H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v), revelando-se o cromatograma com o reagente de NEU (difetilboriloxietilamina), procedendo-se a observação em câmara de U.V. (365 nm). Manchas de fluorescência alaranjada, amarela, vermelha ou verde, consoante o esqueleto molecular, foram usadas como critério para a constatação da presença de flavonóides.

4.1.1.7 Pesquisa de glicosídeos cianogênicos

Foram tomados 1g de folhas jovens de macaxeira (*Manihot utilissima* POHL.), 1g de folhas jovens e 1g de caule e 1g de *Indigofera suffruticosa* Mill., finamente repicadas e acondicionadas individualmente em tubos de ensaios, os quais foram vedados com tampa às quais ficavam presas, tiras de papel de picrato de sódio. Os tubos foram mantidos em banho-maria a uma temperatura de 45^oC durante 40 minutos, para que fosse observada ou não a mudança de coloração da tira. A coloração avermelhada é o indicativo de positividade.

4.1.1.8 Pesquisa de indican

Alíquotas de EMF e EMC foram submetidas à CCD, empregando-se uma mistura de ACOET - HCOOH - ACOH - H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v), a presença de coloração vermelha após imediata revelação com ácido clorídrico a 5% em MEQH foi usado como critério determinante da existência de indican.

4.1.1.9 Pesquisa de iridóides

Alíquotas de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia com padrão de ipolimida, empregando-se como fase móvel uma mistura de ACOET - HCOOH - ACOH - H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v), revelando-se com vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento em estufa a 100^oC, durante 5 minutos. O surgimento de manchas com coloração violeta foi usado como critério diagnóstico da presença de iridóides.

4.1.1.10 Pesquisa de proantocianidinas

Alíquotas de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia, utilizando-se o extrato metanólico de *Sterculia foetida* como padrão, empregando-se uma mistura de $ACOEt - HCOOH - ACOH - H_2O$ (100 : 11 : 11 : 26 v/v), a presença de coloração vermelha após imediata revelação com vanilina clorídrica foi usada como critério determinante da existência de proantocianidinas condensadas (R_f próximo ou coincidente com o ponto de aplicação) e leucoantocianidinas (R_f próximo ao “front”).

4.1.1.11 Pesquisa de saponósidos

Alíquotas de 100 mg de extrato de EMF e EMC foram colocadas em tubos de ensaio, diluídas com água destilada e submetidas ao teste de afrogenicidade, onde as soluções previamente submetidas a forte agitação manual por cerca de 30 trinta segundos, foram em seguida mantidas em repouso, observando-se a consistência e a persistência da espuma produzida por cada amostra. A persistência de espuma abundante por mais de 15 minutos era o indicativo usado à constatação da presença de saponósidos (COSTA, 2001).

4.1.1.12 Pesquisa de triterpenóides e esteróides

Amostras de EMF e EMC foram submetidas à co-cromatografia com, $\acute{A}c$. Ursolico, β -amirina e β -sitosterol, empregando-se uma mistura de $AcOEt - C_7H_8$ (20 : 80 v/v). A revelação foi feita com o reagente de Liebermann-Burchard (SHARMA, 1991), seguido de aquecimento em estufa (100 °C), por 5 minutos. Procedendo-se a visualização do cromatograma no visível e em câmara de u.v. (365 nm). O surgimento de manchas com coloração levemente rósea a avermelhada foi usado como critério de evidência da presença de triterpenóides e esteróides.

4.1.1.13 Pesquisa da atividade hemolítica de *Indigofera suffruticosa* Mill. *in vitro*

Em virtude da planta causar, em bovinos, anemia hemolítica e hemoglobinúria, desenvolveu-se um ensaio para a observação da atividade hemolítica “in vitro”. Utilizaram-se extratos hexânicos, metanólicos, aquosos e acetato de etila, de *Indigofera suffruticosa* Mill., segundo a técnica proposta por Aldea (1945). Dissolveu-se em salina (NaCl 0,9%), quatro gramas de gelatina, aquecendo a temperatura de 40°C. Pronta a suspensão, deixou-se esfriar a 35°C, quando foi incorporado a suspensão de hemácias, obtida de sangue de caprino e desfibrinada pela agitação com microesferas, A gelatina foi espalhada em placas de petri, nas quais incluiu-se fragmentos de papel de filtro embebidos com diversos extratos da planta e uma amostra padrão com solução de saponina³, a qual, promove hemólise. Deixou-se descansar por 24 horas e após esse período, observou-se a ocorrência ou não de halos em torno das amostras da planta. O halo límpido semelhante ao produzido pelo padrão saponina, era o indicativo de positividade.

4.2 Animais e instalações

O protocolo de experimentação foi desenvolvido no aprisco do Departamento de medicina veterinária (DMV) da universidade federal rural de pernambuco (UFRPE). Seis caprinos (*Capra hircus* L. 1758), machos, mestiços e clinicamente sadios, com aproximadamente um ano de idade foram manipulados na experimentação. Os animais passaram por um período de adaptação ao ambiente por quinze dias, sob as mesmas condições higiênico-sanitárias. Nesta fase, procedeu-se a aferição de pesos e a identificação individual foi feita pelas características da pelagem. A alimentação consistiu de feno de capim tifton⁴ (*Cynodon* spp.) e água *ad libitum*.

³ Merck art. 7695

⁴ Laranjeiras

4.3 Protocolo de experimentação

A abordagem clínica dos animais foi efetuada segundo as recomendações de Rosenberger (1983), Blood (1991) e Smith (1993), consistindo em exames diários do comportamento geral, da avaliação do estado de higidez, da aferição e anotação das funções vitais como temperatura, frequência cardíaca, observação dos movimentos respiratórios e ruminais; exame do globo ocular, para observação da coloração da mucosa e vasos episclerais; da avaliação dos linfonodos superficiais e grau de desidratação.

Em virtude da dificuldade da obtenção da planta em áreas próximas ao local da experimentação em quantidades suficientes, quatro dos cinco animais experimentais (01, 02, 03 e 04) ingeriram o extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* Mill., coletada em Venturosa, por sonda orogástrica, sendo este material vegetal pesado de acordo com o tratamento pré-estabelecido para os animais experimentais, acondicionado em sacos plásticos e conservados sob refrigeração, sendo trituradas com água em processador doméstico momentos antes da administração.

A três animais (01, 02 e 03) administrou-se o extrato aquoso de *I. Suffruticosa* durante oito dias, as doses de 10, 20 e 30g/kg respectivamente. Ao quarto animal, 40g/kg em uma única dose; o quinto animal ingeriu 10g/kg de folhas “in natura” recém coletadas no Campus da UFRPE durante oito dias consecutivos, o sexto animal, considerado controle, alimentou-se exclusivamente de feno e água a vontade (Tabela 02).

O modelo experimental escolhido está fundamentado nos experimentos realizados por Barbosa Neto et al. (2001), o qual, estudando os efeitos da *Indigofera suffruticosa* Mill. em bovinos, utilizou doses diárias de 10 a 40g/kg/p.v.

Tabela 02: Delineamento geral das doses de *Indigofera suffruticosa*, administradas experimentalmente a caprinos (*Capra hircus* L. 1758), PE/Brasil, 2006.

Animal	Peso (kg)	Tratamento			Período (dias)	Total ingerido (g)
		(g/kg)	Estado da planta	Total (g)		
01	29	10	Extrato aquoso	200	08	1.600
02	12	20	Extrato aquoso	240	08	1.840
03	12	30	Extrato aquoso	360	08	2.780
04	21	40	Extrato aquoso	840	1	840
05	18	10	"in natura"	1800	08	1.800
06	20,5	-	-	-	-	-

4.4 Coleta de amostras biológicas e avaliações laboratoriais

Coletou-se urina uma vez antes e duas vezes após a administração do extrato aquoso ou "in natura" com intervalos de três horas entre cada obtenção, através de micção espontânea, conforme recomenda Garcia-Navarro (1996) e Smith (1993). Este procedimento foi viabilizado pela fixação de coletores pediátricos plásticos⁵ na região urogenital. As amostras recém obtidas eram acondicionadas em tubos de plástico estéreis, graduados e com tampa.

Na urinálise foram examinados os aspectos físicos como volume, coloração, aspecto, odor e densidade, sendo esta última obtida através do refratômetro clínico uricon⁶. O pH foi verificado através de tiras reagentes⁷ enquanto pesquisou-se sangue oculto, proteínas, cetonas, bilirrubina e uribilinogênio e exame do sedimento conforme procedimentos recomendados por Finco (1989).

O sangue foi coletado através de venopunção da jugular externa, utilizando-se agulhas descartáveis (40 x 12 mm), tubos de ensaio e frascos com anticoagulante. Após antisepsia no local da punção e garroteamento, a primeira fração do sangue, destinada ao hemograma, foi coletada e acondicionada em tubos de cinco milímetros contendo solução aquosa a 10% de sal dissódico de etilenodiaminotetracetato (EDTA), a segunda fração em tubos de dez mililitros deixou-se para a coagulação do sangue e após retração do coágulo, o soro foi

⁵ Coleflex – 100 flexor

⁶ Atago Optical Words Co

⁷ Multistix SG Bayer Diagnóstico

aspirado, centrifugado e congelado a 20°C até a realização das avaliações bioquímicas. Esfregaços sangüíneos foram feitos sob lâminas novas e desengorduradas para a contagem diferencial de leucócitos e outras observações relativas às hemácias, plaquetas e leucócitos, além da pesquisa do corpúsculo de Heinz (MORRIS, 1993).

As contagens celulares foram efetuadas pela técnica do hemocítômetro determinação do eritrograma. A contagem de hemácias foi feita pelo método do hemocítômetro, a dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina⁸, o hematócrito pela técnica do microhematócrito (FELDMAN, 2000).

A contagem diferencial foi feita a partir de estiramento sangüíneo corados com corante Panótico⁹ e leitura em microscópio óptico¹⁰ segundo técnica descrita por Feldman et al. (2000).

Para as análises do perfil bioquímico sangüíneo, utilizou-se kits comerciais⁹ para as dosagens e a leitura foi feita em analisador bioquímico semi-automático¹¹. A creatinina foi determinada pelo método cinético (LUTSGARTEN & WENK, 1972), as atividades enzimáticas da Gama Glutamil Transferase (GGT) sérica, pelo método cinético otimizado (SZAZ, 1969), do Aspartato Amino Transferase (AST) sérica segundo a técnica cinética UV otimizada (MCDUGALL et al., 1991). A uréia foi determinada por reagentes¹² e a leitura feita por colorimetria¹⁰ (CORNELLIUS, 1989). Para a pesquisa dos corpúsculos de Heinz utilizou-se metodologia para esfregaços e coloração azul cresil brilhante a partir do sangue com EDTA recomendadas por Morris (1993) e Feldman (2000).

Todas as amostras biológicas de urina e sangue, coletadas durante a experimentação foram encaminhadas imediatamente após a obtenção ao Laboratório de patologia clínica do DMV/UFRPE.

⁸ Reagente de COR

⁹ New prov./Paraná/Brasil

¹⁰ Olympus BX41

¹¹ CELM Modelo SB-190

¹² LABTEST diagnóstica S/A

Ao término do período experimental, os animais foram sacrificados e para esse procedimento, todos foram sedados com xilazina a 10% e posteriormente inoculados, por via endovenosa com solução saturada de sulfato de magnésio. Após o óbito, procedeu-se a necropsia para exame morfológico e coletou-se fragmentos de órgãos para a histopatologia, conforme recomendam Mejia (1981), Vasconcelos (1988) e Moreno & Gómez (2003).

Fragmentos de fígado, rins, baço e testículo foram coletados e fixados em solução de formol a 10% neutra e tamponada por 24 horas e processados (recorte, desidratação, diafanização, impregnação e emblocamento em parafina). Os blocos foram laminados em micrótomo¹³ obtendo-se secções com espessura de cinco μm que foram corados pela técnica hematoxilina-eosina (HE), de acordo com Luna (1968) e Prophet et al. (1992), sendo examinadas ao microscópio óptico¹⁴.

As necropsias e amostras coletadas *post mortem* foram registradas e processadas no Laboratório de Patologia Animal do DMV/UFRPE.

¹³ Leitz, 1512

¹⁴ Leitz-Dialux 20

4.5. Análise cromatográfica da urina

Tendo realizado a prospecção fitoquímica e verificado as substâncias presentes na planta passíveis de ter atividade na economia animal, foram analisadas 15 amostras de urina para a pesquisa destes elementos.

O co-cromatograma foi feito com 15µl de cada amostra, referente ao segundo, quinto e oitavo dia da experimentação dos animais 01, 02, 03, 04, 05 juntamente com uma amostra do extrato metanólico de *Indigofera suffruticosa* Mill. A fase estacionária utilizada foi uma placa cromatográfica de gel de sílica¹⁵ e a fase móvel, um sistema com ACOEt - HCOOH - ACOH - H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v/v), após a percolação, o co-cromatograma foi revelado com o reagente HCl a 5%, conforme recomendação de Obertür (2004a). A observação de manchas semelhantes na cor e R_f ao padrão (extrato metanólico de *I. suffruticosa* Mill.) era o indicativo de positividade.

¹⁵ MERCK Art. 015533

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A planta utilizada no experimento possui as características taxonômicas descritas por diversos autores, e geralmente, é encontrada em terrenos descampados, a pouca sombra, com alturas de 50 cm a 2 m, com folhas verdes, medindo de 1,5 a 2 cm e pequenos frutos com um a 1,5 cm de comprimento, vagens em forma de foice e agrupados (Figura 03), fixados na região axilar do caule, onde estão inseridas hastes com pequenas flores de tom róseo (Figura 03). Foi também observado que a *Indigofera suffruticosa* está bem difundida nas regiões da zona-da-mata, agreste e sertão do Estado de Pernambuco como planta invasora, sendo eventualmente consumida por bovinos e caprinos. Um desenho esquemático foi elaborado a partir de espécimes coletados para identificação botânica (Figura 04).

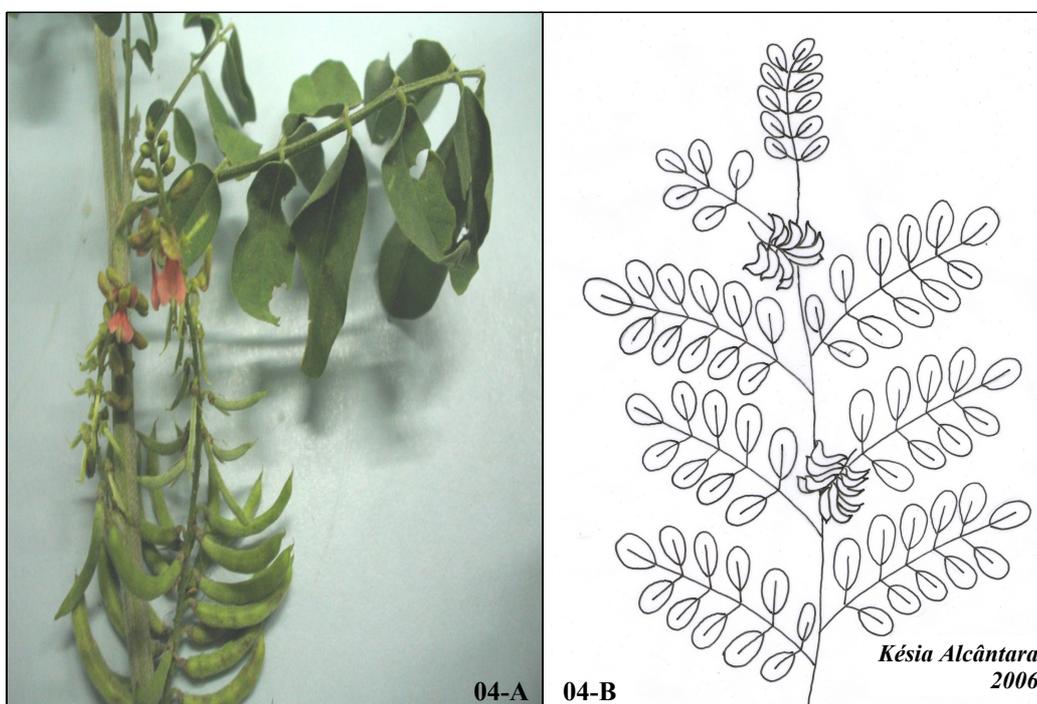


Figura 04-A: *Indigofera suffruticosa* Mill. com flores e sementes. PE/Brasil, 2006.

Figura 04-B: Desenho esquemático de *Indigofera suffruticosa* Mill., coletada no Campus da UFRPE, demonstrando a disposição das folhas e frutos. PE/Brasil, 2006.

5.1. Abordagem fitoquímica da *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae)

As frações do extrato metanólico de folhas (EMF) e extrato metanólico de caule (EMC) de *Indigofera suffruticosa* Mill., provenientes dos municípios de Venturosa, Recife (*campus* da UFRPE) e Passira, submetidas a co-cromatografia, apresentaram semelhança nos resultados e foram negativas para alcalóides, derivados cinâmicos, cumarinas, fenilpropanoglicosídeos, glicosídeos cianogênicos, iridóides, saponósidos e triterpenóides. Ocorreu positividade para glicose (açúcares redutores), demonstrado na Figura 05, traços de luteolina 7,glicosídeo (flavonóide), traços nos caules referentes a taninos catequicos não hidrolisáveis (proantocianidinas condensadas) e indican (Figura 06) e Tabela 03.

Tabela 03: Demonstrativo da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos de folhas (EMF) e caule (EMC) de *Indigofera suffruticosa* Mill. dos municípios de Venturosa, Recife (UFRPE) e Passira. PE/Brasil, 2006.

Metabólitos	emf			EMC		
	VENTUROSA	UFRPE	Passira	VENTUROSA	UFRPE	Passira
Açúcares redutores	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Alcalóides	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Derivados cinâmicos	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Cumarinas	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Fenilpropanoglicosídeos	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Flavonóides	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Glicosídeos cianogênicos	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Indican	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Iridóides	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Proantocianidinas	+	+	+	+	+	+
Saponósidos	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Triterpenóides e Esteróides	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

Obs: +*- taninos catequicos não hidrolisáveis (proantocianidinas condensadas)

A glicose é sintetizada pelos vegetais a partir de precursores inorgânicos como CO₂ e água através da fotossíntese para atender as exigências fundamentais da planta através do seu metabolismo (Santos, 2003).

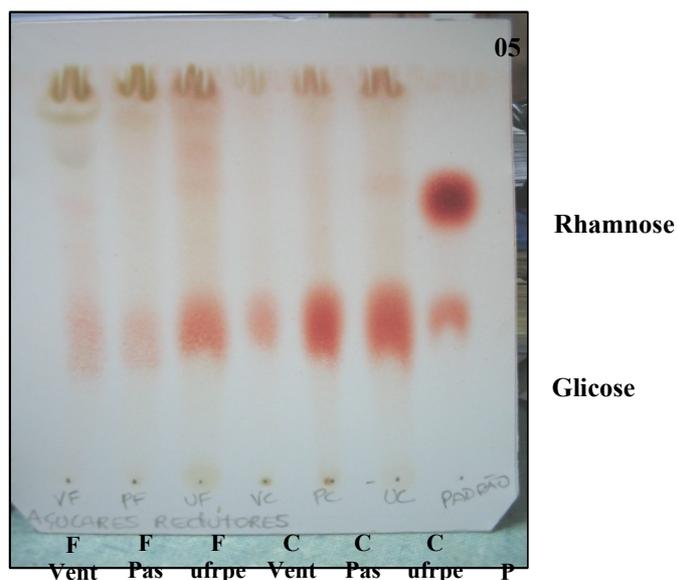


Figura 05: Co-cromatograma demonstrando a presença de glicose em EMF e EMC de *I. suffruticosa* Mill. oriundas dos municípios de Venturosa, Passira e Recife (*campus* da UFRPE), utilizando rhamnose e glicose como padrão. PE/Brasil, 2006.

Taninos catequicos não hidrolisáveis (proantocianidinas condensadas) ou taninos condensados ocorrem em plantas lenhosas e têm atividade biológica como bactericida e fungicida (Santos, 2003).

Na pesquisa do indicão, utilizando-se como reagente vanilína clorídrica ou sulfúrica, a mancha relativa a esta molécula apresentou cor vermelho-tijolo (Figura 06), e este resultado ficou melhor expresso do que o demonstrado por Obertür et al. (2004a) no qual se observa uma fraca mancha azul claro. O resultado foi positivo tanto no extrato metanólico de folhas quanto no de caules das amostras analisadas.

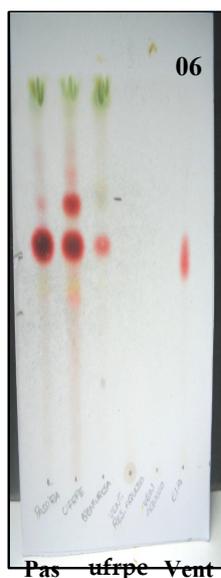


Figura 06: Co-cromatograma demonstrando a presença de indican em EMF de *I. suffruticosa* Mill. oriundas dos municípios de Passira, Recife (*campus* da UFRPE) e Venturosa. PE/Brasil, 2006.

O resultado da prospecção fitoquímica demonstrou que as substâncias observadas em evidência como a glicose, e outros elementos fracamente presentes (traços) são constituintes comuns a muitos vegetais. O que diferencia esta planta de outras é a presença do indican (figura 06). A confirmação desta substância foi feita pela investigação das amostras hidrolisadas pelo calor e particionadas com butanol. O cromatograma feito com este material revelou não mais a presença da mancha vermelho-tijolo e sim manchas azul e róseo, que são relativas ao índigo e indirubina respectivamente, conforme descrevem Chanayath et al. (2002) e Obertür et al. (2004a).

Nenhum dos extratos de *Indigofera suffruticosa*, submetidos ao agar-sangue promoveu o halo hemolítico observado na amostra padrão com solução de saponina, indicando que os componentes presentes na planta não tem ação hemolítica direta (Figura 07).

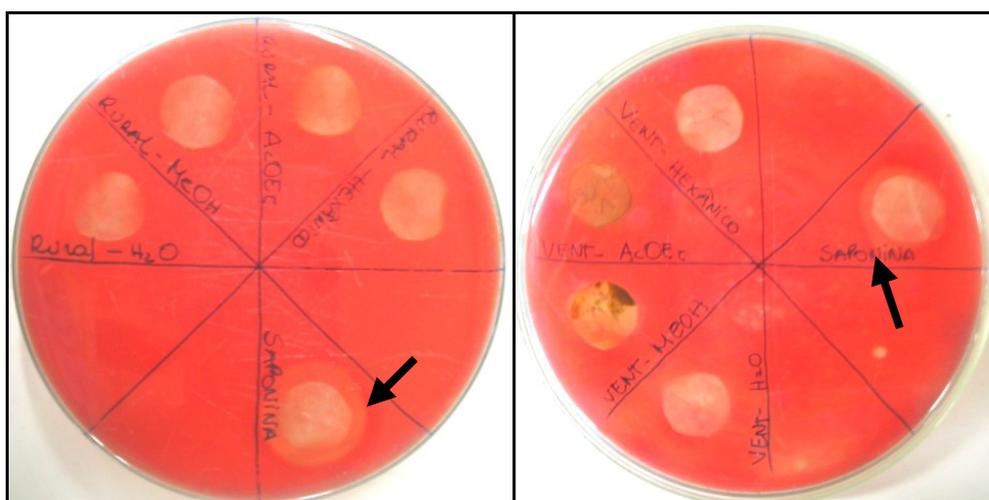


Figura 07: Placas de petri com agar-sangue de caprino (*Capra hircus*L., 1758) contendo fragmentos de papel de filtro embebidos em extratos hexânicos, AcOEt, metanólico e aquoso de *Indigofera suffruticosa* oriundos de Venturosa, Passira e Recife (campus da UFRPE) demonstrando a negatividade para a atividade hemolítica e saponina (seta). PE/Brasil, 2006.

5.2. Aspectos clínicos

Foram obtidos os valores referentes a frequência cardíaca, respiratória, movimentos ruminais e temperatura antes do início do protocolo experimental (Tabela 04) e, de acordo com estes, verificou-se que, durante o período em que ingeriram a planta na forma de extrato aquoso ou “in natura”, os animais não apresentaram alterações significativas dos sinais vitais. O resultado difere do encontrado por Barbosa Neto et al (2001) que encontraram, em bovinos, diminuição de frequência e intensidade dos movimentos ruminais, taquicardia intensa 140/b.p.m.) com alterações no ritmo e na intensidade.

Tabela 04: Demonstrativo das médias dos parâmetros clínicos obtidos de caprinos (*Capra hircus* L., 1758) tratados experimentalmente com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

Animais	Tratamento	Frequências		Movimentos ruminais	Temperatura (°C)
		Cardíaca	Respiratória		
00	Dia 0	67,20	20,80	3,60	38,70
01	10g/kg/p.v.	52,00	23,50	2,50	38,54
02	20g/kg/p.v.	58,00	25,00	3,62	38,74
03	30g/kg/p.v.	62,75	23,50	3,00	38,55
04	40g/kg/p.v.	61,20	20,00	3,00	39,14
05	10g/kg/p.v.	59,00	20,50	3,00	38,82

5.2.1. Urinálise

Nos resultados, descritos nas tabelas 05, 06, 07, 08 e 09, em comparação com os valores obtidos dos animais antes do protocolo experimental, houve mudança da coloração de amarelo à amarelo esverdeado (Figura 08), nas amostras obtidas dos animais que ingeriram o extrato aquoso da planta a partir do segundo dia da experimentação (animais 01, 03 e 04), terceiro dia (animais 01 e 03), quarto dia (animais 01 e 03), quinto dia (animal 03), sexto dia (animais 01 e 03), sétimo dia (animais 02 e 03) e no oitavo dia (animais 01 e 03). O animal 01 (10g/kg/p.v.) apresentou esta mudança de coloração por cinco dias, o 02 (20g/kg/p.v.) teve urina de cor esverdeada apenas no sétimo dia, no animal 03 (30g/kg/p.v.) a urina esteve esverdeada em sete dos oito dias do experimento, no animal 04 (40g/kg/p.v. em dose única) houve esta mudança na coloração apenas no segundo dia enquanto que, nas amostras do animal 05 não houve mudança na coloração.

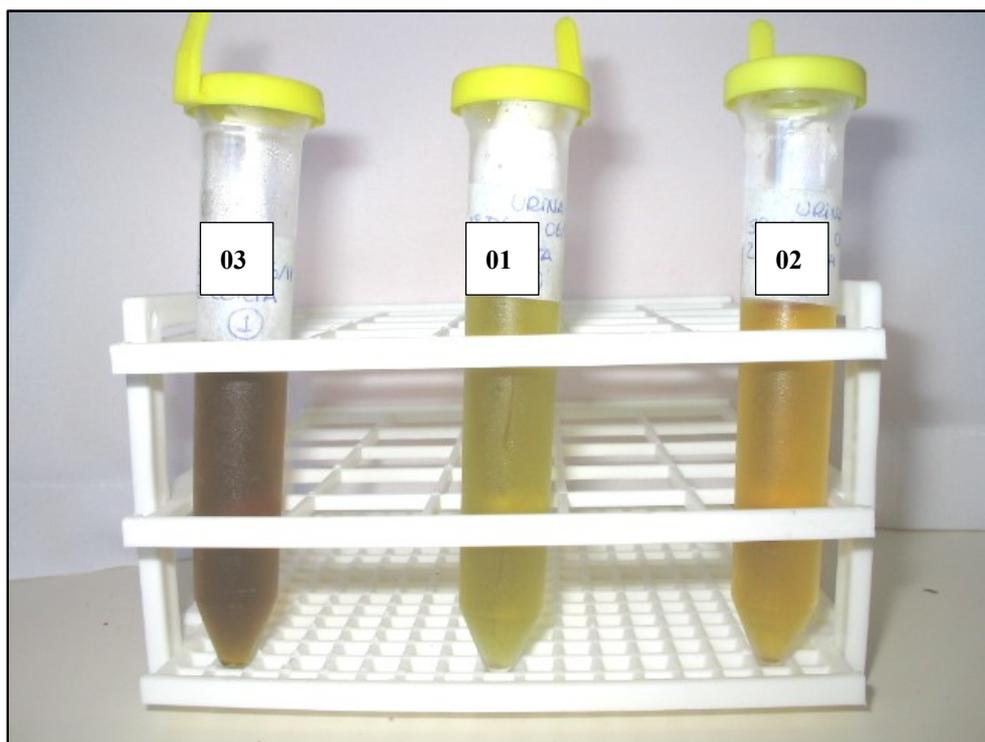


Figura 08: Amostras de urina de coloração esverdeada a amarelada, de caprinos (*Capra hircus* L., 1758) tratados com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso. PE/Brasil, 2006.

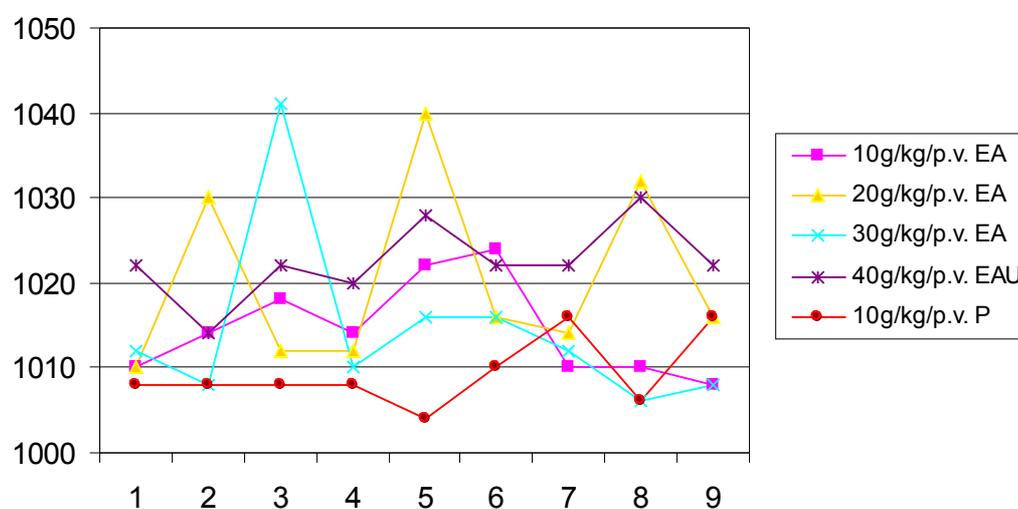
Essa alteração de coloração foi mencionada por Barbosa Neto et al. (2001) e Blankenship (2001), mas não houve comentários sobre o fenômeno. No entanto, considerando as características da planta e sabendo que, após hidrólise e em contato com o ar (MINAMI et al., 1996), há formação de um pigmento azul, o índigo, e como esta coloração esteve presente nos animais que ingeriram o extrato aquoso, é possível que o pigmento eliminado com a urina amarela seja o responsável pela cor verde. O pigmento começou a ser formado no processamento da planta para elaboração do extrato aquoso. No entanto, Garcia-Navarro (1996) também atribui esta coloração a presença aumentada dos pigmentos biliares, bilirrubina ou urobilinogênio.

Com relação a densidade, que mensura indiretamente a capacidade renal de concentração da urina segundo Garcia-Navarro (1996), obteve-se dos animais experimentais antes da experimentação, densidades de 1010 (animais 01 e 02), 1012 (animal 03), 1012 (animal 04) e 1008 (animal 05), perfazendo uma média de 1010,8,; embora Pugh (2004) considere 1040 a média padrão, estes parâmetros

foram os considerados para comparação. Observou-se uma variação na densidade de todos os animais, e os maiores valores (acima de 1040) foram observados no animal 02 durante o terceiro, quarto, sétimo e oitavo dias, no animal 03 apenas no segundo dia. Nos animais 04 e 05 esta variação foi discreta, conforme demonstrado no Gráfico 01.

O aumento da densidade indica uma diminuição da filtração glomerular e/ou um aumento da reabsorção de água, o que levaria os animais à oligúria (GARCIA-NAVARRO, 1996), e para Meyer et al. (1995), a perda de habilidade para a concentração de urina é um dos primeiros sinais de doença tubular.

Gráfico 01: Demonstrativo dos valores das densidades urinárias obtidas nas primeiras coletas num período de oito dias de caprinos tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

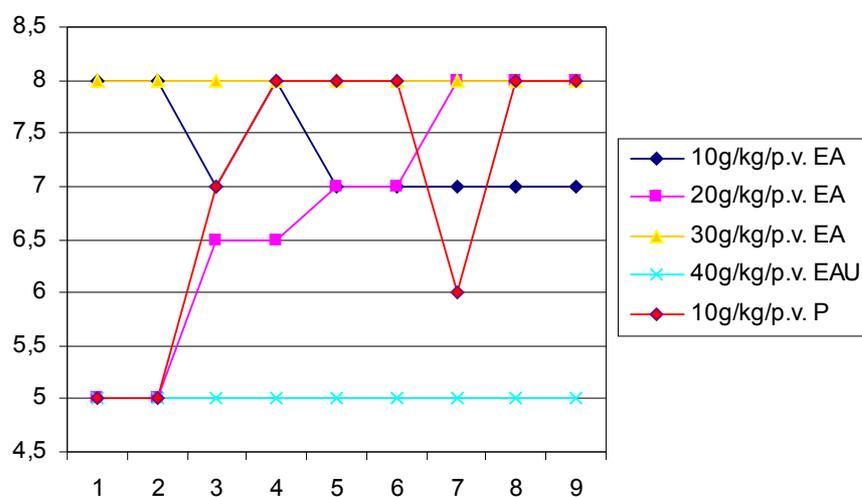


Obs: para as densidades >1041, utilizou-se a numeração 1041.

Os resultados relativos ao pH, o animal 01 variou entre 7,0 e 8,0; o animal 02 entre 5,0 e 8,0, no animal 03 houve poucas alterações (7,0 e 8,0), o animal 04 permaneceu com um pH ácido (5,0) durante todo o experimento, enquanto que o animal 05 também possuía a urina ácida (5,0) no início do experimento que, no decorrer do período alcançou a alcalinidade (pH 8,0), conforme o demonstrado no Gráfico 02.

Sabe-se que está relacionado a função renal de eliminar álcalis e ácidos não voláteis para a manutenção do equilíbrio ácido/básico. Os animais herbívoros que possuem uma dieta rica em carboidratos têm, normalmente, um pH alcalino e o seu aumento pode estar relacionado a alcalose metabólica ou respiratória e a ingestão de bicarbonato de sódio. O aumento da acidez pode resultar da privação de alimentos, febre, acidose metabólica ou respiratória, prolongado exercício muscular ou ingestão de sais ácidos como também pode ocorrer de forma metabólica na insuficiência renal crônica (MEYER ET AL., 1995; GARCIA-NAVARRO, 1996).

Gráfico 02: Demonstrativo dos valores referentes ao pH obtidos nas primeiras coletas em um período de oito dias de caprinos tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.



A presença de proteína foi discreta (traços) nos animais 01 no segundo, terceiro, quarto e sétimo dia; no animal 02, esteve presente no terceiro, quarto e sétimo dia, enquanto que, no animal 03 no segundo e terceiro dia.

De acordo com Bacila (2003), proteínas são normalmente encontradas na urina em pequenas quantidades. Garcia-Navarro (1996) e Meyer et al. (1995), a proteinúria pode estar relacionada ao aumento da densidade urinária, já que em uma urina mais concentrada, é mais fácil detectar traços de proteína. Pode ainda resultar da permeabilidade glomerular anormal na nefrite aguda e crônica, na pielonefrite, nefrose e outras alterações degenerativas caracterizadas por lesões renais tubulares com proteinúria e cilindrúria, podendo ainda ter origem isquêmica ou tóxica.

Alguns traços de sangue foram detectados apenas no animal 01 no segundo e terceiro dia, o que pode significar eritrócitos ou hemoglobina livre, no entanto, na sedimentoscopia houve a presença de hemácias em pequena quantidade. Meyer et al (1995) considera normal a presença de poucos eritrócitos e para Bacila (2003) pode significar lesão renal ou do trato urinário abaixo do rim.

O urobilinogênio esteve presente apenas no animal 02 no sétimo dia, mas numa quantidade ínfima. Garcia-Navarro (1996) comenta que a eliminação de uma pequena parte do urobilinogênio na urina é normal, uma vez que é o pigmento que dá a cor amarela a urina.

A bilirrubina foi detectada em pequenas quantidades no animal 02 no terceiro, quarto, quinto, sétimo e oitavo dia e no animal 03 no terceiro, quarto, quinto e oitavo dia. Na maioria dos animais, a bilirrubinúria é um indicador de excreção biliar deficiente e o seu aumento pode estar associada a três causas: hemolítica, tóxica, e obstrutiva (Garcia-Navarro, 1996; Jones et al. 2000).

Tabela 05: Resultados da urinálise do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 01, tratado experimentalmente com extrato aquoso (10g/kg) de *Indigofera suffruticosa* Mill. por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Cor	Aspecto	Dens.	ph	Proteína	Sangue	Cetona	Urob.	Bilir.
1 ^o	0 ^a	Am. pálido	Límpido	1010	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	1 ^a	Amarelo	Límpido	1014	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
2 ^o	1 ^a	Am. esverd	Límpido	1018	7,0	Negat.	+	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd	Límpido	1024	7,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd	Límpido	1024	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
3 ^o	1 ^a	Am. esverd	Límpido	1014	8,0	Negat.	+	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd	Límpido	1022	6,5	+	++	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd	Límpido	1022	6,5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
4 ^o	1 ^a	Am. esverd	Límpido	1022	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd	Límpido	1030	6,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd	Límpido	1022	6,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
5 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1024	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1022	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1006	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
6 ^o	1 ^a	Am. esverd	Límpido	1010	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Lev. turvo	1032	6,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1006	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
7 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1010	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Lev. turvo	1032	6,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1024	6,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
8 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1008	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd	Lev. turvo	1016	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd	Límpido	1010	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.

Obs: Am.-amarelo, Esverd.-esverdeado, Lev.-levemente, Negat.-negativo

+ - traços

++ - presença discreta

Tabela 06: Resultados da urinálise do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 02, tratado experimentalmente com extrato aquoso (20g/kg) de *Indigofera suffruticosa* Mill. por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Cor	Aspecto	Dens.	ph	Proteína	Sangue	Cetona	Urob.	Bilir.
1 ^o	0 ^a	Am. pálido	Límpido	1010	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	1 ^a	Amarelo	Límpido	1030	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
2 ^o	1 ^a	Am. palha	Límpido	1012	6,5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1010	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. arelo	Límpido	1028	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
3 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1012	6,5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1040	6,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	+
	3 ^a	Am. Turvo	Turvo	>1040	7,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	+
4 ^o	1 ^a	Amarelo	Turvo	1040	7,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Lev.turvo	>1040	7,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	+
	3 ^a	Amarelo	Lev.turvo	1030	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	+
5 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1016	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1010	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	+
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
6 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1014	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1012	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
7 ^o	1 ^a	Amarelo	Lev.turvo	1032	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	+
	2 ^a	Amarelo	Lev.turvo	>1040	6,0	+	Negat.	Negat.	+	++
	3 ^a	Am. esverd	Lev.turvo	>1040	7,0	+	Negat.	Negat.	Negat.	++
8 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1016	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	++
	2 ^a	Amarelo	Lev.turvo	>1040	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Lev.turvo	1016	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.

Obs: Am.-amarelo, Esverd.-esverdeado, Lev.-levemente, Negat.-negativo

+ - traços

++ - presença discreta

Tabela 07: Resultados da urinálise do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado experimentalmente com extrato aquoso (30g/kg) de *Indigofera suffruticosa* Mill. por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia Coleta	Cor	Aspecto	Dens.	ph	Proteína	Sangue	Cetona	Urob.	Bilir.
1 ^o	0 ^a	Am. palha	Límpido	1012	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	1 ^a	Am. palha	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
2 ^o	1 ^a	Am. esverd.	Turvo	>1040	8,0	++	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1006	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1012	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
3 ^o	1 ^a	Amarelo	Lev. turvo	1010	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Acastanhado	Límpido	1032	8,0	++	Negat.	Negat.	+
	3 ^a	Am. esverd.	Límpido	1012	8,0	+	Negat.	Negat.	+
4 ^o	1 ^a	Am. esverd.	Límpido	1016	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd.	Límpido	1010	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	+
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1004	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	+
5 ^o	1 ^a	Am. esverd.	Límpido	1016	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Acastanhado	Límpido	1020	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	++
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
6 ^o	1 ^a	Am. esverd.	Límpido	1012	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Amarelo	Límpido	1006	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Amarelo	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
7 ^o	1 ^a	Amarelo	Límpido	1006	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd.	Límpido	1014	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd.	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
8 ^o	1 ^a	Am. esverd.	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd.	Límpido	1014	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd.	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	+

Obs: Am.-amarelo, Esverd.-esverdeado, Lev.-levemente, Negat.-negativo

+ - traços

++ - presença discreta

Tabela 08: Resultados da urinálise do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 04, tratado experimentalmente com extrato aquoso (40g/kg) de *Indigofera suffruticosa* Mill. em dose única. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Cor	Aspecto	Dens.	ph	Proteína	Sangue	Cetona	Urob.	Bilir.
1 ^o	0 ^a	Am. pálido	Límpido	1012	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1014	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
2 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1022	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	2 ^a	Am. esverd.	Límpido	1018	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	3 ^a	Am. esverd.	Límpido	1018	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
3 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1020	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
4 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1028	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
5 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1022	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
6 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1022	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
7 ^o	1 ^o	Amarelo	Límpido	1030	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
8 ^o	1 ^o	Amarelo	Límpido	1022	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.

Obs: Am.-amarelo, Esverd.-esverdeado, Negat.-negativo

Tabela 09: Resultados da urinálise do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 05, tratado experimentalmente com *Indigofera suffruticosa* Mill. recém coletada (10g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Cor	Aspecto	Dens.	ph	Proteína	Sangue	Cetona	Urob.	Bilir.
0 ^o	1 ^o	Am. pálido	Límpido	1012	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
1 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1008	5,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
2 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1008	7,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
3 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1008	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
4 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1004	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
5 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1010	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
6 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1016	6,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
7 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1006	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
8 ^o	1 ^a	Am. pálido	Límpido	1016	8,0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.

Obs: Am.-amarelo, Negat.-negativo

A sedimentoscopia revelou, principalmente, leucocitúria, que esteve presente no animal 01, com valores acima de 50/p.c. no terceiro e no oitavo dia, acima de 100/p.c. no sexto e sétimo dia; no animal 02, houve aumento de leucócitos acima de 50/p.c. no primeiro, terceiro, quarto e sétimo dia, sendo que acima de 100/p.c. no oitavo dia; no animal 03, valores acima de 50/p.c. foram observados no terceiro dia e acima de 100/p.c. no sexto e sétimo dia; no animal 04, havia leucócitos acima de 50/p.c. no segundo dia e no animal 05 este mesmo aumento estava presente apenas no oitavo dia. Notou-se que estes valores estiveram aumentados principalmente nos animais que ingeriram o extrato aquoso; exceto o animal 04, ao

qual foi administrado apenas uma dose, nesse caso, houve um aumento de leucócitos no segundo dia que nos dias seguintes reduziu bastante.

O aumento de leucócitos no sedimento pode ser resultado de processo inflamatório ou necrose em qualquer ponto do aparelho urogenital (Smith, 1993; Meyer, 1995; Garcia-Navarro, 1996), embora não houvesse sinais clínicos e necroscópicos que evidenciassem processo inflamatório no aparelho urinário desses animais, é oportuno relatar que Nottle (2006), encontrou pigmentos azul e vermelho em alguns sedimentos e cálculos em ovelhas que se alimentavam de trevos e esses pigmentos foram identificados como indigotina e indirubina respectivamente.

Também verificou-se nessa análise a presença discreta de cilindros granulares nos animais 01, 02, 03 e 04. Para Garcia-Navarro (1996), em números elevados, esses cilindros podem indicar doenças renais cursando com necrose do epitélio tubular como nefrite ou nefrose por isquemia ou nefrotoxinas.

Os espermatozóides podem ser vistos no sedimento mas não têm importância para diagnóstico. Células epiteliais são um achado normal. A presença de cristais depende da dieta e não é um fator preocupante, mesmo em número aumentado, salvo se há suspeita de urolitíase (Garcia-Navarro, 1996).

Tabela 10: Resultados da sedimentoscopia do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 01, tratado experimentalmente com extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* Mill. (10g/kg) pelo período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Sptz	Leuc. (p/c)	Hem. (p/c)	Bact.	Células		Cilindros		Cristais	
						Renais (p/c)	Uretrais (p/c)	Gran.	Hial.	Carb. cálcio	Fosf.
1 ^o	0 ^a	V	0 - 2	-	R	-	0 - 2	-	-	-	-
	1 ^a	-	0 - 5	-	R	-	0 - 4	-	-	-	-
2 ^o	1 ^a	-	3 - 6	8 - 10	R	0 - 2	0 - 5	-	-	-	-
	2 ^a	R	18 - 22	10 - 15	R	0 - 1	0 - 5	-	-	-	-
	3 ^a	-	-	10 - 15	-	-	-	-	-	-	-
3 ^o	1 ^a	-	0 - 4	3 - 8	R	0 - 1	0 - 2	0 - 1	-	-	-
	2 ^a	-	>50	10 - 15	R	0 - 1	1 - 5	-	-	-	-
	3 ^a	-	15 - 20 ^V	-	R	0 - 1	1 - 7	0 - 1	-	-	R
4 ^o	1 ^a	-	0 - 4	-	R	-	0 - 3	-	-	R	-
	2 ^a	-	0 - 3	0 - 1	R	-	0 - 5 ^R	-	-	-	-
	3 ^a	-	0 - 3	0 - 1	R	-	0 - 2	-	-	-	-
5 ^o	1 ^a	R	1 - 5	0 - 1	A	0 - 1	0 - 3	-	-	-	-
	2 ^a	-	3 - 7	0 - 2	-	0 - 4	0 - 6 ^R	-	-	-	-
	3 ^a	A	0 - 6	-	R	-	0 - 5	-	-	-	-
6 ^o	1 ^a	-	18 - 25	0 - 3	R	0 - 1	0 - 2	-	-	-	-
	2 ^a	-	>100	0 - 5	A	0 - 2	3 - 6	-	-	-	-
	3 ^a	-	25 - 30	0 - 5	R	0 - 1 ^R	0 - 4	-	-	-	-
7 ^o	1 ^a	-	0 - 3	0 - 3	R	-	0 - 2	-	-	-	-
	2 ^a	-	>100	-	R	-	3 - 8 ^V	0 - 1	-	-	-
	3 ^a	-	>100 ^V	0 - 3	R	0 - 3 ^R	2 - 8 ^V	-	-	-	-
8 ^o	1 ^a	R	13 - 20 ^A	3 - 6	R	-	0 - 1	-	-	-	-
	2 ^a	-	>50 ^A	0 - 1	A	0 - 3	0 - 5 ^A	-	-	-	-
	3 ^a	-	3 - 8 ^R	5 - 7	R	0 - 1	0 - 2	-	-	-	-

Obs: Sptz - espermatozóides, Leuc. - leucócitos, Bact.-bactérias, Hem.- hemácias, Gran. - cilindro granuloso, Hial.- cilindro hialino, Carb. - cristais de carbonato de cálcio, Fosf.- Cristais de fosfato. V- vários, A - alguns e R - raros.

Tabela 11: Resultados da sedimentoscopia do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 02, tratado experimentalmente com o extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* Mill. (20g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Sptz	Leuc. (p/c)	Hem. (p/c)	Bact.	Células		Cilindros		Cristais	
						Renais (p/c)	Uretrais (p/c)	Gran.	Hial.	Carb. cálcio	Fosf.
1 ^o	0 ^a	-	1-7	-	A	0-2	0-2	-	-	-	-
	1 ^a	V	>50	-	V	-	0-4	0-1	-	-	-
2 ^o	1 ^a	-	0-3	0-1	R	-	0-4	-	-	-	-
	2 ^a	R	0-3	0-1	R	-	0-3	0-1	-	-	-
	3 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ^a	1 ^a	V	20-25	3-8	A	0-2	0-3	0-3	-	-	-
	2 ^a	V	7-15	-	V	0-2	3-8 ^A	-	-	-	-
	3 ^a	V	>50	3-5	A	-	0-5 ^A	0-3	-	-	-
4 ^o	1 ^a	V	>50	0-3	A	-	1-6	-	-	-	V
	2 ^a	V	8-12	0-3	A	0-4 ^R	0-4	0-1	-	-	-
	3 ^a	V	8-12	0-5	A	0-1	0-4 ^R	-	-	-	R
5 ^o	1 ^a	R	0-3	-	-	-	0-4 ^R	-	-	-	-
	2 ^a	A	10-15	0-5	R	0-3	1-7 ^A	-	-	-	-
	3 ^a	-	11-15 ^R	0-4	R	0-1	0-6 ^A	-	-	-	-
6 ^o	1 ^a	V	3-7	0-3	A	0-2	0-5 ^A	-	-	-	-
	2 ^a	V	15-20	0-3	A	0-3	0-6 ^R	-	-	R	-
	3 ^a	-	8-11	0-3	R	0-2	0-5	-	-	A	-
7 ^o	1 ^a	V	>50	0-3	V	2-6	6-11 ^R	0-1	-	-	R
	2 ^a	V	>50	-	R	1-6	2-6	-	-	-	-
	3 ^a	-	>50	0-3	R	0-6 ^R	0-6	-	-	-	-
8 ^o	1 ^a	V	15-20	-	R	0-2 ^R	0-4 ^R	-	-	-	-
	2 ^a	A	>100 ^A	0-3	A	3-6 ^V	2-7	-	-	-	-
	3 ^a	V	15-20	0-2	A	0-6 ^R	1-3	-	-	-	-

Obs: Sptz - espermatozoides, Leuc. - leucócitos, Bact.-bactérias, Hem.- hemácias, Gran. - cilindro granuloso, Hial.- cilindro hialino, Carb. - cristais de carbonato de cálcio, Fosf.- Cristais de fosfato. V- vários, A - alguns e R - raros.

Tabela 12: Resultados da sedimentoscopia do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado experimentalmente com extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* Mill. (30g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Sptz	Leuc. (p/c)	Hem. (p/c)	Bact.	Células		Cilindros		Cristais	
						Renais (p/c)	Uretrais (p/c)	Gran.	Hial.	Carb. cálcio	Fosf.
1 ^o	0 ^a	V	3 - 10		A	0 - 2	0 - 2	-	-	-	-
	1 ^a	-	20 - 25	0 - 1	-	0 - 3	0 - 2	-	-	-	-
2 ^o	1 ^a	V	12 - 18	0 - 3	A	0 - 3	1 - 8	-	-	-	-
	2 ^a	-	0 - 3	0 - 5	R	0 - 5	0 - 3	-	-	-	-
3 ^o	3 ^a	V	5 - 10	0 - 1	A	0 - 5	-	0 - 1	-	-	-
	1 ^a	V	0 - 5	0 - 5	A	0 - 4	0 - 3	0 - 1	-	-	-
	2 ^a	V	7 - 15	0 - 1	R	0 - 6	0 - 6	0 - 2	-	-	-
4 ^o	3 ^a	V	>50	0 - 4	A	0 - 5	0 - 5	0 - 1	-	-	-
	1 ^a	V	15 - 22	0 - 3	A	0 - 6	0 - 6	0 - 1	-	-	-
	2 ^a	-	3 - 6	0 - 5	R	0 - 6R	0 - 6	-	-	R	-
5 ^o	3 ^a	V	0 - 3	0 - 3	-	0 - 3	0 - 3	-	-	-	-
	1 ^a	V	20 - 25	0 - 1	A	1 - 7 ^Δ	1 - 6	-	-	-	-
	2 ^a	V	5 - 10	3 - 8	A	0 - 4 ^R	0 - 6	0 - 1	-	-	-
6 ^o	3 ^a	-	0 - 4	0 - 6	R	0 - 6 ^R	0 - 3 ^R	-	-	-	-
	1 ^a	V	1 - 5	0 - 1	R	0 - 3 ^R	0 - 2 ^R	-	-	-	-
	2 ^a	A	0 - 4 ^R	0 - 5	R	-	0 - 3	-	-	-	-
7 ^o	3 ^a	A	>100	0 - 2	R	0 - 3	7 - 11 ^R	-	-	-	-
	1 ^a	V	0 - 3	1 - 8	R	0 - 2	0 - 4	-	-	-	-
	2 ^a	-	>100 ^V	0 - 1	R	3 - 8 ^R	4 - 10 ^R	-	-	-	-
8 ^o	3 ^a	V	11 - 15	0 - 3	R	0 - 4	0 - 3	-	-	-	-
	1 ^a	V	16 - 20	0 - 1	R	0 - 3 ^R	0 - 3 ^R	-	-	R	-
	2 ^a	R	0 - 7 ^R	0 - 3	R	0 - 2	0 - 5	-	-	-	-
	3 ^a	-	0 - 5	0 - 1	R	0 - 2	0 - 2 ^a	-	-	-	A

Obs: Sptz - espermatozóides, Leuc. - leucócitos, Bact.-bactérias, Hem.- hemácias, Gran. - cilindro granuloso, Hial.- cilindro hialino, Carb. - cristais de carbonato de cálcio, Fosf.- Cristais de fosfato. V- vários, A - alguns e R - raros.

Tabela 13: Resultados da sedimentoscopia do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 04, tratado experimentalmente com extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* Mill. (40g/kg) em dose única. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Sptz	Leuc. (p/c)	Hem. (p/c)	Bact.	Células		Cilindros		Cristais	
						Renais (p/c)	Uretrais (p/c)	Gran.	Hial.	Carb. cálcio	Fosf.
1 ^o	0 ^a	V	2-8 ^R	-	-	0-5 ^A	0-4 ^A	0-1	-	-	-
	1 ^a	-	8-115 ^A	0-3	R	2-7 ^R	0-6	0-1	-	-	-
2 ^o	1 ^a	R	9-16 ^R	0-4	R	0-5 ^R	0-4 ^R	-	-	-	-
	2 ^a	R	15-20	1-5	R	1-6 ^A	1-7 ^A	-	-	R	-
	3 ^a	-	>50 ^A	0-6	R	0-6 ^A	1-5 ^A	-	-	-	-
3 ^o	1 ^o	-	3-10	0-2	-	0-4 ^R	0-2 ^R	0-1	-	-	-
4 ^o	1 ^o	-	25-35 ^V	0-7	R	1-8 ^V	1-7 ^V	-	0-1	-	-
5 ^o	1 ^o	-	9-16 ^R	0-3	R	3-8 ^A	0-4 ^A	-	-	-	-
6 ^o	1 ^o	-	7-12	0-2	R	3-7 ^A	2-7 ^A	-	-	-	-
7 ^o	1 ^o	-	25-30 ^A	-	R	2-7 ^A	4-10 ^A	0-1	-	-	A
8 ^o	1 ^o	-	20-25 ^R	0-5	R	3-7 ^A	2-7	0-1	-	-	-

Obs: Sptz - espermatozoides, Leuc. - leucócitos, Bact.-bactérias, Hem.- hemácias, Gran. - cilindro granuloso, Hial.- cilindro hialino, Carb. - cristais de carbonato de cálcio, Fosf.- Cristais de fosfato. V- vários, A - alguns e R - raros.

Tabela 14: Resultados da sedimentoscopia do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 05, tratado experimentalmente com *Indigofera suffruticosa* Mill. recém coletada (10g/kg) por um período de oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Coleta	Sptz	Leuc. (p/c)	Bact.	Hem. (p/c)	Células		Cilindros		Cristais	
						Renais (p/c)	Uretrais (p/c)	Gran.	Hial.	Carb. cálcio	Fosf.
0 ^o	1 ^o	-	-	-	0-1	0-5	3-10	-	-	-	-
1 ^o	1 ^a	A	0-3	R	0-1	0-3	0-3	-	-	-	-
2 ^o	1 ^a	-	0-4	R	0-1	0-1	0-4	-	-	-	-
3 ^o	1 ^a	A	1-7	R	0-3	0-3	0-2	-	-	-	-
4 ^o	1 ^a	R	7-15	R	0-3	0-1	0-3	-	-	-	-
5 ^o	1 ^a	-	1-8	R	0-2	0-2	0-4	-	-	-	-
6 ^o	1 ^a	-	0-4	R	0-1	0-5 ^R	3-8	-	-	-	-
7 ^o	1 ^a	R	2-8	R	0-2	0-5	0-3	-	-	-	-
8 ^o	1 ^a	R	>50	R	0-1	1-5	0-3 ^R	-	-	-	-

Obs: Sptz - espermatozoides, Leuc. - leucócitos, Bact.-bactérias, Hem.- hemácias, Gran. - cilindro granuloso, Hial.- cilindro hialino, Carb. - cristais de carbonato de cálcio, Fosf.- Cristais de fosfato. V- vários, A - alguns e R - raros.

5.2.2 Achados hematológicos

Para a avaliação do eritrograma, considerou-se como referência os valores estabelecidos por Melo (2001) para caprinos machos criados no Estado de Pernambuco, os quais compreendem, para hemácias ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 13,0; hemoglobina (g/dl) 9,6; hematócrito (%) 28,0; VGM (fL) 23,1 e CHGM (%) 34,3, e a média dos valores obtidos dos animais experimentais, antes do início do protocolo, que constaram de: hemácias ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 12,84; hemoglobina (g/dl) 10,3; hematócrito (%) 28,6; VGM (fL) 22,2 e CHGM (%) 36,04, as quais estão descritas na Tabela 15 e os valores obtidos durante a experimentação estão contidos nas Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20.

Tabela 15: Valores das médias dos eritogramas referentes aos cinco caprinos antes do tratamento com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

Animais	Hemoglobin				
	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	a (g/dl)	Hematócrito (%)	VGM (fl)	CHGM (%)
01	14,42	13,00	36,00	25,00	36,20
02	11,94	8,50	24,00	20,30	35,30
03	12,20	9,50	26,00	21,40	36,60
04	12,70	10,00	28,00	21,80	35,80
05	12,96	10,50	29,00	22,50	36,30
Média	12,84	10,30	28,60	22,20	36,04
Desvio padrão	0,97	1,68	4,56	1,76	0,50

Obs: VGM - volume globular médio, CHGM - concentração hemoglobínica globular média.

Foi verificada hemoconcentração nos animais 01 e 05 (Gráfico 03) que pode estar relacionada à desidratação. Os valores de hemoglobina, hematócrito e volume globular médio (VGM) decresceram gradativa e discretamente em todos os animais (Gráficos 04, 05 e 06) o que caracterizou uma leve anemia microcítica. A concentração hemoglobínica globular média (CHGM), demonstrada no Gráfico 07, diminuiu nos animais 01 e 05 (anemia microcítica hipocrômica), manteve-se em níveis aproximados daqueles do dia zero nos animais 02 e 03 (anemia microcítica

normocrômica) e aumentou no animal 04 (anemia microcítica hiperocrômica). Para Scherding (1988), a anemia é um sinal objetivo de enfermidade.

Em comparação com as alterações encontradas por Barbosa Neto et al (2001), que observaram em bovinos, hemoglobina em torno de 2g/dl e número de hemácias abaixo de $2,0 \times 10^6/\text{mm}^3$, nossos achados foram discretos, o menor valor para hemoglobina foi de 7,5g/dl (animal 02) e para hemácias encontrou-se $9,12 \times 10^6/\text{mm}^3$ (animal 03), no entanto, são um indicativo de atividade hemolítica, principalmente porque, a pesquisa para Corpúsculos de Heinz foi positiva, embora também de forma discreta (Figura 09).

Gráfico 03: Demonstrativo dos níveis de hemácias em hemogramas de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

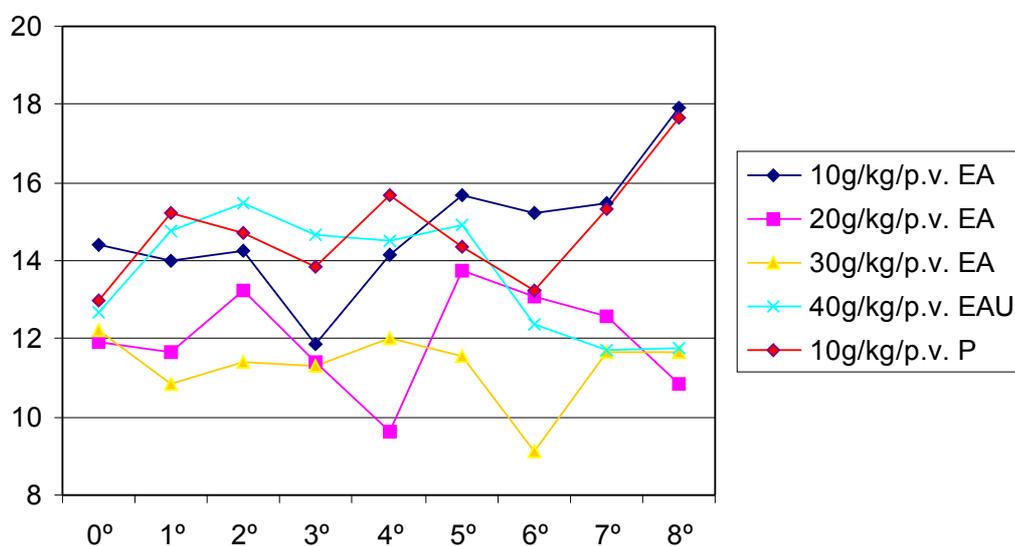


Gráfico 04: Demonstrativo dos níveis de hemoglobina em hemogramas de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

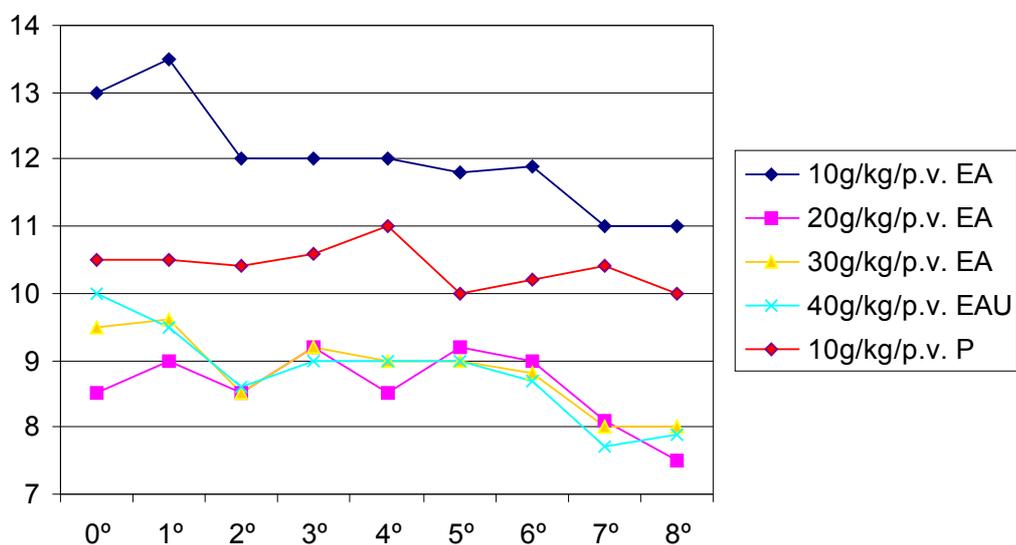


Gráfico 05: Demonstrativo dos valores de hematócritos em hemogramas de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

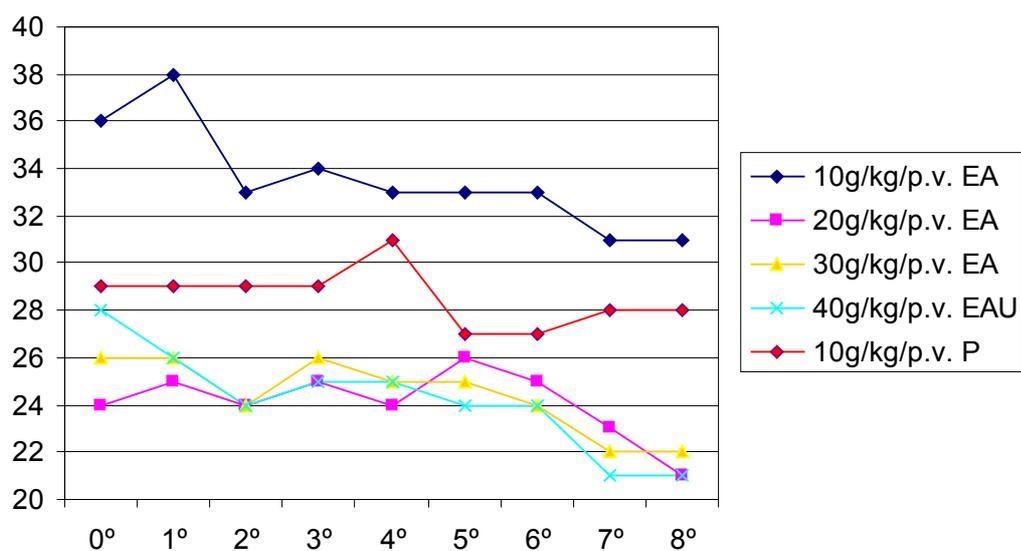


Gráfico 06: Demonstrativo dos níveis de Volume Globular Médio (VGM) em hemogramas de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

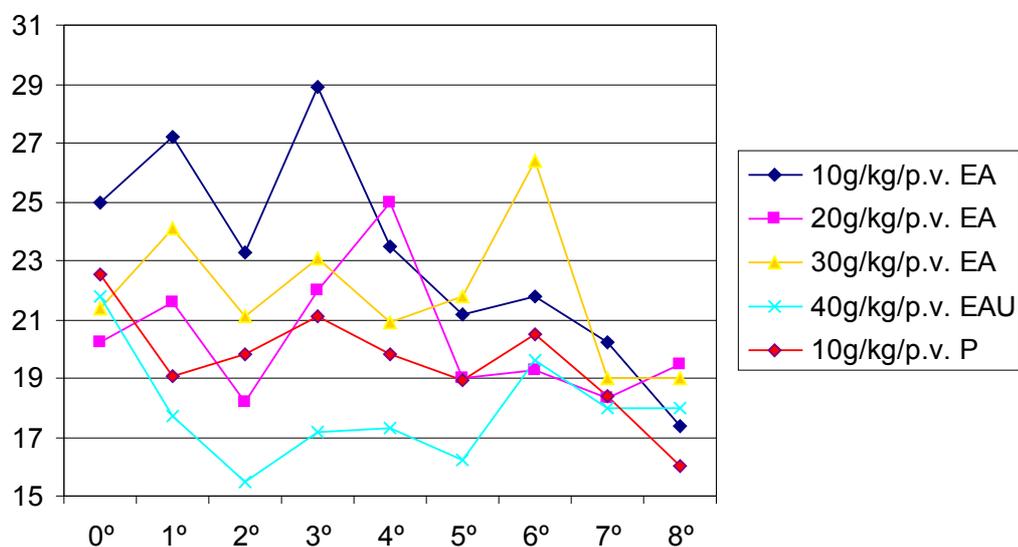


Gráfico 07: Demonstrativo dos valores das Concentrações Hemoglobínicas Globulares Médias (CHGM) em hemogramas de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

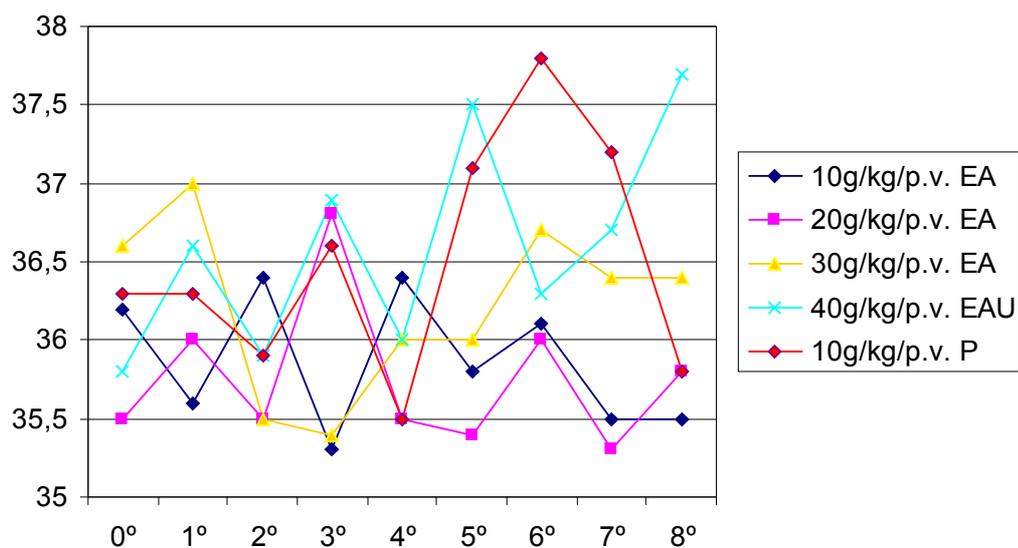


Tabela 16: Valores do eritrograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 01, tratado com 10g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso por oito dias PE/Brasil, 2006.

Dia	Hemácias (10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VGM (fl)	CHGM (%)
0 ^o	14,42	13,00	36,00	25,00	36,20
1 ^o	14,00	13,50	38,00	27,20	35,60
2 ^o	14,26	12,00	33,00	23,30	36,40
3 ^o	11,88	12,00	34,00	28,90	35,30
4 ^o	14,14	12,00	33,00	23,50	36,40
5 ^o	15,68	11,80	33,00	21,20	35,80
6 ^o	15,20	11,90	33,00	21,80	36,10
7 ^o	15,48	11,00	31,00	20,20	35,50
8 ^o	17,90	11,00	31,00	17,40	35,50
Média	14,81	11,90	33,25	22,93	35,82
Desvio padrão	1,72	0,77	2,18	3,71	0,42

OBS: O dia 0^o não foi contabilizado para o cálculo da média e desvio padrão. VGM – volume globular médio, CHGM – concentração hemoglobínica globular média.

Tabela 17: Valores do eritrograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 02, tratado com 20g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso por oito dias PE/Brasil, 2006.

Dia	Hemácias (10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VGM (fl)	CHGM (%)
0 ^o	11,94	8,50	24,00	20,20	35,50
1 ^o	11,64	9,00	25,00	21,60	36,00
2 ^o	13,22	8,50	24,00	18,20	35,50
3 ^o	11,40	9,20	25,00	22,00	36,80
4 ^o	9,63	8,50	24,00	25,00	35,50
5 ^o	13,74	9,20	26,00	19,00	35,40
6 ^o	13,06	9,00	25,00	19,30	36,00
7 ^o	12,60	8,10	23,00	18,30	35,30
8 ^o	10,84	7,50	21,00	19,50	35,80
Média	12,02	8,62	24,12	20,36	35,78
Desvio padrão	1,38	0,60	1,55	2,34	0,48

OBS: O dia 0^o não foi contabilizado para o cálculo da média e desvio padrão. VGM – volume globular médio, CHGM – concentração hemoglobínica globular média.

Tabela 18: Valores do eritrograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso por oito dias PE/Brasil, 2006.

Dia	Hemácias (10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VGM (fl)	CHGM (%)
0°	12,20	9,50	26,00	21,40	36,60
1°	10,86	9,60	26,00	24,10	37,00
2°	11,42	8,50	24,00	21,10	35,50
3°	11,32	9,20	26,00	23,10	35,40
4°	12,04	9,00	25,00	20,90	36,00
5°	11,58	9,00	25,00	21,80	36,00
6°	9,12	8,80	24,00	26,40	36,70
7°	11,66	8,00	22,00	19,00	36,40
8°	11,68	8,00	22,00	19,00	36,40
Média	11,21	8,76	24,25	21,92	36,17
Desvio padrão	0,90	0,56	1,58	2,53	0,55

Obs: O dia 0° não foi contabilizado para o cálculo da média e desvio padrão. VGM – volume globular médio, CHGM – concentração hemoglobínica globular média.

Tabela 19: Valores do eritrograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 04, tratado com 40g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso em dose única PE/Brasil, 2006.

Dia	Hemácias (10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VGM (fl)	CHGM (%)
0°	12,70	10,00	28,00	21,80	35,80
1°	14,76	9,50	26,00	17,70	36,60
2°	15,50	8,60	24,00	15,50	35,90
3°	14,68	9,00	25,00	17,20	36,90
4°	14,50	9,00	25,00	17,30	36,00
5°	14,90	9,00	24,00	16,20	37,50
6°	12,38	8,70	24,00	19,60	36,30
7°	11,72	7,70	21,00	18,00	36,70
8°	11,74	7,90	21,00	18,00	37,70
Média	13,77	8,67	23,75	17,44	36,70
Desvio padrão	1,55	0,60	1,83	1,24	0,65

Obs: O dia 0° não foi contabilizado para o cálculo da média e desvio padrão. VGM – volume globular médio, CHGM – concentração hemoglobínica globular média.

Tabela 20: Valores do eritograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 05, tratado com 10g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. recém coletada por oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Hemácias (10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VGM (fl)	CHGM (%)
0°	12,96	10,50	29,00	22,50	36,30
1°	15,22	10,50	29,00	19,10	36,30
2°	14,70	10,40	29,00	19,80	35,90
3°	13,85	10,60	29,00	21,10	36,60
4°	15,70	11,00	31,00	19,80	35,50
5°	14,36	10,00	27,00	18,90	37,10
6°	13,24	10,20	27,00	20,50	37,80
7°	15,32	10,40	28,00	18,40	37,20
8°	17,64	10,00	28,00	16,00	35,80
Média	15,00	10,38	28,50	19,20	36,52
Desvio padrão	1,34	0,33	1,31	1,56	0,79

Obs: O dia 0° não foi contabilizado para o cálculo da média e desvio padrão. VGM – volume globular médio, CHGM – concentração hemoglobínica globular média.

Os resultados dos leucogramas foram comparados com os valores descritos por Melo (2001), que encontrou para leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 10,3 ($\pm 2,4$); Bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 0,1 ($\pm 0,1$); segmentados ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 4,0 ($\pm 1,9$); eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 0,2 ($\pm 0,3$); basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 0,01 ($\pm 0,1$); linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 5,9 ($\pm 1,9$) e monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 0,3 ($\pm 0,6$), considerando também os valores obtidos dos animais experimentais antes do início do protocolo (dia 0) e suas médias, os quais estão descritos nas Tabelas 21, 22, 23, 24, 25 e 26.

Como resultado, verificou-se, principalmente, aumento dos leucócitos nos animais 01, 02, 04 e 05, dos segmentados (animais 01, 02, 04 e 05) e diminuição desses no animal 03; aumento de linfócitos em todos os animais. Segundo Smith (1993), a infecção bacteriana é a causa mais comum de neutrofilia, no entanto esta pode também acompanhar condições causadoras de destruição tecidual e também é uma condição presente em intoxicações. A linfocitose é descrita como uma condição rara.

Tabela 21: Valores das médias dos leucogramas referentes aos cinco caprinos (*Capra hircus* L., 1758) antes do tratamento com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

Animais	Leuc. (x10³/μl)	Bast. (x10³/μl)	Segm. (x10³/μl)	Eosin. (x10³/μl)	Basóf. (x10³/μl)	Linfóc. (x10³/μl)	Monóc. (x10³/μl)
01	14,33	0,14	6,73	0,29	0,00	6,45	0,72
02	12,50	0,00	7,00	0,00	0,00	0,00	0,55
03	10,18	0,00	5,40	0,00	0,00	4,48	0,30
04	13,33	0,00	6,80	0,17	0,00	4,53	0,26
05	12,91	0,00	5,40	0,00	0,00	4,48	0,30
Média	12,23	0,28	6,26	0,92	0,00	3,98	0,42
Desvio padrão	1,40	0,62	0,80	1,33	0,00	2,38	0,20

Tabela 22: Valores do leucograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 01, tratado com 10g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Leuc. (x10³/μl)	Bast. (x10³/μl)	Segm. (x10³/μl)	Eosin. (x10³/μl)	Basóf. (x10³/μl)	Linfóc. (x10³/μl)	Monóc. (x10³/μl)
0°	14,33	0,14	6,73	0,29	0,00	6,45	0,72
1°	19,37	0,00	11,04	0,20	0,00	7,55	0,58
2°	16,11	0,00	7,25	0,16	0,00	8,22	0,48
3°	17,95	0,00	9,40	0,00	0,00	8,26	0,00
4°	15,22	0,00	8,53	0,16	0,00	6,55	0,00
5°	17,11	0,00	10,10	0,00	0,00	6,84	0,17
6°	25,04	0,00	14,53	0,00	0,00	10,26	0,25
7°	22,47	0,00	12,57	0,00	0,00	11,46	1,45
8°	17,06	0,34	8,36	0,00	0,00	8,18	1,71
Média	18,79	0,04	10,22	0,10	0,00	8,40	0,58
Desvio padrão	3,36	0,12	2,40	0,11	0,00	1,66	0,65

Obs: O dia 0° não foi contabilizado na média e desvio padrão. Leuc.-leucócitos, Bast.-bastonetes, Eosin.-Eosinófilos, Basóf.-basófilos, Linfóc.-linfócitos e Monóc.-monócitos.

Tabela 23: Valores do leucograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 02, tratado com 20g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Leuc. (x10³/μl)	Bast. (x10³/μl)	Segm. (x10³/μl)	Eosin. (x10³/μl)	Basóf. (x10³/μl)	Linfóc. (x10³/μl)	Monóc. (x10³/μl)
0°	12,50	0,00	7,00	0,00	0,00	0,00	0,55
1°	18,00	0,00	12,96	0,18	0,00	4,86	0,00
2°	15,12	0,00	8,77	0,00	0,15	5,90	0,30
3°	17,62	0,00	10,40	0,00	0,00	6,88	0,36
4°	18,06	0,00	10,30	0,00	0,00	7,41	0,37
5°	22,68	0,00	13,16	0,00	0,00	9,53	0,00
6°	15,38	0,00	8,92	0,00	0,00	6,46	0,00
7°	18,21	0,00	9,29	0,00	0,00	8,56	0,36
8°	16,48	0,00	10,218	0,00	0,00	6,09	0,16
Média	17,69	0,00	10,50	0,02	0,01	6,96	0,19
Desvio padrão	2,35	0,00	1,69	0,06	0,01	1,50	0,17

Obs: O dia 0° não foi contabilizado na média e desvio padrão. Leuc.-leucócitos, Bast.-bastonetes, Eosin.-Eosinófilos, Basóf.-basófilos, Linfóc.-linfócitos e Monóc.-monócitos.

Tabela 24: Valores do leucograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Leuc. (x10³/μl)	Bast. (x10³/μl)	Segm. (x10³/μl)	Eosin. (x10³/μl)	Basóf. (x10³/μl)	Linfóc. (x10³/μl)	Monóc. (x10³/μl)
0°	10,18	0,00	5,40	0,00	0,00	4,48	0,30
1°	10,92	0,11	5,68	0,00	0,00	5,02	0,11
2°	9,87	0,20	4,93	0,20	0,00	4,34	0,20
3°	11,13	0,00	4,57	0,00	0,00	6,24	0,34
4°	8,19	0,17	4,18	0,25	0,00	3,44	0,17
5°	13,54	0,00	5,96	0,00	0,00	4,59	0,00
6°	12,28	0,00	5,90	0,00	0,00	6,39	0,00
7°	10,23	0,00	3,68	0,00	0,00	6,24	0,31
8°	10,44	0,00	3,96	0,00	0,00	5,74	0,31
Média	10,82	0,06	4,84	0,05	0,00	5,25	0,16
Desvio padrão	1,60	1,60	0,08	0,89	0,00	1,07	0,14

Obs: O dia 0° não foi contabilizado na média e desvio padrão. Leuc.-leucócitos, Bast.-bastonetes, Eosin.-Eosinófilos, Basóf.-basófilos, Linfóc.-linfócitos e Monóc.-monócitos.

Tabela 25: Valores do leucograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 04, tratado com 40g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso em dose única. PE/Brasil, 2006.

Dia	Leuc. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Bast. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Segm. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Eosin. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Basóf. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Linfóc. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Monóc. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
0°	13,33	0,00	6,80	0,17	0,00	4,53	0,26
1°	15,85	0,00	6,34	0,19	0,00	7,29	0,37
2°	17,85	0,00	9,46	0,24	0,00	5,17	0,71
3°	18,58	1,86	9,29	0,26	0,00	5,57	0,92
4°	16,59	0,00	6,13	0,23	0,00	8,13	0,00
5°	16,22	0,00	7,46	0,08	0,00	7,62	0,32
6°	13,80	0,00	4,28	0,96	0,00	7,87	0,69
7°	14,22	0,00	5,47	0,71	0,00	7,82	0,28
8°	17,85	0,00	9,41	0,24	0,00	5,17	0,71
Média	16,37	0,23	7,23	1,78	0,00	6,83	0,50
Desvio padrão	1,72	0,65	1,97	0,82	0,00	1,29	0,30

Obs: O dia 0° não foi contabilizado na média e desvio padrão. Leuc.-leucócitos, Bast.-bastonetes, Eosin.-Eosinófilos, Basóf.-basófilos, Linfóc.-linfócitos e Monóc.-monócitos.

Tabela 26: Valores do leucograma referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 05, tratado com 10g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. recém coletada por oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Leuc. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Bast. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Segm. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Eosin. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Basóf. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Linfóc. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Monóc. ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
0°	12,91	0,00	5,40	0,00	0,00	4,48	0,30
1°	13,30	0,00	19,95	0,00	0,13	11,17	0,00
2°	14,43	0,00	21,65	0,14	0,00	11,97	0,14
3°	12,70	0,00	26,67	0,00	0,00	9,90	0,12
4°	14,59	0,00	17,51	0,00	0,00	12,69	0,14
5°	13,59	0,00	20,39	0,00	0,00	11,55	0,00
6°	10,92	0,00	25,12	0,00	0,00	8,30	0,11
7°	14,02	0,00	37,86	0,00	0,00	9,95	0,28
8°	19,37	0,00	38,74	0,19	0,00	15,10	0,19
Média	14,11	0,00	25,98	0,42	0,16	11,32	0,12
Desvio padrão	2,42	0,00	8,13	0,79	0,47	2,05	0,09

Obs: O dia 0° não foi contabilizado na média e desvio padrão. Leuc.-leucócitos, Bast.-bastonetes, Eosin.-Eosinófilos, Basóf.-basófilos, Linfóc.-linfócitos e Monóc.-monócitos.

Tomou-se como valores de referência para a bioquímica clínica em caprinos, aqueles descritos por Rego (2000), os quais constam de: uréia, 33,60; creatinina, 1,32; gama glutamil transferase (GGT), 35,51; aspartato amino transferase (AST), 85,87; proteína, 6,56 e albumina, 3,28. Além disso, também foram considerados os valores evidenciados antes do início do protocolo experimental, os quais constam nas Tabelas 27, 28, 29, 30, 31 e 32. Os resultados demonstraram algumas variações, porém todas ocorreram de forma discreta.

Tabela 27: Valores das médias da análise bioquímica referentes aos cinco caprinos (*Capra hircus* L., 1758) antes do tratamento com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

Animais	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	GGT (U/I)	AST (U/I)	Proteína (g/dl)	Albumina (g/dl)
01	55,20	1,60	34	82,00	6,00	3,70
02	38,80	1,30	35	92,00	4,90	3,30
03	37,10	1,15	52	255,00	5,20	3,30
04	65,10	1,69	57	154,00	5,60	3,30
05	57,70	1,60	27	158,00	6,40	3,40
Média	50,78	1,46	41	148,20	5,62	3,40
Desvio padrão	12,28	0,23	12,82	69,06	0,60	0,17

Com relação à uréia e creatinina, observou-se que, apesar da oscilação durante o período experimental, houve decréscimo em todos os animais (Gráfico 08 e 09) no final do período, esse resultado indica hipoproteinemia, uma vez que a uréia é o principal produto do catabolismo das proteínas e que houve perda de massa muscular (Smith, 1993; MEYER, 1995). A diminuição dos valores destes parâmetros não tem significado clínico.

A GGT manteve-se estável no animal 01 mas aumentou nos animais 02 e 03 e diminuiu dos animais 04 e 05, enquanto que a AST aumentou nos animais 01 e 02 e diminuiu nos animais 03, 04 e 05 (Gráfico 10 e 11). A GGT é um indicador de desordens colestáticas, para Kaneko (1997), seu incremento é o resultado da proliferação de ductos biliares. Segundo Smith (1993), a AST é um indicador inespecífico de necrose tecidual e sua elevação pode persistir por até dez dias após um episódio de lesão hepática.

Os níveis de proteína sérica decresceram nos animais 01 e 05 e aumentaram no animal 02, 03 e 04, enquanto os níveis de albumina diminuíram nos animais 01, 02, 03 e 05 e no animal 04 elevaram-se (Gráfico 12 e 13). Feldman et al. (2000) explicam que, há um incremento nos níveis de proteína plasmática durante o processo de reparação na injúria tecidual e o tecido inflamado causa aumento da permeabilidade vascular, promovendo o escapamento de proteínas (primariamente albumina) para o espaço extravascular e conseqüente perda de proteína do espaço vascular. Para Smith (1993), o aumento na concentração de todas as proteínas do sangue resulta da perda do componente líquido do sangue. Esta desidratação pode ocorrer como resultado da redução na ingestão de líquidos e/ou excessiva perda de líquidos. Assim, justifica-se a ascite relacionada a hipoproteinemia, verificada nos animais 01, 02 e notadamente no 03, que apresentaram as taxas mais baixas de albumina sérica.

Gráfico 08: Demonstrativo dos níveis séricos de uréia de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

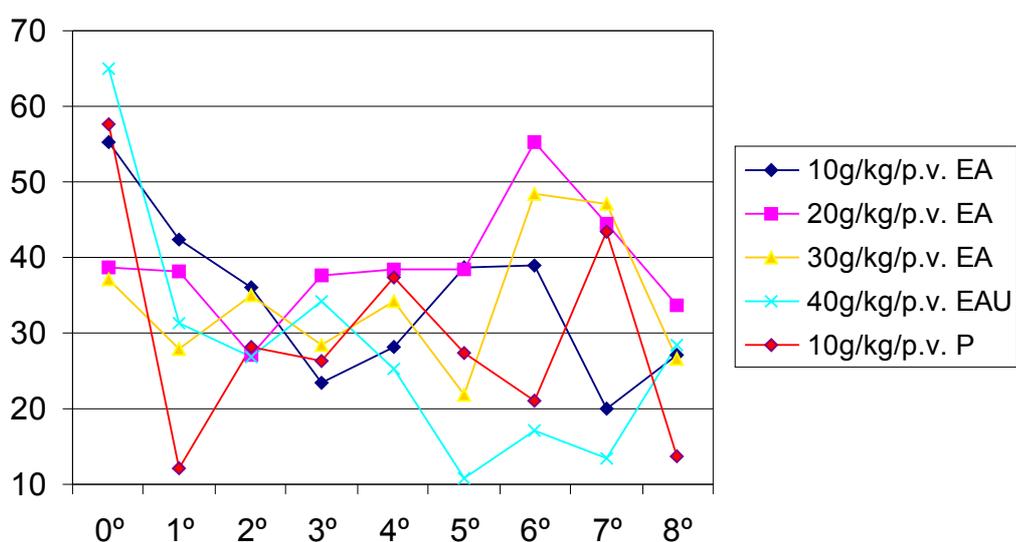


Gráfico 09: Demonstrativo dos níveis séricos de creatinina de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

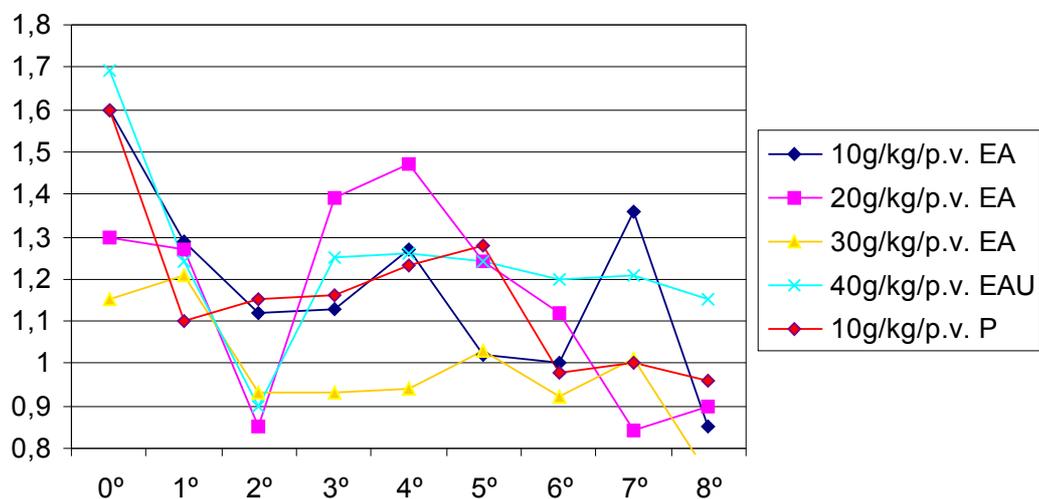


Gráfico 10: Demonstrativo dos níveis séricos da Gama Glutamil Transferase (GGT) de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

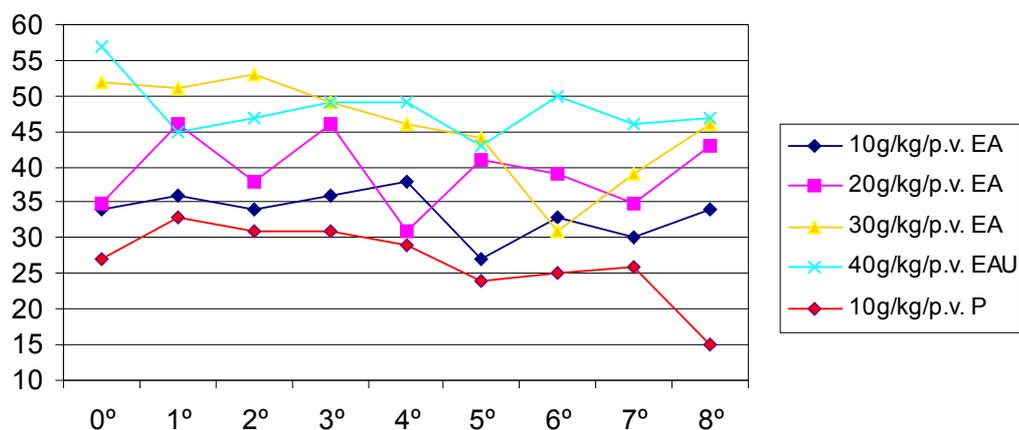


Gráfico 11: Demonstrativo dos níveis séricos da Aspartato Amino Transferase (AST) de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

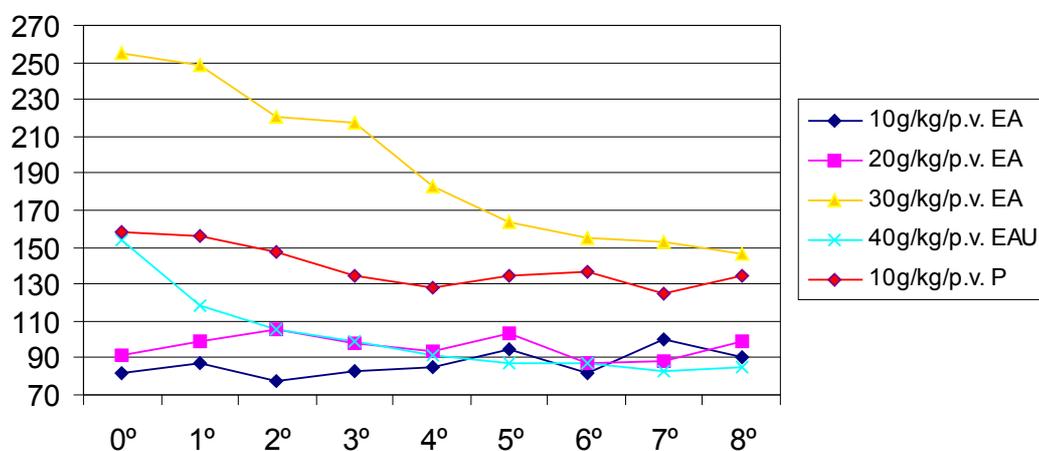


Gráfico 12: Demonstrativo dos níveis séricos da Proteína Total (PTT) de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

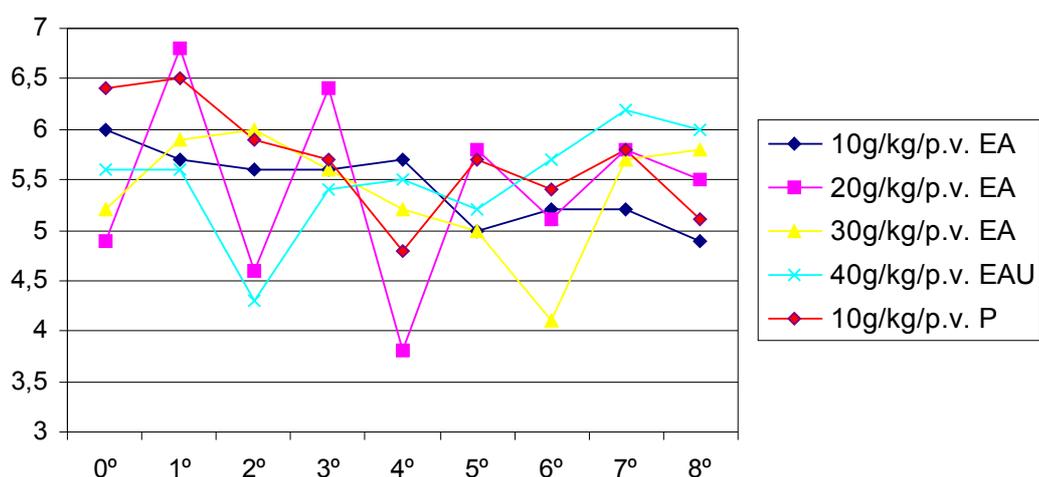


Gráfico 13: Demonstrativo dos níveis séricos de albumina de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diversas doses de *Indigofera suffruticosa* Mill. PE/Brasil, 2006.

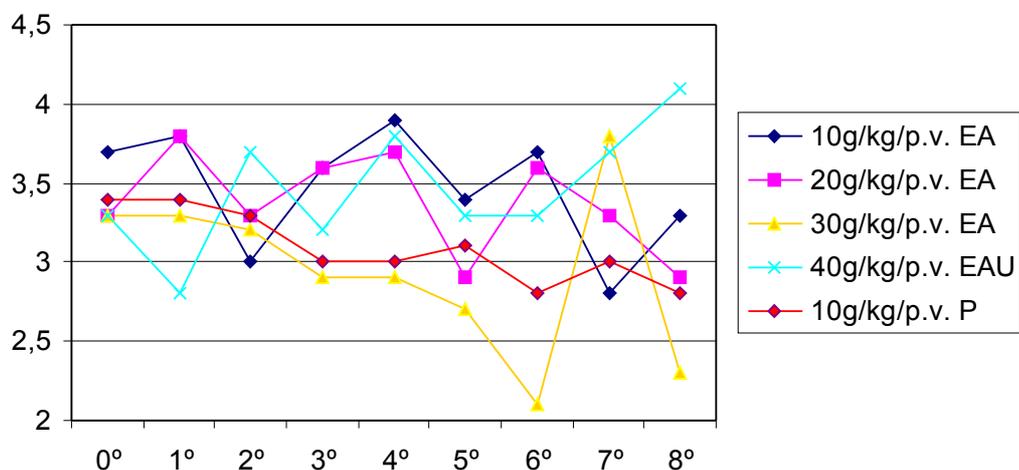


Tabela 28: Valores da análise bioquímica referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 01, tratado com 10g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	GGT (U/l)	AST (U/l)	Proteín Albumin	
					a (g/dl)	a (g/dl)
0º	55,20	1,60	34,00	82,00	6,00	3,70
1º	42,50	1,29	36,00	87,00	5,70	3,80
2º	36,00	1,12	34,00	78,00	5,60	3,00
3º	23,30	1,13	36,00	83,00	5,60	3,60
4º	28,10	1,27	38,00	85,00	5,70	3,90
5º	38,80	1,02	27,00	95,00	5,00	3,40
6º	39,00	1,00	33,00	82,00	5,20	3,70
7º	19,90	1,36	30,00	100,00	5,20	2,80
8º	27,10	0,85	34,00	90,00	4,90	3,30
Média	31,83	1,13	33,50	87,50	5,36	3,43
Desvio padrão	8,30	0,17	3,54	7,23	0,32	0,39

Obs: Não foram computados os valores do dia 0º para o cálculo da média e desvio padrão. GGT - gama glutamil transferase, AST - aspartato amino transferase.

Tabela 29: Valores da análise bioquímica referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 02, tratado com 20g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ggt (ui/i)	ast (ui/i)	Proteín Albumin	
					a (g/dl)	a (g/dl)
0°	38,80	1,30	35,00	92,00	4,90	3,30
1°	38,20	1,27	46,00	99,00	6,80	3,80
2°	27,10	0,85	38,00	105,00	4,60	3,30
3°	37,70	1,39	46,00	98,00	6,40	3,60
4°	38,40	1,47	31,00	94,00	3,80	3,70
5°	38,40	1,24	41,00	103,00	5,80	2,90
6°	55,30	1,12	39,00	87,00	5,10	3,60
7°	44,50	0,84	35,00	88,00	5,80	3,30
8°	33,60	0,90	43,00	99,00	5,50	2,90
Média	39,15	1,13	39,87	96,62	5,47	3,39
Desvio padrão	8,19	0,25	5,25	6,52	0,97	0,35

Obs: Não foram computados os valores do dia 0° para o cálculo da média e desvio padrão. GGT - gama glutamil transferase, AST - aspartato amino transferase

Tabela 30: Valores da análise bioquímica referente ao caprino(*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado com 30g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso durante oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ggt (ui/i)	ast (ui/i)	Proteín Albumin	
					a (g/dl)	a (g/dl)
0°	37,10	1,15	52,00	255,00	5,20	3,30
1°	28,00	1,21	51,00	248,00	5,90	3,30
2°	34,90	0,93	53,00	221,00	6,00	3,20
3°	28,50	0,93	49,00	217,00	5,60	2,90
4°	34,30	0,94	46,00	183,00	5,20	2,90
5°	21,90	1,03	44,00	164,00	5,00	2,70
6°	48,40	0,92	31,00	155,00	4,10	2,10
7°	47,20	1,01	39,00	153,00	5,70	3,80
8°	26,60	0,74	46,00	146,00	5,80	2,30
Média	33,72	0,96	44,87	185,87	5,41	2,90
Desvio padrão	9,63	0,13	7,08	38,12	0,63	0,55

Obs: Não foram computados os valores do dia 0° para o cálculo da média e desvio padrão. GGT - gama glutamil transferase, AST - aspartato amino transferase

Tabela 31: Valores da análise bioquímica referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 04, tratado com 40g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso na dose única. PE/Brasil, 2006.

Dia	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	GGT (U/l)	AST (U/l)	Proteín Albumin	
					a (g/dl)	a (g/dl)
0°	65,10	1,69	57,00	154,00	5,60	3,30
1°	31,30	1,24	45,00	118,00	5,60	2,80
2°	26,90	0,90	47,00	105,00	4,30	3,70
3°	34,10	1,25	49,00	99,00	5,40	3,20
4°	25,20	1,26	49,00	91,00	5,50	3,80
5°	10,70	1,24	43,00	87,00	5,20	3,30
6°	17,10	1,20	50,00	87,00	5,70	3,30
7°	13,40	1,21	46,00	83,00	6,20	3,70
8°	28,50	1,15	47,00	85,00	6,00	4,10
Média	23,40	1,18	47,00	94,37	5,48	3,48
Desvio padrão	8,61	0,12	2,33	12,13	0,57	0,41

Obs: Não foram computados os valores do dia 0° para o cálculo da média e desvio padrão. GGT - gama glutamil transferase, AST - aspartato amino transferase

Tabela 32: Valores da análise bioquímica referente ao caprino (*Capra hircus* L., 1758) 05, tratado com 10g/kg de *Indigofera suffruticosa* Mill. recém coletada durante oito dias. PE/Brasil, 2006.

Dia	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	GGT (U/l)	AST (U/l)	Proteín Albumin	
					a (g/dl)	a (g/dl)
0°	57,70	1,60	27,00	158,00	6,40	3,40
1°	12,10	1,10	33,00	156,00	6,50	3,40
2°	28,20	1,15	31,00	147,00	5,90	3,30
3°	26,40	1,16	31,00	134,00	5,70	3,00
4°	37,30	1,23	29,00	128,00	4,80	3,00
5°	27,50	1,28	24,00	134,00	5,70	3,10
6°	21,00	0,98	25,00	137,00	5,40	2,80
7°	43,50	1,00	26,00	125,00	5,80	3,00
8°	13,70	0,96	15,00	135,00	5,10	2,80
Média	26,21	1,11	26,75	137,00	5,61	3,05
Desvio padrão	0,76	0,12	5,72	10,05	0,52	0,21

Obs: Não foram computados os valores do dia 0° para o cálculo da média e desvio padrão. GGT - gama glutamil transferase, AST - aspartato amino transferase

Os corpúsculos de Heinz (Figura 09) foram verificados em todos os animais experimentais (Tabela 33) e foram mais evidentes nos animais 02 e 03. Embora essa ocorrência não tenha sido expressiva, Duncan e Prasse (1982) consideram que, a presença desses corpúsculos significa hemólise intravascular e a constatação desses é determinante no diagnóstico das anemias hemolíticas (CARLTON & MCGAVIN, 1998).

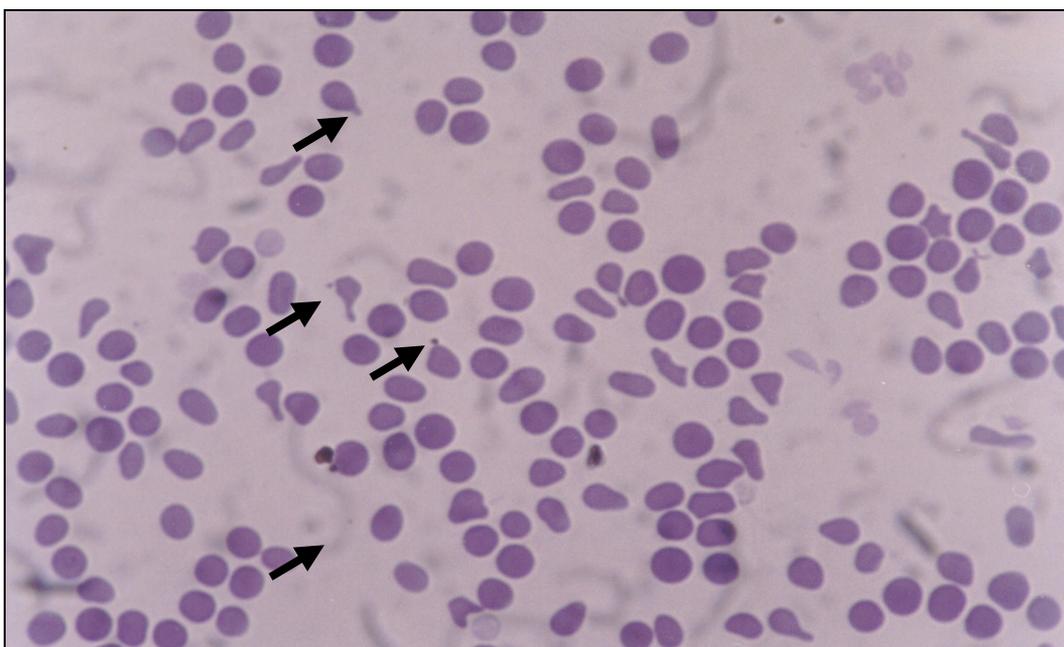


Figura 09: Corpúsculos de Heinz em hemácias do caprino (*Capra hircus* L., 1758) 02, tratado experimentalmente com 20g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso por oito dias. PE/Brasil, 2006.

Tabela 33: Demonstrativo da frequência dos corpúsculos de Heinz em hemácias de caprinos (*Capra hircus* L., 1758) tratados experimentalmente com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso e “in natura”. PE/Brasil 2006.

Dia	Animais				
	Extrato aquoso				“In natura”
	01 (10g/kg/p.v.)	02 (20g/kg/p.v.)	03 (30g/kg/p.v.)	04 (40g/kg/p.v.)	05 (10g/kg/p.v.)
0 ^o	-	-	-	-	-
1 ^o	-	Alguns	Raros	-	Raros
2 ^o	Alguns	Alguns	Raros	Vários	Raros
3 ^o	-	Raros	Raros	Raros	Raros
4 ^o	Raros	Raros	Alguns	Raros	Raros
5 ^o	Raros	Raros	Alguns	Raros	Raros
6 ^o	-	Raros	Alguns	Raros	Raros
7 ^o	-	Alguns	Alguns	Raros	Raros
8 ^o	Raros	Alguns	Alguns	-	-
9 ^o	Raros	Alguns	Alguns	-	-
10 ^o	Alguns	Alguns	Raros	-	-

5.3 Alterações anatomopatológicas

As alterações macroscópicas e microscópicas observadas nas necropsias e exames histopatológicos dos animais 01, 02, 03 e 05 foram anotadas em livro de registro da Área de Patologia/DMV/UFRPE.

5.3.1 Macroscopia

As principais alterações foram, ascite (figura 10), presente nos animais 01, 02 e 03, no qual foi mais evidente, que ingeriu a maior dose (30g/kg/p.v.) em extrato aquoso, além de discreta palidez renal bilateral.

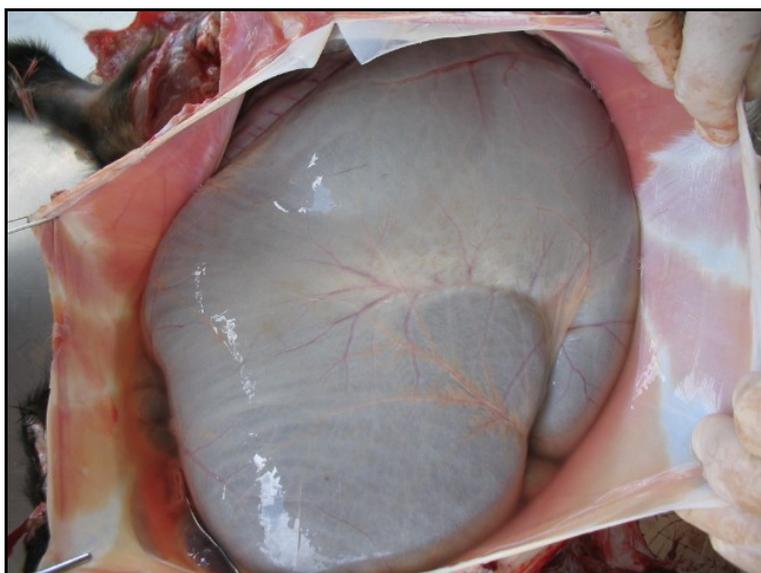


Figura 10: Aumento de líquido intra-peritoneal em caprino (*Capra hircus* L., 1758) 03, tratado com 30g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* na forma de extrato aquoso por 08 dias. PE/Brasil, 2006.

A ascite parece corresponder ao decréscimo nos níveis de albumina, principalmente no animal 03, demonstrado nas análises clínicas. De acordo com Spinosa (1996), a diminuição da síntese de albumina pelo parênquima hepático, tanto pela diminuição do número de hepatócitos como pela função celular

prejudicada implica na diminuição da pressão oncótica e conseqüente elevação da pressão hidrostática no meio intravascular, facilitando o extravasamento de líquidos desse meio.

Esse resultado difere daquele relatado por Barbosa Neto et al (2001), quando investigaram a atividade tóxica de *Indigofera suffruticosa* em bovinos, e verificou durante a necropsia, mucosas pálidas, sangue aquoso, urina vermelho escuro, rins aumentados de volume de coloração marrom-escura, fígado azulado superficialmente e ao corte com lobulação visível.

5.3.2. Microscopia

Lesões microscópicas foram observadas no fígado, rins, baço e testículos e estão demonstradas na Tabela 34.

Houve lesões hepáticas em todos os animais, independente da dose, ou da forma de ingestão (extrato aquoso ou “in natura”). Embora em graus variados, geralmente, estavam presentes tumefação, vacuolização e áreas de necrose de hepatócitos focais (Figura 11), mas, principalmente, na região centrolobular. Em virtude da tumefação, houve desagregação de hepatócitos e dissociação de cordões hepáticos (Figura 12) com conseqüente congestão sinusoidal. Observou-se ainda destruição de sinusóides, além de hemorragia e infiltrado inflamatório.

Barbosa et al. (2001) também observaram na intoxicação experimental em bovinos, tumefação de hepatócitos, áreas de necrose, figuras de picnose ou cariorrexia, no entanto, nos resultados do presente experimento, não foi verificado retenção biliar. Batatinha et al. (1994), investigando a atividade de *I. suffruticosa* sobre a função reprodutiva de ratas, encontraram à microscopia do fígado, um quadro degenerativo-necrótico.

Segundo Coelho (1971), as células hepáticas estão sujeitas a freqüentes alterações bioquímicas ou morfológicas, pelo ambiente pobre em oxigênio que as tornam mais sensíveis ao sofrimento, principalmente, por desempenharem função de detoxificação do organismo, expostas as alterações metabólicas dos lipídios,

proteínas e glicogênio, que induzem a lesões primárias, degenerativas ou infiltrativas. As influências tóxicas sobre o fígado podem resultar em necrose, tendo como sítio mais usual, a região periacinar. Para Carlton & MacGavin (1998), esta região é a última a receber sangue, por isso, é a menos oxigenada e os efeitos da hipóxia se manifestam primeiro nessa área.

Nos rins verificou-se glomeruloesclerose (Figura 13), vacuolização, degeneração e necrose do epitélio tubular; congestão, dilatação, contração e destruição de glomérulos; edema peri-vascular e endotélio reativo (Figura 14), além de cilindro hialino (animal 01). Segundo Carlton e McGavin (1998), a glomeruloesclerose pode resultar de qualquer injúria crônica que resulte em perda de função do glomérulo ou do néfron e a nefrose decorre da isquemia e nefrotoxicidade sobre as células epiteliais dos túbulos renais.

As alterações observadas no baço consistiram de hemossiderose discreta (Figura 15) nos animais 01 e 02, sendo moderada no animal 03. Carlton e McGavin (1998) explicam que, a hemossiderina é visível nos macrófagos esplênicos, especialmente após congestão prolongada, episódios de hemólise mediada por eritrofagocitose esplênica e inflamações crônicas que resultam em aumento no número de macrófagos carregados de hemossiderina.

As lesões nos testículos ocorreram nos animais 01, 02, 03 e 05, consistindo de vacuolização, degeneração (Figura 16) e necrose do epitélio tubular, debris celulares na luz dos túbulos, diminuição e ausência de espermátides e espermatozóides, além de esteratócitos degenerados e ausência de espermatogônias (animal 02).

Para Carlton e McGavin (1998), a degeneração testicular é uma lesão comum com diversas etiologias que são, freqüentemente, desconhecidas, porém, fatores sistêmicos como deficiências nutricionais, aberrações hormonais, irradiações e intoxicações podem ser responsabilizados por essa alteração. Tokarnia (2000) e Pugh (2004) comentam que, em casos de falhas reprodutivas, investiga-se muito mais as causas infecciosas, entretanto, existem as causas não infecciosas, que podem ser mais difíceis de ser diagnosticadas, porém, mais fáceis

de serem tratadas e algumas plantas são responsáveis por causar distúrbios reprodutivos e infertilidade como as que tem ação estrogênica (*Trifolium subterraneum*, *T. repens* e *Medicago sativa*), ainda há aquelas que provocam abortos, como *Tetrapteryx spp.*, *Ateleia glaxioviana* e *Stryphnodendron obovatum* entre outras.

Tabela 34: Demonstrativo das lesões microscópicas observadas no fígado de caprinos tratados experimentalmente com *Indigofera suffruticosa* Mill. em extrato aquoso e “in natura” por 08 dias. PE/Brasil, 2006.

Estado da planta		Extrato aquoso			“in natura”
Tratamento		01 (10g/Kg)	02 (20g/Kg)	03 (30g/Kg)	05(10g/Kg)
Período		08 dias			08 dias
Fígado					
	Tumefação	X	X	X	X
Hepatócitos	Vacuolização focal	X	X	X	X
	Necrose focal	X	X	X	X
	Dissociação de cordões hepáticos	X	X	-	X
	Perda da arquitetura	-	-	X	-
	Congestão (áreas)	X	X	X	-
	Congestão sinusoidal	X	X	-	X
	Destruição de sinusóides	-	-	X	X
Rins					
	Lesão tubular	X	X	X	X
Epitélio tubular	Vacuolização	X	X	X	X
	Degeneração	-	X	X	X
	Necrose	-	X	X	X
	Glomeruloesclerose	X	X	X	X
	Dilatação glomerular	-	X	X	-
	Retração glomerular	X	X	X	-
	Glomérulos destruídos	-	X	X	-
	Cilindros hialinos	X	-	-	-
	Reatividade do endotélio vascular	X	X	-	X
Baço					
	Congestão	-	-	-	X
	Hemossiderose	discreta	discreta	X	-
Testículos					
	Vacuolização do epitélio tubular	X		X	X
	Degeneração/necrose do epitélio tubular	X	X	X	X
	Degeneração de espermátócitos	-	-	X	X
	Ausência de espermátides	X	-	X	X
	Ausência de espermatogônias		X	-	X
	Ausência de espermatozóides	X	-	X	X
	Debris celulares no lúmen dos túbulos	X	-	X	X

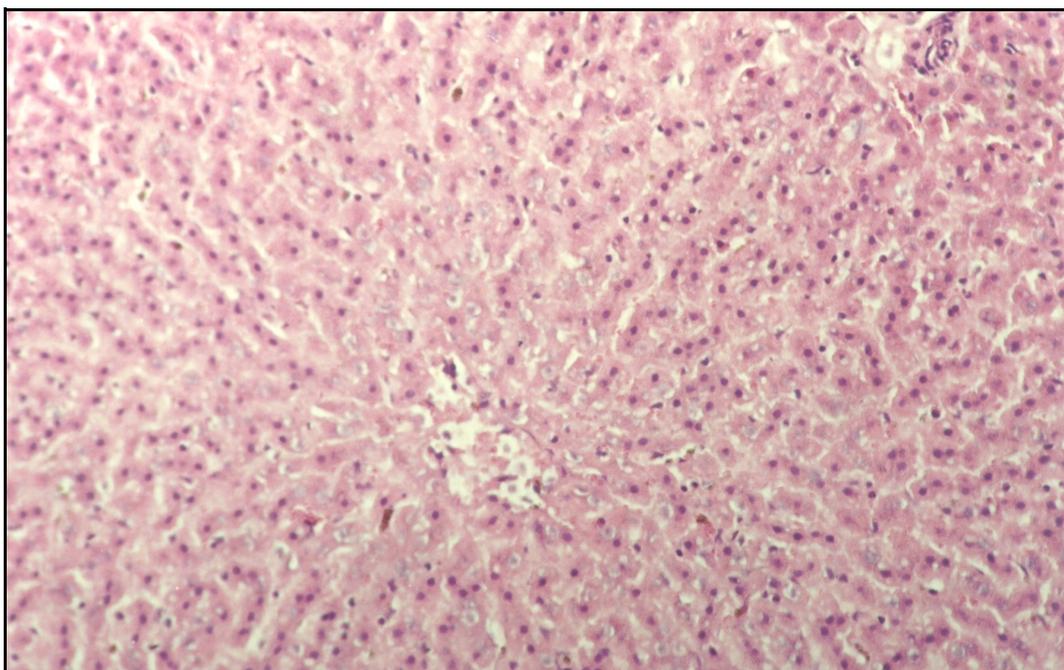


Figura 11: Tumefação e necrose de hepatócitos em fígado de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 30g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso por 08 dias. PE/Brasil, 2006. 16X. HE.

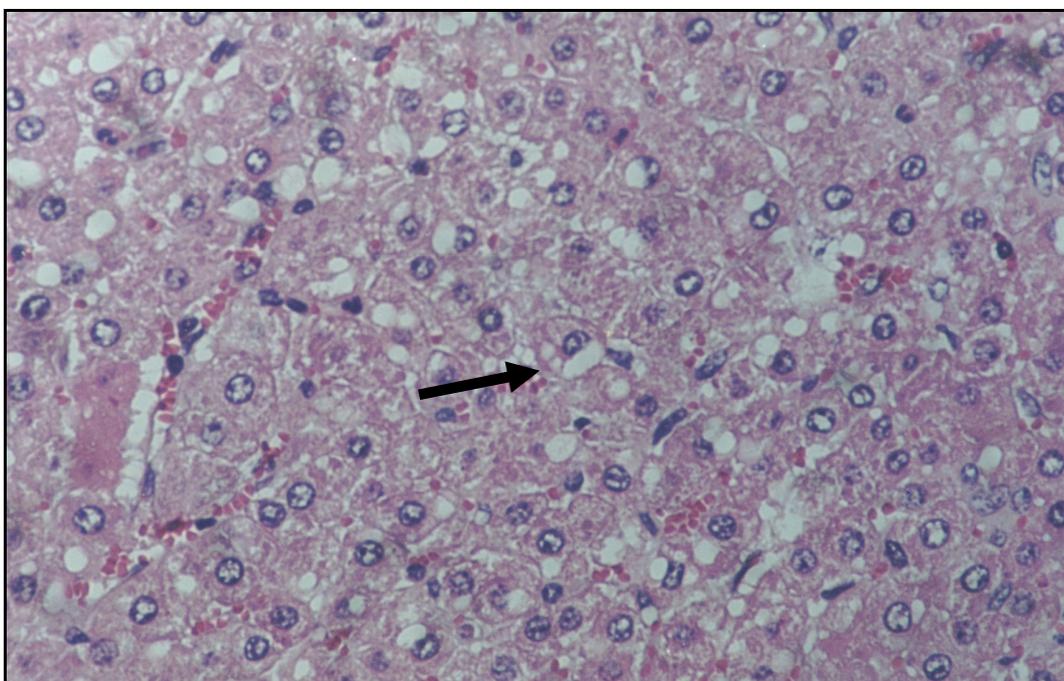


Figura 12: Tumefação e necrose de hepatócitos e dissociação dos cordões hepáticos em fígado de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 30g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso por 08 dias. PE/Brasil, 2006. 40X.HE.

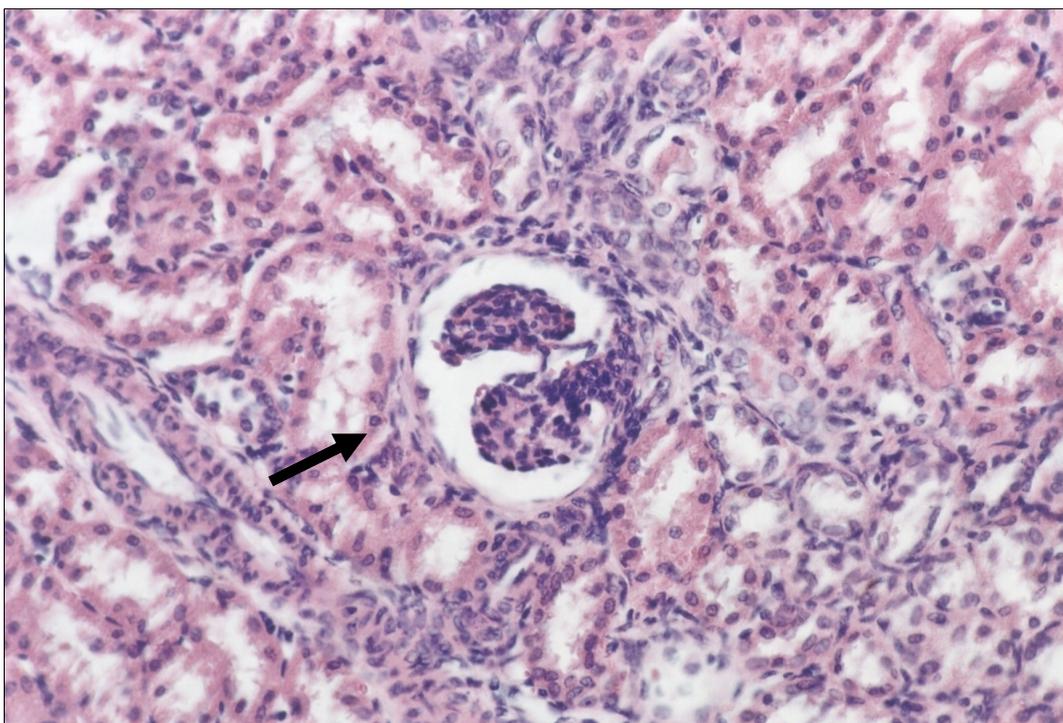


Figura 13: Glomeruloesclerose em caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 10g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso por 08 dias. PE/Brasil, 2006. 16X.HE.

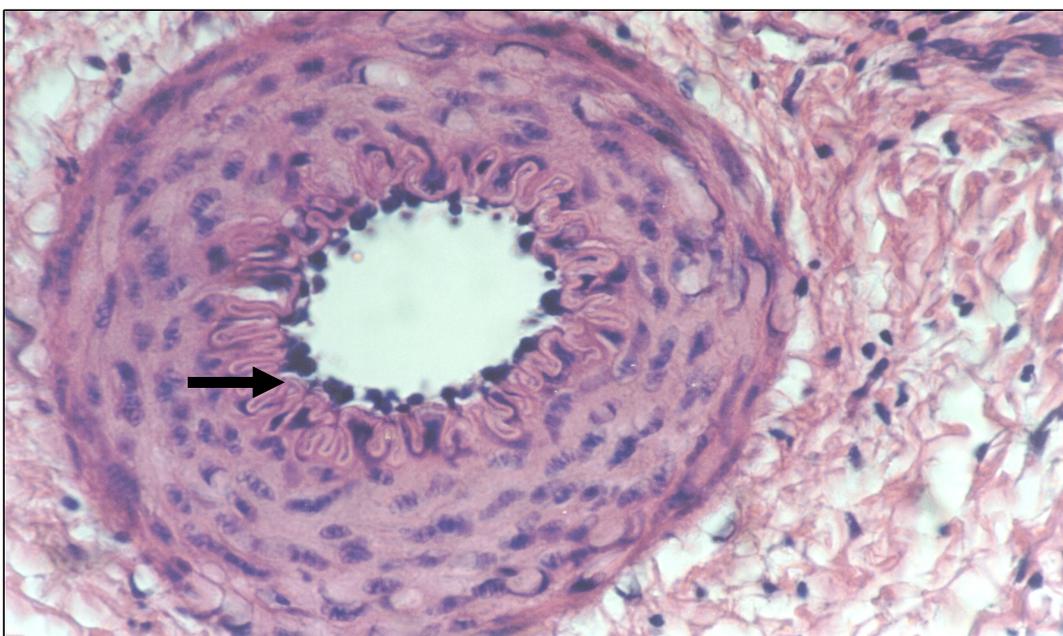


Figura 14: Reatividade do endotélio vascular em rim de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 20g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso por 08 dias. PE/Brasil, 2006. 40X.HE.

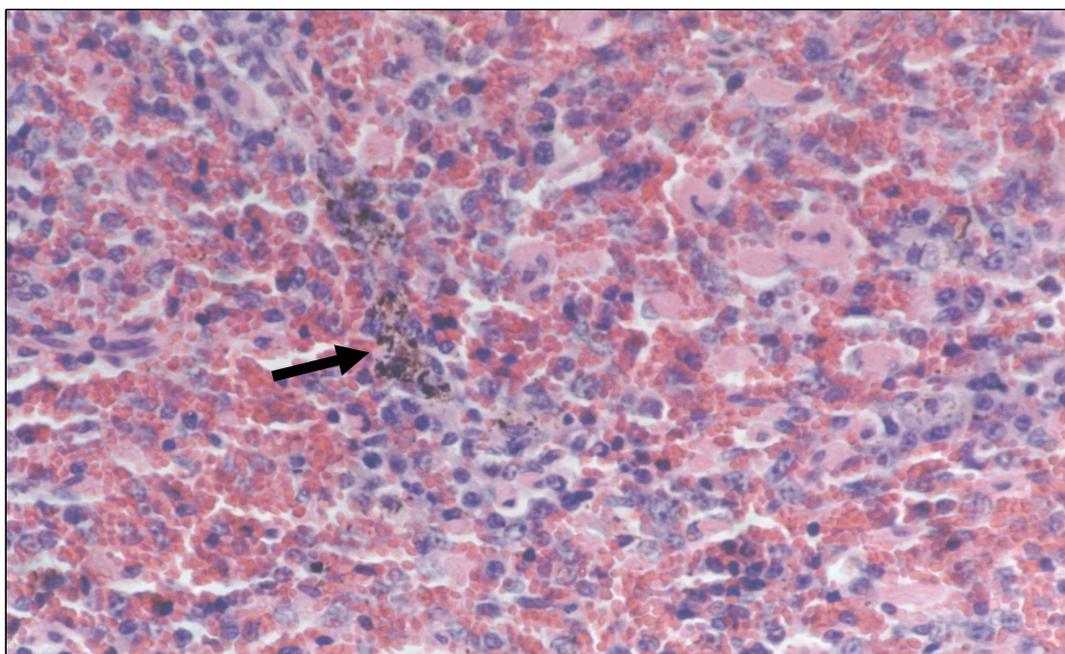


Figura 15: Discreta hemossiderose em baço de caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 10g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* em extrato aquoso por 08 dias. PE/Brasil, 2006. 40X.HE.



Figura 16: Degeneração testicular caprino (*Capra hircus* L., 1758), tratado com 10g/kg/p.v. de *Indigofera suffruticosa* "in natura" por 08 dias. PE/Brasil, 2006. 40X.HE.

5.4 Análise cromatográfica da urina

Foram analisadas 15 amostras, três por animal, utilizando a metodologia sugerida por Obertür (2004a). Observou-se uma mancha, de coloração vermelho-tijolo, semelhante a do indican (Figura 17) em todos os animais, ausente na amostra controle. Durante o processamento, verificou-se que tanto a vanilina clorídrica como a sulfúrica servem como reagente para a evidenciação da mancha pertinente a esta substância, cuja visibilidade é superior àquela observada quando se utiliza o reagente HCl a 5%, que produz uma mancha azul-clara.

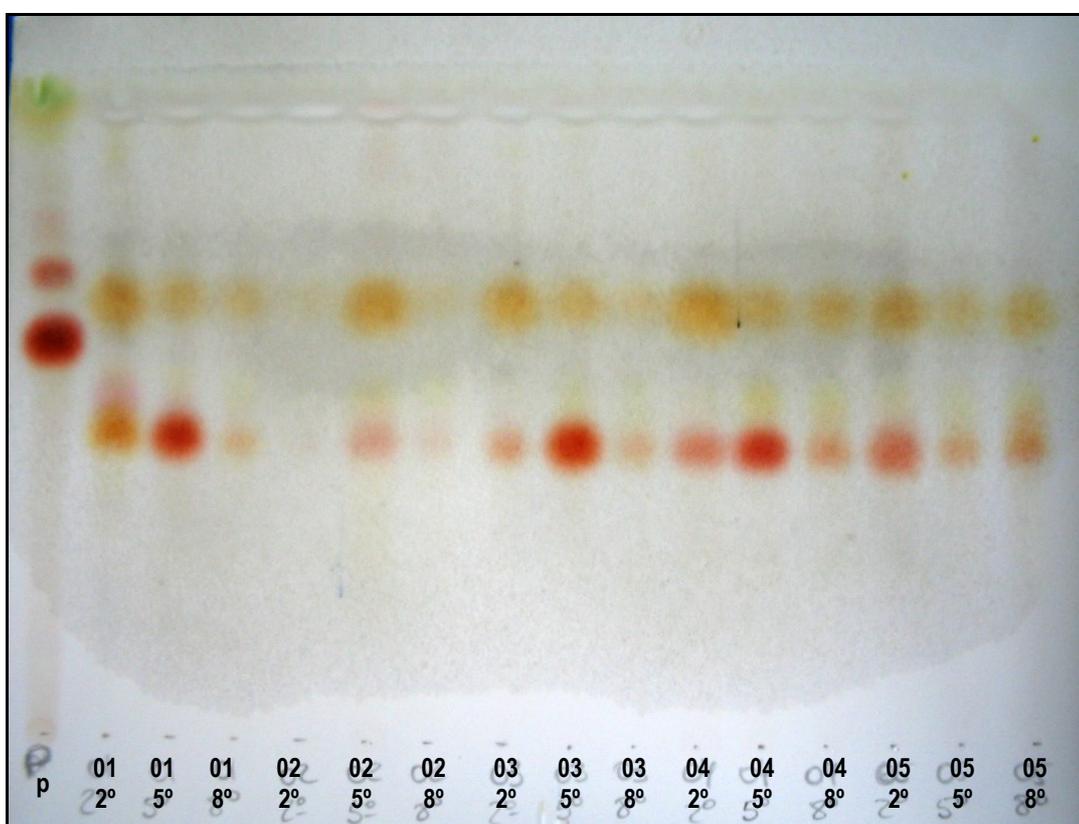


Figura 17: Co-cromatograma das amostras das urinas dos caprinos (*Capra hircus* L., 1758) 01, 02, 03, 04 e 05, relativas as coletas do 2º, 5º e 8º dia em comparação com o padrão (extrato metanólico de *Indigofera suffruticosa* Mill.) demonstrando mancha vermelho-tijolo referente ao derivado do indican. PE/Brasil, 2006.

A comprovação de que esta substância é o indican ou um seu derivado está fundamentada na hidrólise realizada nas amostras de urina, partição com butanol e aplicação em cromatograma, onde ficou evidenciado a presença do índigo e

indirubina e não mais surgiu à mancha vermelho-tijolo relativa ao indican, idêntico ao que ocorreu com a hidrólise da amostra de *Indigofera suffruticosa* Mill., uma reação descrita por Chanayath (2002) e Obertür (2004a).

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos a partir dos objetivos propostos e sob as condições em que foram realizados os procedimentos, permite as seguintes conclusões:

Os espécimes de *Indigofera suffruticosa* Mill. provenientes de Venturosa, Passira e Recife (*Campus* da UFRPE) são quimicamente semelhantes e todos são positivos para presença do indican.

Apenas os animais que ingerem *Indigofera suffruticosa* Mill. na forma de extrato aquoso apresentam urina esverdeada e em alguns há aumento da densidade urinária (>1040), variações de pH urinário (8,0 - 5,0) e leucocitúria ocorreu em todos os animais que ingeriram a planta.

Os achados hematológicos demonstram discreta anemia microcítica (hipocrômica à normocrômica) e presença de corpúsculos de Heinz em todos os animais que ingeriram *Indigofera suffruticosa* Mill.

As principais alterações necroscópicas são ascite e palidez renal.

As lesões microscópicas do fígado, rins e testículos de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), demonstraram que *Indigofera suffruticosa* Mill. é hepatotóxica, nefrotóxica, e causa degeneração testicular.

É possível identificar, na urina de caprinos (*Capra hircus* L., 1758), tratados com diferentes doses de *Indigofera suffruticosa* Mill., em extrato aquoso e “in natura”, a substância derivada do indican, por cromatografia em camada delgada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, P. B.; BUTARAH, G. **Plantas forrageiras - gramíneas e leguminosas**. São Paulo: Nobel, 2004, 162p.
- ALDEA, A. Prova prática para identificar a presença de saponinas. *La Farmacia Chilena*, A. 19, n.3, 1945.
- ALEJO, J. P. de.; MIRANDA, R.; RODRIGUES, G. Actividad anticonvulsivante (Antiepiléptica) del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarrón). *Rev. Cubana Plant Med.* 1(2): 7-10, 1996.
- ALEJO, J. P. de; RODRIGUEZ, G. R.; FLORES, R. M. Actividad anticonvulsivante de las fracciones butanólica e acetato de etilo de la *Indigofera suffruticosa* Mill. (Añil cimarrón). *Rev. Cubana Plant Med.* 3(3): 7-11, 1998.
- ALI, A. N.; ATTIF, O. A.; MORHAMMED, M. I. Herbal medicine in two yemen province. *Yemen Med. J.* 3: 13-20, 1999.
- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. **Leguminosae: source book of characteristics, uses and nodulation**. Washington: The University of Wisconsin Press, 1981. 813p.
- ANAND, K. K.; CHAND, D.; GHATAK, B. J. R. Protective effect of alcoholic extract of *indigofera tinctoria* Linn. in experimental liver injury. *Indian J. Exp. Bid.* 17: 685-687, 1979.
- ANDERSON, R. C. MAJAK, W.; RASMUSSEN, M. A.; ALLISON, M. J. Detoxificação potential of a new species of ruminal bacteria that metabolize nitrate and naturally occurring introtoxings in: Garland, T.; Bar, A. C. (Eds), **Toxic plants and other natural toxicants**. CAB International, Wallington, Oxon, 1998, p. 154-158.
- ANDRADE, S. O.; PERGRINO, C. J. B.; AGUIAR, A. A. Estudo sobre *Brachiaria* sp (Tanner grass), efeito nocivo para bovinos. *Arqs. Inst. Biológico.* 38(3): 135-150, 1971.
- AYLWARD, R. D.; COURT, R. D.; HAYDOCK, K. P.; STRICKLAND, R. W.; HEGARTY, H. P. *Indigofera* species with agronomic potential in the tropics. Rat Toxicity studies. *Australian Journal of Agricultural Research.* 38(1), 177-186. 1987.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Robe, 2003, 581p.
- BAHIA. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. v.1, Governo do Estado da Bahia, SEPLANTEC, 1979, p.1201.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. 26 ed. São Paulo: M.V.P., 1970.
- BARBOSA NETO, D. J.; OLIVEIRA, C. M. C.; PEIXOTO, P. V.; BARBOSA, I. B. P.; ÁVILA, S. C.; TOKARNIA, C. H. Anemia hemolítica causa da por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* V.21, n.1, p. 18-22, 2001.
- BARBOSA, R. C. S. B. C.; BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, D. F. **Revisão e atualização da literatura em plantas tóxicas do Estado da Paraíba**, João Pessoa: UFPB.BC, 1983, 55p.
- BARROSO, G. M. **Sistemática da angiosperma do Brasil**. São Paulo: EDUSP, 1984. v.2., 324p.

- BASTOS, J. E. D.; FERREIRA, F. A.; SANTOS, J. B. F. DOS. Apontamentos de toxicologia – identificação e diagnóstico. **Cad. Tec. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte: CENEX, n.9, p. 1-64, 1994.
- BATATINHA, M. J. M.; MOREIRA, E. L. T.; SALES, L. A.; BAUTISTA, A. R. P. L.; LIMA, I. C.; NASELLO, A. G.; PRATA, E.M. R. Estudos toxicológicos de leguminosas: Toxicidade de *Indigofera suffruticosa* Mill. sobre a função reprodutiva de ratas. **Arq. EMV-UFBA**, Salvador, v.17, n.1, 1994.
- BEN, B. L. Column Chromatography-spectrophotometric determination of índigo and indirubin in Qingdai, a traditional Chinese medicine. **Chin. Trad. Herb. Drugs**. 12:11-15, 1981.
- BHASKAR, A. E.; GANGA, N. ARIVUDAIMBI, R.; SANTHANUM, G. Antiinflammatory, analgesic activities of *Indigofera aspalathoides*. **Indian J. Med.** 76 (10): 115-116, 1982.
- BLANKENSHIP, B. A. **The Armed Forces Institute of Pathology. Department of Veterinary Pathology** Wednesday slide conference, 2001-2002, conference 12, Dec, 2001.
- BLOOD, H. R. **Clínica Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 871p.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. 3. ed. Mossoró: Escola Superior de Agricultura. 1976. 452p.
- CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 1998, 672p.
- CHANAYATH, N.; LHICOCHAIPHANT, S.; PHUTRAKUL, S. Pigment extraction Techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. And *Baphicacanthus cusia* Brem. And Chemical Structure Analysis of Their Major Components. **cmu. Journal**. v. 1(2), p. 149-160, 2002.
- CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, forages and poisonous plants**. Illinois: Interstate Publishers, 1998, 463p.
- CHEVILLE, N. F. **Introdução à Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 1993. p.283.
- CHRISTIE, G. S.; DEMUNK, F. G.; MADSEN, N. P.; HEGARTY, M. P. The effects of an arginin antagonist on stimulated human lymphocytes in culture. **Pathology**, v.3, p. 139-144, 1971.
- CLARK, R. J. H.; COOKSEY, C. J.; DANIELS, M. A. M. WITHNALL, R. **Endeavour New Series**. v.17, p.191, 1993.
- COOKE, A. R. The toxic constituent of *Indigofera endecaphylla*. **Archives of biochemistry and biophysics**. v.55, issue 1, march, p. 114-120, 1955.
- CORNELIUS, C. Liver function. In: KANEKO, J. J. **Clinical Biochemistry of domestic Animals**. California: Academic Press, cap. 14, 1989, p. 364-397.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.8, 2000, p. 272-273.

- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.1262.
- DAHTO, M. U. Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves. **J. Ethnopharmacol.** v.64, p. 277-282, 1999.
- DEMUNK, F. G.; CHRISTIE, G. S.; HEGARTY, M. P. The effects of indospicine on bone marrow cells in liquid culture. **Pathology**, v.4, p. 133-137, 1972.
- DOMINGUEZ, X. G.; MARTINEZ, C.; CALERO, A.; DOMINGUEZ JR., X. A. HINOJOSA, M.; ZAMUDIO, A. Louisfieserone, na unusual flavanone derivative from *Indigofera suffruticosa*, Mill. **Tetrahedron Letters**, n.5, p. 429-432, 1978.
- EYRE, M. D.; PHILLIPS, D. E.; EVANS, I. M.; THOMPSON, A. The nutritional role of S-methyl-L-cysteine. **J. Sci. Food Agric.** 34: 696-700, 1983.
- FELDMAN, B. F.; ZINKI, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 1344p.
- FERRAZ, E. M. N. Composição florística em trechos de vegetação de caatinga e brejo de altitude na região do Vale do Pajeú. Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 21, n.1, p. 7 -15, 1998.
- FERREIRA, E. S. B.; HULME, A. N.; MCNAB, H.; QUYUE, A. The natural constituents of historical textile dyes. **Chem. Soc. Rev.** v.33, p. 329-336, 2004.
- FINCO, D. R. Kidney function In: KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. California: Academic Press. cap 18, 1989, p. 496-537.
- FINNEGAN, R. A.; MUELLER, W. H. Chemical examination of a toxic extract of *Indigofera endecaphylla*. The endecaphyllins. **J. Pharm. Sci.** 54: 1136-1144, 1965.
- GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; BARINSON, A. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.31, p. 207 - 209, 2003.
- GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; HONDA, N. K.; SILVA, A. J. R. **Phytochemistry**. v.28, p.1251, 1989.
- GARCIA, M. **Manual de semiologia e clínica dos ruminantes**. São Paulo: Varela, 1996, p. 108.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de urinálise veterinária**. São Paulo: Varela, 1996 95p.
- GENAUST, H. **Etymologisches Wörterbuch der botanischen pflanzennameir**. Hamburg: Nikol, 2005, p. 306.
- HAN, R. Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China. **Stem Cells** 12, 53-63, 1994.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1998, 288p.
- HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. 1939, p. 146.
- HOWARD, R. A. 1988. **Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. Dicotyledoneae**, part 1. v.4. Jamaica Plain, MA: Arnold Arboretum, Havard University, 673p.

- HURRY, J. B. **The Woad Plant and its Dye**. London: Oxford University Press, 1930.
- IBGE <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=tso=z>
- INDIRUBIN COOPERATIVE GROUP. Clinical study of indirubin in the treatment of 314 patients with chronic granulocytic leukemia. **Chin. J. Hematol.** 1:132, 1980.
- IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte I**. Editorial Hemisferio Sur, 1998, 550p.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- JAMES, L. F. Solving poisonous plant problems by a team approach, p.1-6 In: Colegate S.M. & Dorling P.R. (ed.) **Plant Associated Toxins**. CAB International, Wallingford, 1994.
- JONES, T. C.; HUNT, R. T.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6.ed., São Paulo: Manole, 2000, p. 74-80.
- KOKUBUN, T.; EDMONDS, J. JOHN, P. Indoxyl derivatives in wad in relation to medieval indigo production. **Phytochemistry**, v.49, n.1, p.79-87, 1998.
- KUN LESTARI, W. F. Dyeing process with natural indigo: The tradition and technology. **Revival Natural Indigo dye**. Sept. 20-29, 1998.
- LEITE, P. S. *Indigofera suffruticosa* Mill.: Ensaio fitoquímico e ações biológicas (João Pessoa). Universidade Federal da Paraíba: **Tese de Doutorado**, 2003, 90p.
- LIOGIER, H. A. **Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe**. San Juan: Iberoamericana de Ediciones. 1990, 566p.
- LU, R. G. Determination of indirubin and indigo in natural indigo (Qingdai) with dual Wavelength spectrometry. **Chin. Pharm. Bull.** 21: 72-74, 1986.
- LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute do Pathology**. 3. ed. New York: Mac Grw Hill, 1968. 258p.
- LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**. V.18, n.11, p.1419-1422, 1972.
- MAIER, W.; SCHUMANN, B.; GROGER, D. Biosynthesis of indoxyl in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. **Phytochemistry** .29: 817-819, 1990.
- MAJAK, W.; BENN, M.; MCEVAN, D.; PASS, M. A. Three nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera linnaei*. **Phytochemistry**. n.31, v.7, july, p.2393-2395, 1992.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Acad. Pres., 1982, p. 52-61.
- MATOS, F. J. A. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: Ed. UFC, 1999, 78p.
- MCDUGALL, S.; LEPHERD, L. L.; SMITH, S. Haematological and biochemical reference values for grazing saanen goats. **Australian Veterinary Journal**. v.68, n.11, p. 370-372, 1991.
- MC NAMARA, J. O. Role of neurotransmitter in seizure mechanism in the kindled model of epilepsy. **Fed Proe**. v.43, p. 2516-2520, 1984.

- MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995, 308p.
- MELO, M. M. Plantas tóxicas para bovinos no Estado de Minas Gerais. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte: CENEX, n. 24, p. 5-52, 1998.
- MELO, M. T. Hemograma referencial de caprinos criados no Estado de Pernambuco; procedimentos clínico-laboratoriais e avaliação da influência dos fatores etário e sexual. Recife: UFRPE, 2001. **Dissertação de Mestrado**. 72p.
- MILLER, R.; SMITH, C. R. Seeds of Indigofera species: their content of amino acids that may be deleterious. **J. Agric. Food Chem.** v.21 p. 909-912, 1973.
- MINAMI, Y.; KANAFUJI, T.; MIURA, K. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Polygonum tinctorium* which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. **Biosci. Biotech. Biochem.** v.60, p. 147-149, 1996.
- MINAMI, Y.; TAKAO, H.; KANAFUJI, T.; MIURA, K.; KONDO, M.; HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M. MATSUBARA, H. Glucosidase in the índigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. **Plant Cell Physiol.** v.38, p. 1069-1074, 1997.
- MORENO, B.; GOMEZ, N. Técnicas de necropsia y examen macroscópico de cadáveres, toma de muestras para el estudio histopatológico in: REKALDE, G. A.; PÉREZ, A. L. G. **Necropsia y toma de muestras en pequeños rumiantes**. Ovis, n. 84, enero, 2003. p. 27-44.
- MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G. **Manual de manejo do herbário de Ilhéus, Bahia**, 1986.
- MORRIS, D. D. Coleta e apresentação das amostras para citologia e hematologia in: **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993, 900p.
- MUNDAY, R.; MANNS, E. Comparative toxicity of prop(en)yl disulfides derived from Alliaceae: Possible involvement of 1-propenyl disulfides in onion-induced hemolytic anemia. **J. Agric. Food Chem.** 42: 959-962, 1994.
- NEAL, M. C. 1965. **In gardens of Hawaii**. Spec. Pub. 50, Honolulu: Bernice P. Bishop Museum Press, 924p.
- NEU, R. A. New Reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. **Natuwissenschaften**, n.43, p.82, 1956.
- NOTTLE, M. C. Urinary sediments in sheep feeding on oestrogenic clover. IV. Indigotin and indirubin in some sediments and calculi. **Australian Journal of Agricultural Research**. 26: 2, p. 313-318, 2006.
- OBERTÜR, C.; GRAF.; H.; HAMBURGER, M. The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves - a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments. **Phytochemistry**, v.65, p. 3261-3268, 2004a.
- OBERTÜR, C.; SCHNEIDER, B. GRAF.; H.; HAMBURGER, M. The elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.) - Identification of the jamor indigo precursor, isatan A, and a structure revision of isatan B. **Chem Biodiv.** v.1, p. 174-182, 2004b.

- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 1997, p. 147.
- OLIVEIRA, R. B. de.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas. Conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Holos, 2003, 64p.
- OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. p. 429
- PEARN, J. H.; HEGARTY, M. P. Indospicineae the teratogenic factor from *Indigofera spicata* extract causing cleft palate. **Br. J. Exp. Path.** v.51, p. 34-36, 1970.
- PLANT & TEXTILE – A legacy of technology, Cornell Cooperative Extension. 2005. www.hort.cornell.edu/plantsandtextiles/indigo.html
- PROPHET, E. B.; MILLES, B.; ARRINGTON, J. B. SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Armed Force Institute of Pathology American Registry of Pathology, Washington. 1992. 279p.
- PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004, 513p.
- RADELEFF, R. D. **Toxicologia Vegetal**. Espanha: Ed. Leon, 1964, 235p.
- RÊGO, E. W. Contribuição ao estudo da bioquímica clínica de caprinos (*Capra hircus* L.) criados no Estado de Pernambuco. Influência de fatores de variabilidade etário e sexual. **Tese de doutorado**. São Paulo, FMVZ da USP, 2000.
- RIBEIRO, L.R.; BAUTISTA, A. R.; SILVA, A. R. Toxicological and toxicogenetic effects of plants used in popular medicine and in cattle food. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 86 Suppl. v.2, p. 89-91., 1991.
- RIET-CORREA, .; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras**. v.21, n.1, jan/mar, 2001.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. V.2, São Pauo: Varela, 2001, p. 283.
- RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicação por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Rio Grande do Sul: Hemisfério Sul do Brasil, 1993, p. 326.
- ROBERTSON, E. H; CARTWRIGHT,, R. A; WOOD, J. J. Natural products of woody plants. **Sci. Food Agr**. 7, 637-640, 1956.
- ROIG, J. T. **Plantas medicinales aromáticas y venenosas de Cuba**. La Habana: Editorial Ciência y Técnica, Instituto del Libro, 1974, p. 315-316.
- ROSENBERGER, G. **Enfermidades de los bovinos**. Buenos Aires: Hemisferio Sul, v. I, II, 1983, 1154p.
- SANTOS, R. I. dos Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários in: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; MELLO, J. C. P. DE.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2003, 1102p.
- SCHERDING. R. G. **Emergências clínicas em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988, p.159.

- SCHMIDT, H. Indigo – 100 Jahre industrielle synthese. **Chem. Unserer Zeit.** 31, 121-128, 1997.
- SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K. Thin-layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. **Journal of Chromatography.** 1991, 587:351-354.
- SHIN, J. J.; LEE, J. J. Cultural conditions and growth characteristics of indigo (*Polygonum tinctorium*) cells in an air-lift bioreactor. **Kor. J. Biotechnol. Bioeng.** 8: 193-199, 1993.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; MELLO, J. C. P. DE.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia – da planta ao medicamento.** 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2003, 1102p.
- SIMON, J. E.; CHADWICK, A. F.; CRAKER, L. E. 1984. Herbs: An indexed bibliography. 1971-1980. **The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medical plants of the Temperate Zone.** Archon Books, Hamden, CT. 770p.
- SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais.** São Paulo: Manole, 1993, 900p.
- SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 545p.
- STASI, L. C. DI. **Plantas medicinais – arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar,** São Paulo: UNESP, 1996, 230p.
- SZAZ, G. KINETIC fotometric method for serum gama glutamil transpeptidase. **Clinical Chemistry.** v.15, n.2, p.124-133, 1969.
- TANG, Y. Determination of indirubin in Qingdai (*Baphicacanthus cusia* Bremk.) and Chinese medicines containing it. **Chin. J. Pharm. Anal.** v.7, p. 40-42, 1987..
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia e bovinos e outros herbívoros.** Manaus: INPA, 1979, 62p.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Diagnóstico de intoxicação por planta em bovinos e outros herbívoros. **Pesq. Vet. Bras.** v.6, n.3, jul/set, 1986.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. PEIXOTO, P. V. Metodologia da investigação sobre plantas tóxicas de interesse pecuário. **Pesq. Vet. Bras.,** v.9, n.3/4, jul/dez, 1989.
- TOKARNIA, C. H.; CHAGAS, B. R.; CHAGAS, A. D.; SILVA, H. K. Anemia hemolítica causada por *Ditaxis desertorum* (Euphorbiaceae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v.17, n.3/4, p. 112-116, 1997.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. A importância do conhecimento sobre as plantas tóxicas. **Revista CFMV.** Ano 6, n.20, mai/jun/jul/ago, 2000a.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, 2000b, 320p.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon.** v.40, p. 1635-1660, 2002.

- VASCONCELOS, A. C. **Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária**. Brasília, MEC/ABEAS, 1988 74p. (Programa Agricultura nos Trópicos, v 4.).
- VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Hong Kong: The Macmillan Press, 1981.
- VON POSER, G. L.; MENUT, C.; TOFFOLI, M. E.; VERIN, P.; SOBRAL, M.; BESSIERI, J. M.; LAMATY, G.; HENRIQUES, A. T. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p. 1829-1832, 1996.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Drogenanalyse**. Berlin: Springer-Verlag, 1996, 164p.
- WALLENFELS, K. Detection of reducing sugars in paper chromatogram and quantitative evaluation. **Naturwissenschaften** 37, 491-492 (1950).
- WILLIAMS, L. **Exploraciones botánicas en la Guayana Venezolana**. Caracas (Venezuela): Servicio botânico. MAC., 1942, 467p.
- WONG, B. M.; RODRIGUEZ, S. N.; ALEJO, P. L. J.; PEREZ, F. M. Actividad de la *Indigofera sufruticosa* Mill. En la epilepsia crônica experimental y su relación com aminoácidos neurotransmissores. **Rev. Cubana Plant Med.** v.1, n.4 p. 18-21, 1999.
- XIA, Z. Q.; ZENK, M. H. Biosynthesis of Indigo precursors in higher plants. **Phytochemistry**. v.31, n.8, 1992, p. 2695-2697.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; MELLO, J. C. P. DE.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2003, 1102p.