

ANDRÉA LUIZA CUNHA LAURA

**EFEITOS DA INGESTÃO DE EXTRATO  
HIDROACETÔNICO DE *Maytenus ilicifolia*  
E HIDROETANÓLICO DE *Achyrocline alata*  
EM RATAS PRENHES E SEUS FETOS**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL  
DEZEMBRO / 2009

ANDRÉA LUIZA CUNHA LAURA

**EFEITOS DA INGESTÃO DE EXTRATO  
HIDROACETÔNICO DE *Maytenus ilicifolia*  
E HIDROETANÓLICO DE *Achyrocline alata*  
EM RATAS PRENHES E SEUS FETOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Máximo de Siqueira.

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL  
DEZEMBRO / 2009

ANDRÉA LUIZA CUNHA LAURA


**EFEITOS DA INGESTÃO DE EXTRATO  
HIDROACETÔNICO DE *Maytenus illicifolia*  
E HIDROETANÓLICO DE *Achyrocline alata*  
EM RATAS PRENHES E SEUS FETOS**

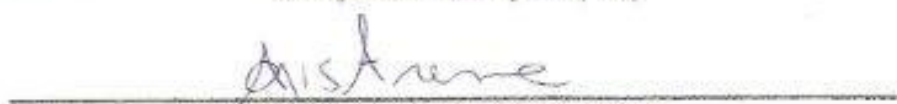
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.  
Área de Concentração: Saúde e Tecnologia.

RESULTADO: Aprovada.

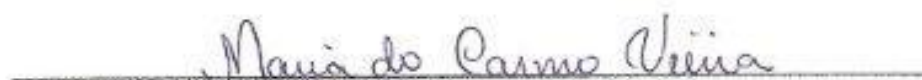
Campo Grande (MS), 16 de dezembro de 2009.


BANCA EXAMINADORA:

  
Prof. Dr. João Máximo de Siqueira (Orientador)  
Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ)  
Campus de Divinópolis (MG)

  
Profa. Dra. Arielle Cristina Arena  
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

  
Profa. Dra. Danielle Serra de Lima Moraes  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)

  
Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira  
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

  
Prof. Dr. Rodrigo Julliano Oliveira  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)

**Este trabalho é dedicado:**

À minha mãe Laudelina Rocha Cunha, pelo exemplo de amor, renúncia e dedicação, cujo apoio e incentivo sempre foram fundamentais na minha vida.

A meus filhos Pedro Enrico e Lívia Elena que transformaram minha existência, meus eternos amores..., desculpem-me pelas ausências por causa do trabalho...

Ao meu esposo amado e amigo Valdemir, cúmplice de jornada de aprendizado, obrigada pelo carinho...

## AGRADECIMENTOS

A Deus pai e criador...

A Jesus, irmão maior, exemplo de amor incondicional...

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina “Doutor Hélio Mandetta” e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pela oportunidade de realização deste Curso.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e seus funcionários pela dedicação prestada ao crescimento do Curso.

Aos Docentes das disciplinas cursadas na Pós-Graduação, pelos conhecimentos adquiridos e aos Pós-Graduandos pelo prazeroso convívio.

À FUNDECT/MS (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) pelo auxílio financeiro (Edital Chamada FUNDECT N° 06/2005 – Doutorado no MS – Processo: 41/100.230/2005).

A meus pais, Antônio Liberato da Cunha (*in memória*) e Laudelina Rocha Cunha, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com coragem e dignidade, pelo amor e exemplo de vida.

A meus irmãos e irmãs, pelo apoio e incentivo em minha vida.

A Valdemir Antônio Laura e aos nossos amados filhos, Pedro Enrico e Lívia Elena, por serem indispensáveis ao meu equilíbrio, por me fazer querer ser uma pessoa melhor.

A Maria Sudária Garcia (Sogrinha), Iraceles Aparecida Laura e Idarlete Garcia Laura (Cunhadas) pelo apoio e auxílio com os filhos em inúmeras ocasiões.

À minha amiga Gisele de Almeida, que jamais desiste de si mesma e das pessoas que ama, jamais desiste de ser feliz, que mesmo estando longe, sinto sempre presente a meu lado.

À Adriana da Silva Cabanha de Matos pelo apoio e valiosa colaboração com os filhos e o lar.

Ao Professor Dr. João Máximo de Siqueira pela confiança em mim depositada, apoio, orientação, sugestões, paciência e amizade demonstrados durante e execução deste trabalho e no transcorrer de todo o curso.

À Maria Rita Stringhetti de Toledo por ter possibilitado e incentivado nossos trabalhos iniciais na área de toxicologia da reprodução e plantas medicinais.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira pela confiança, oportunidade de parceria e recurso financeiro (Chamada Fundect Nº 04/2005 - Rede de Pesquisa - Processo: 23/200.040/2007 - Termo de Outorga nº 002/07) disponibilizado para aquisição de equipamentos imprescindíveis e fundamentais para a execução dos experimentos em condições controladas e seguras.

À Profa. Dra. Luciane Candeloro pela confiança e recurso financeiro (Chamada Fundect Nº 04/2006 UNIVERSAL - Processo: 23/200.197/2007 - Termo de Outorga nº 0026/2008) disponibilizado para aquisição do material de consumo dos experimentos.

À Profa. Dra. Ezilda Jacomassi (UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil) pela identificação botânica das exsiccatas de número 902 e 2.191 (*Maytenus ilicifolia*), oriundas do Herbário DDMS de Dourados/MS.

À Andréa Lantieri Correa de Barros e Roseana Silveira Leite, pela dedicação, responsabilidade, valioso apoio e consideração em todas as etapas de condução dos experimentos.

Aos acadêmicos: João Marcos Souza Gualberto, Plínio Turine Neto, Ana Cláudia de Oliveira Fernandes e Juliana Libman Luft, pela ajuda na condução de algumas etapas dos experimentos.

Ao Dr. Rodrigo J. Oliveira e Véssia da Silva Leite pela dedicação, responsabilidade e valiosa ajuda na análise esquelética e visceral dos experimentos.

Ao Cláudio Gonçalves Oliveira, Simone Bertozzi de Souza Vasconcelos e Luciane Candeloro pelo apoio valioso e fundamental na confecção e análise do material histológico.

A todos os funcionários do Biotério da UFMS pela atenção e boa vontade em colaborar disponibilizando os animais.

Ao amigo Paulo Robson de Souza por seu valioso e fundamental apoio no registro do material fotográfico. Aos Técnicos e Profs. do Departamento de Biologia da UFMS, em especial Teresa C. Stocco Pagotto, Édna Scremin-Dias, Maria Rosângela Sigrist, Ângela L. Bagnatori Sartori, Danielle S. de Lima Moraes, Aline P. Lorenz Lemke, Marina de L. Xavier Corrêa, Sandra dos Santos Cereali e Simone R. Mendes Grance, pela torcida, apoio, e consideração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<i>Maytenus ilicifolia</i>	ix
LISTA DE FOTOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
<i>Achyrocline alata</i>	xvi
LISTA DE FOTOS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACTS	xxiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2.A REVISÃO DE LITERATURA	4
2.A.1 <i>Maytenus ilicifolia</i> (Espinheira-Santa)	4
2.A.2 Substâncias Químicas	6
2.A.2.1 Triterpenos	7
2.A.2.2 Substâncias Fenólicas	9
2.A.2.2.1 Taninos	10
2.A.2.2.2 Flavonóides	12
2.A.3 Propriedades farmacológicas	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
EXPERIMENTO I - <i>Maytenus ilicifolia</i>	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Procedência e Coleta do Material Botânico	30
3.2 Obtenção do Extrato Vegetal	30
3.3 Animais de Experimentação	31

<b>3.4 Acasalamento e Diagnóstico de Prenhez</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Determinação da Dosagem</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Grupos e Delineamento Experimental</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Avaliação da Toxicidade Materna</b>	<b>33</b>
<b>3.8 Avaliação do Desempenho Reprodutivo Materno e do Desenvolvimento Embrionário</b>	<b>34</b>
<b>3.9 Avaliação do Desenvolvimento das Ninhadas</b>	<b>36</b>
<b>3.9.1 Fixação e Análise Visceral</b>	<b>36</b>
<b>3.9.2 Diafanização e Análise Esquelética</b>	<b>42</b>
<b>3.9.3 Fixação e Análise Histológica</b>	<b>45</b>
<b>3.10 Análise Estatística e Registro do Material Fotográfico</b>	<b>46</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Toxicidade Materna</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Desenvolvimento das Ninhadas</b>	<b>53</b>
<b>4.3.1 Análise Visceral</b>	<b>53</b>
<b>4.3.2 Análise Esquelética</b>	<b>57</b>
<b>4.3.3 Análise Histológica</b>	<b>60</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Toxicidade Materna</b>	<b>73</b>
<b>5.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário</b>	<b>74</b>
<b>5.3 Desenvolvimento das Ninhadas</b>	<b>76</b>
<b>5.3.1 Análises Esquelética e Visceral</b>	<b>76</b>
<b>5.3.2 Análise Histológica</b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>86</b>
<b>2.B REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>100</b>
<b>2.B.1 <i>Achyrocline alata</i> (Jateí-kaá ou Jataí-kaá)</b>	<b>100</b>
<b>2.B.2 Substâncias Químicas</b>	<b>101</b>
<b>2.B.3 Propriedades farmacológicas</b>	<b>103</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>107</b>



<b>EXPERIMENTO II- <i>Achyrocline alata</i></b>	<b>113</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>113</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>116</b>
2.1 Objetivo Geral	116
2.2 Objetivos Específicos	116
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>117</b>
3.1 Procedência e Coleta do Material Botânico	117
3.2 Obtenção do Extrato Vegetal	117
3.3 Animais de Experimentação	117
3.4 Determinação da Dosagem	118
3.5 Grupos e Delineamento Experimental	118
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>120</b>
4.1 Toxicidade Materna	120
4.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário	124
4.3 Desenvolvimento das Ninhadas	127
4.3.1 Análise Visceral	127
4.3.2 Análise Esquelética	131
4.3.3 Análise Histológica	134
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>142</b>
5.1 Toxicidade Materna	142
5.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário	143
5.3 Desenvolvimento das Ninhadas	145
5.3.1 Análises Esquelética e Visceral	145
5.3.2 Análise Histológica	147
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>153</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>154</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>166</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>167</b>

## LISTA DE FOTOS

### EXPERIMENTO I - *Maytenus ilicifolia*

- Foto 1 – Relação e localização de cortes utilizados durante o estudo de malformações viscerais: (1) Corte transversal na altura da cavidade oral; (2) Corte frontal na região pré-gabelar; (3) Corte frontal na região orbital; (4) Corte frontal na região do vértex; (5) Corte transversal na região de pescoço; (6) Corte transversal na região do terço médio torácico; (7) Corte transversal na região abdominal inferior; (8) Corte transversal na região pélvica. Fonte: Oliveira, 2001. 37
- Foto 2 – Sequência de cortes para estudo visceral em feto normal. (A) Corte transversal na altura da cavidade oral: 1 – Palato, 2 – Cérebro; (B) Corte frontal na região pré-gabelar: 1 – Septo nasal; 2 – Coana; (C) Corte frontal na região orbital: 1 – Bulbo olfatório, 2 – Cristalino, 3 – Coana, 4 – Retina; (D) Corte frontal na região do vértex: 1 – Ventrículo Lateral, 2 – Terceiro ventrículo; (E) Corte transversal na região de pescoço: 1 – Traquéia, 2 – Esôfago, 3 – Medula espinhal; (F) Corte transversal na região do terço médio torácico: 1 – Traquéia, 2 – Timo, 3 – Coração, 4 – Aurícula direita; 5 – Fígado. Fonte: Oliveira, 2001. 38
- Foto 3 – Sequência de cortes para estudo visceral em feto normal. (A) Corte transversal na região do terço inferior do tórax: 1 – Medula, 2 – Diafragma; (B) Corte transversal na região do terço superior do tórax: 1 – Medula espinhal, 2 – Artéria Aorta, 3 – Fígado, 4 – Veia Cava Inferior, 5 – Veia hepática; (C) Corte transversal na região do terço médio abdominal: 1 – Estômago, 2 – Rins, 3 – Fígado, 4 – Alças intestinais, 5 – Medula espinhal; (D) Corte transversal na região do terço inferior abdominal: 1 – Rins, 2 – Medula espinhal, 3 – Fígado, 4 – Alças intestinais. Fonte: Oliveira, 2001. 39
- Foto 4 – Sequência de cortes para estudo visceral em feto normal. (A) Corte transversal na região pélvica: 1 – Rins, 2 – Medula espinhal, 3 – Fígado, 4 – Alças intestinais, 5 – Pelve renal; (B) Cortes transversal na região pélvica: 1 – Ovários, 2 – Cornos uterinos (útero bicórneo), 3 – Bexiga, 4 – Alças Intestinais; (C) Corte transversal na região pélvica: 1 – Testículos, 2 – Bexiga, 3 – Intestino grosso. Fonte: Oliveira, 2001. 40
- Foto 5 – Corte transversal de rins, (A) Aspecto normal: 1 – Papila renal, 2 – Pelve renal, 3 – Medula espinhal. Fonte: Oliveira, 2001. 41
- Foto 6 – Corte transversal de rins. (A) Aspecto dismórfico: 1 – Hidronefrose; (B) Aspecto dismórfico: 1 – Hidronefrose e hipoplasia de papila renal; (C) Aspecto dismórfico: 1 – Hidronefrose, 2 – Hidronefrose e hipoplasia de papila renal. Fonte: Oliveira, 2001. 41
- Foto 7 – Vista superior da ossificação craniana normal: (A) Nasal; (B) Frontal; (C) Parietal; (D) Interparietal; (E) Supraoccipital. Fonte: Damasceno et al., 2008. 43

- Foto 8 – Vista lateral da ossificação craniana normal: (F) Pré-maxilar; (G) Maxilar; (H) Zigomático; (I) Escamoso; (J) Exoccipital. Fonte: Damasceno et al., 2008. 43
- Foto 9 – Vista ventral da ossificação craniana normal: (L) Volmer; (M) Palato; (N) Présfenóide; (O) Basisfenóide; (P) Hamulo; (Q) Basoccipital, (R) Orbtosfenóide; (S) Tímpânico. Fonte: Damasceno et al., 2008. 44
- Foto 10 – Pontos de ossificação do esterno adulto anormal: (A) Esternébrio anormal; (B) Agenesia de esternébrio; (C) Esternébrio com ossificação incompleta. Fonte: Damasceno et al., 2008. 44
- Foto 11 – Corte transversal na região pélvica normal em feto do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Aspecto Normal do Sistema Urogenital. (A) Masculino: 1 – Testículos, 2 – Bexiga, 3 – Alças Intestinais, 4 – Rins, 5 – Ureteres, 6 - Intestino grosso; (B): Feminino: 1 – Ovários, 2 – Cornos uterinos (útero bicórneo), 3 – Bexiga. Campo Grande (UFMS), 2009. 54
- Foto 12 – Corte frontal na região do vértex em feto do grupo Controle 2 (C2) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. (A) Aspecto Normal: 1 – Ventrículo Lateral, 2 – Terceiro Ventrículo, 3 – Quarto Ventrículo, 4 – Hemisfério cerebral; (B) Aspecto Alterado (Dismórfico): 1 Hidrocefalia à custa de dilatação do terceiro e quarto ventrículos; (C) 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação dos ventrículos laterais, 2 – terceiro e quarto ventrículos. Campo Grande (UFMS), 2009. 55
- Foto 13 – Corte transversal de rins em feto do grupo Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. (A) Aspecto Normal do Rim, 1 – Papila renal, 2 – Pelve renal, 3 – Medula espinhal; (B) Hidronefrose. Campo Grande (UFMS), 2009. 56
- Foto 14 – Vista superior da ossificação craniana com fontanela normal (\*) em feto do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; (a) nasal; (b) frontal; (c) parietal; (d) interparietal; (e) supraoccipital. Campo Grande (UFMS), 2009. 57
- Foto 15 – Pontos de ossificação do esterno normal em feto do grupo Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (a) Manúbrio; (b) 4 Centros Esternais; (c) Processo Xifóide. Campo Grande (UFMS), 2009. 58
- Foto 16 – Pontos de ossificação do esterno anormal em feto do grupo Controle (C2) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Ossificação Reduzida e Agenesia de Esternébrios. Campo Grande (UFMS), 2009. 58

## LISTA DE FIGURAS

### EXPERIMENTO I - *Maytenus ilicifolia*

- Figura 1 - Peso corpóreo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes no 1º, 6º, 15º e 20º dia(s) de prenhez (DP) nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009. 47
- Figura 2 - Ganho de peso e ganho de peso líquido (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009. 48
- Figura 3 - Estimativa do consumo de água filtrada (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009. 49

- Figura 4 - Estimativa do consumo de ração comercial (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009. 50
- Figura 5 – Fotomicrografia de baço de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular ( $\rightarrow$ ) e deposição de hemossiderina (\* grânulos de cor marrom escura). HE, 400X. 60
- Figura 6 – Fotomicrografia de baço de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X. 61
- Figura 7 – Fotomicrografia de fígado de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X. 62
- Figura 8 – Fotomicrografia de rim de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular ( $\rightarrow$ ). HE, 200X. 63
- Figura 9 – Fotomicrografia de rim de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X. 64
- Figura 10 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular (\*) e hemorragia hepática ( $\rightarrow$ ). HE, 200X. 65

- Figura 11– Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Hemoperitônio (→). HE, 100X. 66
- Figura 12 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Sem alteração hepática. HE, 200X. 67
- Figura 13 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Sem alteração no peritônio. HE, 200X. 67
- Figura 14 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Vasos da derme congestionados (→). HE, 200X. 68
- Figura 15 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Sem alteração na derme. HE, 200X. 69
- Figura 16 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Observe que o cório viloso (CV) e as áreas, decídua basal (DB), zona juncional (ZJ) e zona labiríntica (ZL), estão bem organizadas. Sem alteração na placenta. HE, 100X. 70
- Figura 17 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Maior aumento das áreas de decídua basal (DB) e zona juncional (ZJ). HE, 200X. 70
- Figura 18 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Maior aumento da zona labiríntica. Os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas estão bem definidos (\*). HE, 200X. 71

Figura 19 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Observe a zona labiríntica com os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas (\*) bem definidos. HE, 200X. 71

Figura 20 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Maior aumento da zona labiríntica (ZL) próxima a placa coriônica. Observe o tronco viloso (TV) ramificado entre os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas (\*). HE, 200X. 72

Figura 21 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Observe o tronco viloso (TV) ramificado entre os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas (\*). HE, 200X. 72

## LISTA DE TABELAS

### EXPERIMENTO I - *Maytenus ilicifolia*

- Tabela 1. Pesos (média  $\pm$  erro padrão da média) absoluto (PA) e relativo (PRel) dos órgãos maternos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 51
- Tabela 2. Desempenho (média  $\pm$  erro padrão da média) reprodutivo das ratas e análise dos fetos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 52
- Tabela 3. Anomalias viscerais fetais (médias  $\pm$  erro padrão da média) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 56
- Tabela 4. Anomalias esqueléticas fetais (média  $\pm$  erro padrão da média) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 59



## LISTA DE FOTOS

### EXPERIMENTO II - *Achyrocline alata*

- Foto 17 – Corte transversal na região pélvica normal em feto do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Aspecto Normal do Sistema Urogenital: (A) Masculino 1 – Testículos, 2 – Bexiga, 3 – Rins, 4 – Medula espinhal; (B) Feminino: 1 – Ovários, 2 – Cornos uterinos (útero bicórneo), 3 – Bexiga, 4 - Rins. Campo Grande (UFMS), 127
- Foto 18 – Corte frontal na região do vértex em feto do grupo Controle 1 (C1) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. (A) Aspecto Alterado (Dismórfico): 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação do terceiro e quarto ventrículos; (B) 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação dos ventrículos laterais, 2 - terceiro e quarto ventrículos. Campo Grande (UFMS), 2009. 128
- Foto 19 – Corte transversal de rim em feto do grupo Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. (A) Aspecto Normal do Rim, 1 – Papila renal, 2 – Pelve renal, 3 – Medula espinhal; (B) Aspecto dismórfico do rim - Hidronefrose. Campo Grande (UFMS), 2009. 129
- Foto 20 – Foto 20 – Vista da ossificação craniana em feto do grupo Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. (A) Fontanela Normal (\*), 1 - nasal, 2 - frontal, 3 - parietal, 4 - interparietal, 5 - supraoccipital. (B) Fontanela um pouco aumentada (\*). Campo Grande (UFMS), 2009. 131
- Foto 21 – Pontos de ossificação do esterno adulto em feto do grupo Controle (C2) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP: (A) Manúbrio, (B) Centros Esternais (Esternébrios Assimétricos), (C) Processo Xifóide. Campo Grande (UFMS), 2009. 132

## LISTA DE FIGURAS

**EXPERIMENTO II- *Achyrocline alata***

- Figura 22 - Peso corpóreo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes no 1º, 6º, 15º e 20º dia(s) de prenhez (DP) nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009. 120
- Figura 23 - Ganho de peso e ganho de peso líquido (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009. 121
- Figura 24 - Estimativa do consumo de água filtrada (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009. 122

- Figura 25 - Estimativa do consumo de ração comercial (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP), tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP, controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP, tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP, média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6), média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15), média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009. 123
- Figura 26 – Fotomicrografia de baço de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular ( $\rightarrow$ ). HE, 200X. 135
- Figura 27– Fotomicrografia de baço de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 200X. 135
- Figura 28 – Fotomicrografia de fígado de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X. 136
- Figura 29 – Fotomicrografia de rim de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X. 137
- Figura 30 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração hepática. HE, 200X. 138
- Figura 31 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam: *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração no peritônio. HE, 200X. 138
- Figura 32 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração na derme. HE, 200X. 139

Figura 33 – Fotomicrografia da placenta de rata do grupo Tratado 1 (T1): 140  
receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo)  
dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP.  
Concentração de infiltrados de neutrófilos ao redor e na decídua basal (DB).  
HE, 200X.

Figura 34 – Fotomicrografia da placenta de rata do grupo Tratado 1 (T1): 141  
receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo)  
dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP.  
Concentração de infiltrados de neutrófilos ao redor e na decídua basal (DB).  
HE, 400X.

## LISTA DE TABELAS

### EXPERIMENTO II- *Achyrocline alata*

- Tabela 5. Peso (média  $\pm$  erro padrão da média) absoluto (PA) e relativo (PRel) dos órgãos maternos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 124
- Tabela 6. Desempenho reprodutivo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas e análise dos fetos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 125
- Tabela 7. Anomalias viscerais fetais (médias  $\pm$  erro padrão da média) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 130
- Tabela 8. Anomalias esqueléticas fetais (média  $\pm$  erro padrão da média) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009. 133

## RESUMO

No Brasil, as plantas medicinais têm assumido crescente importância como um recurso terapêutico alternativo muito útil nos programas de atenção primária de saúde. Entre as plantas mais solicitadas pela população de Campo Grande (MS) aos raizeiros e/ou por eles indicadas, têm-se *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa) e *Achyrocline alata* (Jataí-kaá). Apesar de serem amplamente utilizadas, não há trabalhos que atestem a sua segurança em relação às gestantes. Dessa forma, objetivou-se avaliar o risco toxicológico da exposição aos extratos hidroacetônico de *M. ilicifolia* e hidroetanólico de *A. alata* no sistema reprodutivo de ratas Wistar e em seus fetos, a fim de verificar a segurança das doses preconizadas e utilizadas na medicina popular. Para tanto, foram realizados dois experimentos. No experimento com *M. ilicifolia* (EMI), ratas prenhes foram distribuídas em quatro grupos experimentais (dois grupos controles e dois grupos tratados). Os grupos foram submetidos ao seguinte esquema de tratamento: Grupo Controle 1 (C1): receberam, via gavagem, 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Grupo Tratado 1 (T1): receberam, via gavagem, extrato seco de *M. ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada do 1º ao 20º DP; grupos Controle 2 (C2) e Tratado 2 (T2) receberam, respectivamente, as mesmas substâncias administradas aos dois primeiros grupos, alterando-se apenas o tempo de exposição, que foi do 6º ao 15º DP. O experimento com *A. alata* (EAA) foi executado de forma idêntica ao de *M. ilicifolia* (EMI), alterando-se apenas a dosagem administrada aos animais que foi de 3,9 mg/kg de peso corpóreo. O protocolo para uso de animais em experimentação (nº 115/2006) foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMS. No 20º DP, as ratas (EMI e EAA) foram submetidas à eutanásia e laparotomia, os ovários, útero, órgãos maternos (baço, fígado e rins), fetos e placentas foram retirados, pesados e avaliados externamente para verificar possíveis distúrbios referentes à cor, ao tamanho, à textura e à presença de cistos. Contou-se o número de corpos lúteos, fetos vivos e/ou mortos e reabsorções embrionárias. A partir desses dados foram calculados os parâmetros relativos à fertilidade (razão sexual, índice placentário, viabilidade fetal e as taxas de eficiência de implantação, reabsorção e perdas pré e pós-implantação). Os fetos foram divididos em grupos para as análises esquelética, visceral e histológica. Para a

comparação dos resultados quantitativos foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos (ANOVA e Kruskal-Wallis), conforme a natureza de distribuição dos dados. Após a detecção de diferenças pela ANOVA e pelo Teste de Kruskal-Wallis foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey e Dunn, respectivamente. Os dados qualitativos e as freqüências obtidas tiveram a ninhada utilizada como unidade-base. Em todos os casos, quando  $p < 0,05$ , a diferença foi considerada estatisticamente significativa. No EMI e EAA, quando os grupos experimentais foram comparados quanto: 1) aos sinais clínicos de toxicidade - não foram registradas mortes maternas, eriçamento dos pêlos corporais, alteração da deambulação e diarreia; 2) alterações de peso corpóreo - o acompanhamento diário da evolução gestacional demonstrou que não houve diferenças significativas quanto ao peso corpóreo (PC), ganho de peso (GP) e ganho de peso líquido (GPL), indicando gestação normal sem efeito dos tratamentos; 3) alterações no consumo de alimento e água - os indícios de toxicidade de *M. ilicifolia* e *A. alata* no período de organogênese (consumo de água e ração) e durante todo período gestacional (consumo de ração) parecem ter sido transitórios, uma vez que não foi constatada diferenças quanto a PC, GP e GPL; 4) peso absoluto (PA) e relativo (PR) de fígado, ovários, rins e útero materno com fetos e sem fetos - os resultados foram similares; 5) desempenho reprodutivo materno e desenvolvimento embrionário - os resultados para tamanho dos fetos, assim como seu peso corpóreo e de suas placentas, índice placentário e taxas (implantação, perdas pré e pós-implantação, reabsorção e viabilidade fetal) encontravam-se semelhantes entre os grupos, sendo assim, os tratamentos não alteraram as condições fisiológicas e intra-uterinas relacionadas com a reprodução e desenvolvimento embrio-fetal; 6) análise macroscópica dos órgãos maternos (baço, fígado e rins) - não revelou nenhuma alteração; 7) variações esqueléticas e viscerais nos fetos - foram variantes do normal e possivelmente regressariam caso a gestação chegasse a termo e/ou no período pós-natal; 8) análise microscópica dos fetos - não apresentou efeitos teratogênicos. Considerando o EMI: 1) 6º ao 15º DP e 1º ao 20º DP - não provocou alterações anátomo-histológicas no fígado materno; não causou efeitos tóxicos ou alterações morfológicas na placenta das ratas; 2) 1º ao 20º DP - apresentou efeitos citotóxicos maternos no baço e rins; alterações fetais no fígado, hemoperitônio e vasos da derme. Considerando o EAA: 1) 6º ao 15º DP e 1º ao 20º DP - não provocou alterações anátomo-histológicas no fígado e rins maternos; não provocou alterações nas células fetais do fígado, região

peritoneal e derme; 2) 1º ao 20º DP - apresentou efeitos citotóxicos maternos no baço e processo inflamatório agudo com concentração de infiltrados de neutrófilos ao redor e na decídua basal das placentas (face materna) do grupo T1 (mais intenso) e C2. No EMI e EAA não foram registradas mortes maternas e fetais, assim como desvio da proporção esperada de 1:1 para razão sexual. Sendo assim, *M. ilicifolia* e *A. alata* não afetaram os processos de organogênese e diferenciação sexual dos fetos, ou seja, não são teratogênicas. Os resultados obtidos não excluem a possibilidade de toxicidade humana durante a gestação. O uso como medicamento deve ser previamente validado cientificamente na espécie humana, como qualquer outro medicamento. A utilidade medicamentosa na gestação deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias. Portanto, é preciso cautela, os efeitos da exposição nos organismos materno e fetal, devem ser considerados, respeitando-se a complexidade farmacológica e as possíveis transformações que se impõe a unidade materno/placentária/fetal.

**Palavras-Chave:** Espinheira-santa/toxicidade, Marcela/toxicidade, *Rattus norvegicus*, preparação de uso popular, desempenho reprodutivo, teratogênese, histopatologia.



## ABSTRACT

In Brazil, the medicinal plants have assumed increasing importance as a resource very useful therapeutic alternative in the programs of primary health care. Among the plants most requested by the population of Campo Grande to salespeople and / or indicated by them, have *Maytenus ilicifolia* and *Achyrocline alata*. Despite being widely used, there are no papers attesting its safety in relation to pregnant women. Thus, in this work the aim was to evaluate the toxicological risk of exposure to hydroacetic dry extract of *M. ilicifolia* and hydroethanolic of *A. alata* in the reproductive system of rats (*Rattus norvegicus*) and their fetuses in order to verify the safety of in the dose recommended and used in folk medicine. To this purpose, two experiments were carried out. In the experiment with *M. ilicifolia* (EMI), pregnant rats were distributed into four experimental groups (two control groups and two treated groups). Both groups underwent the following treatment schedule: Group Control 1 (C1) received, by gavage, 0.5 mL of filtered water from the 1<sup>st</sup> to 20<sup>th</sup> day of pregnancy (DP), the Group 1 (T1) received by gavage, dry extract of *M. ilicifolia* (15.1 mg / kg body weight) dissolved in 0.5 mL / day of filtered water from the 1<sup>st</sup> to the 20<sup>th</sup> DP, the control group 2 (C2) and the treated 2 (T2) received, respectively, the same as those given to first two groups, changing only the exposure time, which was the 6<sup>th</sup> to the 15<sup>th</sup> DP. The experiment with *A. alata* (EAA) was performed identically to that of *M. ilicifolia* (EMI) changing only the dosage administered to animals was 3.9 mg / kg of body weight. The protocol for animal use in experimentation (No 115/2006) was approved by the Ethics Committee of UFMS. In the 20<sup>th</sup> DP, the rats (EMI and EAA) were subjected to euthanasia and laparotomy, the ovaries, uterus, maternal organs (spleen, liver and kidneys), fetuses and placentas were removed, weighed and assessed externally to investigate possible disturbances related to color, size, texture and the presence of cysts. We counted the number of: lutea, live fetuses and / or resorptions and dead cells. From these data we calculated the parameters for fertility (sex ratio, placental index, fetal viability and the rate of: implantation efficiency, turnover and loss pre-and post-deployment). The fetuses were divided into groups for the analysis of skeletal, visceral and histology. For comparison of the quantitative tests were used parametric and non parametric (ANOVA and Kruskal-Wallis), depending on the type of data distribution. After the detection of differences by ANOVA and the Kruskal-Wallis test was used for multiple comparisons and Dunn's

test, respectively. Qualitative data obtained and the frequencies have the litter used as base unit. In all cases, when  $p < 0.05$ , the difference was considered statistically significant. In EMI and EAA, when the experimental groups were compared for: 1) clinical signs of toxicity - no maternal deaths were recorded, erection of body hair, abnormal walking and diarrhea; 2) changes in body weight - the daily monitoring of gestational development showed no significant differences in body weight (BW), weight gain (WG) and net weight gain (NPG), indicating normal pregnancy without treatment effect; 3) changes in food consumption and water - the evidence of toxicity of *M. ilicifolia* and *A. alata* during organogenesis (water consumption and diet) and throughout the gestational period (intake) appear to be transient, since we found no differences in BW, WG and NPG; 4) absolute weight (BP) and relative (RP) of liver, ovaries, kidneys and uterus with fetuses and fetuses without - the results were similar; 5) maternal reproductive performance and embryo development - the results for size of the fetus, as well as their body weight and their placentas, and placental index rates (implantation losses before and after implantation, fetal resorption and viability) were similar between groups, so the treatments did not alter the physiological conditions and intrauterine related with reproduction and embryo-fetal development; 6) macroscopic analysis of maternal organs (spleen, liver and kidneys) - revealed no changes; 7) visceral and skeletal variations in fetuses - were variants of normal and possibly regress if the pregnancy came to term and/or the postnatal period; 8) microscopic analysis of the fetus – did not show teratogenic effects. Whereas EMI: 1) 6<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> DP and 1<sup>st</sup> to 20<sup>th</sup> DP - did not alter anatomic lesions in maternal liver, does not cause toxic effects or alterations in the placenta of rats, 2) 1<sup>st</sup> to 20<sup>th</sup> DP - showed cytotoxic effects on maternal spleen and kidneys, fetal liver, hemoperitoneum and vessels of the dermis. Considering the EAA: 1) 6<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> DP and 1<sup>st</sup> to 20<sup>th</sup> DP - do not alter anatomic lesions in maternal kidneys and livers, no change in fetal liver cells, peritoneal region and dermis, 2) 1<sup>st</sup> to 20<sup>th</sup> DP - showed cytotoxic effects on maternal spleen and acute inflammatory process with a concentration of neutrophil infiltration around and in the placentas basal decidua (maternal side) in group T1 (most intense) and C2. In the EMI and EAA were not recorded maternal deaths and stillbirths, as well as deviation from expected ratio of 1:1 for sex ratio. Thus, *M. ilicifolia* and *A. alata* did not affect the processes of organogenesis and sexual differentiations of the fetus, *i.e.*, are not teratogenic. The results do not exclude the possibility of human toxicity during pregnancy. The use as

a medicine must first be scientifically validated in humans, like any other medicine. The drug use during pregnancy should be based on experimental evidence showing this evidence. Therefore, caution is needed, the effects of exposure in maternal and fetal bodies, should be considered, respecting the complexity and possible pharmacological changes which requires a mother/placenta/fetal development.

**Keywords:** Espinheira-santa/toxicity, Marcela/toxicity, *Rattus norvegicus*, preparation of popular use, reproductive performance, teratogenesis, histopathology.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais desempenham um importante papel na medicina moderna. Primeiramente, porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1996).

Plantas Mediciniais são aquelas que possuem tradição de uso em uma população ou comunidade e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Ao serem processadas para a obtenção de um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico (CARVALHO et al., 2007).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48/2004 (Legislação Atual que regulamenta o registro de Fitoterápicos – BRASIL, 2004a), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápico é o medicamento cujo princípio ativo é um derivado de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros), obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodução e constância de sua qualidade. Não se considera como medicamento fitoterápico aquele que inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (CARVALHO et al., 2007).

De acordo com a WHO (*World Health Organization*), devido à pobreza e pouco acesso à medicina moderna, cerca de 65 a 80% da população mundial dependem essencialmente das plantas como forma primária de cuidar da saúde (SUZUKI, 2002; CALIXTO, 2005).

O produto natural é mais barato e, muitas vezes, de fácil acesso, o que contribui para melhoria da saúde de pessoas de baixo poder aquisitivo (ANDRADE et al., 2005).

Aproximadamente, 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Segundo Aschwanden (2001) o mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de US\$ 43 bilhões por ano. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano.

Diante da grande importância dos medicamentos fitoterápicos, vários países da Europa estão intensificando esforços para unificar a legislação referente aos medicamentos fitoterápicos, amplamente comercializados nestes países (em especial na Alemanha e França). No entanto, nos Estados Unidos, as preparações à base de plantas são classificadas como suplementos nutricionais, não sendo necessário submeter dados de segurança e eficácia ao *Food and Drug Administration* (FDA) para a comercialização destes produtos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

De acordo com Calixto e Yunes (2001), aproximadamente 75% dos compostos puros naturais utilizados pelas indústrias farmacêuticas foram isoladas, seguindo recomendações da população. Portanto, é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo uso popular do que em plantas escolhidas ao acaso.

Nos últimos anos a legislação brasileira vem passando por modificações e duas importantes políticas foram estabelecidas em 2006. A primeira foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada por meio da Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006 (BRASIL, 2006a). A segunda foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos publicada por meio do Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006b). Ambas as políticas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia à população, priorizando a biodiversidade do país.

No Brasil, as espécies utilizadas como medicinais são principalmente nativas e geralmente obtidas de forma extrativista. Muitas plantas, freqüentemente utilizadas por populações locais, ainda não foram estudadas e nem seus princípios ativos foram identificados para validá-las como medicamentos ou para aproveitá-las economicamente. Mesmo assim, podem apresentar atividade medicinal satisfatória e serem utilizadas desde que não apresentem efeito tóxico aparente (BALBACH, 1986; BERG, 1993).

De acordo com Simões et al. (2001), o uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso medicamentoso, deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias.

Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (SILVA et al., 2001; TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

A baixa qualidade e padronização dos produtos comercializados, além do uso de espécies erradas, da adulteração, superdosagens, uso indevido e interação com medicamentos levou as autoridades sanitárias a preocuparem-se com a segurança, eficácia e qualidade das drogas vegetais (SILVA et al., 2001).

As espécies medicinais apresentam metabolismo secundário produzindo substâncias químicas com função de proteção ao ataque de pragas e doenças. Estas substâncias que são nocivas a alguns organismos podem apresentar atividades terapêuticas a outros e às vezes a relação tóxico/terapêutica depende apenas da dose (MAGALHÃES, 1997).

No decorrer da gestação, vários agentes podem interferir no desenvolvimento normal do embrião, levando a alterações funcionais e/ou morfológicas que podem acarretar na inviabilidade do conceito. A intensidade de tais efeitos teratogênicos depende de vários fatores, como: a etapa do desenvolvimento embrionário, o tempo de exposição à substância, a relação dose-efeito, o genótipo materno-fetal e o mecanismo patogênico específico de cada agente (SPRITZER, SANSEVERINO e SCHULER, 2001).

Considerando que gestantes e lactantes constituem um grupo populacional que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais, objetivou-se avaliar o risco toxicológico da exposição ao extrato seco de *Maytenus ilicifolia* e de *Achyrocline alata* sobre o sistema reprodutivo de ratas Wistar e em seus fetos, durante o período de organogênese e durante todo o período de gestação (prenhez), a fim de comprovar sua segurança na dose preconizada pela medicina popular.

## 2.A REVISÃO DE LITERATURA

### 2.A.1 *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa)

*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., família Celastraceae, é conhecida popularmente como espinheira-santa pela aparência das folhas que possuem as bordas com espinhos e pelas propriedades medicinais (MAGALHÃES, 2002).

A família Celastraceae engloba cerca de 50 gêneros compreendendo entre 800 e 850 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais e apenas alguns gêneros alcançam regiões temperadas (HEYWOOD, 1978; CRONQUIST, 1981).

O gênero *Maytenus* conta com 200 espécies tropicais, sendo que a América do Sul dispõe do maior número delas. Destas, 40% ou aproximadamente 76 espécies e 14 variedades ocorrem no Brasil, destacando na flora nacional *M. ilicifolia*. O nome do gênero *Maytenus* vem de Maytén, nome de uma planta utilizada pelos Mapuches, no Chile. A denominação *ilicifolia* significa o que tem folhas iguais ao *Ilex*, que é um azevinho usado como enfeite de Natal, do mesmo gênero no qual se encontra a erva-mate (REIS e SILVA, 2004).

Os nomes populares são: cancerosa, cancoroso, cancosa, congora, coromilho-do-campo, erva-cancerosa, espinheira-santa, espinheira-divina, espinho-de-Deus, limãozinho, maiteno, pau-josé, salva-vidas e sombra-de-touro (CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994). Segundo Nunes et al. (2003), em Campo Grande-MS, as raízes de *M. ilicifolia* são conhecidas popularmente como cancerosa e as folhas como espinheira-santa.

*M. ilicifolia*, espécie autóctone (nativa) do Brasil (MARIOT e BARBIERI, 2007), é encontrada principalmente na região sul do Brasil e nos países vizinhos, Paraguai, Uruguai e Leste da Argentina. Ainda no Brasil registra-se a ocorrência no estado de Mato Grosso do Sul e São Paulo, no interior de mata nativa e mata ciliar, onde o solo é rico em matéria orgânica e bem drenada, em altitude de até 1.200 m. É uma planta de clima temperado e subtropical com umidade relativa variando de média a alta (RADOMSKI, 1998; CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994). O cultivo da planta no estado do Paraná concentra-se nas regiões de Curitiba, Guarapuava e Irati (REIS e SILVA, 2004).

*M. ilicifolia* é uma espécie arbórea-arbustiva, geralmente com 5 m de altura. Apresenta caule liso e inserção das folhas helicoidal, o que a distingue de *M. aquifolium* que apresenta caule e ramos com estrias longitudinais e inserção das

folhas pareada (MAGALHÃES, 1997). As folhas são simples, alternadas e lanceoladas com cristais de oxalato de cálcio nas células epidérmicas e camada de cutícula espessa (DUARTE e DEBUR, 2005).

Jacomassi e Machado (2003) também descreveram características anatômicas importantes de *M. ilicifolia*, tanto para distinção entre esta espécie e *M. aquifolium* bem como de outras espécies que podem ser erroneamente identificadas como espinheira-santa.

Segundo Scheffer (2001), *M. ilicifolia* apresenta uma taxa de fecundação cruzada de 99,6%, sendo classificada como uma espécie alógama.

Estima-se que cerca de 40% das plantas comercializadas como *M. ilicifolia* sejam na verdade de outras espécies (SCHEFFER, CORRÊA JUNIOR e GRAÇA, 2004), mas a maior demanda hoje é por folhas de *M. ilicifolia*, considerada a verdadeira. Devido à similaridade morfológica das folhas, outras espécies são adicionadas como adulterantes, por exemplo, a *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger, *Zollernia ilicifolia* Vog. e *M. aquifolium* (REIS e SILVA, 2004; NEGRI, 2007).

Em oito amostras de fitoterápicos à base de espinheira-santa submetida à CCD (cromatografia em camada delgada) apenas três amostras revelaram a presença de marcadores químicos de *M. ilicifolia* e somente uma das amostras revelou ausência de marcadores químicos considerados adulterantes (ALBERTON, FALKENBERG e FALKENBERG, 2002).

Acredita-se que 95% da coleta de espinheira-santa ainda sejam obtidas por extrativismo, atividade ilegal e sem controle sanitário, e por isso, o produto que chega ao consumidor normalmente não atende às especificações exigidas. Na reunião técnica Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais, promovida pelo IBAMA e CENARGEN (atual Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) em Brasília, no ano de 2001, a espinheira-santa foi considerada prioritária para o desenvolvimento de trabalhos de manejo e conservação por causa da crescente demanda de utilização e pelo extrativismo. Em função do extrativismo é considerada espécie ameaçada de extinção, tornando-se necessário sair do sistema de extrativismo e solidificar o sistema de domesticação e cultivo (REIS e SILVA, 2004 apud MARIOT e BARBIERI, 2006).

Em 1988, no Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde, foi publicada uma série de trabalhos relatando as propriedades terapêuticas da *M. ilicifolia* em relação a sua ação



atividade antiúlcera gástrica (CARLINI, 1988). Os resultados obtidos comprovaram cientificamente a eficácia terapêutica da planta.

Na década de 90, *M. ilicifolia* foi alvo de biopirataria, tendo seu extrato patenteado por uma empresa japonesa, logo após as primeiras publicações que comprovaram a eficiência da planta contra gastrite e úlcera gástrica em pesquisa realizada no Brasil (CARVALHO, 2005 apud RIBEIRO, 2008).

*M. ilicifolia* faz parte de uma lista de 34 plantas (BRASIL, 2004b) que não necessitam de validação das indicações terapêuticas e da segurança de uso para o registro, como medicamentos fitoterápicos, no Ministério da Saúde. Para o registro devem ser respeitadas as seguintes especificações para a planta: parte usada, padronização (marcador químico para o extrato), forma de uso, indicação terapêutica, dosagem, via de administração, posologia e restrição de uso. No caso da *M. ilicifolia* as especificações são: - Parte usada: folhas; - Padronização (marcador químico): taninos totais; - Formas de uso: extratos e tintura; - Indicações terapêuticas: dispepsias, coadjuvante no tratamento de úlcera gástrica; - Dose diária: 60 a 90 mg de taninos/dia; - Via de administração: oral; - Restrição de uso: não apresenta (venda sem prescrição médica).

Atualmente a Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 2003) apresenta aspectos morfoanatômicos e o controle de qualidade da droga vegetal. As dosagens dos fitoterápicos de *M. ilicifolia* são padronizadas de acordo com o conteúdo de taninos totais presentes.

Segundo Mariot e Baebieri (2006) a tecnologia para a produção de fitofármacos a partir da espinheira-santa já está em fase de estudos no País, com boas perspectivas de lançamento de medicamentos em um futuro próximo. Em conjunto com os laboratórios Aché e Biossintética, a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) registrou recentemente as patentes de duas substâncias retiradas de plantas. Uma delas deve dar origem ao primeiro medicamento desenvolvido integralmente no Brasil. Um estudo está sendo feito com a espinheira-santa (*M. ilicifolia*) e o outro com o nó-de-cachorro (*Heteropteris aphrodisíaca*).

## **2.A.2 Substâncias químicas**

As plantas, ao contrário dos animais, conseguem sintetizar substâncias químicas para o próprio sustento. Algumas destas substâncias sofrem sucessivas transformações produzindo os metabólitos secundários. Destes, a maioria apresenta

atividade farmacológica e são denominados de princípios ativos. Os metabólitos secundários podem ser armazenados em diferentes locais e órgãos na planta e, a sua ação biológica pode acontecer com a substância química isolada ou em associação (FONTE, 2004).

Na espinheira-santa foram isoladas várias substâncias químicas bioativas (metabólitos), onde as mais citadas são os taninos, os flavonóides e os terpenos, grupo em que estão inseridos os triterpenos (CORDEIRO, VILEGAS e LANÇAS, 1999).

Di Stasi (2004) em uma revisão sobre compostos bioativos em espécies de *Maytenus*, relata a presença de pristimerina, um triterpeno do tipo friedelano com ação antimalárica e compostos fenólicos com atividade inibitória sobre a replicação do vírus HIV-1 em *M. senegalensis*. Em *M. canariensis* foram isoladas nortriterpenos com atividade antibiótica e sesquiterpenos, com atividade inseticida. *M. macrocarpa* apresenta nortriterpenos, denominados macrocarpinas, os quais são citotóxicos, sesquiterpenos com atividade leishmanicida e triterpenos do tipo friedelano. Triterpenóides do tipo friedelano também foram isolados desta espécie por Chávez et al. (1998). Foi evidenciado por Kennedy et al. (2001), a ação leishmanicida de sesquiterpenos isolados de *M. magellanica* e *M. chubutensis*.

Entre os compostos bioativos em *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, que podem ter ação antiulcerogênica e antigástrica, destacam-se os triterpenos. Os triterpenóides são compostos constituídos basicamente de trinta unidades de carbono – seis isoprenos (CARDOSO et al., 2001). A maioria possui em sua constituição hidroxilas que podem ser glicosiladas, produzindo os heterosídeos cardiotônicos, importantes agentes terapêuticos para doenças cardiovasculares e as saponinas.

As plantas medicinais freqüentemente apresentam diferenças químicas sazonais, afetando a produção de princípios ativos nas diferentes épocas do ano. Análises realizadas em folhas de *M. aquifolium* nas quatro estações do ano revelaram que na primavera o teor de flavonóides e fenóis totais foram maiores, enquanto que para os triterpenos o maior teor ocorreu no inverno, sendo que a proporção de friedelan-3-ol para a friedelina foi de 5:1 (YARIWAKE et al., 2005).

### **2.A.2.1 Triterpenos**

Os triterpenóides são compostos constituídos basicamente de trinta unidades de carbono – seis isoprenos (CARDOSO et al., 2001). A maioria possui em sua

constituição hidroxilas que podem ser glicosiladas, produzindo os heterosídeos cardiotônicos, importantes agentes terapêuticos para doenças cardiovasculares e as saponinas. Biossinteticamente são derivados de condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato (FPP) unidas cauda-cauda, produzindo o esqualeno. A provável ciclização da molécula de esqualeno leva à formação da estrutura básica dos triterpenóides, o ciclopentano-hidrofenantreno, importante precursor dos esteróides vegetais e animais e das saponinas triterpênicas. As saponinas triterpenóides apresentam três tipos de estruturas básicas: oleanos, ursanos e lupanos.

Itokawa et al. (1991) identificaram em *M. ilicifolia* os triterpenos denominados cangoronina e ilicifolina. Eles são do tipo friedelano e foram fracionados junto com outros sete triterpenos já conhecidos. Os autores mostraram que alguns destes compostos têm ação citotóxica, como, por exemplo, a pristimerina, indicando que podem ser úteis no tratamento de tumores.

Shirota et al. (1994) elucidaram a estrutura de alguns triterpenos aromáticos. Estes compostos mostraram atividade citotóxica moderada para três linhagens celulares. As estruturas de outros dois triterpenos dímeros, denominados cangorosina A e cangorosina B, foram elucidadas por Shirota et al. (1997) em extrato de raízes de *M. ilicifolia*. Ohsaki et al. (2004) relatam a descoberta de quatro novos triterpenos, além de outros conhecidos, presentes nas folhas de espinheira santa. Dentre estes novos triterpenos, o erithrodiol exibiu significativa ação citotóxica (antitumoral) *in vitro*, contra algumas linhagens de células tumorais.

Apesar de a literatura destacar os triterpenos como os principais compostos bioativos em espinheira-santa, Corsino et al. (1998a) destacaram que a família Celastraceae é uma fonte rica de sesquiterpenos. Os autores isolaram e elucidaram a estrutura química de dois sesquiterpenos, a aquifoliulina E-I e a aquifoliulina E-II. Ao verificarem a ação citotóxica do extrato de *M. aquifolium* em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, eles sugeriram que os sesquiterpenos podem ser os principais responsáveis por causar pequenos danos no DNA. Em outro trabalho, Corsino et al. (1998b) também elucidaram a estrutura de outros dois sesquiterpenos, a aquifoliulina E-III e a aquifoliulina E-IV.

Os triterpenos quinonametídeos maitenina e 22 $\beta$ -hidroximaitenina são membros de um pequeno grupo de produtos naturais peculiares às espécies das famílias Celastraceae e Hippocrateaceae (GUNATILAKA, 1996) com potencial anticancerígeno (BAVOVADA et al., 1990). A ligação da maitenina ao DNA sugere

uma interação celular que pode elucidar a atividade antitumoral (CAMPANELLI et al., 1980). Santana, Asfora e Cortias (1971) mostraram que estes compostos são efetivos contra carcinoma epidermóide.

Corsino et al (1998c) quantificaram os triterpenos maitenina e 22 $\beta$ -hidroximaitenina a partir da técnica de calos oriundos de explantes de folhas de *M. aquifolium* por meio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cultivados em dois meios de cultura com diferentes concentrações de cinetina. O rendimento dos triterpenos no meio é dependente da diminuição da concentração de cinetina.

Corsino et al. (2000), ao estudarem a biossíntese de triterpenóides em *M. aquifolium*, identificaram que as folhas produzem 3 $\beta$ -friedelanol e friedelina (friedelano) e raízes acumulam maitenina e pristimerina (quinonametídicos). Os triterpenos derivados de friedelano, uma vez biossintetizados nas folhas, são translocados para as raízes e posteriormente transformados nos triterpenóides quinonametídicos, que apresentam ação antitumoral.

Buffa Filho et al. (2002), por meio do método HPLC de fase-reversa, quantificaram triterpenóides citotóxicos em cinco tipos morfológicos de *M. ilicifolia*. Os compostos encontrados em baixas concentrações foram 20 $\alpha$ -hidroximaitenina e 22 $\beta$ -hidroximaitenina e os em altas maitenina, celastrol e pristimerina.

### **2.A.2.2 Substâncias fenólicas**

As substâncias fenólicas possuem pelo menos um anel aromático ligado a um grupamento hidroxila. Estão distribuídas amplamente no reino vegetal e, porém os animais são praticamente incapazes de sintetizar o anel aromático. São derivados metabolicamente do ácido chiquímico e fenilpropanóides (ROBARDS et al., 1999 apud NEGRI, 2007). A maioria das substâncias fenólicas não é encontrada na natureza na forma livre, mas como ésteres ou heterosídeos. Nas plantas, encontram-se armazenados nos vacúolos, no estado reduzido ou frequentemente como heterosídeos, que não são tóxicos às plantas (BECKMAN, 2000 apud NEGRI, 2007). No corte ou esmagamento da planta que normalmente ocorre durante a colheita, os polifenóis são oxidados pela PPO (polifenol oxidase) a quinonas dando coloração escura. Se as quinonas se ligarem aos aminoácidos contendo S (enxofre) ou N (nitrogênio) há formação de complexos quinona-aminoácido alterando cor, aroma e sabor da planta (BITTNER, 2006 apud NEGRI, 2007).

As substâncias fenólicas são encontradas principalmente como polifenóis e estão presentes em várias classes de metabólitos secundários, como os taninos e os flavonóides e são facilmente oxidáveis por enzimas, metais, luz e calor (SIMÕES et al., 2003). A composição fenólica é determinada genética e ambientalmente, porém o processamento e o armazenamento podem modificar os teores por reações oxidativas, principalmente nas frutas.

As reações mais importantes que ocorrem nos polifenóis estão relacionadas com o potencial redox, mais especificamente a atividade antioxidante e o escurecimento oxidativo (ROBARDS et al., 1999 apud NEGRI, 2007).

Martins, Guterres e Ortega (2003) encontraram nas folhas de *M. ilicifolia*: 8,72; 5,61 e 3,11 g% de polifenóis totais, polifenóis não-tanantes e taninos totais, respectivamente.

Na espinheira-santa as substâncias fenólicas são encontradas no mesofilo, predominantemente no segundo extrato paliçádico (DUARTE e DEBUR, 2005).

Os usos das substâncias fenólicas são variados. Na indústria alimentícia e farmacêutica são utilizados como flavorizante, corante, aromatizante e principalmente como antioxidante (SIMÕES et al., 2003).

#### **2.A.2.2.1 Taninos**

Os taninos são polifenóis encontrados em plantas superiores e são utilizados desde muito tempo no curtimento de couro (SIMÕES et al., 2003).

O termo tanino foi o nome dado à infusão de cascas de árvores como o carvalho e a castanheira, na qual peles de animais eram tratadas para obtenção de couros maleáveis e de grande durabilidade (QUEIROZ, MORAIS e NASCIMENTO, 2002). Nas plantas os taninos exercem função de proteção contra os herbívoros e ataques de insetos, fungos e bactérias (MADHAN et al., 2005 apud NEGRI, 2007).

Segundo Cardoso et al. (2001) os taninos são compostos de sabor adstringente, derivados de fenilpropanos, capazes de formar complexos com proteínas, açúcares e alcalóides indólicos. Dividem-se em duas categorias: derivados de esqueletos (C6- C1)<sub>n</sub>, chamados de taninos hidrosolúveis, e derivados de esqueletos (C6-C3-C6)<sub>n</sub>, chamados de taninos condensados ou proantocianidinas. Os taninos hidrolizáveis possuem rotas biossintéticas ainda desconhecidas. Sabe-se que seu precursor é o ácido gálico ou seu dímero de condensação, o ácido elágico. Os taninos condensados são biossintetizados pelas

condensações de derivados de ácido chiquímico e unidades de malonil-CoA, levando à formação das catequinas. Estas são importantes precursoras das proantocianidinas (taninos condensados) e antocianidinas. Caracterizam-se por serem oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas unidades flavonoídicas (flavan-3-ol e flavan-3,4-diol). Portanto, são também considerados compostos flavonóides, sendo denominados de flavolanas, diferenciando-se dos taninos hidrolisáveis por não possuírem resíduos glicosídeos em sua estrutura. Entre as atividades farmacológicas que os taninos condensados apresentam – quando complexados com proteínas – destacam-se a proteção da mucosa do estômago em tratamento de úlcera péptica, as propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes, e o bloqueio da formação da placa dental por meio da inibição da glicosiltransferase, produzida por bactérias bucais.

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; 3) habilidade de se complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos. Foi sugerido também que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente relacionados com estas três propriedades (HASLAM, 1996).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

As propriedades fisiológicas e farmacológicas dos taninos foram estudadas por Haslam et al. (1989). Estes autores estudaram também o princípio da adstringência e da cicatrização como base terapêutica em ferimentos da mucosa, já que os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações por meio da formação de uma camada protetora (complexo taninoproteína e/ou tanino-polissacarídeo).

Hatano et al. (1989) observaram que taninos condensados e hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar radicais livres de oxigênio e desempenham um

importante papel no processo inflamatório. Isto leva a acreditar em um possível efeito antimutagênico, uma vez que a sua função protetora também se estende ao DNA das células. Estas observações foram confirmadas por Buelga e Scalbert (2000) referente à atividade anticâncer; por Negro, Tommasi e Miceli (2003) referente à atividade antioxidante.

A característica fundamental que dá aos taninos suas propriedades biológicas parece ser a alta concentração de grupos orto-fenol-hidroxila (HASLAM, 1974).

A ocorrência de taninos condensados e hidrolisáveis no reino vegetal segue padrões significativamente diferentes. Enquanto taninos condensados ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetalae das dicotiledôneas e não foram encontrados nas Sympetalae (MELLO e SANTOS, 2003).

#### **2.A.2.2.2 Flavonóides**

Os flavonóides existem em abundância no reino vegetal e são encontrados em sua maioria nas angiospermas (CARDOSO et al., 2001). Caracterizam-se estruturalmente por serem polifenólicos derivados de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ligados na orientação cabeça-cauda, e que podem conter, como substituintes, hidroxilas ou seus derivados funcionais, tais como ésteres, metoxilas, além de glicosídeos, isoprênicos, presos em posições específicas dos anéis. Os flavonóides têm como precursores a fenilalanina e a acetil-CoA. São originados de reações de derivados do ácido chiquímico e derivados do acetato. Os flavonóides são divididos nas seguintes classes: flavonas, flavonóis, antocianinas e isoflavonóides, sendo esta última classe restrita à família Fabaceae. Os compostos mais importantes encontrados nos vegetais, para cada uma das três primeiras classes são: flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (canferol, quercetina, miricetina e galangina) e antocianinas (cianidina e malvidina).

Para os flavonóides são relatados usos na proteção contra radiação UV e visível, proteção aos ataques de insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de polinizadores, propriedades antioxidantes, estrogênicas, alelopáticas e também a capacidade de inibir a ação de enzimas. Usados como pigmentos, para tanagem de couro e fermentação de chás. Na terapêutica tem atividade antitumor, antiinflamatória, antioxidante, antiviral e, além disso, são utilizados na reposição hormonal dentre outras atividades (SIMÕES et al., 2003).

Numa dieta alimentar normal, ingere-se aproximadamente de 20 mg a 1 g de flavonóides por dia (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996). No entanto, são controversos os estudos de absorção dos flavonóides. Alguns autores sugerem que a quercetina heterosídica tem melhor absorção que a aglicona (ROBARDS et al., 1999 apud NEGRI, 2007), enquanto outros pesquisadores dizem o oposto (MUROTA e TERAQ, 2003).

Na espinheira-santa, a maior parte dos flavonóides é do tipo heterosídico. A quercetina heterosídica é mal absorvida no intestino delgado, devido à porção açúcar que a torna mais hidrofílica. Após a ingestão, os heterosídeos são hidrolisados em agliconas (formas ativas) no intestino delgado por enterobactérias. As agliconas pelo caráter mais lipofílico são melhores absorvidas no intestino grosso pelos fosfolipídeos de membrana. Em seguida, entram na circulação e no fígado sofrem O-metilação, glicuronidação ou sulfatação. São excretados pela bile e retornam ao intestino, sendo reabsorvidas ou excretadas pelas fezes (MUROTA e TERAQ, 2003).

A determinação quantitativa dos flavonóides heterosídicos é difícil, devido à presença de diferentes açúcares ligados à molécula principal, além de possuírem açúcares ligados a outras moléculas de açúcares e em diferentes posições (HERTOG, HOLLMAN e VENEMA, 1992). Os flavonóides heterosídicos têm a porção glicona normalmente ligadas à posição 3, no anel C (ROBARDS et al., 1999 apud NEGRI, 2007). Em geral, para o doseamento dos flavonóides utiliza-se a metodologia de espectrofotometria por UV e por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) realizando uma hidrólise ácida do flavonóide para a retirada da parte glicona. Segundo Leite et al. (2001) os flavonóides tetra-glicosilados são úteis como marcadores químicos para o controle de qualidade em *Maytenus*, como já anteriormente descrito por Vilegas et al. (1998), os quais distinguiram, por meio da técnica HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatographic), amostras autênticas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* e amostras alteradas com *Sorocea bomplandii*, uma espécie muitas vezes confundida com a espinheira-santa, devido à morfologia similar da folha.

### **2.A.3 Propriedades farmacológicas**

A *M. ilicifolia* apresenta diversos usos, são descritas ações anticonceptiva, abortiva, anti-séptica, digestiva, antiespasmódica, tratamento de feridas, de úlceras



estomacais, diurética, laxativa, antiasmática, antitumoral, combate problemas hepáticos e disfunção erétil. Porém, a principal indicação das folhas de espinheira-santa é o tratamento de gastrites, úlceras gástricas e duodenais (HNATYSZYN et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; REIS e SILVA, 2004).

Souza-Formigoni et al. (1991) compararam em ratos, previamente induzidos à úlcera gástrica, os efeitos do extrato de *M. ilicifolia* com os de cimetidina - droga de ação anti-histamínica, inibitória sobre a hemorragia digestiva e sobre a secreção gástrica de ácidos, comumente observados na úlcera péptica. O efeito protetor dependente da dose foi demonstrado tanto com a administração do extrato aquoso via oral quanto intraperitoneal. Observaram que a planta mostrou-se menos nociva à parede estomacal, pois provocou um aumento no volume e pH do suco gástrico. Também mencionam que extratos liofilizados mostram a mesma atividade antiulcerogênica depois de até 15 meses de estocagem. Dessa forma, os extratos liofilizados apresentam grande estabilidade, o que dá valor ao uso de produtos comerciais da planta. O efeito antiulcerogênico foi associado à presença de taninos hidrolisáveis (REIS e SILVA, 2004). Porém, Faleiros et al. (1992) apud Magalhães (2002) atribuíram o efeito às substâncias triterpênicas friedelina e friedelanol, enquanto que Queiroga et al. (2000) avaliando os efeitos desses triterpenos em modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos, observaram que associados ou isolados foram inativos na redução das úlceras. Este resultado sugeriu que estes terpenos possivelmente não sejam os responsáveis diretos pela ação antiulcerogênica da espinheira-santa.

Análises por espectrografia e raios-X cristalográfico das raízes de *M. ilicifolia*, mostraram que esta planta possui compostos citotóxicos para três linhagens celulares (SHIROTA et al., 1994) e efeito antitumoral (BAVOVADA et al., 1990), o qual foi demonstrado por Fox (1991) em ensaio clínico utilizando coquetéis fitoterápicos contendo também *Catharanthus roseus*, *Combretus caffrum*, *Maytenus ovatus*, *Bugula neritina*, *Pancratium littorale*, *Phyllanthus acuminatus*, *Dolabella auriculata*, *Taxus brevifolia* e *Taxus species*.

Melo et al. (2001) realizaram experimento com bactérias *Escherichia coli* que foram colocadas em meio contendo SnCl<sub>2</sub> – substância com propriedade genotóxica e extrato de *M. ilicifolia*. Neste experimento observou-se que a planta demonstrou proteção à toxicidade do SnCl<sub>2</sub> e maior sobrevivência às bactérias, devido à redução do estanho, demonstrando efeito antioxidante do meio contendo o fitoterápico, efeito

também demonstrado e atribuído aos flavonóides em estudos de Oshima et al. (1998); Magnani, Gaydou e Hubaud (2000); Mora et al. (1990) e Cotellet et al. (1992) que afirmam ainda, a capacidade desses flavonóides de atuarem sobre radicais hidroxilas, devido a propriedade de doar hidrogênio.

Segundo Cunico et al. (2002) o extrato etanólico bruto das folhas de *M. ilicifolia* atuou em fungos fitopatógenos, inibindo o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em 10% e estimulando o crescimento de *Colletotrichum acutatum* em 30%.

Martins, Guterres e Ortega (2003) verificaram que o extrato aquoso seco obtido por spray-dryer das folhas não apresentou atividade antiulcerogênica significativa na administração oral em ratos machos Wistar. Porém, o extrato aquoso liofilizado reduziu em 77% a lesão em úlcera gástrica, utilizando a indometacina como ulcerogênica e cimetidina como antiulcerogênica. A menor atividade foi associada à diminuição de taninos.

Jorge et al. (2004), avaliaram a eficácia dos extratos hexânico (triterpenos) e acetato de etila (polifenóis - taninos condensados e flavonóides) de *M. ilicifolia* como antiinflamatório, antinociceptivo e em lesões gástricas, como protetor e cicatrizante. O extrato hexânico apresentou melhor atividade que o acetato de etila, ambos mostraram ser ativos na dose de 320 mg/kg em ratos e houve aumento de volume gástrico e pH. As substâncias flavônicas apresentam atividade antiinflamatória pela diminuição na formação de mediadores proinflamatórios como as prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Os triterpenos são antiulcerogênicos pelo estímulo da síntese de muco ou pela manutenção do conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica em níveis elevados.

De acordo com Rattmann et al. (2006) a atividade biológica vasorelaxante atribuída ao extrato das folhas de *M. ilicifolia* possivelmente esta envolvida com a produção de óxido nítrico, ativação da guanilato ciclase e abertura dos canais de potássio.

Costa et al. (2008) demonstraram a citotoxicidade da pristimerina, isolada de *M. ilicifolia*, para várias linhagens de células tumorais humanas. Os autores apontaram a pristimerina como representante de uma classe emergente de produtos químicos com potencial anticancerígeno.

Recentemente foi demonstrado *in vivo*, em experimento realizado com ratos, o potente efeito hipotensor dependente de óxido nítrico via guanilato ciclase das preparações obtidas a partir das folhas de *M. ilicifolia* (CRESTANI et al., 2009).

Existem várias espécies medicinais do gênero *Maytenus* – além de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* – que vêm sendo amplamente estudadas, como *M. senegalensi*, *M. macrocarpa* e *M. canariensis* (DI STASI, 2004). O autor cita alguns trabalhos com estas espécies. *M. senegalensis* apresenta atividade antimalárica, leishmanicida e inibitória sobre a replicação do vírus HIV-1 por meio da ação da pristimerina. *M. canariensis* apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida. *M. macrocarpa* apresenta compostos com ação citotóxica e leishmanicida. Foi evidenciada por Kennedy et al. (2001), a ação leishmanicida de *M. magellanica* e *M. chubutensis*. Macari, Portela e Pohlit (2006) demonstraram o efeito antioxidante e a citotoxicidade de *M. guyanensis*. Bruni et al. (2006) relataram a antimutagenicidade e a ação antimicrobiana de *M. krukovii* e Fonseca et al. (2007) as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de *M. truncata*.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberton MD, Falkenberg DB, Falkenberg MB. Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Rev. Bras. Farmacogn. 2002; 12(Supl):11-3.

Andrade AM, Bizão N, Faria FS, Moreira TC, Murakami DM. Avaliação do efeito diurético das folhas e raízes de *Boerhavia diffusa* L. (pega-pinto) em ratos. J. Bras. Fitomed. 2005; 3(2):56-61.

Aschwanden C. Herbs for health, but how safe are they? Bull. W. H. O. Geneva. 2001; 79(7):691-2.

Balbach A. A Flora Nacional na Medicina Doméstica. 17 ed. São Paulo; 1986. p. 406-676.

Balunas MJ, Kinghorn D. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 2005; 78:431-41.

Bavovada R, Blasko G, Shien HL, Pezzuto JM, Cordell GA. Spectral assignment and cytotoxicity of 22-hydroxytingenone from *Glyptopetalum sclerocarpum*. Planta Med, 1990; 56:380-3.

Berg ME van den. Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2 ed. Rev. E. Aum. – Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) nº 89 de março de 2004. Determina a publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. D.O.U. (Sessão 1). Brasília, 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U (Sessão 1). Brasília, 18 mar. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Poder Executivo. Brasília, 04 mai. 2006a.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo. Brasília, 23 de jun. 2006b.

Bruni R, Rossi D, Muzzoli M, Romagnoli C, Paganetto G, Besco E, Choquecillo F, Peralta K, Lora WS, Sacchetti G. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. *Fitoterapia*. 2006; 77(7-8):538-45.

Buelga CS, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food. Agr. Sussex*. 2000; 80:28-32.

Buffa Filho W, Corsino J, Bolzani VS, Furlan M, Pereira AMS, França SC. Quantitative determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane derivatives from Five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal*. 2002; 13:75-8.

Calixto JB, Yunes RA. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001.

Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *J. Ethnopharmacol*. 2005; 100:131-34.

Campanelli AR, D'Alagni M, Marini-Bettolo S. Spectroscopic evidence for the interaction of tingenone with DNA. *FEBS Lett*. 1980; 122: 256-9.

Cardoso MG, Shan AYKV, Pinto JEBP, Delú Filho N, Bertolucc SKV. Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal. Lavras: UFLA, 2001. p. 81.

Carlini ELA. Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) e outras. Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 87.

- Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Machado Netto E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia. 2007; Ano V(11):26-32.
- Chávez H, Estévez-Braun A, Ravelo AG, González AG. Friedelane Triterpenoids from *Maytenus macrocarpa*. J Nat. Prod. 1998; 61(1):82-5.
- Cordeiro PJM, Vilegas JHY, Lanças FM. HRGC-MS Analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira-santa"). J Braz Chem Soc. 1999; 10(6):523-26.
- Corrêa Junior C, Ming LC, Scheffer MC. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP; 1994.
- Corsino J, Alécio AC, Ribeiro ML, Furlan M, Pereira AMS, Duarte IB, França SC. Quantitative Determination of Maitenin and 22 $\beta$ -Hydroxymaitenin in Callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. Phytochem Anal. 1998c; 9:245-7.
- Corsino J, Bolzani VS, Pereira AMS, França SC, Furlan M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. Phrtochem. 1998a; 48(1):137-40.
- Corsino J, Bolzani VS, Pereira AMS, França SC, Furlan M. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. Phytochem. 1998b; 49(7):2181-3.
- Corsino J, Carvalho PRF, Massuo JK, Latorre LR, Oliveira OMMF, Araújo AR, Bolzani VS, França SC, Pereira AMS, Furlan M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Sdalacia campestris*. Phytochem. 2000; 55:741-8.
- Costa PM, Ferreira PMP, Bolzani VS, Furlan M, Santos VAFFM, Corsino J, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. Toxicol in Vitro; 2008; 22:854-63.

Cotelle N, Bernier JL, Henichart JP, Catteau JP, Gaydou F, Wallet JC. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radical Bio Med.* 1992; 12:211-9.

Crestani S, Rattmann YD, Cipriani TR, Souza LM, Iacomini M, Kassuya CAL, Marques MCA, Silva-Santos JE. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vasc Pharmacol.* 2009; 51(1):57-63.

Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press; 1981.

Cunico MM, Cirio GM, Miguel OG, Miguel MD, Montrucchio DP, Auer CG, Grigoletti Júnior A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2002; 12(2):69-73.

Di Stasi LC. Aspectos químicos e farmacológicos da espinheira-santa: uma análise da utilidade dos dados. In: Reis MS, Silva SR. Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. Brasília: IBAMA, 2004. p 204.

Duarte MR, Debur MC. Steam and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. *Fitoterapia.* 2005; 76(1):41-9.

Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. Parte II, p. 194.

Ferreira PM, Oliveira CN, Oliveira AB, Lopes MJ, Alzamora F, Vieira MAR. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. *Planta.* 2004; 219:319-324.

Fonseca APND, Silva GDF, Carvalho JJ, Salazar GDCM, Duarteb LP, Silva RP, Martinez-Jorge R, Tagliati CA, Zani CL, Alves TMA, Peres V, Vieira Filho PSA. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quim Nova.* 2007; 30(4):842-7.

Fonte NN. A Complexidade das Plantas Medicinais: Enfoque Farmacêutico. In: \_\_\_\_\_. Complexo Agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas, e condimentares no Estado do Paraná: diagnósticos e perspectivas. Curitiba: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais: EMATER-Paraná: Embrapa Florestas; 2004. p. 24-45.

Fox BW. Medicinal plants in tropical medicine - Natural products in cancer treatment from bench to the clinic. T Roy Soc Trop Med H. 1991; 85(1):22-5.

Gunatilaka AAL. Triterpenoid quinonemethides and related compounds (Celastrolids). Prog Chem Org Nat Prod. 1996; 67:1-123.

Haslam E, Lilley TH, Ya C, Gaffney SH, Spencer CM, Martin R, Magnolato D. Some observations on the role of plant polyphenols in traditional herbal medicines. Farmaceutisch Tijdschr. voor Belgie, Brussel. 1989; 66:21-5.

Haslam E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drug: Possible Modes of Action. J. Nat. Prod. 1996; 59:205-15.

Haslam E. Polyphenol-protein interactions. Biochem. J. 1974; 139:285-88.

Hatano T, Edamatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara A. Effects of interaction of tanins with co-existing substances. VI Effects of tanins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chem. Pharm. Bull. 1989; 37:2016-21.

Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. J. Agric. Food Chem. 1992; 40(9):1591-98.

Heywood VH. Flowering plants of the world. Oxford: Oxford University Press; London: Melboulne; 1978.

Hnatyszyn O, Moscatelli V, Garcia J, Rondina R, Costa M, Arranz C, Ballaszczuk A, Ferraro G, Coussio JD. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the *corpus cavernosum* of Guinea pig. Phytomedicine. 2003; 10:669-74.



Itokawa H, Shirota O, Ikuta H, Morita H, Takeya K, Litaka Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochem.* 1991; 30(11):3713-6.

Jorge RM, Leite JPV, Oliveira AB, Tagliati CA. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94(1):93-100.

Kennedy ML, Cortés-Selva F, Pérez-Victoria JM, Jiménez IA, González AG, Muñoz OM, Gamarro F, Castanys S, Ravelo AG. Chemo sensitization of a multidrugresistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus megellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem*, 2001; 44(26):4668-76.

Leite JPV, Rastrelli L, Romussi G, Oliveira AB, Vilegas JHY, Vilegas W, Pizza C. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49(8):3796-801.

Macari PAT, Portela CN, Pohlit AM. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. *Acta Amaz.* 2006; 36(4):513-8.

Magalhães PM. O Caminho Medicinal das plantas: aspectos sobre o cultivo. Campinas: RZM Press UNICAMP; 1997. p. 120.

Magalhães, PM. Agrotecnologia para o cultivo de espinheira-santa. 18 jan. 2002. Acesso em: 02 out. 2005. Disponível em: <  
<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm>>.

Magnani L, Gaydou EM, Hubaud JC. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Anal Chim Acta.* 2000; 41:209-16.

Mariot MP, Barbieri RL. Espinheira-santa: uma alternativa de produção para a pequena propriedade. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Embrapa Clima Temperado. Documento, 177. 2006. Acesso em: 13 fev. 2007. Disponível em: [http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento\\_177.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_177.pdf)

Mariot MP, Barbieri RL. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus aquifolium* Mart.). Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, 2007; 9(3):89-99.

Martins AG, Guterres SS, Ortega GG. Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. Acta Farm. Bonaerense. 2003; 22(1):39-44.

Mello JCP, Santos SC. Taninos. In: Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC; 2003. p. 615.

Melo SF, Soares SF, da Costa RF, da Silva CR, de Oliveira MB, Bezerra RJ, Caldeira-de-Araujo A, Bernardo-Filho M. Effect of the Cymbopogon citrates, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. Mutat Res. 2001; 496:33-8.

Mora A, Payá M, Rios JM, Alcaraz MJ. Structure activity relationships of polymetoxylflavones and other flavonoids as inhibitors of non enzymic lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1990; 40:793-7.

Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. Arch Biochem Biophys. 2003; 417(1):12-7.

Negri MLS. Secagem das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia - Setor de Ciências da Saúde. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Bioresour. Technol., Oxford. 2003; 87:41-4.

Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. Rev. Bras. Farmacogn. 2003; 13(2):83-91.

Ohsaki A, Imai Y, Naruse M, Ayabe SI, Komiyama K, Takashima J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. J Nat Prod. 2004; 67(3):469-71.

Oshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilbert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavanoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrile and nitroxil anion. Free Radical Bio Med. 1998; 25:1057-65.

Queiroga CL, Silva GF, Dias PC, Possenti A, Carvalho JE. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelin-3\_ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). J. Ethnopharmacol. 2000; 72(3):465-8.

Queiroz CRAA, Morais SAL, Nascimento EA. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). Rev. Árvore. 2002; 26(4):493-7.

Radomski MI. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1998.

Rattmann YD, Cipriani TR, Sassaki GL, Iacomini M, Rieck L, Marques MCA, Silva-Santos JE. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. J. Ethnopharmacol. 2006; 104(3):328-35.

Reis MS, Silva SR. Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. Brasília: IBAMA; 2004. p. 204.

Ribeiro MV. Estabelecimento *in vitro* e análise da variabilidade genética de acessos de Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) coletados no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado - Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Pelotas; 2008.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant Activity relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. Free Radical Bio Med. 1996; 20(7):933-56.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Willians & Wilkins; 1996. p.1-14.

Santana CF, Asfora JJ, Cortias CT. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. *Rev. Inst. Antibióticos*. 1971; 11:37-39.

Scheffer MC, Corrêa Junior C, Graça LR. Aspectos da Cadeia Produtiva da Espinheira-Santa. In: \_\_\_\_\_. *Complexo Agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas, e condimentares no Estado do Paraná: diagnósticos e perspectivas*. Curitiba: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais: EMATER Paraná: Embrapa Florestas; 2004. p. 253-71.

Scheffer MC. Sistema de cruzamento e variação genética entre populações e progênies de espinheira-santa. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal – Silvicultura) – Universidade Federal do Paraná; 2001.

Shirota O, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Iitaka Y. Cytotoxic Aromatic Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *J. Nat. Prod.* 1994; 57(12):1675–81.

Shirota O, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Revised structures of cangorosins, triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *J Nat Prod.* 1997; 60(2):111-5.

Silva SR, Buitrón X, Oliveira LH, Martins MVM. *Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio*. Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha & IBAMA, [Relatório final]. 2001.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC; 2001.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC; 2003.

Souza-Formigoni MLO, Oliveira MGM, Monteiro MG, Silveira Filho NG, Braz S, Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 1991; 34:21-7.

Spritzer DT, Sanseverino MTV, Schuler FL. Manual de Teratogênese. Porto Alegre: Universidade/UFRGS; 2001.

Suzuki O. Mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil. In: Schulz V, Hansel R, Tyler N. Fitoterapia Racional. Brasília; 2002.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Rev. Bras. Cienc Farm. 2006; 42(2):289-306.

Vilegas JHY, Lanças FM, Wauters JN, Angenol L. Characterization of adulteration of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bomplandii* (Moraceae) by high-performance thin layer chromatography. Phytochem Anal. 1998; 9:263-6.

Yariwake JH, Lanças FM, Cappelaro EA, Vasconcelos EC, Tiberti LA, Pereira AMS, Franca SC. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). Rev. Bras. Farmacogn. 2005; 15(2):162-68.

## EXPERIMENTO I - *Maytenus ilicifolia*

### 1. INTRODUÇÃO

*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae, espécie medicinal autóctone (nativa) do Brasil, conhecida popularmente como espinheira-santa, é uma das plantas medicinais mais comercializada por raizeiros no Centro de Campo Grande-MS. Por meio de um levantamento realizado nesta cidade, foram detectadas informações referentes às partes usadas (raízes, caule ou casca de caule, fruto, semente etc.), modos de preparo, via de administração e indicações terapêuticas das plantas utilizadas pela população rural e urbana (SIQUEIRA et al., 1994; NUNES et al., 2003).

Os estudos da ação farmacológica da espinheira-santa foram realizados utilizando principalmente as folhas, pois é a parte da planta que normalmente é utilizada pela população nas infusões ou pela indústria farmacêutica para elaboração de medicamentos (MARIOT e BARBIERI, 2007).

Na medicina popular brasileira, é usada principalmente para o tratamento de úlceras, indigestão, gastrites crônicas e dispepsias (BALBACH, 1980; CRUZ, 1982; CARLINI, 1988; BORN, 2000; FERREIRA et al., 2004; FREITAS et al., 2005; CIPRIANI et al., 2006; BAGGIO et al., 2007a, b).

Em uma ampla revisão sobre o uso tradicional da espinheira-santa, Scheffer (2004) cita como indicação popular o uso como vulnerário (para curar feridas), anti-séptico, antiespasmódico, diurético, antiasmático, antitumoral, laxativo, para a cura do vício da bebida e enfermidades do fígado, para tratar a hidropisia devido ao abuso do álcool.

Estudos etnobotânicos também relatam a indicação popular da espinheira-santa para outras funções, como, por exemplo, depurativo do sangue e tratamento de diabetes, problemas urinários e intestinais (MARIOT, 2005).

Segundo Hnatyszyn (1974), Arenas e Azorero (1977) e Martinez-Crovetto (1987), a infusão das folhas de *M. ilicifolia* é utilizada como contraceptivo, abortivo e emenagogo, principalmente, entre as populações rurais e indígenas do Paraguai.

Oliveira et al. (1991) verificaram os efeitos dos extratos (aquoso e hidroalcoólico) de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, na fertilidade de ratos machos e fêmeas, bem como a teratogenicidade. Porém, não encontraram resultados significativos e sugeriram então, que fossem realizados estudos mais detalhados.

Montanari, Carvalho e Dolder (1998) testaram os efeitos do extrato etanólico de *M. ilicifolia* em testículos de camundongos. Observaram células germinativas imaturas e/ou mortas com núcleos picnóticos e vacuolizações nos túbulos seminíferos. Apesar de serem observadas espermátides com núcleos menores e acúmulo de lipídeos nas células de Sertoli, não houve efeito significativo do extrato sobre a formação dos espermatozóides.

Montanari e Bevilacqua (2002) testaram os efeitos do extrato hidroalcoólico de *M. ilicifolia* administrado oralmente em camundongos em períodos distintos da gestação. Efeitos abortivos só foram observados no período de pré-implantação (entre o 1º e 3º dia de gestação). Provavelmente o útero neste período, estava inapto para receber o conceito, sugerindo que o extrato influenciou na atividade do hormônio estrogênio. A atividade estrogênica do extrato sugere que o mesmo pode interferir com a receptividade uterina ao embrião. Entretanto, os efeitos não foram uniformes entre os animais, sendo que, em alguns, nenhuma alteração foi observada, nem mesmo na fase de pré-implantação do embrião. Segundo os autores, isto significa que, em humanos, o aborto poderia ocorrer em algumas mulheres e em outras não.

Camparoto et al. (2002) testaram a ação mutagênica do extrato das folhas de *M. ilicifolia* e *Bauhinia candicans*, entretanto, não conseguiram obter significância estatística que comprovasse tal ação em células da medula de rato e raiz de cebola.

Apesar do difuso uso popular, as informações toxicológicas de *M. ilicifolia* no desempenho reprodutivo ainda são escassas e limitam-se a parâmetros que ainda podem ser mais explorados. Torna-se também necessário investigar possíveis efeitos tóxicos decorrentes da interação de substâncias químicas do extrato com órgãos que estão em intensa proliferação celular, como são os tecidos embrionários e ainda, verificar se houve alterações nos órgãos maternos, uma vez que a rata na prenhez torna-se mais sensível devido às bruscas alterações hormonais às quais são submetidas neste período.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o risco toxicológico da exposição ao extrato hidroacetônico seco das folhas de *M. ilicifolia* no sistema reprodutivo de ratas Wistar e em seus fetos, a fim de confirmar sua segurança na dose preconizada pela utilização na medicina popular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os sinais indicativos de toxicidade materna: clínicos, consumo (ração e água filtrada), toxicidade de órgãos, perdas sanguíneas vaginais e ocorrência de morte;
- Avaliar o desempenho reprodutivo materno e o desenvolvimento de seus fetos;
- Verificar a possibilidade de alterações anátomo-histológicas nos órgãos (baço, fígado e rins) das ratas e em seus fetos;
- Avaliar o processo de ossificação, desenvolvimento do sistema nervoso e das vísceras dos fetos;
- Verificar a possibilidade de alterações histológicas nas placentas e variações e/ou malformações nos fetos.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedência e Coleta do Material Botânico

As partes aéreas (folhas) de *M. ilicifolia* (Celastraceae) foram cultivadas e colhidas no Horto de Plantas Medicinais (HPM) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados/MS, pela Dra. Maria do Carmo Vieira.

Visando garantir a qualidade e uniformidade do material vegetal, as folhas foram coletadas no período da manhã, selecionadas e secas em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 36 a 38°C, até a obtenção de massa constante.

A espécie vegetal foi identificada pela Dra. Ezilda Jacomassi (UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil) por meio do envio de réplicas das exsicatas de números 902 e 2.191, as quais se encontram depositadas como documento taxonômico no Herbário DDMS da UFGD, Dourados, MS, Brasil.

No Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande/MS, sob a orientação do Dr. João Máximo de Siqueira, o material vegetal foi processado visando à obtenção de diferentes extratos (Percolação, Ultra-Turrax, Maceração) em diferentes solventes (Acetona, H<sub>2</sub>O, Hidroetanólico).

#### 3.2 Obtenção do Extrato Vegetal

Avaliações farmacognósticas dos extratos (cromatografia em camada delgada-CCD, teor extrativo) foram efetuadas visando otimizar e selecionar o melhor extrato a ser utilizado na proposta deste trabalho.

A partir dos resultados obtidos com cromatografia em camada delgada-CCD confirmou-se que o extrato de *M. ilicifolia* obtido em Acetona:Água (70:30) foi o mais apropriado para a condução do experimento, pois este possui constituição química mais complexa (por CCD) e sendo esta mistura de solventes indicada para plantas ricas em substâncias fenólicas.

O extrato das folhas de *M. ilicifolia* (40 g) foi obtido com acetona:água (70:30; v/v) à 10% (p/v) em Ultra-Turrax (UTC 115 KT) durante 20 min, filtrado, seguido de concentração à pressão reduzida em evaporador rotatório (FIZATON). Este extrato foi mantido em dessecador por 72 horas até a obtenção de um resíduo sólido amorfo de coloração marrom. O resíduo sólido marrom foi triturado em cápsula de

porcelana, fornecendo um pó amorfo marron, rendendo 9,1 g de extrato hidroacetônico (22,8% extrato seco/droga vegetal).

### 3.3 Animais de Experimentação

Utilizou-se ratas albinas (*Rattus norvegicus*) Wistar nulíparas, heterogênicas, de padrão sanitário convencional, com cerca de dois meses de idade, pesando aproximadamente  $200 \pm 10$  g, cedidas pelo Biotério Central da UFMS.

O número total de animais fornecidos pelo Biotério foi de 56 fêmeas e 12 machos com idade de 65 e 94 dias de nascidos, respectivamente.

Os animais foram alojados em gaiolas (caixas) de polipropileno (49X34X26 cm), providas de camas de maravalha selecionadas (*Pinnus* sp – não esterilizada), bebedouro plástico para água e cocho para ração comercial do tipo peletizada. As gaiolas eram higienizadas três vezes por semana. Durante todo procedimento experimental, água filtrada e comida (ração peletizada para ratos Nuvilab CR1-Nuvital, Curitiba-PR) foram fornecidas “*ad libitum*”.

Os animais foram mantidos sob condições padronizadas de climatização (Estante ventilada): temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar entre 55 e 75% e fotoperíodo de 12 horas (ciclo invertido: 06:00 – 18:00 escuro, 18:00 – 06:00 claro).

Os experimentos foram conduzidos (julho a setembro/2008) no Laboratório de Biologia Geral do Departamento de Biologia (DBI) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFMS.

O protocolo para uso de animais em experimentação (nº 115/2006) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS. Foram seguidos os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo atual Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

### 3.4 Acasalamento e Diagnóstico de Prenhez

Após 10 dias de aclimatização na estante ventilada, foi realizado o período de acasalamento dos animais.

Para a determinação das fêmeas prenhes, fez-se o acasalamento pelo sistema poligâmico, usando-se machos de fertilidade previamente comprovada. Foram acasaladas, durante três horas (07:00 às 10:00), duas fêmeas para cada

macho. O diagnóstico de prenhez foi confirmado por meio da observação de espermatozoides e de células de estro (caracterizada como a fase estrogênica máxima) no esfregaço vaginal, sendo este considerado o dia zero da gestação (TAYLOR, 1986). Os esfregaços foram avaliados a fresco, em microscopia óptica (aumento 200X). Após esta confirmação as fêmeas foram separadas e então distribuídas, randomicamente, nos grupos experimentais. Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de 10 progenitoras em cada grupo experimental. As 10 fêmeas prenhes de cada grupo foram mantidas em quatro caixas (duas ou três fêmeas por caixa) de polipropileno.

### **3.5 Determinação da Dosagem**

A dosagem de 15,1 mg/animal/dia (mg/kg de peso corpóreo) foi determinada com base na dose preconizada pela utilização na medicina popular, consumo diário de quatro a cinco xícaras de chá preparado com as folhas em infusão (BALBACH, 1986; FREITAS, 1992), e fazendo a proporção em termos de peso corpóreo, tendo como base um adulto de 70 kg.

### **3.6 Grupos e Delineamento Experimental**

No rato, o implante do blastocisto no útero materno ocorre até o quinto dia de prenhez (DP), a organogênese vai do sexto ao décimo quinto dia e deste até o vigésimo primeiro ocorre o desenvolvimento fetal (MANSON e KANG, 1989). O período mais crítico do desenvolvimento é o da organogênese, quando tecidos e órgãos estão se diferenciando rapidamente, ficando susceptíveis a interferências de agentes externos (teratógenos) capazes de alterar seu desenvolvimento aumentando a incidência de anomalias congênitas (MOORE e PERSAUD, 2004).

Para a realização do experimento, 40 ratas prenhes foram distribuídas, randomicamente, em quatro grupos experimentais (dois grupos controles e dois grupos tratados) com 10 animais cada.

Os grupos foram submetidos ao seguinte esquema de tratamento diário:

- Grupo Controle 1 (C1): recebeu, via gavagem, 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º DP;
- Grupo Tratado 1 (T1): recebeu, via gavagem, extrato seco de *M. ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada do 1º ao 20º DP;

- Grupo Controle 2 (C2): recebeu, via gavagem, 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP;
- Grupo Tratado 2 (T2): recebeu, via gavagem, extrato seco de *M. ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada do 6º ao 15º DP.

### 3.7 Avaliação da Toxicidade Materna

Os indicativos de toxicidade materna avaliados foram sinais clínicos; decréscimo ou aumento de peso corpóreo, de consumo de ração e água; toxicidade de órgãos; perdas sanguíneas vaginais e mortalidade materna (MANSON e KANG, 1994; LEMONICA, DAMASCENO e STASI, 1996; CHAHOUD et al., 1999).

Para detectar sinais clínicos indicativos de toxicidade materna, as ratas prenhes foram observadas decorridos 30 minutos e depois de seis horas após os tratamentos. Quando não eram mais tratadas foram observadas apenas uma vez ao dia. A toxicidade materna foi avaliada pela presença de pêlos eriçados, hipoatividade ou hiperatividade no interior da gaiola, presença de sialorréia, diarreia e/ou mortes (CHRISTIAN, 2001).

Para avaliar alterações de peso corpóreo, as ratas prenhes foram pesadas no 1º, 6º, 15º e 20º dia de prenhez (DP). A partir destes dados, foi calculado o ganho de peso e ganho de peso líquido (corrigido) das progenitoras. Ganho de peso (GP) = peso final (20º DP) – peso inicial (1º DP). Ganho de peso líquido (GPLQ) = GP - peso do útero com fetos.

Para avaliar alterações no consumo de água filtrada e ração, a estimativa do consumo foi efetuada pela diferença entre o que foi colocado às 07:00 em um dia e o que sobrou às 07:00 do dia seguinte (água 100 mL/animal e ração 50 g/animal). Ao final de cada cálculo, a quantidade consumida era repostada. A água dos bebedouros foi trocada diariamente e o consumo foi estimado nos próprios bebedouros.

A estimativa do consumo médio de ração e água filtrada, por rata, foi avaliada em função de quatro intervalos (M2-6, M7-15, M16-20 e M2-20) definidos ao longo do período de prenhez. O intervalo M2-6 correspondeu à média de consumo do 2º ao 6º DP (cinco dias), o M7-15 à média de consumo do 7º ao 15º DP (9 dias), o M16-20 a média de consumo do 16º ao 20º DP (cinco dias) e o M2-20 a média de consumo do 2º ao 20º DP (19 dias).

### **3.8 Avaliação do Desempenho Reprodutivo Materno e do Desenvolvimento Embrionário**

No 20º DP, as ratas prenhes foram submetidas à eutanásia experimental, que significa “boa morte”, ato de induzir a morte sem dor ou tensão (NOGUEIRA et al 2002). Para isso, foram acondicionadas em câmara de sacrifício com dióxido de carbono. O fornecimento de gás na câmara de sacrifício foi realizado com, no máximo, duas ratas de cada vez a fim de se evitar o mínimo de sofrimento e estresse (medo, angústia, tentativa de fuga) possível. A causa das mortes foi por hipóxia cerebral, processo rápido e de baixo custo.

O reconhecimento e a confirmação da morte ocorreram quando os sinais, em conjunto, foram parada respiratória e ausência dos sinais de batimento cardíaco e das contrações musculares reflexas (calafrios, tremores e espasmos).

Após a eutanásia, baço, fígado e rins maternos foram retirados, pesados e avaliados externamente para verificar possíveis alterações referentes à cor, ao tamanho, à textura (consistência) e à presença de cistos. Posteriormente, os órgãos foram fixados em formol 10% tamponado visando o processamento e as análises histológicas.

A eutanásia foi efetuada no 20º DP por causa dos recém nascidos malformados ou com baixa viabilidade serem freqüentemente mortos e canibalizados pelas genitoras (GLEICH e FROHBURG, 1977).

Após eutanásia e subsequente laparotomia, os cornos uterinos, ovidutos e ovários foram expostos e removidos. Os ovários foram dissecados (destituídos de tecido conectivo adjacente), pesados e foi contado o número de corpos lúteos de gestação.

Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente, de forma a permitir visualizar os fetos e quantificá-los, assim como os pontos de implantação (implantes) e a presença de reabsorções.

Com o toque de uma pinça, foram contados os fetos vivos (apresentaram movimento reflexo ao toque) e mortos (sem movimento reflexo). O útero foi pesado com os fetos (útero cheio) e, após a onfalectomia, sem os fetos (útero vazio). Fetos e respectivas placentas foram removidos e pesados. O peso das placentas foi tomado como medida indireta do desenvolvimento fetal. Foi determinado o número de fetos vivos machos e fêmeas por meio da inspeção pélvica.

Todos os fetos vivos tiveram a distância crânio caudal (comprimento do corpo) e o tamanho encefálico determinados. A distância crânio caudal foi obtida com o feto colocado em posição decúbito ventral, membros fletidos, pescoço em extensão e cauda estendida. Em uma placa de vidro depositada sobre papel milimetrado, marcou-se a projeção do ápice do nariz e do início da região escamosa da cauda. A distância entre os dois pontos foi considerada como comprimento do corpo fetal.

O tamanho encefálico (distância inter auricular) foi obtido com o feto colocado em posição frontal. Com o auxílio de um paquímetro foi medida a distância entre as aberturas do conduto auditivo. A avaliação do crescimento fetal foi realizada com base no comprimento crânio caudal, na distância inter auricular (tamanho encefálico) e no peso dos fetos. O peso das placentas foi tomado como medida indireta do desenvolvimento fetal.

Os fetos foram minuciosamente examinados sob microscópio estereoscópico, para avaliação de sua morfologia externa (cor e textura da pele, presença de pontos hemorrágicos e malformações e/ou anomalias).

A partir destes dados foram calculados os parâmetros relativos à fertilidade: Índice placentário = (peso placentário) / (peso do feto); Taxa de eficiência de implantação = (nº de implantações / nº de corpos lúteos) X 100; Taxa de reabsorção = (nº de reabsorções / nº de implantações) X 100; Taxa de perdas pré-implantação = [(nº de corpos lúteos – nº de implantações) / nº de corpos lúteos] X 100; Taxa de perdas pós-implantação = [(nº de implantações – nº de fetos vivos) / nº de implantações] X 100; Taxa de viabilidade fetal = (nº de fetos vivos / nº de implantações) X 100; Razão sexual = (nº de machos nascidos / nº de fêmeas nascidas) X 100.

O peso relativo do baço, fígado e rins materno, ovários e útero com os fetos e sem os fetos também foram calculados (peso do órgão / peso do animal no dia da eutanásia).

A adequação do peso à idade da prenhez foi obtida segundo a metodologia de Oliveira et al. (2009). Para este autor, os fetos podem ser classificados como: fetos com peso adequado para a idade prenhez (PAIP) – peso compreendido entre a média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos de baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) – peso corpóreo inferior à média de peso

dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; fetos acima do peso para a idade de prenhez (APIP) – peso corpóreo superior à média de peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo.

### **3.9 Avaliação do Desenvolvimento das Ninhadas**

Cada ninhada foi dividida randomicamente em três grupos distintos, para análise de possíveis malformações esqueléticas ou malformações viscerais e para análise histológica de alguns órgãos fetais.

#### **3.9.1 Fixação e Análise Visceral**

Os corpos dos fetos foram colocados em solução de Bodian's para fixação. A análise foi realizada segundo os cortes propostos por Barrow e Taylor (1969) para estudo de tórax e abdômen e pelos cortes estratégicos propostos por Wilson (1965) para estudo de cabeça. Os métodos consistem em seccionar transversalmente os fetos, de maneira que seja possível a avaliação de possíveis malformações e/ou anomalias viscerais em palato, ouvido interno, medula, cavidade nasal, septo nasal, retina, córnea, cristalino, hemisfério cerebral, ventrículos (cérebro), glândula salivar, tireóide, esôfago, traquéia, timo, coração, fígado, rins, bexiga, ureter e gônadas. A classificação das alterações foi baseada, principalmente, nos trabalhos de Taylor (1986), Manson e Kang (1994) e modificações propostas por Oliveira et al. (2009).

Os exames das vísceras e esqueletos fetais foram realizados em estereomicroscópio.

As alterações encontradas, neste estudo, foram denominadas de anomalias quando havia alteração do processo normal do desenvolvimento sem comprometer a função geral ou específica, ou o desenvolvimento pós-natal do feto. Quando as anormalidades estruturais eram incompatíveis com a sobrevivência, foram consideradas malformações, visto que não foram realizados métodos de estudos complementares que provissem outras alterações.

Segundo Bernardi (1999) o termo malformação não significa somente formação anormal de tecidos, ele remete também a anormalidades bioquímicas.

Visando facilitar o entendimento dos resultados da análise visceral, foi inserida uma relação de fotos contendo os tipos de cortes utilizados (Foto 1 a 6) durante o estudo de malformações viscerais (OLIVEIRA, 2001).

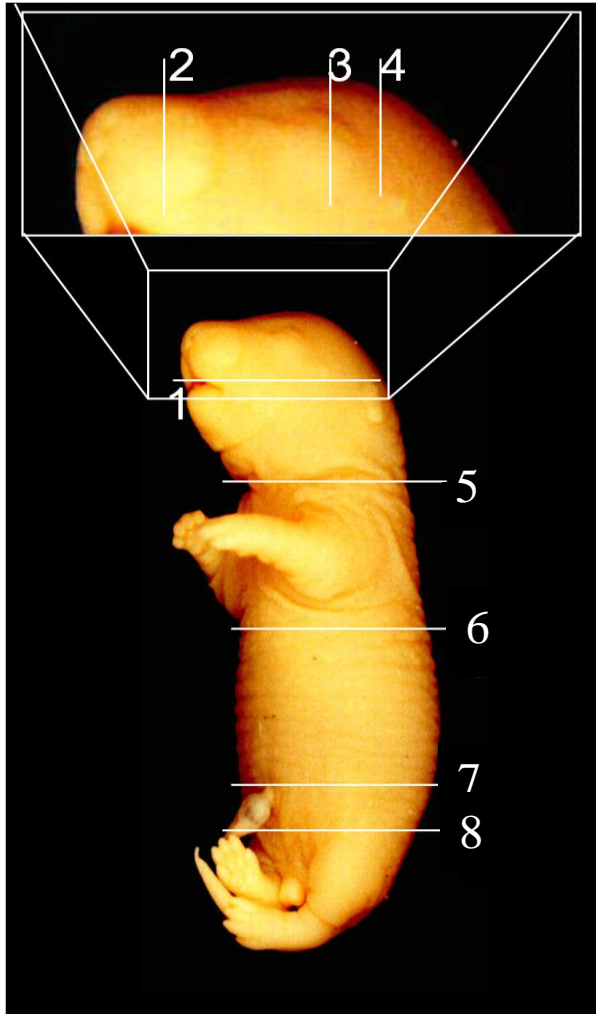


Foto 1 – Relação e localização de cortes utilizados durante o estudo de malformações viscerais: (1) Corte transversal na altura da cavidade oral; (2) Corte frontal na região pré-gabelar; (3) Corte frontal na região orbital; (4) Corte frontal na região do vértex; (5) Corte transversal na região de pescoço; (6) Corte transversal na região do terço médio torácico; (7) Corte transversal na região abdominal inferior; (8) Corte transversal na região pélvica. Fonte: Oliveira, 2001.



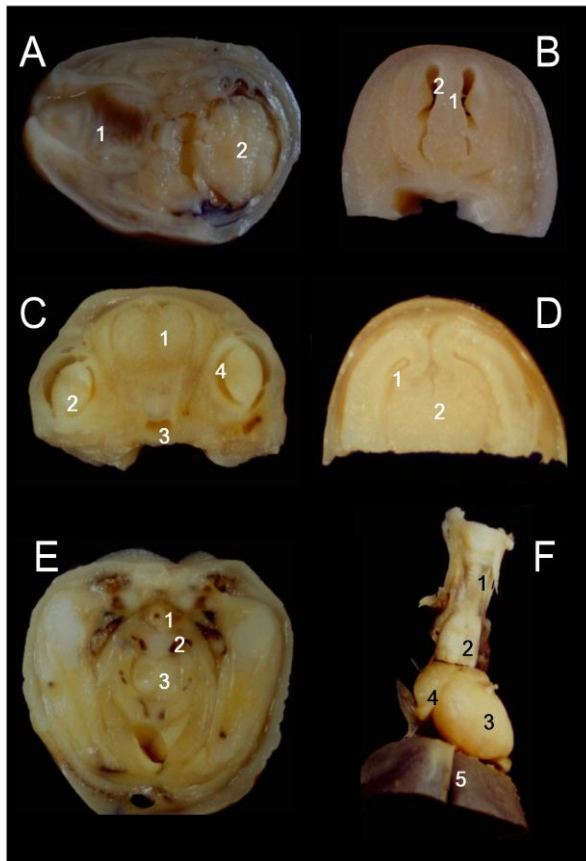


Foto 2 – Sequência de cortes para estudo visceral em feto normal. (A) Corte transversal na altura da cavidade oral: 1 – Palato, 2 – Cérebro; (B) Corte frontal na região pré-gabelar: 1 – Septo nasal; 2 – Coana; (C) Corte frontal na região orbital: 1 – Bulbo olfatório, 2 – Cristalino, 3 – Coana, 4 – Retina; (D) Corte frontal na região do vértex: 1 – Ventrículo Lateral, 2 – Terceiro ventrículo; (E) Corte transversal na região de pescoço: 1 – Traquéia, 2 – Esôfago, 3 – Medula espinhal; (F) Corte transversal na região do terço médio torácico: 1 – Traquéia, 2 – Timo, 3 – Coração, 4 – Aurícula direita; 5 – Fígado. Fonte: Oliveira, 2001.

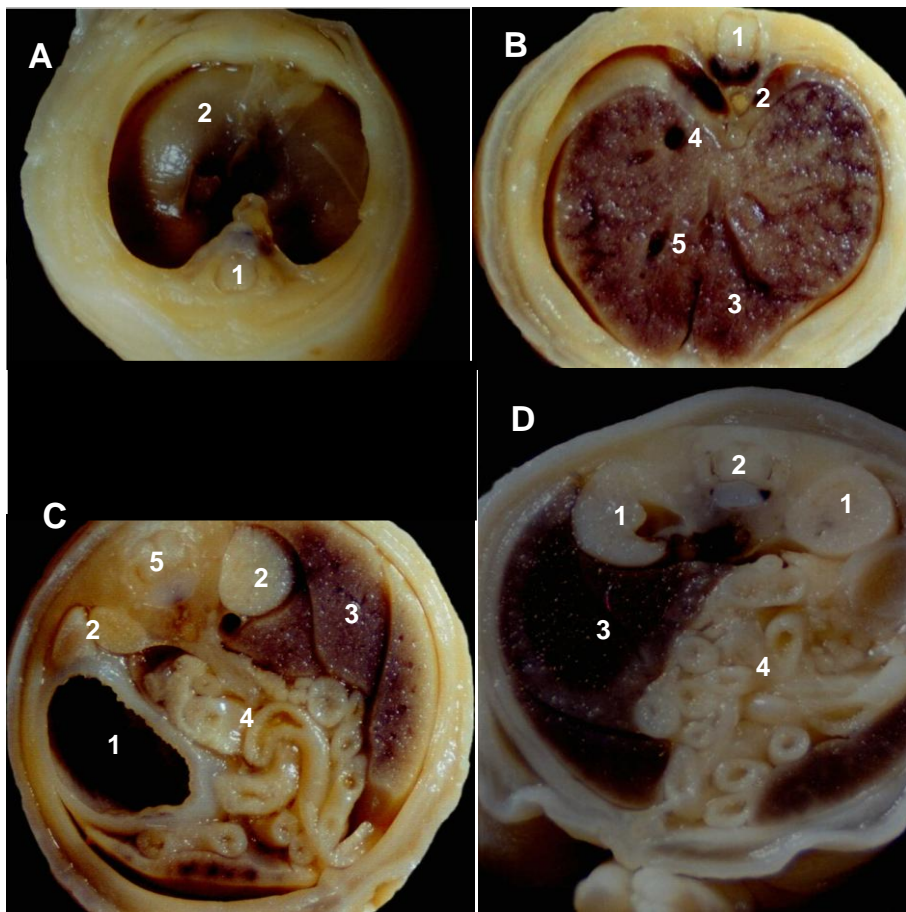


Foto 3 – Sequência de cortes para estudo visceral em feto normal. (A) Corte transversal na região do terço inferior do tórax: 1 – Medula, 2 – Diafragma; (B) Corte transversal na região do terço superior do tórax: 1 – Medula espinhal, 2 – Artéria Aorta, 3 – Fígado, 4 – Veia Cava Inferior, 5 – Veia hepática; (C) Corte transversal na região do terço médio abdominal: 1 – Estômago, 2 – Rins, 3 – Fígado, 4 – Alças intestinais, 5 – Medula espinhal; (D) Corte transversal na região do terço inferior abdominal: 1 – Rins, 2 – Medula espinhal, 3 – Fígado, 4 – Alças intestinais. Fonte: Oliveira, 2001.

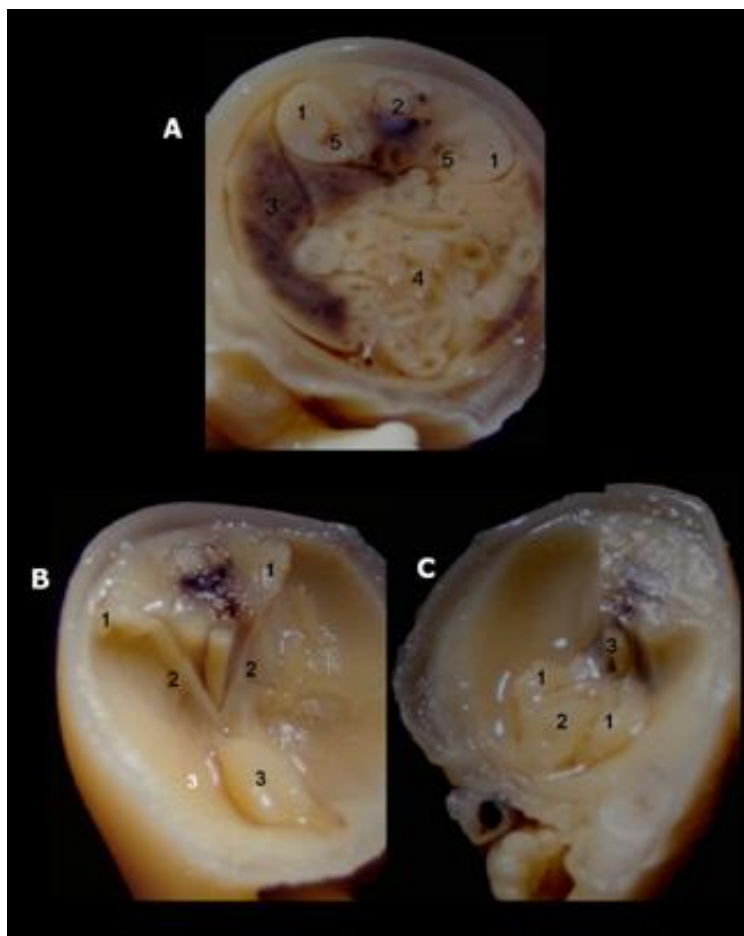


Foto 4 – Sequência de cortes para estudo visceral em feto normal. (A) Corte transversal na região pélvica: 1 – Rins, 2 – Medula espinhal, 3 – Fígado, 4 – Alças intestinais, 5 – Pelve renal; (B) Cortes transversal na região pélvica: 1 – Ovários, 2 – Cornos uterinos (útero bicórneo), 3 – Bexiga, 4 – Alças Intestinais; (C) Corte transversal na região pélvica: 1 – Testículos, 2 – Bexiga, 3 – Intestino grosso. Fonte: Oliveira, 2001.



Foto 5 – Corte transversal de rins, com aspecto normal: 1 – Papila renal, 2 – Pelve renal, 3 – Medula espinhal. Fonte: Oliveira, 2001.



Foto 6 – Corte transversal de rins. (A) Aspecto dismórfico: 1 – Hidronefrose; (B) Aspecto dismórfico: 1 – Hidronefrose e hipoplasia de papila renal; (C) Aspecto dismórfico: 1 – Hidronefrose, 2 – Hidronefrose e hipoplasia de papila renal. Fonte: Oliveira, 2001.

### **3.9.2 Diafanização e Análise Esquelética**

Para preparação dos fetos foi utilizado o procedimento proposto por Staples e Schnell (1964). Baseados neste método, os corpos dos fetos foram colocados em acetona e após 24 horas foram eviscerados. A acetona foi substituída por uma solução de KOH a 0,8% misturada a solução saturada de alizarina red. Esta mistura de soluções foi trocada quatro vezes com intervalo mínimo de 24 horas. Ao término das quatro trocas, a solução foi substituída pela solução clareadora. A partir daí, foram realizadas as análises baseadas na contagem dos pontos de ossificação proposta por Aliverti et al. (1979), a qual determina o grau de desenvolvimento fetal e no roteiro proposto por Taylor (1986) para observação de parâmetros como anomalias e/ou malformações nos osso cranianos (vista superior: nasal, frontal, parietal, inter-parietal e supra-occipital), esterno (manúbrio, centros esternais e processo xifóide), vértebras (cervicais, torácicas, lombares, sacrais e caudais), costelas, pelve, clavícula, membros anteriores (carpos, metacarpos e falanges) e posteriores (tarsos, metatarsos e falanges).

Visando facilitar o entendimento dos resultados da análise esquelética, foram inseridas algumas fotos dos ossos do crânio e do esterno (Foto 7 a 10) de fetos (DAMASCENO et al., 2008).

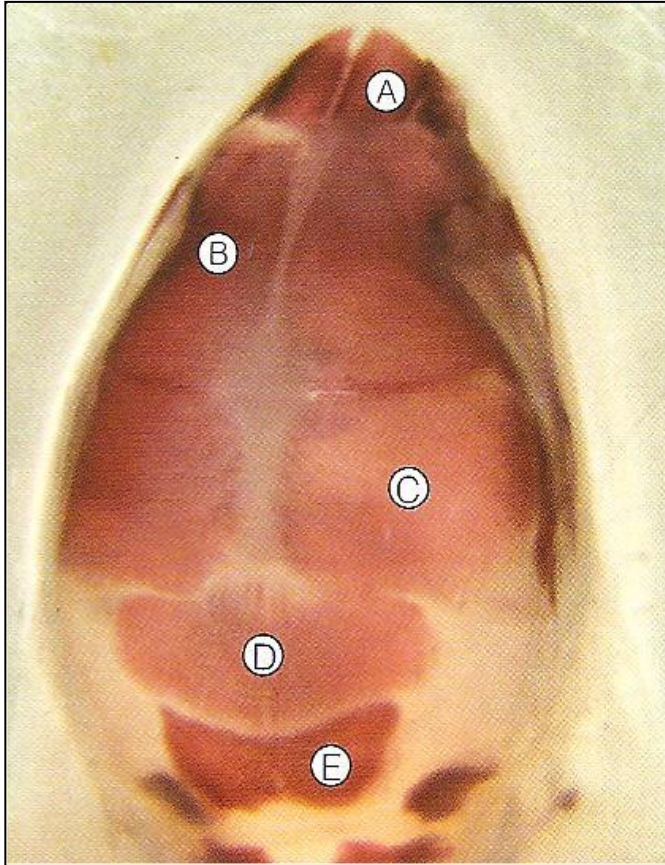


Foto 7 – Vista superior da ossificação craniana normal: (A) Nasal; (B) Frontal; (C) Parietal; (D) Interparietal; (E) Supraoccipital. Fonte: Damasceno et al., 2008.

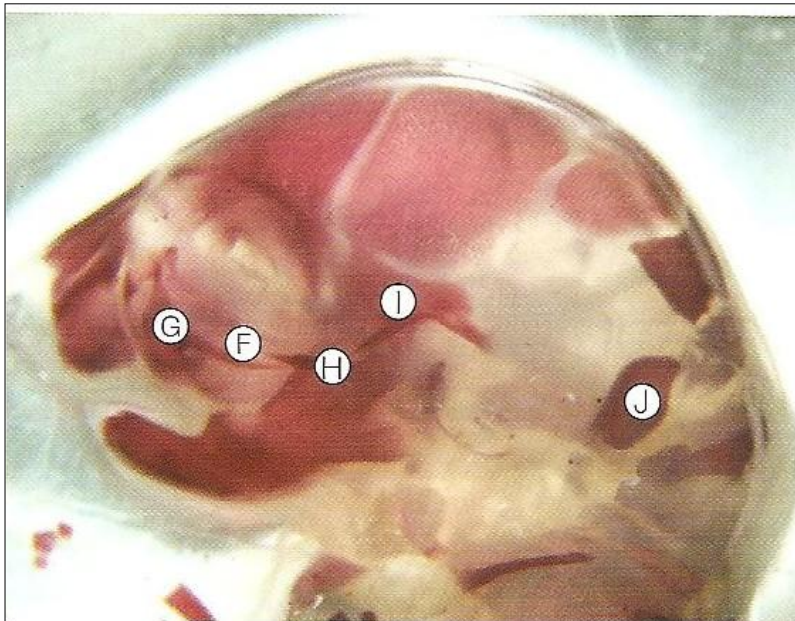


Foto 8 – Vista lateral da ossificação craniana normal: (F) Pré-maxilar; (G) Maxilar; (H) Zigomático; (I) Escamoso; (J) Exoccipital. Fonte: Damasceno et al., 2008.

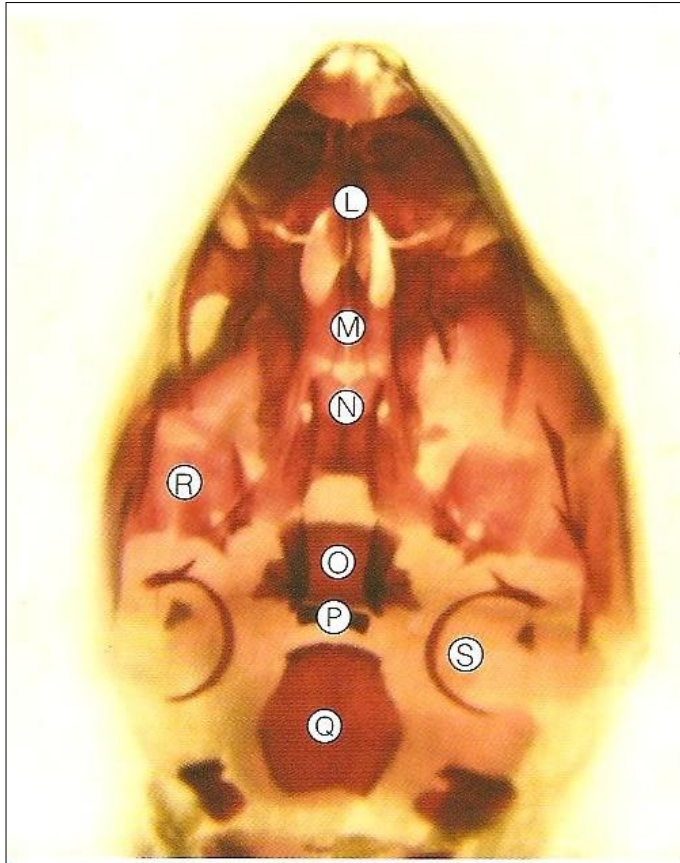


Foto 9 – Vista ventral da ossificação craniana normal: (L) Volmer; (M) Palato; (N) Présfenóide; (O) Basisfenóide; (P) Hamulo; (Q) Basoccipital, (R) Orbtosfenóide; (S) Tímpanico. Fonte: Damasceno et al., 2008.

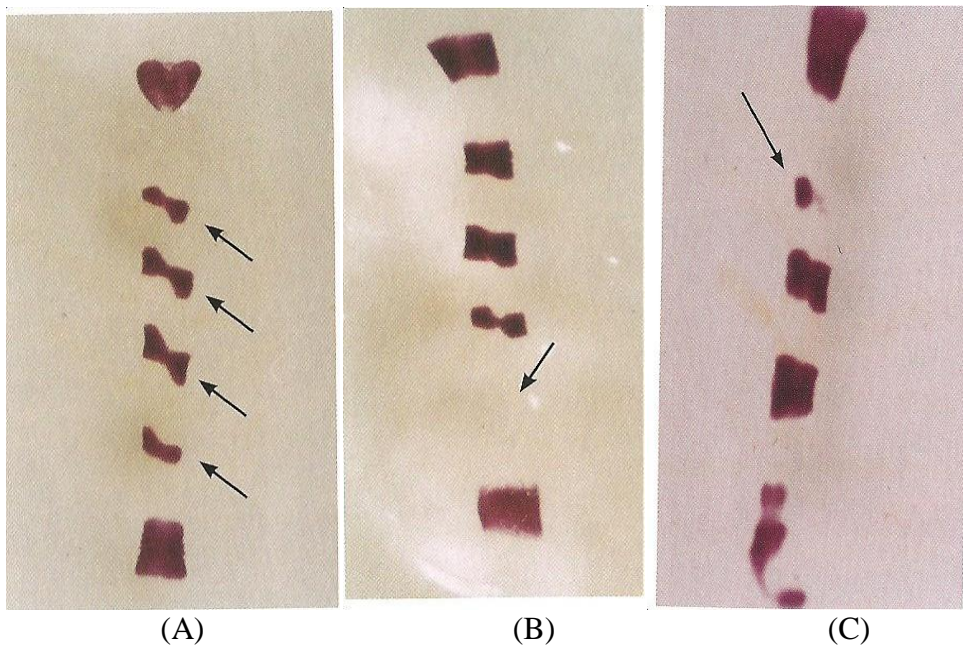


Foto 10 – Pontos de ossificação do esterno adulto anormal: (A) Esternébrio anormal; (B) Agenesia de esternébrio; (C) Esternébrio com ossificação incompleta. Fonte: Damasceno et al., 2008.

### 3.9.3 Fixação e Análise Histológica

Os corpos dos fetos e suas placentas foram fixados em formol 10% tamponado e Methacarn, respectivamente. Após fixação, foram selecionados, randomicamente, dois fetos e três placentas de cada ninhada. Cada placenta foi seccionada em duas partes iguais antes da inclusão em parafina. Os procedimentos histológicos de rotina foram efetuados e cortes histológicos com aproximadamente 5 $\mu$ m, transversais e longitudinais conforme o material, foram obtidos e corados pela técnica de H.E. (hematoxilina – eosina) para avaliação microscópica da morfologia. Foram analisados no microscópio de luz dois cortes de cada feto e placenta.

Os órgãos maternos (baço, fígado e rins) foram fixados em formol 10% tamponado e foram efetuados os mesmos procedimentos descritos, quanto à coloração do tecido, espessura e número de cortes analisados por rata prenhe.

Na leitura das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o fígado: bom estado de conservação, homogeneidade de aspecto, identificação de lóbulos hepáticos íntegros, espaço porta íntegro e veias hepáticas bem definidas; cordões sinusóides presentes, íntegros, confluindo para veia centro-lobular. Nos capilares sinusóides entendeu-se como normal a presença de algumas hemácias. Nas células hepáticas, consideraram-se normais aquelas com um ou mais núcleos íntegros, em geral centralizados, e nucléolos bem evidentes. No citoplasma, foi considerado padrão de normalidade encontrar áreas basófilas e eosinófilas.

Quando houve alteração da coloração padrão já bem estabelecida para as estruturas hepáticas, alteração na morfologia de núcleos, rompimento de limites de alguma organela citoplasmática e presença de congestão vascular, foram entendidos como sendo possível de ser provocado pela *M. ilicifolia* (espinheira-santa) em sua dose de aplicação.

Nos rins, a normalidade obedeceu aos quesitos: bem conservados, apresentando corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros; os glomérulos formados por capilares, podócitos, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas. Outros itens avaliados: cápsula de Bowman íntegra, presença de células cúbicas ou poliédricas, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleo arredondado. Na região medular, analisaram-se as alças de Henle junto aos capilares e túbulos coletores, estes com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico, quando dentro da normalidade.



Quanto ao baço, na leitura das lâminas, foram considerados os seguintes aspectos na avaliação: cápsula esplênica, estrutura tecidual (polpa branca e vermelha) e vascularização.

Todas as etapas relacionadas à confecção e análise do material histológico foram efetuadas no Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Morfofisiologia da UFMS.

### **3.10 Análise Estatística e Registro do Material Fotográfico**

Para a comparação dos resultados quantitativos foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos (ANOVA e Kruskal-Wallis – Programa GraphPad InStat), conforme a natureza de distribuição dos dados. Após a detecção de diferenças pela ANOVA e pelo Teste de Kruskal-Wallis foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey e Dunn, respectivamente. Os dados qualitativos e as freqüências obtidas tiveram a ninhada utilizada como unidade-base, conforme recomenda a literatura especializada (MANSON, ZENICK e COSTLOW, 1982; HANSEMAN e HOGAN, 1995). Em todos os casos, quando  $p < 0,05$ , a diferença foi considerada estatisticamente significativa.

As fotos foram obtidas por meio de uma câmara digital Nikon e, posteriormente, impressas em papel fotográfico.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Toxicidade Materna

Quando os grupos experimentais foram comparados por meio de sinais clínicos de toxicidade, não foram registradas mortes maternas, eriçamento de pêlos, alteração da deambulação (hipo ou hiperatividade locomotora) e diarreia.

O acompanhamento diário da evolução gestacional demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto ao peso corpóreo, ganho de peso e ganho de peso líquido. Portanto, não houve variações, todas as ratas ganharam peso entre o início da gestação, durante o tratamento e a eutanásia, indicando uma gestação normal, sem efeito dos tratamentos (Fig. 1 e 2).

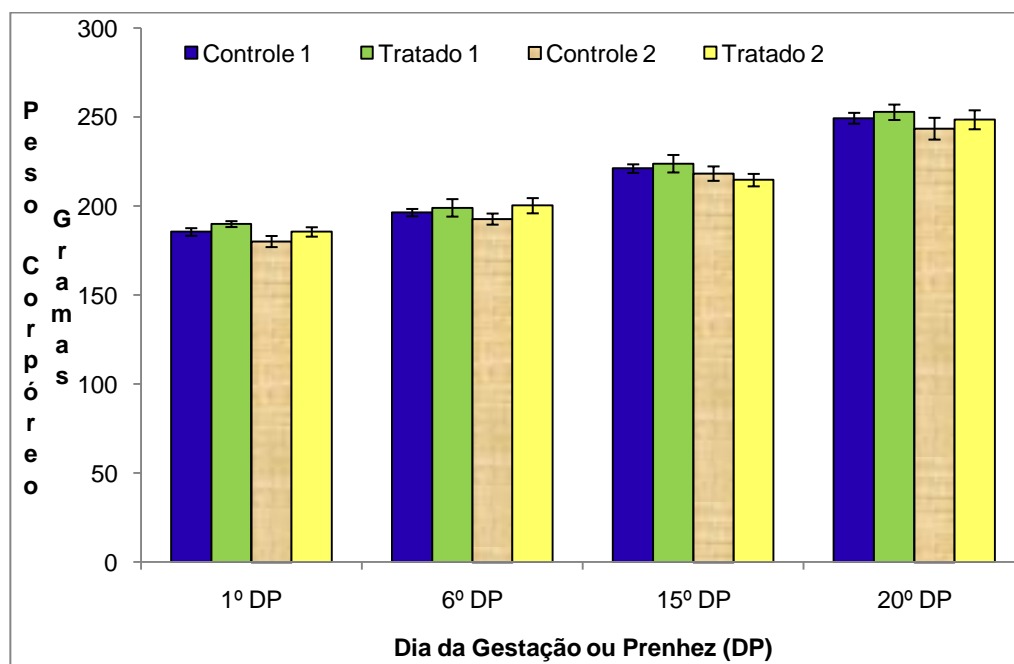


Figura 1 - Peso corpóreo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes no 1º, 6º, 15º e 20º dia(s) de prenhez (DP) nos grupos experimentais: controle 1 (C1) – receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009.

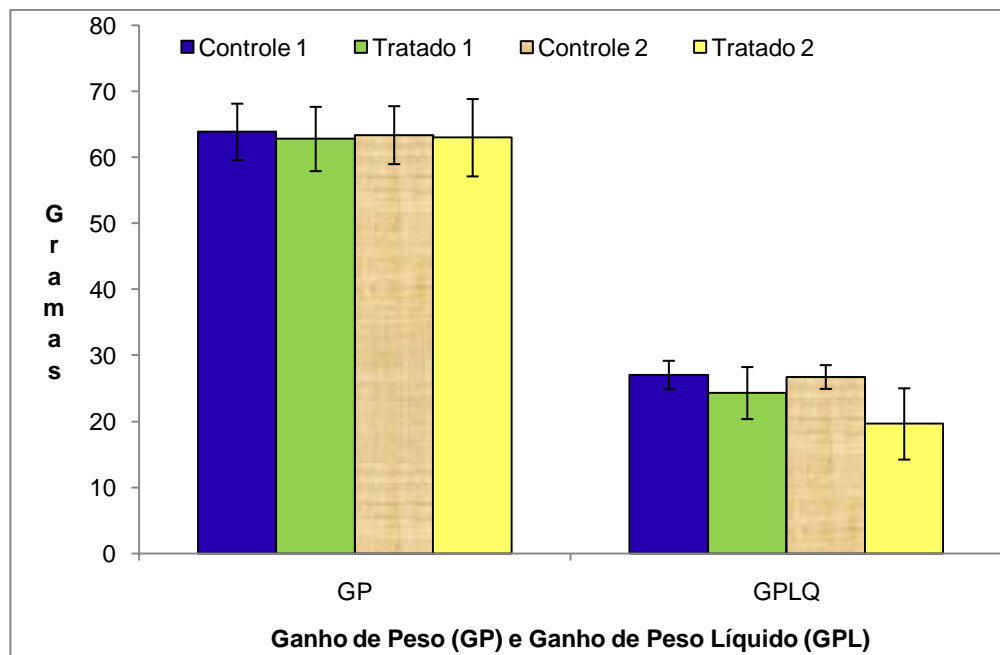


Figura 2 - Ganho de peso e ganho de peso líquido (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009.

Outro critério indicativo de toxicidade materna refere-se às alterações no consumo de alimento e água. A estimativa do consumo médio de água filtrada do 2º ao 6º DP (M2-6) e do 16º ao 20º DP (M16-20) foi similar entre os grupos experimentais. Não houve efeito dos tratamentos, quanto ao consumo de água, durante os cinco primeiros (M2-6) e os cinco últimos dias (M16-20) de administração dos tratamentos (Fig. 3). Considerando a estimativa do consumo médio de água do 7º ao 15º DP (M7-15) e do 2º ao 20º DP (M2-20), o grupo experimental T2 apresentou diferenças significativas com relação aos grupos C1 e C2, ou seja, durante nove dias após o intervalo M2-6 e também considerando todo o intervalo M2-20 (19 dias), a redução no consumo de água do grupo tratado durante o período de organogênese (T2) foi detectada quando comparada com qualquer um dos grupos controles (Fig. 3).

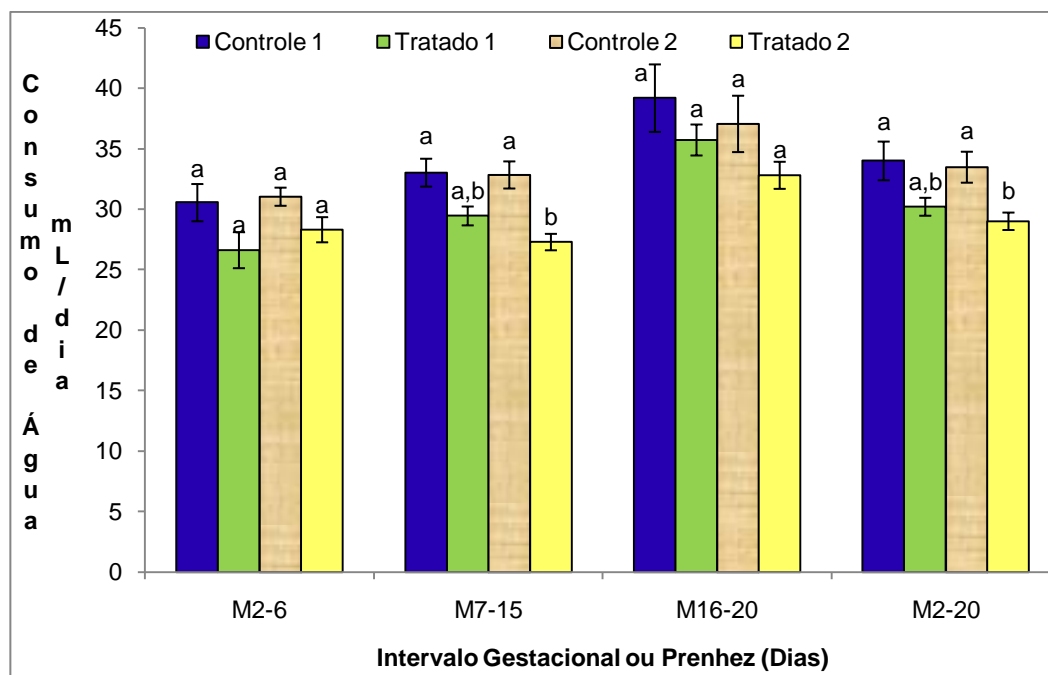


Figura 3 - Estimativa do consumo de água filtrada (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009.

Com relação à estimativa do consumo médio de ração comercial do 2º ao 6º DP (M2-6), os resultados foram similares entre os grupos experimentais. Não houve efeito dos tratamentos, quanto ao consumo de ração, durante os cinco primeiros dias de administração dos tratamentos (Fig. 4). Entretanto, considerando a estimativa do 7º ao 15º DP (M7-15), os grupos experimentais T1 e T2 diferiram significativamente do C1. Durante nove dias, após o intervalo M2-6, a redução no consumo de ração dos grupos tratados (T1 e T2) foi detectada quando comparada com o grupo controle que recebeu água durante todo período gestacional (Fig. 4).

Considerando a estimativa do 16º ao 20º DP (M16-20), o grupo experimental T2 apresentou diferenças significativas com todos os demais grupos. Durante os cinco últimos dias de administração dos tratamentos (M16-20), a redução no consumo de ração do grupo tratado durante o período de organogênese (T2) foi detectada quando comparada com todos os grupos experimentais (Fig. 4). Quanto à

estimativa do 2º ao 20º DP (M2-20), o grupo experimental T1 diferiu, significativamente, dos grupos C1 e C2. Durante todo o intervalo M2-20 (19 dias), a redução no consumo de ração do grupo tratado durante todo período gestacional (T1) foi detectada quando comparada com qualquer um dos grupos controles (Fig. 4).

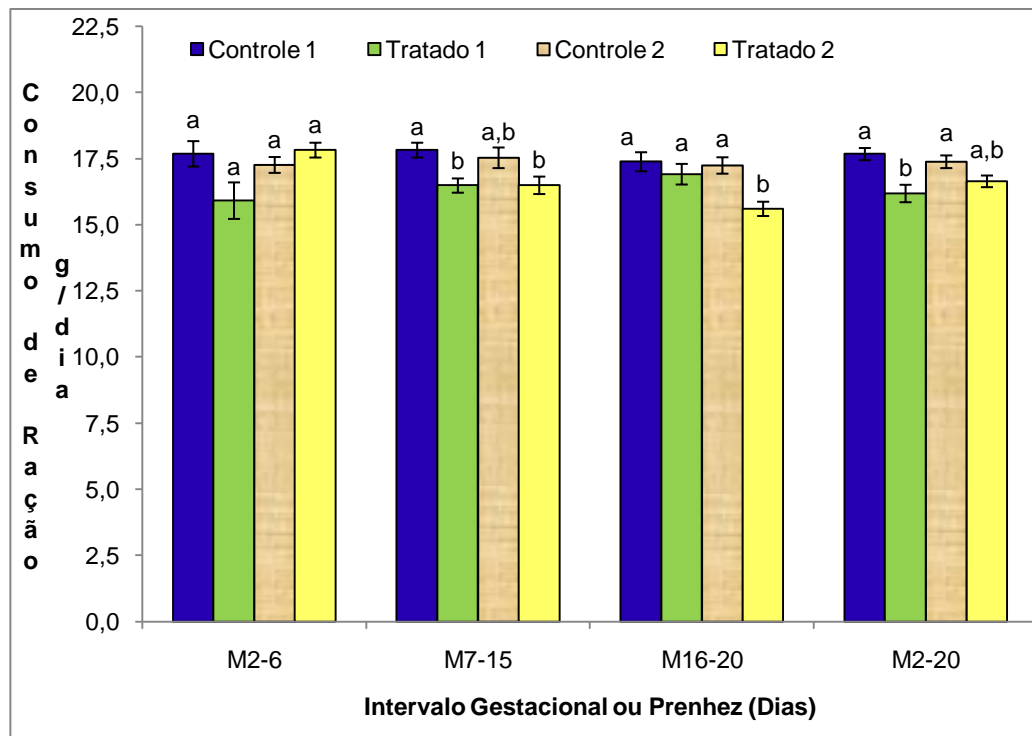


Figura 4 - Estimativa do consumo de ração comercial (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009.

Tomados em conjunto, os resultados parecem indicar presença de efeitos tóxicos de *M. ilicifolia* relativos ao consumo de água durante o período de organogênese e de ração tanto no período de organogênese quanto durante todo o período gestacional.

Encontram-se descritos na Tabela 1, os valores referentes ao peso absoluto e relativo dos órgãos maternos nos grupos experimentais.

Tabela 1. Peso (média  $\pm$  erro padrão da média) absoluto (PA) e relativo (PRel) dos órgãos maternos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
PA Baço (mg)	519,30 $\pm$ 9,44	514,90 $\pm$ 16,28	480,30 $\pm$ 23,21	459,50 $\pm$ 26,51
PRel	0,2085 $\pm$ 0,0047	0,2043 $\pm$ 0,0076	0,1984 $\pm$ 0,0110	0,1864 $\pm$ 0,0098
PA Fígado (g)	10,55 $\pm$ 0,32	11,67 $\pm$ 0,35	11,04 $\pm$ 0,51	10,43 $\pm$ 0,42
PRel	4,2321 $\pm$ 0,1276	4,6187 $\pm$ 0,1166	4,5237 $\pm$ 0,1471	4,2225 $\pm$ 0,1164
PA Ovários (mg)	165,10 $\pm$ 7,45	165,60 $\pm$ 10,71	165,90 $\pm$ 10,37	167,80 $\pm$ 5,74
PRel	0,0662 $\pm$ 0,0029	0,0653 $\pm$ 0,0036	0,0677 $\pm$ 0,0030	0,0684 $\pm$ 0,0028
PA Rins (mg)	1.526,80 $\pm$ 51,35	1.639,60 $\pm$ 49,72	1.550,10 $\pm$ 42,98	1.491,90 $\pm$ 52,58
PRel	0,6129 $\pm$ 0,0222	0,6479 $\pm$ 0,0139	0,6377 $\pm$ 0,0168	0,6044 $\pm$ 0,0118
PA Útero com fetos (g)	36,84 $\pm$ 3,88	38,49 $\pm$ 3,93	36,65 $\pm$ 4,25	46,46 $\pm$ 2,54
PRel	14,6250 $\pm$ 1,4320	15,1050 $\pm$ 1,4690	14,7727 $\pm$ 1,4750	18,8345 $\pm$ 0,9449
PA Útero sem fetos (g)	3,87 $\pm$ 0,28	3,90 $\pm$ 0,30	3,79 $\pm$ 0,25	4,21 $\pm$ 0,18
PRel	1,5452 $\pm$ 0,0955	1,5328 $\pm$ 0,1110	1,5473 $\pm$ 0,0871	1,7059 $\pm$ 0,0564

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados). Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ .

No modelo experimental e na dose utilizada, pode-se constatar que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tab. 1). Não houve efeito dos tratamentos para peso absoluto e relativo de baço, fígado, ovários, rins e útero materno com fetos e sem fetos.

A análise macroscópica externa dos órgãos maternos (baço, fígado e rins) não revelou nenhuma alteração morfológica perceptível (cor, tamanho, textura, hemorragias e cistos).

#### 4.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário

A Tabela 2 apresenta os valores relativos à fertilidade, desempenho reprodutivo das ratas e análise dos fetos nos grupos experimentais.

Tabela 2. Desempenho reprodutivo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas e análise dos fetos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
Nº de corpos lúteos no ovário direito <sup>1</sup>	5,10 $\pm$ 0,59	5,80 $\pm$ 0,36	5,30 $\pm$ 0,61	5,20 $\pm$ 0,44
Nº de corpos lúteos no ovário esquerdo <sup>1</sup>	5,60 $\pm$ 0,45	5,50 $\pm$ 0,37	5,10 $\pm$ 0,48	6,40 $\pm$ 0,37
<b>Nº de corpos lúteos nos ovários<sup>1</sup></b>	<b>10,70 <math>\pm</math> 0,67</b>	<b>11,30 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>10,71 <math>\pm</math> 0,37</b>	<b>11,60 <math>\pm</math> 0,45</b>
Nº de implantes no corno uterino direito <sup>1</sup>	4,80 $\pm$ 0,63	5,70 $\pm$ 0,42	5,40 $\pm$ 0,50	5,20 $\pm$ 0,44
Nº de implantes no corno uterino esquerdo <sup>1</sup>	5,70 $\pm$ 0,45	4,90 $\pm$ 0,66	4,50 $\pm$ 0,50	6,40 $\pm$ 0,37
<b>Nº de implantes nos cornos uterinos<sup>1</sup></b>	<b>10,50 <math>\pm</math> 0,65</b>	<b>10,60 <math>\pm</math> 0,93</b>	<b>9,90 <math>\pm</math> 0,75</b>	<b>11,60 <math>\pm</math> 0,45</b>
Nº de fetos vivos no corno uterino direito <sup>1</sup>	3,80 $\pm$ 0,66	5,00 $\pm$ 0,52	4,50 $\pm$ 0,52	4,70 $\pm$ 0,42
Nº de fetos vivos no corno uterino esquerdo <sup>1</sup>	4,40 $\pm$ 0,54	3,80 $\pm$ 0,57	3,20 $\pm$ 0,55	5,20 $\pm$ 0,36
<b>Nº de fetos vivos nos cornos uterinos<sup>1</sup></b>	<b>8,20 <math>\pm</math> 0,96</b>	<b>8,80 <math>\pm</math> 0,93</b>	<b>7,70 <math>\pm</math> 0,93</b>	<b>9,90 <math>\pm</math> 0,57</b>
Nº de reabsorções no corno uterino direito <sup>1</sup>	1,00 $\pm$ 0,37	0,70 $\pm$ 0,42	0,90 $\pm$ 0,43	0,50 $\pm$ 0,22
Nº de reabsorções no corno uterino esquerdo <sup>1</sup>	1,30 $\pm$ 0,62	1,10 $\pm$ 0,38	1,30 $\pm$ 0,50	1,00 $\pm$ 0,21
<b>Nº de reabsorções nos cornos uterinos<sup>1</sup></b>	<b>2,30 <math>\pm</math> 0,84</b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,74</b>	<b>2,20 <math>\pm</math> 0,89</b>	<b>1,50 <math>\pm</math> 0,22</b>
Peso Fetal <sup>1</sup> (g)	2,65 $\pm$ 0,13	2,54 $\pm$ 0,03	2,80 $\pm$ 0,24	2,79 $\pm$ 0,16
Adequação do peso a idade de prenhez		PAIP		PAIP
Comprimento Fetal <sup>1</sup> (cm)	3,55 $\pm$ 0,09	3,47 $\pm$ 0,03	3,58 $\pm$ 0,12	3,61 $\pm$ 0,08
Peso Placentário <sup>1</sup> (g)	0,49 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,01
Índice Placentário <sup>1</sup>	0,19 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01
Razão Sexual <sup>2</sup> (%)	103,97 $\pm$ 7,95	97,83 $\pm$ 8,68	106,33 $\pm$ 14,16	103,16 $\pm$ 6,90
Taxa de eficiência de implantação <sup>2</sup>	98,33 $\pm$ 1,67	93,00 $\pm$ 7,00	92,17 $\pm$ 5,92	100,00 $\pm$ 0,00
Taxa de perdas pré-implantação <sup>2</sup>	1,67 $\pm$ 1,67	7,00 $\pm$ 7,00	7,83 $\pm$ 5,92	0,00 $\pm$ 0,00
Taxa de perdas pós-implantação <sup>2</sup>	21,87 $\pm$ 8,49	15,20 $\pm$ 5,80	21,39 $\pm$ 7,48	12,92 $\pm$ 2,03
Taxa de reabsorção <sup>2</sup>	21,87 $\pm$ 8,49	15,20 $\pm$ 5,80	21,39 $\pm$ 7,48	12,92 $\pm$ 2,03
Taxa de viabilidade fetal <sup>2</sup>	78,13 $\pm$ 8,49	84,80 $\pm$ 5,80	78,61 $\pm$ 7,48	87,08 $\pm$ 2,03

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados); Recém nascido com peso adequado para a idade de prenhez (PAIP). Teste Estatístico: <sup>1</sup>ANOVA/Tukey, p>0,05; <sup>2</sup>Kruskall-Wallis, p>0,05.

De acordo com os resultados pode-se constatar que não houve diferenças significativas entre os grupos para número de corpos lúteos nos ovários e número de implantes, fetos vivos e reabsorções nos cornos uterinos (Tab. 2).

Do mesmo modo, verificou-se que os resultados para tamanho dos fetos, assim como seu peso corpóreo e de suas placentas, índice placentário e taxas (implantação, perdas pré e pós-implantação, reabsorção e viabilidade fetal) encontravam-se semelhantes entre os grupos (Tab. 2). Sendo assim, os tratamentos não alteraram as condições fisiológicas e intra-uterinas relacionadas com a reprodução e desenvolvimento fetal.

Em nenhum dos grupos estudados foi registrado fetos mortos e desvio da proporção esperada de 1:1 para razão sexual (Tab. 2). Portanto, os tratamentos não afetaram os processos de organogênese e diferenciação sexual dos fetos.

### **4.3 Desenvolvimento das Ninhadas**

#### **4.3.1 Análise Visceral**

Não foram observadas alterações macroscópicas externas nos fetos dos grupos controles e tratados, assim como no sistema urogenital dos mesmos (Foto 11).



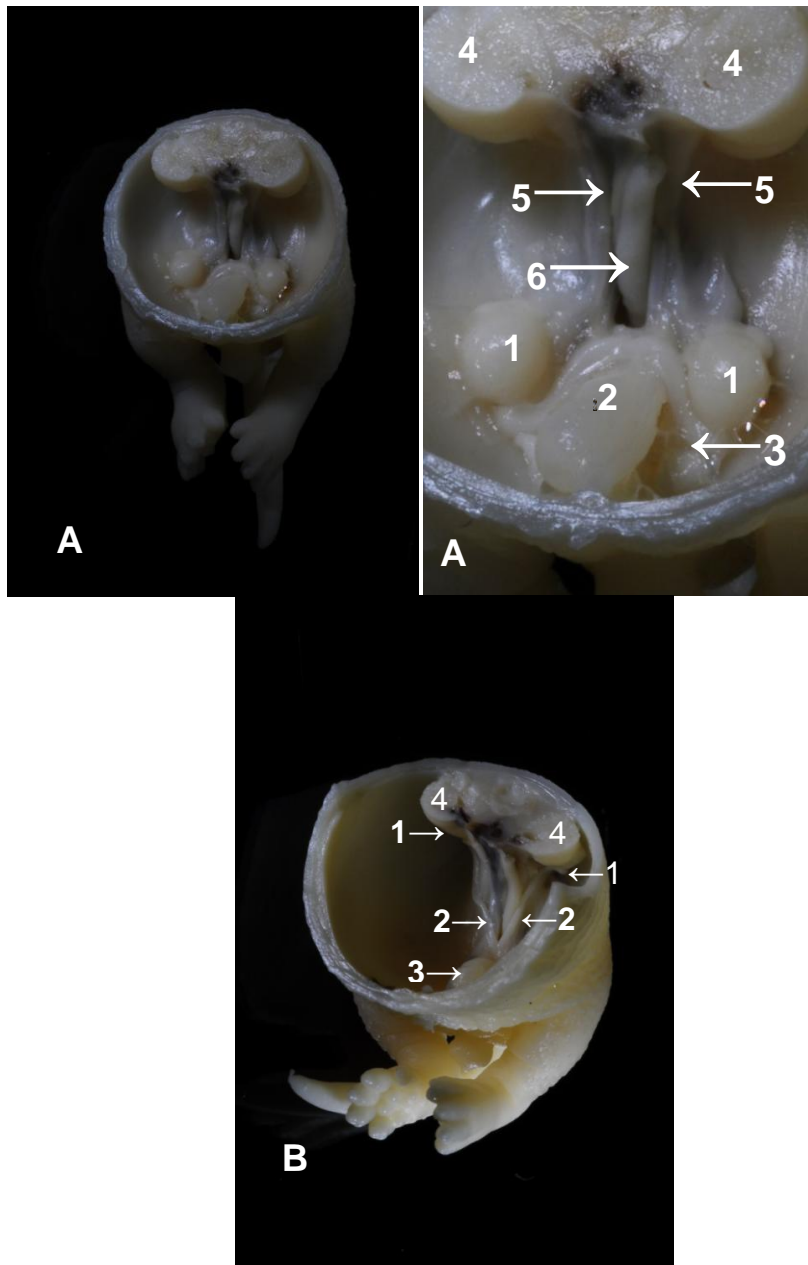


Foto 11 – Corte transversal na região pélvica normal em feto do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Aspecto Normal do Sistema Urogenital. (A) Maculino: 1 – Testículos, 2 – Bexiga, 3 – Alças Intestinais, 4 – Rins, 5 – Uretéres, 6 - Intestino grosso; (B): Feminino: 1 – Ovários, 2 – Cornos uterinos (útero bicórneo), 3 – Bexiga, 4 - Rins. Campo Grande (UFMS), 2009.

Foi constatado hidrocefalia em todos os grupos estudados (Foto 12). Apenas um caso de hidronefrose (Foto 13) e um de agenesia esofágica nos grupos C2 e T1, respectivamente, os quais foram considerados eventos isolados, uma vez que, estatisticamente, não houve diferenças significativas quando comparadas com os demais grupos experimentais (Tab. 3).

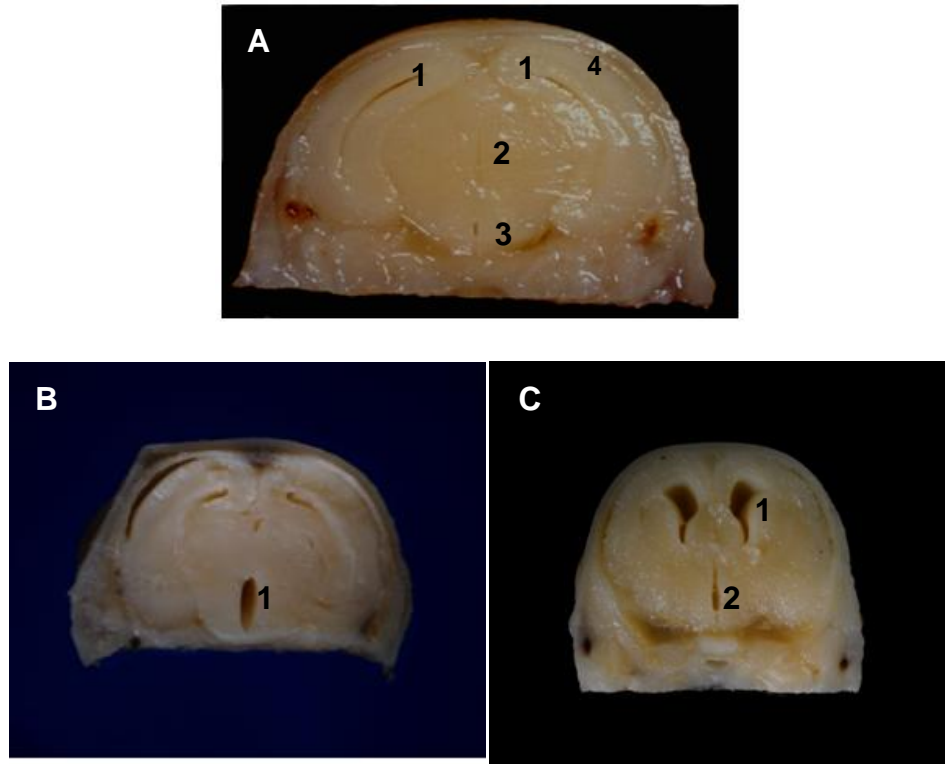


Foto 12 – Corte frontal na região do vértex em feto do grupo Controle 2 (C2) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> DP. (A) Aspecto Normal: 1 – Ventrículo Lateral, 2 – Terceiro Ventrículo, 3 – Quarto Ventrículo, 4 – Hemisfério cerebral; (B) Aspecto Alterado (Dismórfico): 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação do terceiro e quarto ventrículos; (C) 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação dos ventrículos laterais, 2 – terceiro e quarto ventrículos. Campo Grande (UFMS), 2009.



Foto 13 – Corte transversal de rim em feto do grupo Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Aspecto dismórfico do rim - Hidronefrose. Campo Grande (UFMS), 2009.

Tabela 3. Anomalias viscerais fetais (médias  $\pm$  erro padrão da média) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
Total de Fetos	28	31	25	34
Hidrocefalia	71,67 $\pm$ 11,13	87,50 $\pm$ 6,72	75,00 $\pm$ 10,32	82,50 $\pm$ 9,89
Hidronefrose	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 5,00	0,00 $\pm$ 0,00
Agensia Esofágica	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 5,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Total de Anomalias	71,67 $\pm$ 11,13	92,50 $\pm$ 5,34	80,00 $\pm$ 10,18	82,50 $\pm$ 9,89

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados). Teste Estatístico: Kruskal-Wallis/Dunn,  $p > 0,05$ .

### 4.3.2 Análise Esquelética

As variações observadas, em função da idade gestacional dos fetos, foram discriminadas por região anatômica e tipo (Foto 14 a 16).

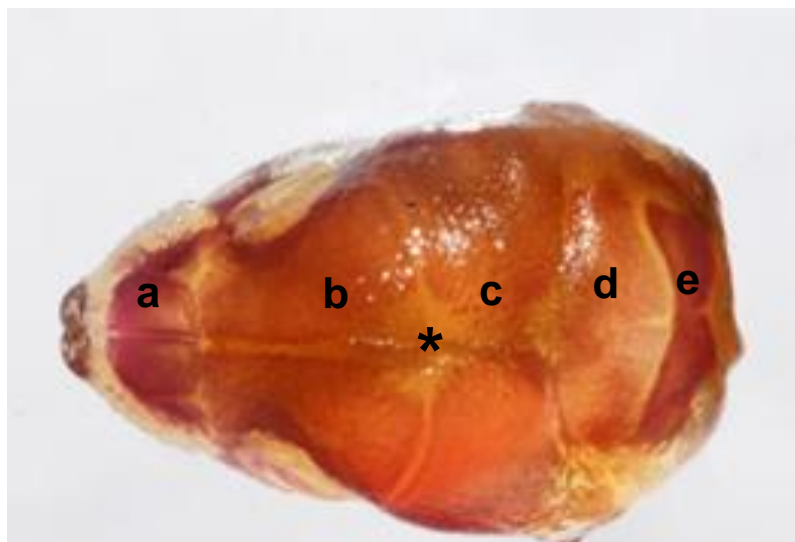


Foto 14 – Vista superior da ossificação craniana com fontanela normal (\*) em feto do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; (a) nasal; (b) frontal; (c) parietal; (d) interparietal; (e) supraoccipital. Campo Grande (UFMS), 2009.

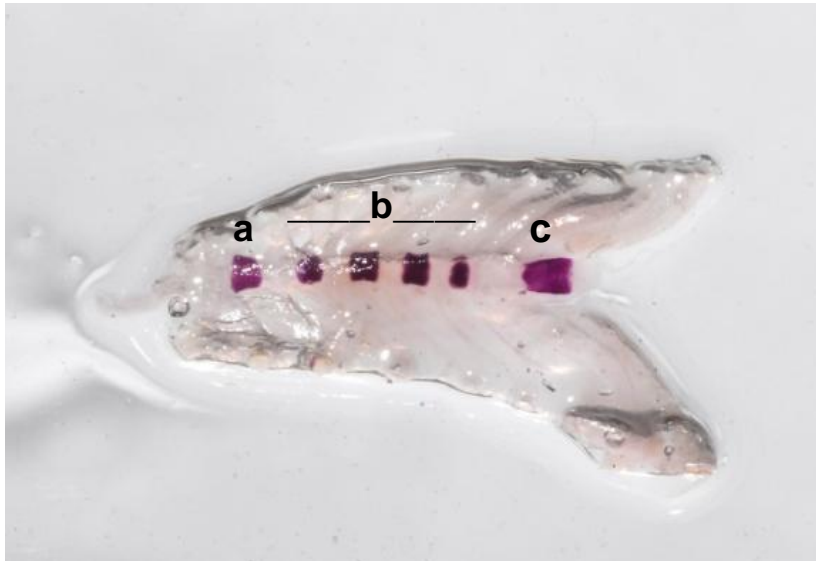


Foto 15 – Pontos de ossificação do esterno normal em feto do grupo Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (a) Manúbrio; (b) 4 Centros Esternais; (c) Processo Xifóide. Campo Grande (UFMS), 2009.



Foto 16 – Pontos de ossificação do esterno anormal em feto do grupo Controle (C2) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Ossificação Reduzida e Agenesia de Esternóbrios. Campo Grande (UFMS), 2009.

Constatou-se nos grupos tratados (T1 e T2) uma tendência de aumento na incidência das alterações esqueléticas, as quais foram consideradas variantes do normal, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e controles. (Tab. 4).

Tabela 4. Anomalias esqueléticas fetais (média  $\pm$  erro padrão da média) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
Total de Fetos	27	29	27	35
Taxa de Anomalia Esquelética	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	90,00 $\pm$ 10,00	90,00 $\pm$ 10,00
<b>Alterações do Crânio</b>	<b>26,67 <math>\pm</math> 12,96</b>	<b>53,33 <math>\pm</math> 26,39</b>	<b>22,50 <math>\pm</math> 7,03</b>	<b>34,17 <math>\pm</math> 13,29</b>
Alterações do Nasal	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Alterações do Frontal	5,00 $\pm$ 5,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Alterações do Parietal	7,50 $\pm$ 5,34	23,33 $\pm$ 13,19	9,17 $\pm$ 4,72	15,00 $\pm$ 7,64
Alterações do Interparietal	2,50 $\pm$ 2,50	20,00 $\pm$ 13,33	6,67 $\pm$ 4,44	10,83 $\pm$ 5,83
Alterações do Supraoccipital	11,67 $\pm$ 6,11	10,00 $\pm$ 10,00	6,67 $\pm$ 4,44	8,33 $\pm$ 4,31
<b>Alterações do Esterno</b>	<b>93,33 <math>\pm</math> 15,75</b>	<b>116,67 <math>\pm</math> 7,03</b>	<b>84,17 <math>\pm</math> 16,59</b>	<b>90,00 <math>\pm</math> 10,00</b>
Esternóbrios Ausentes	78,33 $\pm$ 10,56	94,17 $\pm$ 3,94	74,17 $\pm$ 12,94	77,50 $\pm$ 9,47
Esternóbrios Reduzidos	12,50 $\pm$ 7,16	16,67 $\pm$ 7,03	6,67 $\pm$ 4,44	7,50 $\pm$ 3,82
Esternóbrios Assimétricos	2,50 $\pm$ 2,50	5,83 $\pm$ 3,94	3,33 $\pm$ 3,33	5,00 $\pm$ 3,33

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados). Teste Estatístico: Kruskal-Wallis/Dunn,  $p > 0,05$ .

### 4.3.3 Análise Histológica

A análise microscópica dos baços maternos revelou que, o grupo das ratas tratadas durante todo período gestacional (T1), apresentou alterações histopatológicas, hemossiderose (deposição de hemossiderina) e congestão vascular (Fig. 5).

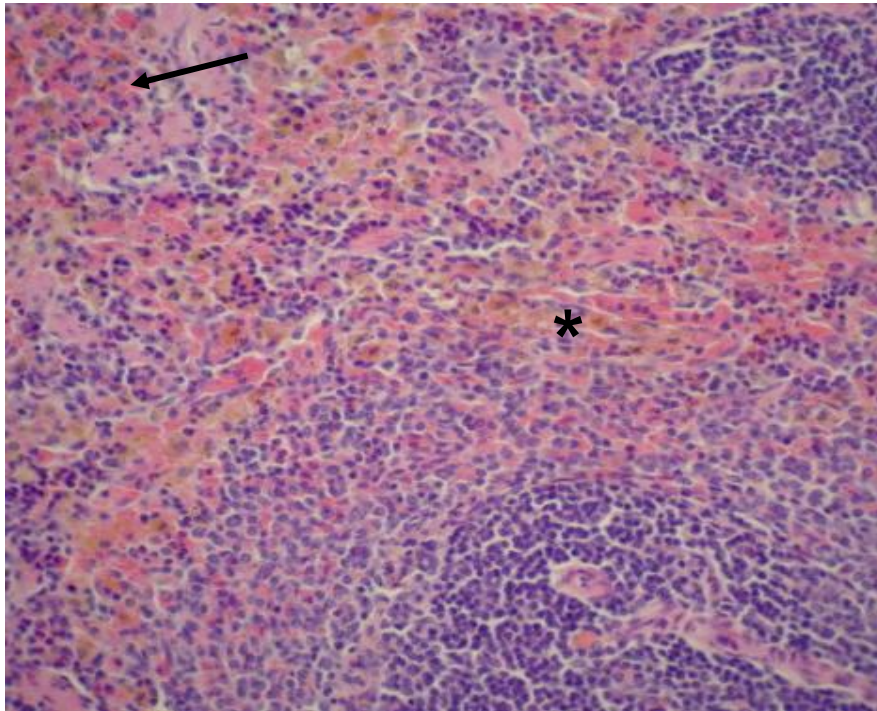


Figura 5 – Fotomicrografia de baço de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular (→) e deposição de hemossiderina (\* grânulos de cor marrom escura). HE, 400X.

Os fetos do grupo tratado durante o período de organogênese (T2), controle C1 (Fig. 6) e C2 não apresentaram nenhuma alteração morfológica no baço.

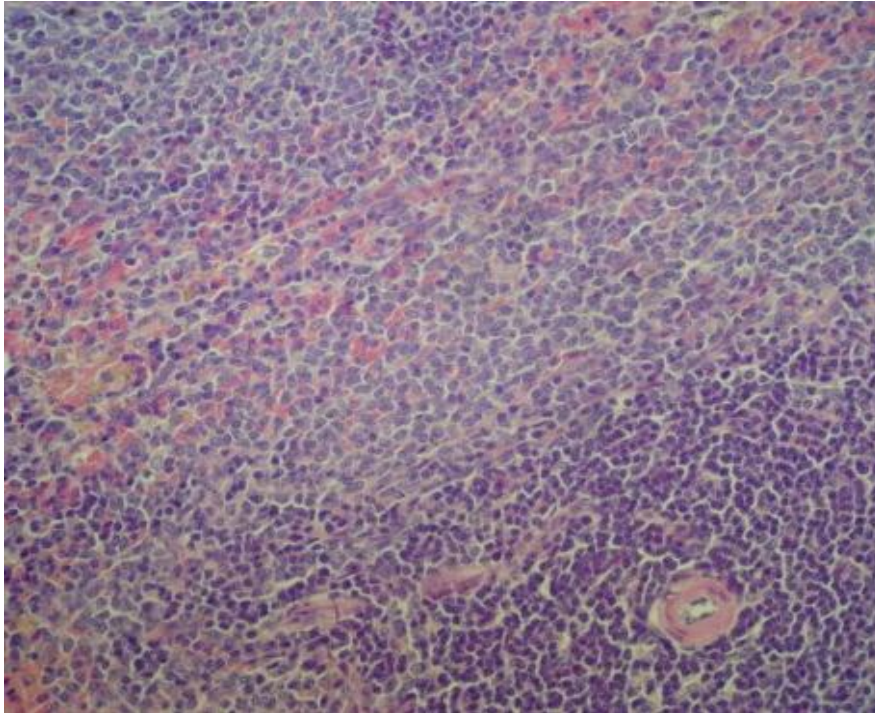


Figura 6 – Fotomicrografia de baço de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X.



Nenhuma alteração foi observada no fígado das ratas. Os parâmetros histológicos apresentaram-se dentro da normalidade nos grupos experimentais (Fig. 7).

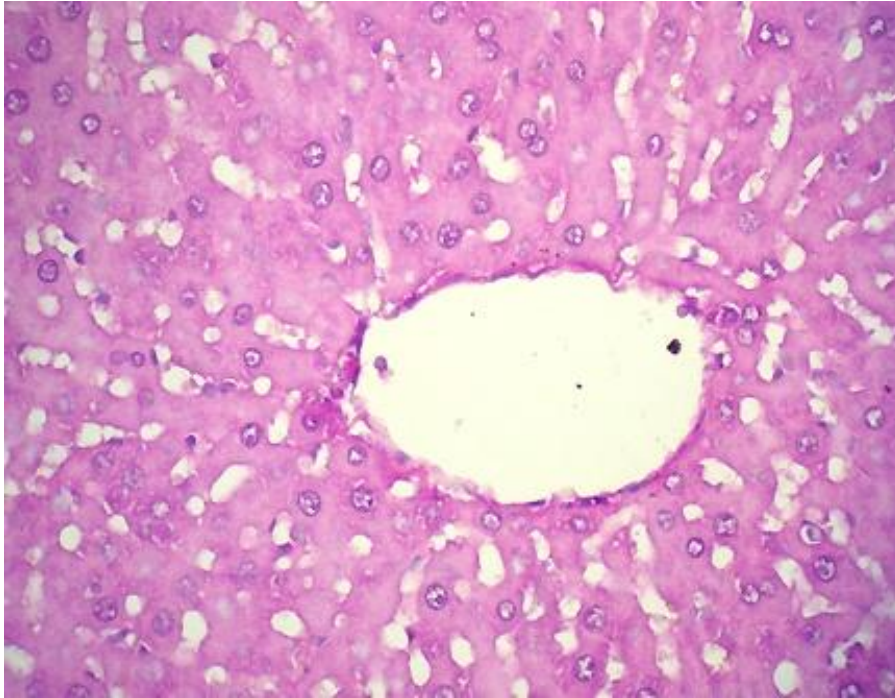


Figura 7 – Fotomicrografia de fígado de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X.

Com relação aos rins maternos, o grupo das ratas tratadas durante todo período gestacional (T1) apresentou alteração do tipo congestão vascular (Fig. 8).

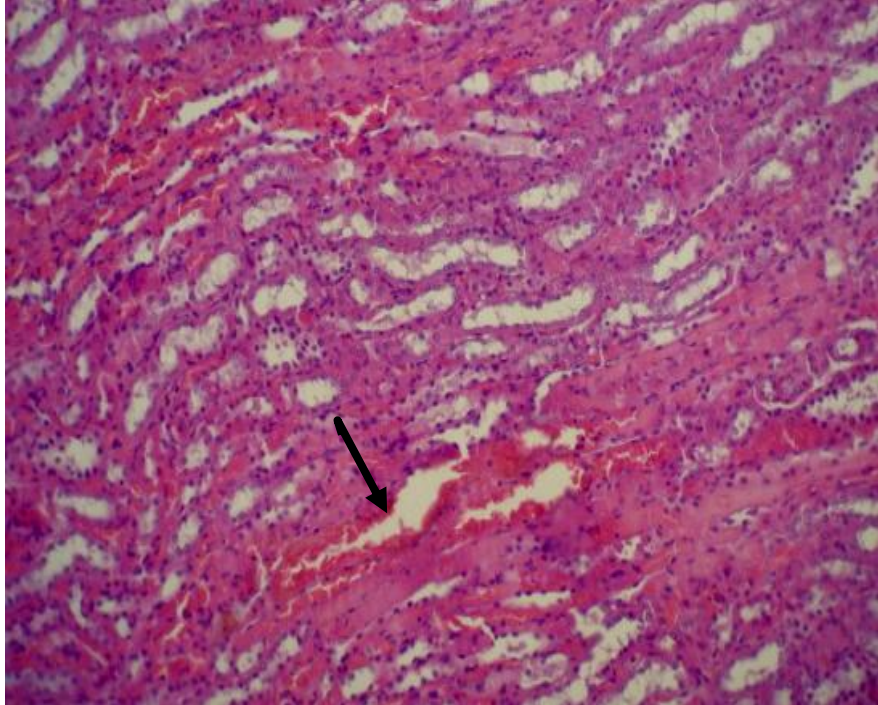


Figura 8 – Fotomicrografia de rim de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular (→). HE, 200X.

Os fetos do grupo tratado durante o período de organogênese (T2), controle C1 (Fig. 9) e C2 não apresentaram nenhuma alteração morfológica nos rins.

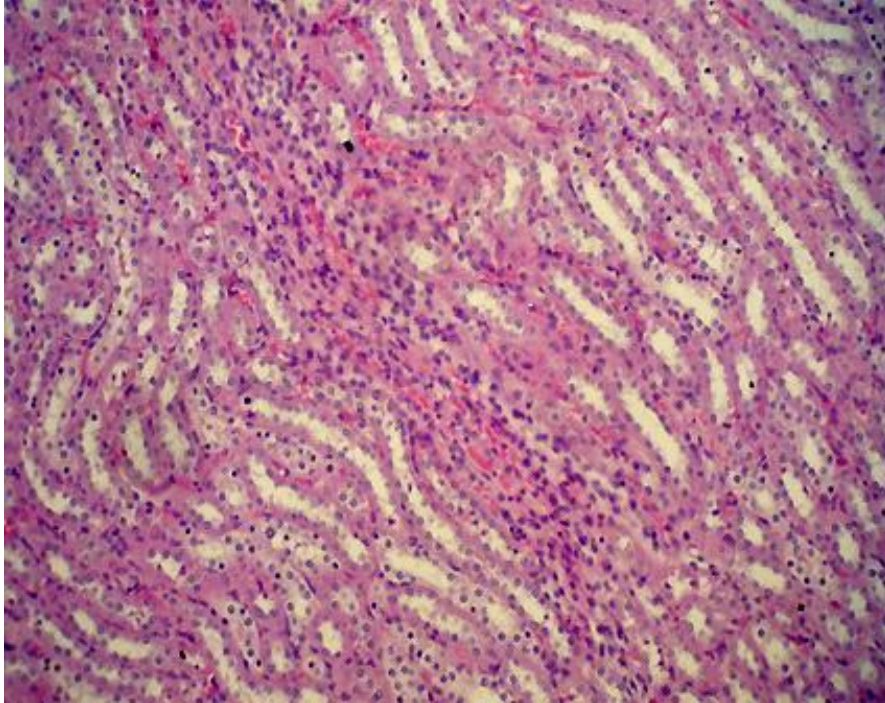


Figura 9 – Fotomicrografia de rim de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X.

Na avaliação dos cortes histológicos da secção transversal do abdômen dos fetos, foram observadas alterações do tipo congestão e hemorragia hepática (Fig. 10), além de hemoperitônio nos fetos do grupo das ratas tratadas durante todo período gestacional - T1 (Fig. 11).

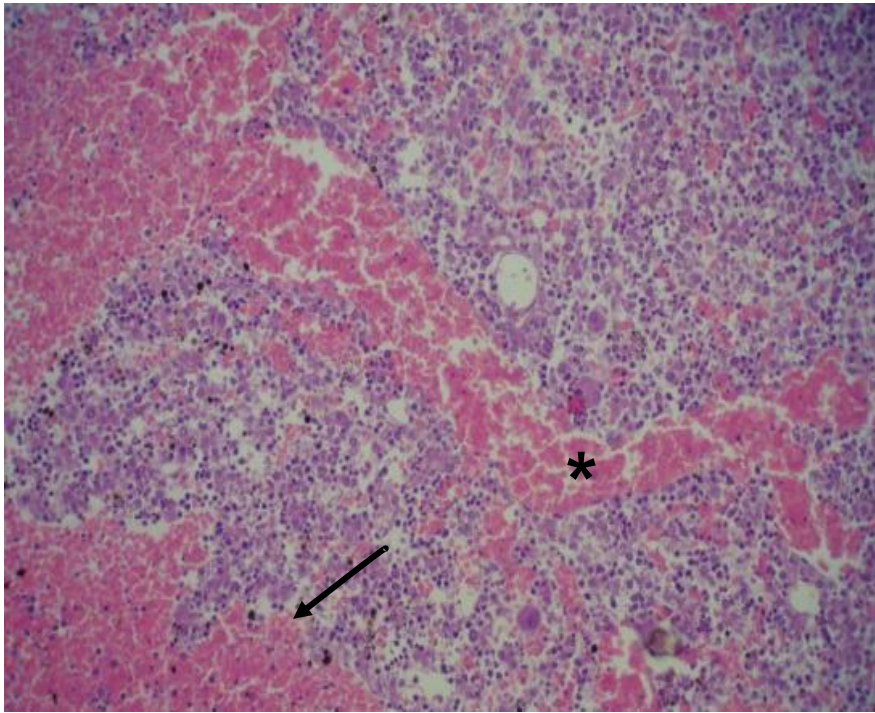


Figura 10 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular (\*) e hemorragia hepática (→). HE, 200X.

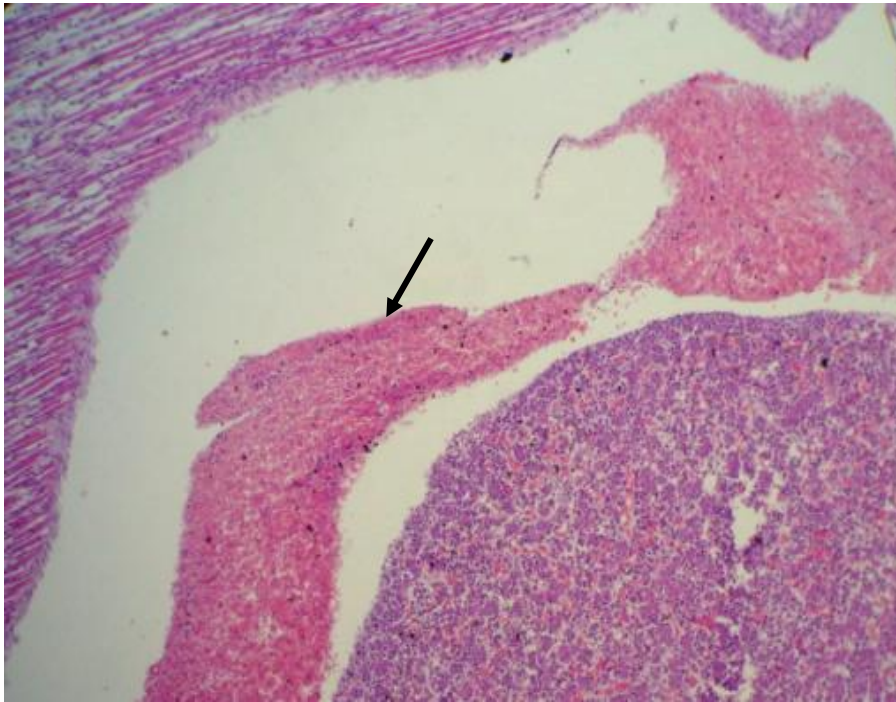


Figura 11– Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Hemoperitônio (→). HE, 100X.

Os fetos do grupo tratado durante o período de organogênese (T2), controle C1 (Fig. 12) e C2 (Fig. 13) não apresentaram nenhuma alteração morfológica hepática e no peritônio, respectivamente.

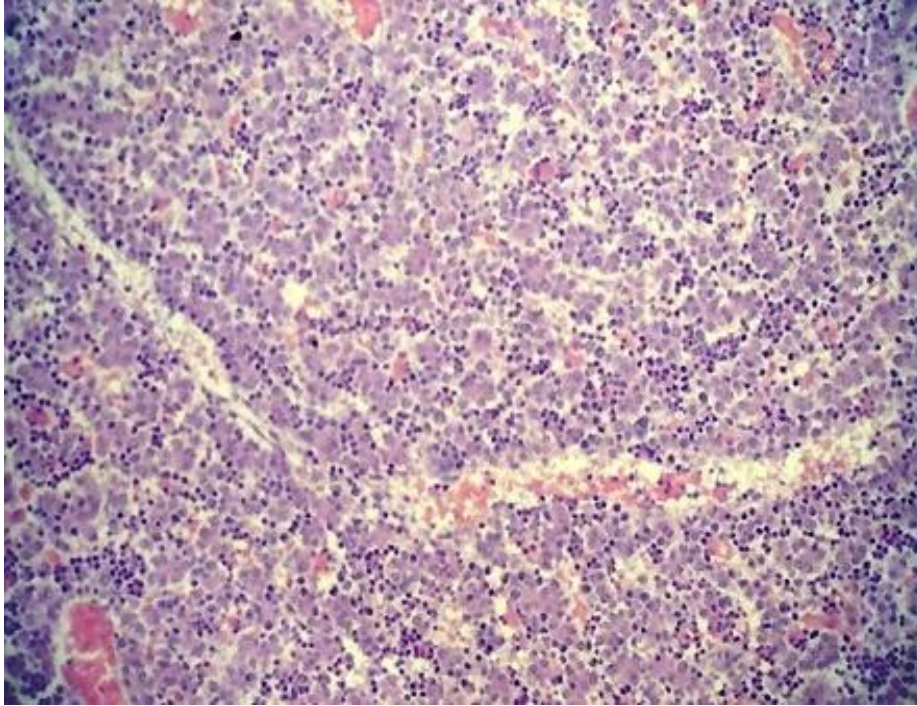


Figura 12 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração hepática. HE, 200X.

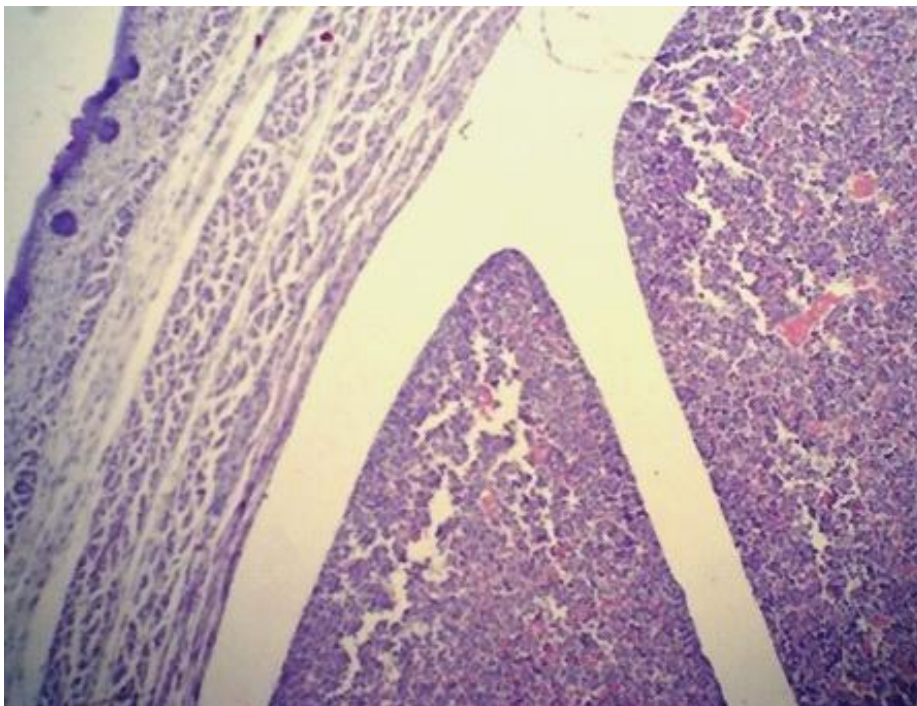


Figura 13 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração no peritônio. HE, 200X.

Os vasos da derme também se apresentaram congestionados nos fetos das ratas tratadas durante todo período gestacional - T1 (Fig. 14).

Os fetos do grupo tratado durante o período de organogênese (T2), controle C1 (Fig. 15) e C2, não apresentaram nenhuma alteração na derme.

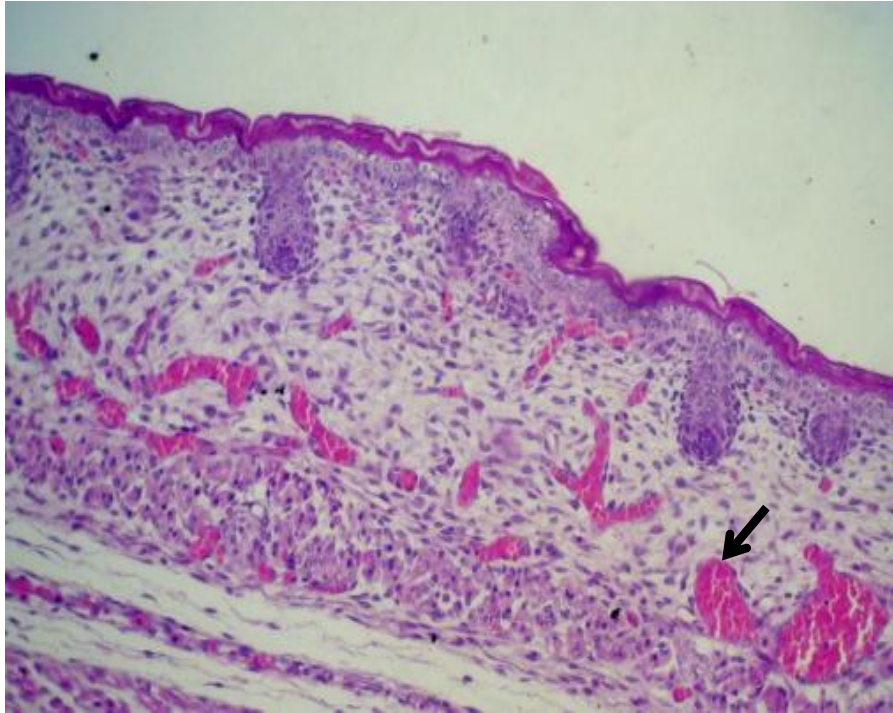


Figura 14 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Maytenus ilicifolia* (15,1 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Vasos da derme congestionados (→). HE, 200X.

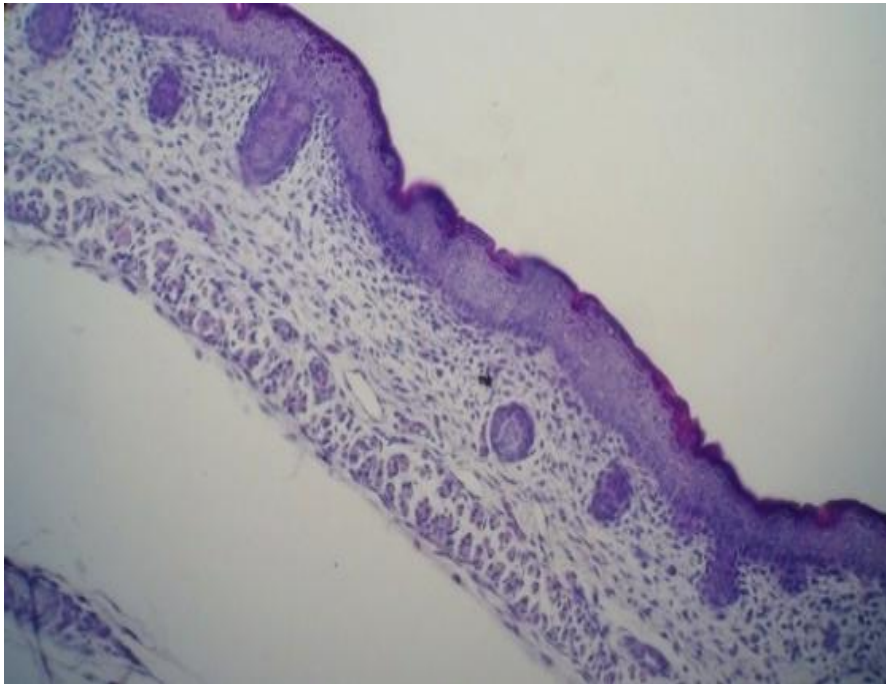


Figura 15 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração na derme. HE, 200X.

Com relação às placentas, nenhuma alteração foi observada nos grupos. As regiões, decídua basal, zona juncional e zona labiríntica não apresentaram diferenças morfológicas entre os grupos estudados (Fig. 16 a 21).



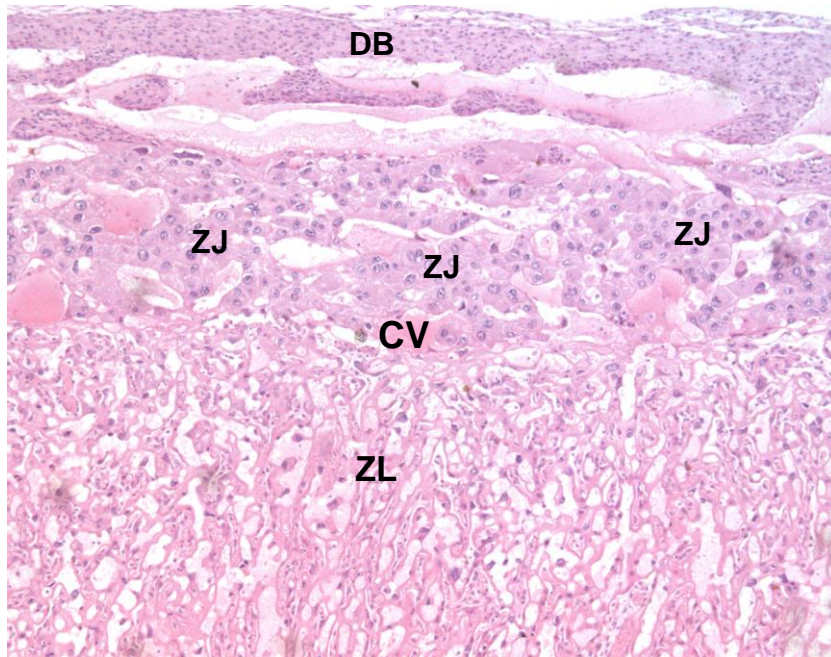


Figura 16 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> DP. Observe que o cório viloso (CV) e as áreas, decídua basal (DB), zona juncional (ZJ) e zona labiríntica (ZL), estão bem organizadas. Sem alteração na placenta. HE, 100X.

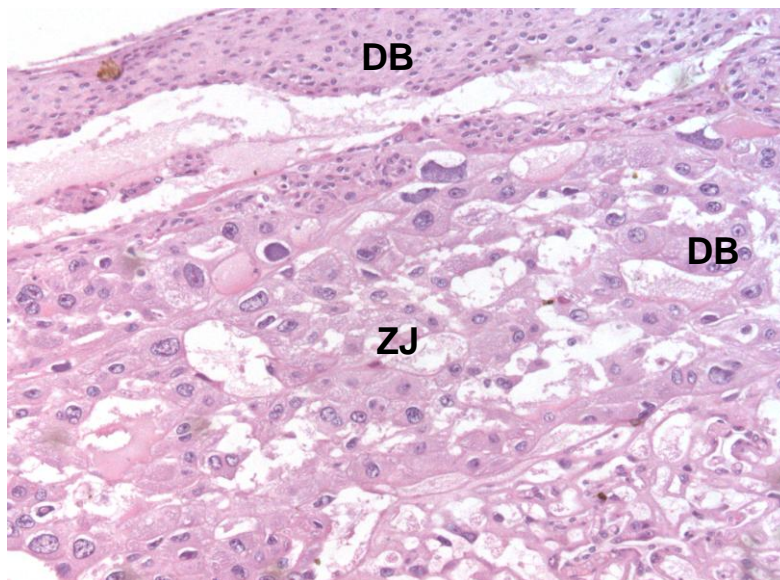


Figura 17 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> DP. Maior aumento das áreas de decídua basal (DB) e zona juncional (ZJ). Sem alteração na placenta. HE, 200X.

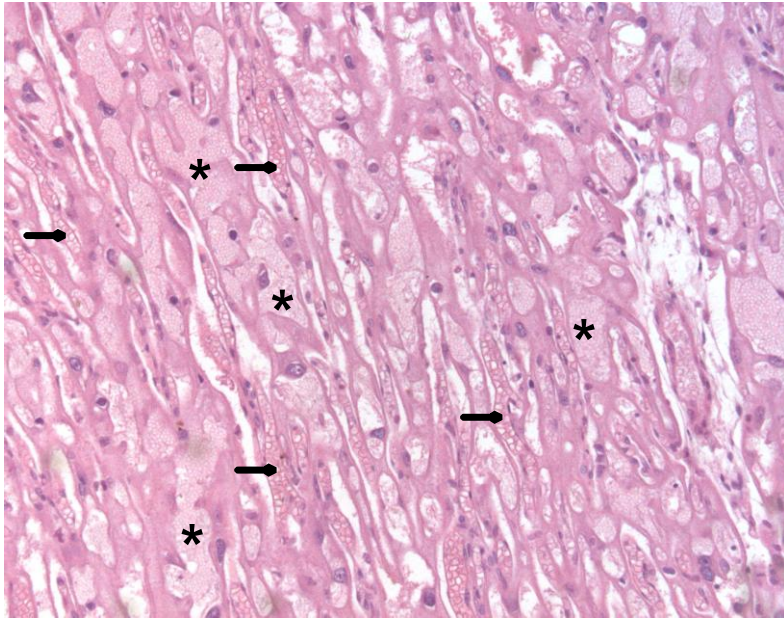


Figura 18 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Maior aumento da zona labiríntica. Os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas estão bem definidos (\*). HE, 200X.

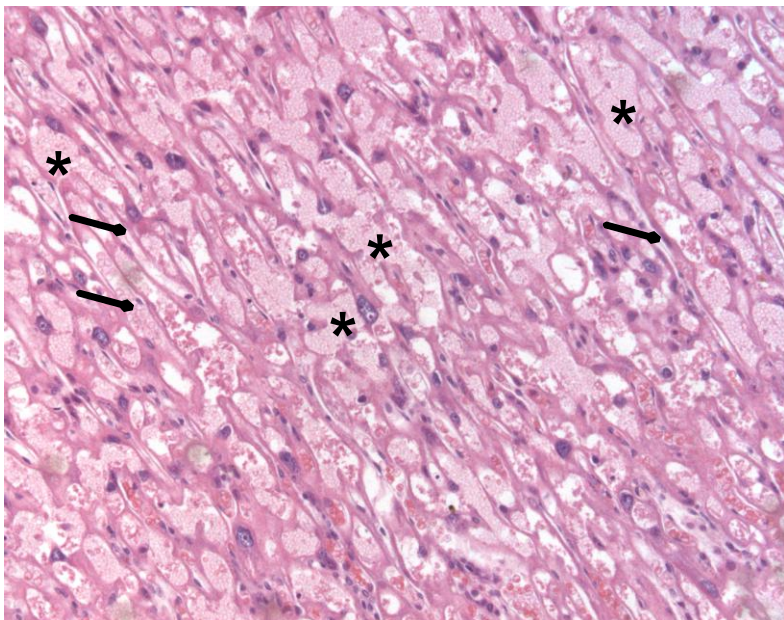


Figura 19 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Observe a zona labiríntica com os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas (\*) bem definidos. HE, 200X.

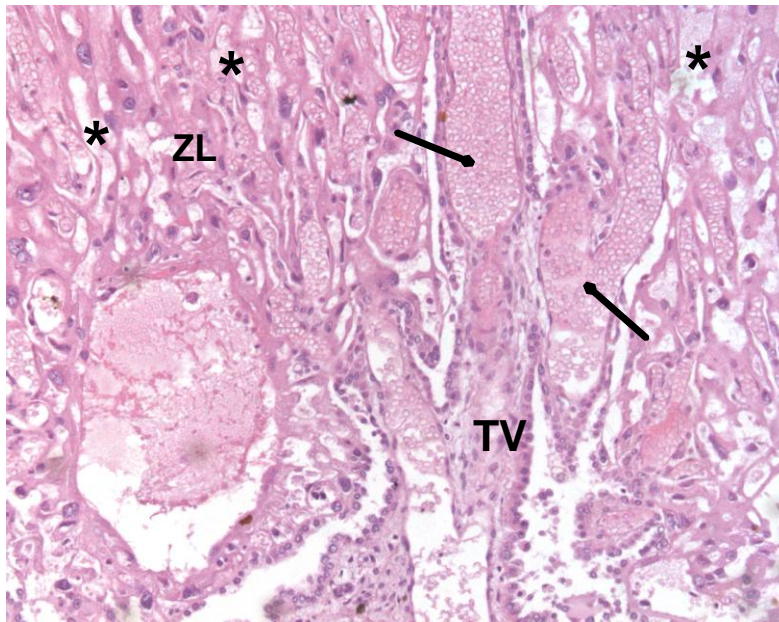


Figura 20 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Maior aumento da zona labiríntica (ZL) próxima a placa coriônica. Observe o tronco viloso (TV) ramificado entre os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas (\*). HE, 200X.

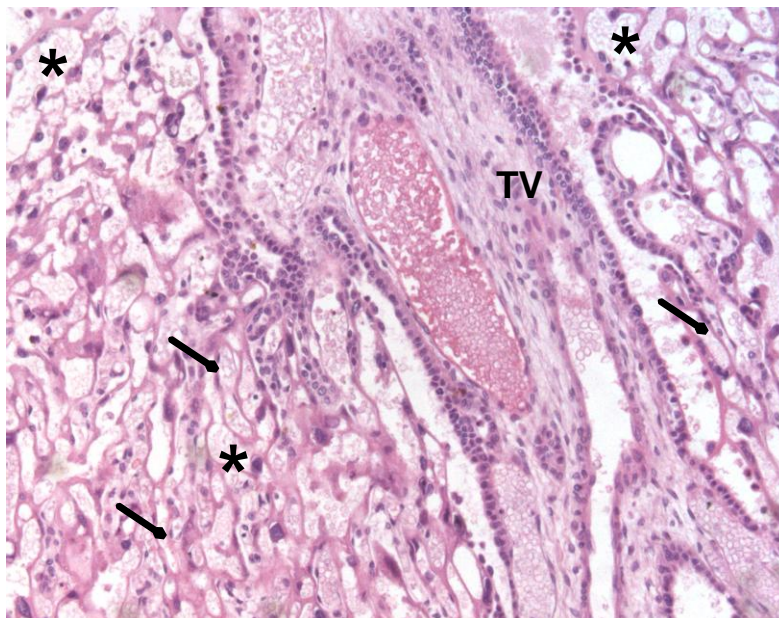


Figura 21 – Fotomicrografia da placenta de ratas do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Observe o tronco viloso (TV) ramificado entre os vasos fetais (→) e as lacunas vasculares maternas (\*). HE, 200X.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Toxicidade Materna

Considerando que não ocorreram mortes maternas, alteração na atividade locomotora, nem ocorrência de piloereção, diarreia, perdas sangüíneas vaginais e que em nenhum dos grupos pareceu existir indicação de desconforto ou estresse, pode-se inferir que a administração do extrato de *M. ilicifolia* às ratas prenhes não causou toxicidade, observável por critérios clínicos.

A gravidez é caracterizada por aumento progressivo do peso materno, decorrente do crescimento do feto e de seus anexos (em torno de 40%) e de adaptações próprias do organismo (os 60% restantes), caracterizadas por anabolismo no início e catabolismo no final da gestação (RUDGE, BORGES e CALDERON, 2000).

Neste trabalho, durante a evolução da gestação, foi verificado um aumento do peso das ratas muito semelhante entre os diferentes tratamentos. Provavelmente, este fato estava relacionado com o crescimento dos fetos e de seus anexos, indicando uma gestação normal, sem efeitos nocivos à saúde materna e fetal.

Alterações no consumo médio de água e ração constituem sinais clínicos que indicam toxicidade de um fármaco (MANSON e KANG, 1994).

Apesar dos resultados encontrados sugerirem indícios de toxicidade do extrato no período de organogênese (redução no consumo de água e ração) e durante todo período de prenhez das ratas (redução no consumo de ração), os efeitos parecem ter sido transitórios, uma vez que não foram constatadas diferenças quanto ao peso corpóreo (1<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> DP), ganho de peso e ganho de peso líquido entre os grupos estudados.

Segundo Maciel, Pinto e Veiga (2002), as plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes, contribuindo para a mesma atividade.

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação e estudos farmacocinéticos pré-clínicos constituem grandes desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (GEBHARDT, 2000).

A análise do peso corpóreo visa avaliar possíveis efeitos tóxicos no organismo como um todo. Já o peso de órgãos e sua observação macroscópica são utilizados para avaliar efeitos tóxicos específicos em algum sistema ou órgão específico (MANSON e KANG, 1994).

Neste trabalho, os resultados encontrados para peso absoluto e relativo dos órgãos maternos (baço, fígado, ovários, rins e útero com fetos e sem fetos) foram similares entre os grupos experimentais. Por meio do parâmetro peso relativo qualquer erro de conclusão quanto ao ganho ou perda de peso em relação a tratamento poderia ser corrigido. Desta forma, garantiu-se que os animais maiores ou menores não apresentariam as médias maiores ou menores, respectivamente.

A análise macroscópica dos órgãos maternos (baço, fígado e rins) não revelou nenhuma alteração morfológica perceptível referente à cor, ao tamanho, à textura (consistência) e à presença de cistos.

## **5.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário**

Quando se analisa os efeitos tóxicos de alguma substância sobre um embrião em fase de desenvolvimento é importante verificar se as condições fisiológicas, relacionadas com a reprodução, encontram-se uniformes entre os grupos experimentais.

Khera (1987) definiu toxicidade materna como alterações transitórias ou permanentes na fisiologia materna (alteração na homeostasia, dos níveis hormonais das membranas fetais ou mesmo alterações comportamentais) com potencial para causar efeitos adversos nas proles durante o desenvolvimento embrio-fetal ou pós-natal. O mesmo autor, em 1985, já tinha correlacionado malformações fetais que ocorrem com baixa frequência (exencefalia, encefalocele, micro ou anoftalmia e outras) à redução do peso materno.

Embora essa relação tenha sido contestada por Chahoud et al. (1999), não existem dúvidas de que a toxicidade materna pode influir no desenvolvimento adequado do embrião.

O peso do ovário depende bastante do número e do volume dos corpos lúteos, visto serem eles as maiores estruturas no órgão (WAYNFORTH, 1971). Os corpos lúteos são a fonte principal de secreção de progesterona (KATO, MORISHIGE e ROTHCHILD, 1979); eles aumentam de volume durante a gestação, tendo sido demonstrado que seu crescimento está intimamente correlacionado com

o aumento de secreção de progesterona e 20-hidroxi-progesterona (UCHIDA et al., 1970), hormônios indispensáveis à manutenção da prenhez em rata.

Durante o início da prenhez, a secreção de estrogênios ovarianos é responsável tanto por estimular a proliferação de células epiteliais do endométrio como para tornar o estroma uterino receptivo para a implantação (PARIA et al., 2000; SMITH, 2001).

Em ratas, diferente do que acontece em humanos, os corpos lúteos mantêm-se ativos durante todo o período gestacional (KELLER, 2006).

Como o peso dos ovários não diferiu entre os grupos experimentais, é possível inferir que as ratas tiveram produção hormonal semelhante. Portanto, o ambiente hormonal materno não diferiu entre os tratamentos.

Uma das medidas que pode ser utilizada em estudos biológicos é a correlação entre o número de corpos lúteos e o de implantes, uma vez que a cada corpo lúteo, teoricamente, corresponderia um implante (INMAN e MARKIVIEE, 1963; KATO, MORISHIGE e ROTCHILD, 1979). Quanto maior a proporção entre o número de corpos lúteos e o de implantes, maior será o número de ovulações que resultam em oócitos fertilizados e blastocistos implantados.

A implantação é o processo pelo qual o embrião realiza o contato físico e fisiológico íntimo com o endométrio materno para o estabelecimento da gestação. Apesar de haver variação neste processo entre espécies, certos eventos básicos são similares. A característica fundamental deste processo é o desenvolvimento sincronizado do embrião para o estágio de blastocisto e a diferenciação do útero para o estado receptivo. Em seguida, ocorrem interações entre o blastocisto ativado e o epitélio uterino para iniciar a implantação (PARIA et al., 2000).

O fato do número de implantes viáveis/rata não apresentar diferenças significativas entre os grupos, indica que os tratamentos, provavelmente, não afetaram o processo de implantação dos blastocistos.

A partir da implantação, o blastocisto pode continuar seu desenvolvimento normal, desenvolver-se de forma anormal ou então morrer. Reabsorção é nome que se dá para a lise *in situ* de um embrião ou feto (KALTER, 1980); quanto maior a proporção de reabsorções maior, evidentemente, o número de fetos cujo desenvolvimento foi interrompido.

Como o número de reabsorções/rata não apresentou diferenças significativas entre os grupos, pode-se inferir que os tratamentos não interferiram com o progresso do desenvolvimento embrionário após a implantação.

Sabe-se que o índice (proporção) de implantação correlaciona-se com o número de corpos lúteos, e é um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (FORD, 1982). Contrastando com o índice de implantação, a presença de reabsorções indica uma falha no desenvolvimento embrionário. Como os dois índices não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais estudados, pode-se inferir que a capacidade reprodutiva materna não foi afetada pelos tratamentos.

A placenta tem uma importância crucial para o desenvolvimento do feto, pois fornece os nutrientes necessários para seu crescimento, entre outras funções (REGNAULT et al., 2002). Distúrbios no suprimento sanguíneo uterino estão associados com alta morbidade pré-natal e neonatal e restrição de crescimento intra-uterino (AUGUSTIN, 2000; ZYGMUNT et al., 2003). Uma estreita relação entre o peso fetal e placentário já foi demonstrada em algumas espécies: humanos (THOMPSON, BILLEWICZ e HYTTEN, 1969), coelhos (BRUCE e ABDUL, 1973), roedores (GILBERT e LETURQUE, 1982) e porcos (SANIN et al., 2001).

O fato do tamanho dos fetos, assim como seu peso corporal e o de suas placentas terem sido semelhantes em todos os grupos experimentais estudados, indica que os tratamentos não alteraram a disponibilidade de nutrientes maternos necessários para a manutenção do metabolismo e desenvolvimento fetal. Tal suposição parece ser corroborada pela ausência de significância do índice placentário e pelo fato dos recém nascidos terem tido peso adequado para a idade gestacional.

### **5.3 Desenvolvimento das Ninhadas**

#### **5.3.1 Análises Esquelética e Visceral**

Certas variações esqueléticas ocorrem espontaneamente em fetos e recém nascidos. Sabe-se que a incidência dessas variantes anatômicas aumenta após o tratamento de fêmeas prenhes com agentes teratogênicos (TAYLOR, 1986).

Variações esqueléticas podem ser consideradas como efeito de drogas em doses maiores (14<sup>a</sup> costela extra) ou apenas variações normais (14<sup>a</sup> costela

rudimentar e variações de esternóbrios). Quando constituem os únicos sinais de embriotoxicidade, elas não devem ser classificadas como anormalidades. Variações do esterno, por exemplo, parecem ter um valor duvidoso na previsão do potencial teratogênico, pois só aumentam consideravelmente sua incidência quando também já se mostraram claramente teratogênicas por outros critérios. Deve-se enfatizar que algumas variações esqueléticas são consideradas espécie-específicas e, conseqüentemente, podem apresentar diferentes magnitudes de resposta em outras linhagens ou espécies (KIMMEL e WILSON, 1973).

Alguns tipos de malformações (fenda palatina em camundongos) podem resultar de distúrbios da homeostasia do organismo materno e, portanto, não representarem uma ação tóxica direta sobre o embrião ou o feto (MANSON, 1986).

Diversos fatores de crescimento (CUETO e GERTON, 2001) e citocinas (TORCHINSKY e TODER, 2004) relacionados ao desenvolvimento normal do embrião já foram identificados e caracterizados. Para uma gestação bem sucedida, é necessário que haja um balanço intrauterino de citocinas. Trabalhos demonstram que o estresse embriopático modula a expressão de um grande número de citocinas e que dependendo de como a maquinaria apoptótica funciona, os estresses embrionários, independentemente de sua natureza, podem ou não resultar em desenvolvimento fetal inadequado ou perda gestacional (TORCHINSKY e TODER, 2004).

As anomalias encontradas, tanto esqueléticas como viscerais, apresentaram-se nos grupos tratados em quantidades e de natureza muito semelhante às aquelas observadas nos grupos controles. Dados da literatura que apontam a incidência dessas anomalias para essa espécie experimental estão de acordo com as encontradas neste estudo (KIMMEL e WILSON, 1973; SZABO, 1989).

Portanto, é possível inferir que as alterações encontradas nos ossos do crânio e do esterno, geralmente transitórias e reversíveis em roedores, podem constituir indicativos de leve atraso no desenvolvimento ósseo, não adversos a sobrevivência dos fetos, decorrentes da laparotomia no 20º DP.

Com relação às alterações viscerais, sabe-se que após o nascimento, as hidrocefalias leves e algumas vezes moderadas, podem regredir em algumas espécies e inclusive em humanos e que as diferenças entre espécies podem ocorrer devido às possíveis transformações farmacocinéticas que se impõe a unidade materno/placentária/fetal (SPINOSA, GÔRNIK e BERNARDI, 1999). Portanto, é



possível inferir que as hidrocefalias nos graus encontrados (grupos tratados maior incidência que controles) nos fetos são variantes do normal e sugere-se que as mesmas até pudessem regredir caso a prenhez chegasse a termo e/ou depois de algum tempo após o nascimento.

Quanto à constatação de hidronefrose e agenesia esofágica, é possível inferir que surgiram de eventos isolados e devido ao acaso. Portanto, não resultaram da ação dos tratamentos, uma vez que só foram observadas em um feto do grupo controle (C2) e um feto do tratado (T1), respectivamente. Outro fato que reforça esta possibilidade é que, estatisticamente, não houve diferenças significativas quando comparados com os demais grupos experimentais.

### **5.3.2 Análise Histológica**

Quando se testa um possível efeito tóxico de uma determinada substância em um conceito, faz-se necessário estabelecer se esses efeitos são causados direta ou indiretamente no mesmo. Por meio de alterações no organismo materno pode-se, secundariamente, interferir no desenvolvimento normal do conceito (CHANG et al., 2002).

A maioria das substâncias químicas consideradas como agentes tóxicos são substâncias exógenas conhecidas como xenobióticos. A planta medicinal utilizada como medicamento é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo, nele introduzido com finalidades terapêuticas. A maioria dos xenobióticos é lipossolúvel, característica que permite sua absorção por difusão passiva através da membrana lipídica das células. O organismo remove os xenobióticos por meio de uma série de alterações estruturais mediante diversos processos de biotransformação. A biotransformação geralmente leva à formação de compostos mais polares, portanto, mais hidrofílicos, conseqüentemente mais facilmente excretados do que seu composto original (SMITH e CLARK, 1987; RAHMAN, RAILKAR e VENKATARARN, 1992; YUAN et al., 1995; VESSEY, 1996).

Para que um determinado xenobiótico provoque lesão, dependerá da dose, de sua forma estrutural e dos mecanismos que utilize o organismo para conferir-lhe polaridade e lhe excretar. Desta forma, a eficiência da eliminação de substâncias lipofílicas, depende de sua conversão a substâncias polares e hidrossolúveis, fenômeno que é habitualmente o fator limitante na eliminação das drogas do organismo (SOUSA et al., 2003; SOUSA, 2004).

O órgão mais comumente envolvido com a biotransformação de xenobióticos é o fígado. O fígado atua na emulsão de gorduras por meio da produção da bile, na metabolização de substâncias presentes na corrente sanguínea, na regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, homeostasia e auxílio à resposta imune. Esta atuação é devida a sua posição estratégica e por suas células (hepatócitos) estarem entre as células mais ricamente perfundidas do organismo (OGA, 1995; VESSEY, 1996; GUYTON e HALL, 2002; SCHINONI, 2006).

Os xenobióticos são absorvidos por difusão passiva através da membrana lipídica das células e percorrem o organismo unido a proteínas plasmáticas, basicamente a albumina, ou se ligam à célula adiposa. Os sistemas de desintoxicação preferentemente hepáticos servem para dar maior polaridade, a fim de facilitar sua excreção. O fígado os modifica para aumentar sua polaridade e torná-los hidrossolúveis. As moléculas já hidrossolúveis podem voltar ao plasma e serem eliminadas pela urina, ou passar para a bile e serem eliminados com as deposições (OGA e BASILE, 1994; VESSEY, 1996; STURGILL e LAMBERT, 1997; MEEKS, HARRISON e BULL, 2000).

Considerando que na análise histológica do fígado das ratas não foi evidenciado nenhum tipo de alteração nos grupos, é possível inferir que as enzimas existentes nos microsomas hepáticos (ex: citocromo P<sub>450</sub>) e as enzimas não microsômicas tenham catalisado os processos de biotransformação (VESSEY, 1996; STRECK e DALLA COSTA, 1999; MEEKS, HARRISON e BULL, 2000) do extrato de *M. ilicifolia*, aumentando sua polaridade e facilitando sua excreção, o que pode ser verificado pela ausência de alterações morfológicas no órgão.

Quanto às alterações histopatológicas evidenciadas no baço e nos rins das ratas do T1 pode-se inferir que, a célula endotelial dos capilares sanguíneos foi mais sensível a algum componente do extrato de *M. ilicifolia*. No baço, sua toxicidade deve ter alterado a célula endotelial, gerando a congestão e conseqüente acúmulo de hemossiderina no órgão. O efeito hemossiderose evidenciado no baço das ratas (T1), está relacionado com as hemácias que estavam estagnadas no baço, devido ao fenômeno de congestão vascular observado, as quais foram fagocitadas por macrófagos. Portanto, o acúmulo do extrato de *M. ilicifolia* no baço resultou no efeito citotóxico observado pela interação biológica entre dose e tempo de exposição com receptor biológico apropriado, a célula endotelial.

A hemossiderina é visível ao microscópio óptico como grânulos de cor marrom escura, tamanho variável e aspecto refringente (BLOOD e RADOSTITS, 1989; COLES, 1993; COWELL e TYLER, 1993).

O baço como órgão linfóide, tem importante papel na defesa orgânica devido a seus mecanismos de filtração sanguínea e fagocitose, além da produção de fatores do complemento e imunoglobulinas (BABCOCK, AMOSCATO e NISHIODA, 1983; DOWNEY et al., 1987).

Com relação aos rins maternos, a congestão vascular detectada, no grupo das ratas T1, pode ter sido gerada pelo mesmo componente do extrato de *M. ilicifolia*, metabólitos secundários, que foi citotóxico na congestão dos vasos do baço materno.

Segundo Finco (1997), o rim é particularmente um órgão vulnerável aos efeitos de agentes tóxicos, devido à alta taxa de perfusão e à habilidade de concentrar muitas substâncias na luz tubular, o que pode se agravar na gestação, devido ao aumento fisiológico na taxa de filtração glomerular (HYTTEN, 1984).

Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais podem apresentar efeitos tóxicos. Segundo Capasso et al. (2000), espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas podem ocasionar ação tóxica renal e as espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas alguns tipos de dermatites.

Quanto ao comprometimento das funções do fígado e dos vasos da derme detectado nos fetos das ratas do T1 pode-se inferir que, a presença do mesmo componente do extrato de *M. ilicifolia* tenha sido tóxica provocando lesões em células endoteliais dos vasos da região abdominal, ocasionando hemoperitônio e dilatações vasculares dérmicos consoantes aos ingurgitamentos capilares e conseqüentes hemorragias evidenciadas nestes fetos. O tamanho do fígado fetal aumenta linearmente com a idade gestacional, só que durante a vida intra-uterina o fígado é imaturo, o retículo endoplasmático dos hepatócitos ainda pouco desenvolvido reduz a sua capacidade de metabolizar xenobióticos, levando a uma maior permanência dos mesmos no organismo. É possível, que ao longo da exposição o efeito foi sendo somado no organismo fetal, até alcançar o nível tóxico. Portanto, é possível que o rompimento do vaso (hemorragia) no fígado fetal e cavidade abdominal (hemoperitônio), possam ter sido gerados pelo mesmo componente do extrato que foi citotóxico na congestão dos vasos do baço e rins

maternos. Entretanto, nos fetos o efeito citotóxico foi maior porque chegou a causar rompimento da parede do vaso, ocasionando hemorragia. O fato dos fetos apresentarem os vasos mais sensíveis e, seu organismo ser menor que o materno, o que deve estar relacionado com o peso corporal e concentração de extrato ou do seu produto de biotransformação, pode ter contribuído com o efeito citotóxico mais acentuado nos mesmos.

Como exemplos de substâncias presentes em plantas com efeitos hepatotóxicos podem ser citados os do safrol, apiol, lignanas e alantoína (AKERELE, 1993). Um caso importante de efeito tóxico relatado recentemente foi ocasionado pelo uso de cápsulas de têucrío (*Teucrium chamaedrys* L. – Labiateae), que causou uma epidemia de hepatite na França. A origem do efeito tóxico foi atribuída a diterpenos do tipo neo-clerodano, transformados pelo citocromo P<sub>450</sub> em metabólitos hepatotóxicos, que apresentavam uma subunidade epóxido. Anteriormente, o uso do têucrío era tido como seguro até que a comercialização do vegetal em cápsulas associadas à camomila, prescrito para dietas de emagrecimento, desencadeou os casos de hepatite tóxica (LOEPER et al., 1994; SAVVIDOU et al., 2007).

Outro exemplo é o do confrei (*Symphytum officinale* L.). Esta planta é utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcalóides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998). Após diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por esses alcalóides, o uso do confrei foi desaconselhado pela OMS.

Os compostos com ação bioativa de importância farmacológica são produzidos por meio da biossíntese dos metabólitos secundários. Estudos fitoquímicos revelam a presença de muitos constituintes químicos (metabólitos) em *M. ilicifolia*, como flavonóides glicosilados (LEITE et al., 2001), triterpenóides (PEREIRA et al., 1993; CORDEIRO et al., 1999), taninos (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; MARTINS, GUTERRES e ORTEGA, 2003, REIS e SILVA, 2004) e polissacarídeos como a arabinogalactana (CIPRIANI et al., 2006). Os triterpenóides e a arabinogalactana foram sugeridos como importantes para o efeito antiulcerogênico de *M. ilicifolia* (CORDEIRO et al., 1999; CIPRIANI et al., 2006). Estudos relatam a ação citotóxica (antitumoral) dos triterpenos maitenina, pristimerina e do erithrodiol em várias linhagens de células tumorais (SHIROTA et

al., 1994; OHSAKI et al., 2004; COSTA et al., 2008). Os flavonóides têm sido relacionados com redução na mortalidade desencadeada por doenças que atingem as artérias coronárias (HERTOG et al., 1993; KNEKT et al., 1991). De acordo com vários autores, esses compostos têm potencial vasodilatador (HERRERA et al., 1996) tanto na presença (LEMOS et al., 1999) quanto na ausência de endotélio vascular (HERRERA et al., 1996). Dentre os flavonóides com efeitos vasodilatadores, encontrados na *M. ilicifolia* constatou-se a presença de catequina e epicatequina (SOARES DE MOURA et al., 2002; RATTMANN et al., 2006; BAGGIO et al., 2007a, b; CRESTANI et al., 2009). Dentre outras atividades biológicas atribuídas aos flavonóides destacam-se a antiinflamatória (JORGE et al., 2004), antioxidante (MELO et al., 2001; CORSINO et al., 2003; VELLOSA et al., 2006; PESSUTO et al., 2009) e antimutagenica (HORN e VARGAS, 2003).

Segundo Tennant (1977), o fígado por ser o principal órgão responsável pelo metabolismo e detoxificação de xenobióticos, está sujeito a danos induzidos por várias substâncias químicas. Na gestação essa susceptibilidade está aumentada, uma vez que nesse período há um decréscimo no metabolismo hepático e uma redução no nível de albumina plasmática, aumentando a proporção de drogas livres no plasma da gestante (HYTTEN e PAINTIN, 1963; HYTTEN, 1981 e 1984; TURK e CASTEEL, 1997).

A eficácia e a toxicidade das drogas usadas na gestação são difíceis de serem estimadas devido às alterações em muitos parâmetros fisiológicos (ex: hormonais) e pela variação das atividades enzimáticas no metabolismo das mesmas, ditadas pela presença da placenta e do feto. Quando a mãe é exposta a substâncias tóxicas durante a gestação, pode haver um mecanismo de indução, que aumenta a metabolização de drogas pelo feto (HODGE e TRACY, 2007; WEIER et al., 2008).

Morgan (1997) relata que a extensão da exposição fetal às drogas (substâncias tóxicas) administradas ao organismo materno depende de numerosos fatores – em particular dos mecanismos de eliminação materno-fetal e da permeabilidade placentária. Refere que, na gravidez, devido ao aumento do trabalho cardíaco há elevação de 50% no fluxo plasmático renal efetivo e nível de filtração glomerular. Isto resulta em aumento correspondente do *clearance* renal da droga. A transferência placentária de pequenas moléculas lipofílicas da mãe para o feto é eficiente, porque a membrana placentária é uma membrana lipofílica muito delgada,

com extensa área de superfície para trocas e elevados níveis de fluxo sanguíneo placentário fetal e materno. Não obstante, a transferência placentária de moléculas relativamente hidrofílicas é lenta e isto pode limitar a exposição fetal à droga.

No presente estudo, é possível inferir que o extrato de *M. ilicifolia* (metabólitos secundários) tenha atravessado a placenta passando pela veia umbilical, fígado fetal e, então, para a circulação sistêmica do feto, criando o efeito potencial de passagem evidenciado no fígado dos fetos (ratas do T1).

Em ratos e seres humanos o blastocisto rompe o epitélio uterino e invade o estroma endometrial, levando à formação da placenta que se caracteriza por uma íntima relação entre as circulações fetal e maternal (hemocorial). A implantação em ratos e seres humanos é caracterizada por uma pronunciada reação estroma-endométrio, referida como decidualização, a decídua forma o componente maternal da placenta (RASWEILER IV e BADWAIK, 1999; WITORSCH, 2002a, b; GRAY e col., 2004).

A placenta consiste em duas partes, uma porção fetal derivada do córion viloso e uma porção materna formada pela decídua basal. Ela apresenta três zonas distintas: labiríntica, juncional e basal. A zona labiríntica é formada por células gigantes trofoblásticas (citotrofoblasto), sinciotrofoblasto e mesênquima fetal, no qual existem canais vasculares maternos e vasos fetais, responsáveis pelas trocas de substâncias entre a mãe e o feto. A zona juncional é composta por células gigantes secundárias trofoblásticas, de glicogênio e espongiotrofoblásticas que secretam hormônios imprescindíveis para a viabilidade fetal uma vez que sua ausência resulta em morte fetal. A zona da decídua basal, formada por células deciduais, no qual a porção fetal da placenta está ligada à parede uterina (CSAPO, DRAY e ERDOS, 1974; MUNTENER e HSU, 1977; LLUSIA, 1992; BARTHOLOMEUSZ, BRUCE e LYNCH, 1999; RIDER et al., 2000).

A placenta é um órgão vital para o crescimento e desenvolvimento fetal, pois transporta oxigênio e nutrientes, além de proteger contra possíveis traumas. Mediar à transferência de nutrientes da mãe para o feto e remover produtos de metabolismo da circulação fetal constitui uma de suas funções primordiais (ADAMSON et al., 2002; CROSS, 2005). No entanto, são ainda pouco conhecidos os mecanismos de transporte de substâncias bioativas na placenta, bem como a sua regulação. Sabe-se que é mediado por uma rede complexa de transportadores de membranas que se distribuem de uma forma polarizada no sinciotrofoblasto e que depende de

algumas características da droga, como lipossolubilidade e peso molecular (CROSS, 2005; WEIER et al., 2008; COX et al., 2009).

Em algumas situações, muitas substâncias podem interferir nas propriedades funcionais da placenta, e causar alterações em sua estrutura, levando a possíveis perdas ou danos ao feto (LEVARIO-CARRILO et al., 2004; HODGE e TRACY, 2007; WEIER et al., 2008).

Segundo Cox et al (2009), a placenta do ser humano e do rato apresentam similaridades estruturais interessantes, pois mais de 80% dos genes conhecidos por causar fenótipo placentário (envolvidos com a estrutura e/ou função) no rato são co-expressos no ser humano. Outros fatores como curto ciclo estral, breve período gestacional (ENDERS e BLANKENSHIP, 1999) e placenta do tipo hemocorial, igual à de humanos, tornam o rato um dos melhores modelos para se estudar os mecanismos da placenta e as patologias obstétricas (BURDON et al., 2007).

De acordo com os resultados do presente estudo a exposição ao extrato de *M. ilicifolia* não causou alterações na morfologia da placenta das ratas Wistar, mas teve implicações vasculares nos fetos.

Os resultados obtidos no presente estudo não excluem a possibilidade de toxicidade humana durante a gestação. Essa é a razão principal de se evitar o uso de medicamentos nessa fase (UIGNARD e JOHN, 1986; HODGE e TRACY, 2007; WEIER et al., 2008). Se a intenção é utilizar a *M. ilicifolia* como medicamento, ela deve ser previamente validada, isto é, ter sua ação comprovada e sua toxicidade potencial avaliada cientificamente na espécie humana, como qualquer outro medicamento. Sua utilidade medicamentosa na gestação deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aquelas que a utilizam é suplantado pelos benefícios individuais que dela possam advir. Portanto, é preciso muita cautela, os efeitos da exposição em ambos os organismos, materno e fetal, devem ser considerados, respeitando-se a complexidade farmacológica e as possíveis transformações que se impõe a unidade materno/placentária/fetal.

## 6. CONCLUSÕES

Com base no modelo experimental, dose utilizada e face aos resultados expostos, concluiu-se que o extrato de *Maytenus ilicifolia*:

1) Durante o período de organogênese (6<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> DP) e todo período gestacional (1<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> DP)

- não causou toxicidade materna clinicamente observável e morte;
- não alterou o consumo de água, ração e as condições fisiológicas e intra-uterinas relacionadas com a reprodução;
- não interferiu com o desenvolvimento fetal e a capacidade de levar a termo uma gestação;
- não provocou alterações anátomo-histológicas no fígado das ratas;
- não causou efeitos tóxicos ou alterações morfológicas na placenta das ratas;
- não apresentou efeitos teratogênicos nos fetos.

2) Durante todo período gestacional (1<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> DP)

- apresentou-se tóxico para as células maternas renais e do baço;
- apresentou-se tóxico para os fetos no fígado, hemoperitônio e vasos da derme.

Portanto, é preciso muita cautela na utilização da planta durante o período de prenhez, devendo-se levar em consideração os efeitos da exposição em ambos os organismos, materno e fetal, respeitando-se a complexidade farmacológica e as possíveis transformações que se impõe a unidade materno/placentária/fetal.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2002; 250(2):358-73.

Akerele O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram.* 1993; 28:13-20.

Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E, Leone VG, Mariani L. The extend of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology.* 1979; 20:237-42.

Arenas P, Azorero RM. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. *Economic Botany.* 1977; 31:298-301.

Augustin HG. Vascular morphogenesis in the ovary. *Baillières Clin Ob Gy.* 2000; 14(6):867-82.

Babcock GF, Amoscato AA, Nishioda K. Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis and differentiation of macrophages and granulocytes. *Ann N Y Acad Science.* 1983; 419:64-75.

Baggio CH, Freitas CS, Otofujii GM, Cipriani TR, Souza LM, Sasaki GL, Iacomini M, Marques MCA, Vela SM. Flavonoids of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss protect the gastric mucosa of rodents through inhibition of both  $H^+, K^+$ -ATPase activity and formation of nitric oxide. *J Ethnopharmacol.* 2007a; 113:433-40.

Baggio CH, Freitas CS, Santos AC, Mayer B, Twardowschy A, Cipriani TR, Iacomini M, Mesia-Vela S, Marques MCA. Inibição da motilidade gastrintestinal por frações da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex 76 Reiss. obtidas por fracionamento biomonitorado. In: 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto. 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007b. p. 48-48.

Balbach A. A Flora Nacional na Medicina Doméstica, 11 ed. A edificação do lar, São Paulo; 1980. p. 885.

Balbach, A. A Flora Nacional na Medicina Doméstica. 17 ed. São Paulo; 1986. p. 406-676.

Barrow MV, Taylor WI. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. J. Morphol. 1969; 127:291-306.

Bartholomeusz RK, Bruce NW, Lynch AM. Embryo survival and fetal and placental growth following elevation of maternal estradiol blood concentrations in the rat. Biol. Reprod. 1999; 61:46-50.

Bernardi MM. Exposição aos elementos durante o período perinatal. In: Souza-Spinoza H, Gorniak SL, Bernardi MM. (Eds.). Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 566-74.

Blood DC, Radostits OM. Clínica Veterinária. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989.

Born GCC. Plantas medicinais da Mata Atlântica (Vale do Ribeira-SP). Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.

Bruce NW, Abdul K. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal circulation in the rabbit at different stages of gestation. J Reprod Fertil. 1973; 32:15-24.

Buckel, P. Toward a new natural medicine. Naturwissenschaften. 1998; 85(4):155-63.

Burdon C; Mann C; Cindrova-Davies T; Ferguson-Smith AC; Burton GJ. Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the Murine placenta. Placenta. 2007; 28(7):724-33.

Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS, Vicentini VEP. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. Genet. Mol. Biol. 2002; 25(1):85-9.

Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*. 2000; 71:1(Supl)S58-S65.

Carlini ELA. Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) e outras. Brasília: CEME/AFIP, 1988. p. 87.

Chahoud I, Ligensa A, Dietzel I, Faqi AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol*. 1999; 13:375-81.

Chang CV, Felicio AC, Reis JEP, Guerra MO, Peters VM. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81:265-9.

Christian MS. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW. *Method of toxicology*. Philadelphia: Taylor e Francis; 2001. p. 1301-81.

Cipriani TR, Mellinger CG, de Souza LM, Baggio CH, Freitas CS, Marques MCA, Gorin PA, Sasaki GL, Iacomini M. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. *J. Nat. Products*. 2006; 69(71):18-21.

Coles EH. *Patologia Clínica Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Saunders; 1993.

Cordeiro PJM, Vilegas JHY, Lanças FM. HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira Santa"). *J Braz Chem Soc*. 1999; 10(6):523-6.

Corsino J, Silva DHS, Zanoni MVB, Bolzani VS, França SC, Pereira AMS, Furlan M. Antioxidant Flavan-3-ols and Flavonol Glycosides from *Maytenus aquifolium*. *Phytother Res*. 2003; 17:913-6.

Costa PM, Ferreira PMP, Bolzani VS, Furlan M, Santos VAFFM, Corsino J, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicol in Vitro*. 2008; 22:854-63.

Cowell RL, Tyler RD. Diagnostic Cytology. California: American Veterinary, 1993.

Cox B, Kotlyar M, Evangelou AI, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Whiteley K, Jurisica I, Adamson SL, Rossant J, Kislinger T. Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology. *Mol Syst Biol.* 2009; 5:279-83.

Crestani S, Rattmann YD, Cipriani TR, Souza LM, Iacomini M, Kassuya CAL, Marques MCA, Silva-Santos JE. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vasc Pharmacol.* 2009; 51(1):57-63.

Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice-a review. *Trophoblast Res.* 2005; 19:54-59.

Cruz GL. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. 2 ed. Civilização Brasileira. São Paulo. 1982. p. 335–6.

Csapo A, Dray F, Erdos T. Letter: Oestradiol 17beta: Inhibitor of placental growth. *Lancet.* 1974; 6:51-2.

Cueto LD, Gerton GL. The Influence of Growth Factors on the Development of Preimplantation Mammalian Embryos. *Arch Med Res.* 2001; 32 (6):619-26.

Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR. Anomalias Congênitas - Estudos Experimentais. Belo Horizonte: COOPMED; 2008. p. 102.

D'Ercole AJ, Underwood, LE. Growth factors in fetal growth and development. In: Novy, MJ, Resko, JA. Fetal endocrinology. New York: Academic Press; 1981. p. 155-82.

Downey EC, Shackford SR, Fridlund PH, Ninnemann RN. Long-term Depressed Immune Function in Patients Splenectomized for Trauma. *J Traum.* 1987; 27(6):661-3.

Enders AC; Blankenship TN. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliver Rev.* 1999; 38:3-15.

Ferreira PM, Oliveira CN, Oliveira AB, Lopes MJ, Alzamora F, Vieira MAR. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. *Planta.* 2004; 219:319-324.

Finco DR. Kindney function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5 ed. London: Academic Press; 1997.

Ford WCL. The effect of deoxy-6-fluoroglucose on the fertility of males rats and mice. *Contraception.* 1982; 25:535-45.

Freitas F. Avaliação farmacobotânica de plantas medicinais comercializadas pelos raizeiros de Campo Grande, 65p. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (MS); 1992.

Freitas CS, Baggio CH, Otofujii GM, Mendes DAGB, Marques MCA. Inibição da secreção ácida gástrica pelo sobrenadante etanólico da extração aquosa da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss - Celastraceae (SEEA). In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2005, Águas de Lindóia. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2005. p. 89.

Gebhardt R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Med.* 2000; 66(2):99-105.

Gilbert M, Leturque A. Fetal weight and its relationship to placental blood flow and placental weight in experimental intrauterine growth retardation in the rat. *J Dev Physiol.* 1982; 4:237-46.

Gleich J, Froberg H. General Teratological Techniques. In: Neubert D, Merker HJ, Kwasigroch TE. *Methods in prenatal toxicology,* Massachusetts: PSG Publishing Company; 1977. p. 94-102.

Gray Junior LE, Wilson V, Noriega N, Lambright C, Furr J, Stoker TE, Laws SC, Goldman J, Cooper RL, Foster PM. Use of the Laboratory Rat as a Model in Endocrines Disruptor Screening and Testing. *ILAR J.* 2004; 45(4):425-37.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*, 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2002.

Hanseman JK, Hogan MD. Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology.* 1995; 12:165-72.

Herrera MG, Zarzuelo A, Jimenez J, Marhuenda E, Duarte J. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1996; 27(2):273-7.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer.* 1993; 20(1):21-9.

Hnatyszyn O, Arenas P, Moreno AR, Rondina RVD, Coussio JD. Estudio Fitoquímico preliminar de plantas medicinales paraguayas. I. Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklorica. *Rev. Soc. Cient. Paraguai.* 1974; 14:23-57.

Hodge LS, Tracy TS. Alterations in drug disposition during pregnancy: implications for drug therapy. *Expert Opin Drug Met.* 2007; 3(4):557-71.

Horn RC, Vargas VMF. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the salmonella/microsome assay. *Mutagenesis.* 2003; 18:113-8.

Hyttén FE, Paintin DB. Increase in plasma volume during normal pregnancy. *J Obstet Gyn Brit Em.* 1963; 70:402-7.

Hyttén FE. Physiological changes in the mother related to drug handling. In: Krauer, B. *Drugs and Pregnancy*. New York: Academic Press; 1984. p. 7.

Hyttén FE. Weight gain in pregnancy-30 year of research. *S Afr Med J.* 1981; 60(1):15-9.

Inman OR, Markivee CR. Gross effects on rabbit embryos and newborns of x – irradiation in the blastocyst stage. *Anat. Rec.* 1963; 174:139-47.

Jorge RM, Leite JPV, Oliveira AB, Tagliati CA. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94(1):93-100.

Kalter H. The relationship between congenital malformations and prenatal mortality in experimental animals. In: Potter I, Hook EB. *Human embryonic and fetal death*. New York: Academic Press; 1980. p. 29-44.

Kato H, Morishige WK, Rothchild I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rats. *Endocrinology.* 1979; 105:846-50.

Keller KA. Development and reproductive toxicology. Cap. 2, p. 305-55. In: \_\_\_\_\_, Jacobson-Kram D. *Toxicological testing handbook*. 2 ed. Informa Healthcare: New York; 2006.

Khera KS. Maternal toxicity – a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology.* 1985; 31:129-53.

Khera KS. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders – a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1987; 17(4):345-75.

Kimmel CA, Wilson JG. Skeletal Deviations in Rats: Malformations or Variations? *Teratology.* 1973; 8:309-316.

Knekt O, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res.* 1991; 57(2):529-34.

Leite JPV, Rastrelli L, Romussi G, Oliveira AB, Vilegas JHY, Vilegas W, Pizza C. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49(8):3796-801.

Lemonica IP, Damasceno DC, Stasi LC. Study of the embryotoxic effects of na extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Braz J Med Biol Res. 1996; 29:223-7.

Lemos VS, Freitas MR, Muller B, Lino YD, Queiroga CE, Cortes SF. Dioclein, anew nitric oxide-and endothelim-dependent vasodilatador flavonoid. Eur J Pharmacol. 1999; 386(1):41-6.

Levario-Carrillo M; Olave ME; Corral DC; Alderete JG; Gagiotti SM; Bevilacqua E. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. Exp Toxicol Pathol. 2004; 55:489-96.

Llusia JB. La placenta: Fisiología y patologia. 1 ed. Buenos Aires: Díaz de Santos, 1992.

Loeper J, Descatoire V, Letteron P, Moulis C, Degott C, Dansette P, Fau D, Pessayre D. Hepatotoxicity of germander in mice. Gastroenterol. 1994; 106(2):464-72.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. Quim. Nova. 2002; 25(3):429-38.

Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 3 ed. New York: Raven Press; 1994. Cap. 28. p. 989-1037.

Manson JM, Zenick H, Costlow RD. Teratology test methods for laboratory animals. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press; 1982. p. 141-84.

Manson JM. Teratogens. In: CD Klaasen, MO Amdur, J Doull. Casarett and Doull` S Toxicology. MacMilan Publshing Company, New York, 1986.

Mariot MP, Barbieri RL. Metabólitos secundários e propriedades mediciniais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus aquifolium* Mart.). Rev. Bras. Pl. Med. 2007; 9(3):89-99.



Mariot MP. Recursos genéticos de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*) no Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitomelhoramento), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2005.

Martinez-Crovetto R. Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en la medicina popular del nordeste argentino. *Am Ind.* 1987; 47:279-93.

Martins AG, Guterres SS, Ortega GG. Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. *Acta Farm. Bonaerense.* 2003; 22(1):39-44.

Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ. *Hepatotoxicology.* CRV Press, Inc., Corporate Blvd., New York, Boca Raton, Florida. 2000. p. 700.

Melo SF, Soares SF, Costa RF, Silva CR, Oliveira MBN, Bezerra RJAC. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutat Res Gen Tox En.* 2001; 496(1):33-8.

Montanari T, Bevilacqua E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. *Contraception.* 2002; 65(2):171-5.

Montanari T, Carvalho JE, Dolder H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart.ex. Reiss on spermatogenesis. *Contraception.* 1998; 57(5):335-9.

Morgan DJ. Drug disposition in mother and foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24(11):869-73.

Muntener M, Hsu YC. Development of trophoblast and placenta of the mouse. *Acta Anat.* 1977; 98:241-52.

National Research Council. In: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington: National Academy Press; 1996. p. 140.

Nogueira FS, Coelho WMD, Caris CCP, Alves FA, Coelho NMD, Apolinário JC. Eutanásia Animal. *Ciên. Agr. Saúde FEA.* 2002; 2(2): 90-95.

Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Rev. Bras. Farmacogn. 2003; 13(2):83-92.

Oga S, Basile AC. Medicamentos e suas Interações. São Paulo: Atheneu; 1994. p. 199.

Oga S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu; 1995. p. 515.

Ohsaki A, Imai Y, Naruse M, Ayabe SI, Komiyama K, Takashima J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. J Nat Prod. 2004; 67(3):469-71.

Oliveira MGM, Monteiro MG, Macaúbas C, Barbosa VP, Carlini EA. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. J. Ethnopharmacol. 1991; 34(1):29-41.

Oliveira RJ. Possível efeito do tratamento de ratas prenhes com doses altamente diluídas de arsênio na prevenção da teratogenicidade deste metal. [Monografia]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP); 2001.

Oliveira RJ, Salles MJS, Silva AF, Kanno TYN, Lourenço ACS, Freiria GA, Matiazi HJ, Ribeiro LR, Mantovani MS. Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. Regul Toxicol Pharm. 2009; 53:164-73.

Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. Semin. Cell Dev. Biol. 2000; 11(2):67-76.

Pereira AMS, Pereira PS, Cerdeira RMM, Franca SC, Rodrigues DC, Moraes FR, Moraes JRE. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Acta Hort. 1993; 333:205-210.

Pessuto MB, Costa IC, Souza AB, Nicoli FM, Mello JCP, Petereit F, Luftmann H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Quim Nova. 2009; 32(2):412-6.

Rahman YE, Railkar AM, Venkatararn S. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (DMPH or L1) in rat, rabbit and dog models. *Drug Today*. 1992; 28:55-63.

Rasweiler IV JJ, Badwaik NK. Discoidal Placenta. In: Knobil E, Neill JD. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 890-902.

Rattmann YD, Cipriani TR, Sasaki GL, Iacomini M, Rieck L, Marques MCA, Silva-Santos JE. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. *J Ethnopharmacol*. 2006; 104(3):328-35.

Regnault TRH, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental Development in Normal and Compromised pregnancies – A Review. *Placenta*. 2002; 23 (Suppl A): Trophoblast Research. (16):119-29.

Reis MS, Silva SR. Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. Brasília: IBAMA; 2004. p. 204.

Rider V, Jones SR, Foster RT, Imakawa K. Changes in the temporal and spatial expression of H beta 58 during formation and maturation of the chorioallantoic placenta in the Rat. *Biol Reprod*. 2000; 63(6):1735-46.

Rudge MVC, Borges VTM, Calderon IMP. Adaptação do organismo materno à gravidez. In: Neme B, editor. *Obstetrícia básica*. São Paulo: Sarvier; 2000;42-51.

Sanin LH, López SR, Olivares ET, Terrazas MC, Silva MAR, Carrillo ML. Relation between Birth Weight and Placenta Weight. *Biol Neonate*. 2001, 80:113-117.

Savvidou S, Goulis J, Giavazis I, Patsiaoura K, Hytioglou P, Arvanitakis C. Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L.: report of two cases and review of the literature. *Eur J Gastroen Hepat*. 2007; 19(6):507-11.

Scheffer MC. Uso Tradicional e atual de espécies de *Maytenus*. In: Reis MS, Silva SR. (org.). *Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: Maytenus* spp., espinheira-santa. Brasília: IBAMA, 2004. p. 53-66.

Schinoni MI. Fisiologia Hepática: Hepatic Physiology. *Gaz Méd.* 2006; 76 Suppl 1:85-89.

Shirota O, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Iitaka Y. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *J. Nat. Prod.* 1994; 57(12):1675-81.

Siqueira JM, Silva MF, Resende UM, Castro MSA. Plantas medicinais comercializadas pelos raizeiros de Campo Grande - MS. In XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Resumo de Temas Livres; 1994 set 20-23; Fortaleza. Brasil. Ceará: 1994. p. 007.

Smith DA, Clark B. Pharmacokinetics and toxicity testing basic principles and pitfalls. In: Nau H, Scott WJ. (Ed.). *Pharmacokinetics in teratogenesis*. Florida: CRC Press.; 1987. p. 108-21.

Smith SK. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends in Endocrin Met.* 2001; 12(4):147-51.

Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliviera EPB. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54:1515-20.

Sousa AB, Manzano H, Soto-Blanco B, Gorniak SL. Toxicokinetics of cyanide in rats, pigs and goats after oral dosing with potassium cyanide. *Arch toxicol.* 2003; 77(6):330-4.

Sousa AB. Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal. Estudo em ratos. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Souza-Formigoni MLO, Oliveira MGM, Monteiro MG, Silveira Filho NG, Braz S, Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 1991; 34:21-7.

Spinosa HS, Gorniak SM, Bernardi MM. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 2 ed. Guanabara Koogan, 1999. p. 556-74.

Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol.* 1964; 39:61-3.

Streck EL; Dalla Costa T. Isoformas do citocromo P450 e outros fatores que alteram a biotransformação de fármacos. *Infarma.* 1999; 11(11-12):36-41.

Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem.* 1997; 43:1512-26.

Szabo KT. Congenital malformations in laboratory and farm animals. San Diego: Academic Press; 1989.

Taylor P. Skeletal examination. *Practical teratology.* 1986; 10:77-100.

Tennant BC. Hepatic Function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5 ed. London: Academic Press; 1997. p. 327-52.

Thompson AM, Billewicz WZ, Hytten FE. The weight of placenta in relation to birthweight. *Brit J Obstet Gynaec.* 1969; 76:865-72.

Torchinsky A, Toder V. To die or not to die: the function of the transcription factor NFkB in embryos exposed to stress. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 51:138-43.

Turk RJ, Casteel SW. Clinical Biochemistry in Toxicology. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5 ed. London: Academic Press; 1997.

Uchida K, Kadowaki M, Nomura Y, Myata K, Miyake T. Relationship between ovarian progesterin secretion and corpora lútea function in pregnant rat. *Endocri. JPN.* 1970; 17:499-507.

Uignard JP, John EG. Renal function in the tiny, premature infant. *Clin. Perinatol.* 1986; 13(2):377-401.

Velloso JCR, Khalil NM, Formenton VAF, Ximenes VF, Fonseca LM, Furlan M, Brunetti IL, Oliveira OMMF. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia.* 2006; 77(3):243-4.

Vessey DA. Metabolismo of xenobiotics by the human liver. In: Zakin D, Boyer TD. Hepathology: A Textbook of Liver Disease. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 257-305.

Waynforth HB. Changes in the volume of rats corpus luteum during pregnancy and after surgical interference with the uterus and placenta. *Acta Endocrinol.* 1971; 66:296-302.

Weier N, He SM, Li XT, Wang LL, Zhou SF. Placental drug disposition and its clinical implications. *Curr Drug Metab.* 2008; 9(2):106-21.

Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: Wilson JC, Warkany J. Teratology principles and techniques. Chicago: Univ. of Chicago Press; 1965. p. 262-77.

Witorsch RJ. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40(7):905-12, 2002. Review.

Yuan JH, Goehl TJ, Abdo K, Clark J, Espinosa O, Bugge C. Effects of gavage versus dosed feed administration on the toxicokinetics of benzyl acetate in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33(2):151-8.

Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2003; 110 (Suppl 1):10-18.

## 2.B REVISÃO DE LITERATURA

### 2.B.1 *Achyrocline alata* (Jateí-kaá ou Jataí-kaá)

O gênero *Achyrocline* (Less) DC pertence à família Asteraceae, tribo *Gnaphalieae*, grupo *Helichrysum*. Asteracea constitui uma das maiores famílias das Angiospermaes, com aproximadamente 1.535 gêneros e cerca de 23.000 espécies, arranjadas em três subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994).

Segundo Barroso et al. (1991), no Brasil, a tribo *Gnaphalieae* apresenta cerca de 16 gêneros com poucas espécies, sendo que o grupo *Inuleae-Gnaphaliinae*, possui sistemática complexa em virtude da homogeneidade dos caracteres vegetativos, do tamanho reduzido dos capítulos e da pouca variação dos caracteres florais, que tornam duvidosos os limites entre os diferentes gêneros.

A sistemática do gênero é problemática e a classificação de cada espécie ainda não está bem definida. Apesar de algumas espécies serem amplamente utilizadas, são poucas as informações disponíveis sobre suas propriedades terapêuticas, algumas podem relacionar-se a altas concentrações de polifenóis (BROUSSALIS et al., 1988).

O gênero *Achyrocline* é popularmente conhecido como marcela, macela-do-campo, marcela-da-terra (ALMEIDA, 1993), marcelinha, losna-do-mato (PIO-CORREA, 1984); jateikaá (MARQUES e BARROS, 2001), jataí-kaá ou jateí-kaá (NUNES et al., 2003), macela, camomila nacional e macela-amarela (LORENZI e MATOS, 2002).

As espécies deste gênero estão amplamente distribuídas, desde Minas Gerais até a Argentina (BROUSSALIS et al., 1988; CORRÊA, 1978). Muitas crescem em regiões secas; algumas em áreas muito extensas como, por exemplo, *A. satureioides* (Lam.) DC. e outras restritas, como *A. ramosissima* (Sch. Bip.) Rusby, encontrada na Argentina, Peru e Bolívia em altitudes acima de 2000 m.

Segundo Lorenzi e Matos (2002), *A. satureioides* (Lam) DC e *A. alata* (Kunth) DC apresentam propriedades e características muito semelhantes e, seus constituintes químicos estão associados a várias propriedades funcionais de importância biológica.

## 2.B.2 Substâncias químicas

*A. saturoioides* (Lam) DC é a espécie mais estudada do ponto de vista químico, apresentando ácido caféico (FERRARO, NORBEDO e COUSSIO, 1981; SIMÕES, 1984; DESMARCHELIER, COUSSIO e CICCIA, 1998), ácido clorogênico e isoclorogênico (BROUSSALIS et al., 1988 e 1989; KADARIAN et al., 2002), derivados de fenilpirona e cavapirona (KALOGA, HÄNSEL e CYBULSKI, 1983), flavonóides (SIMÕES, 1984; MESQUITA et al., 1986; BROUSSALIS, FERRARO e COUSSIO, 1993; DESMARCHELIER, COUSSIO e CICCIA, 1998), minerais (PUHLMANN et al., 1992), óleos voláteis (LABUCKAS et al., 1999; LORENZO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002) e polissacarídeos (PUHLMANN et al., 1992).

*A. alata* (Kunth) DC, segundo Bohlmann et al. (1980), não apresenta constituição química característica na raiz. Entretanto, nas partes aéreas já foram isolados os seguintes compostos químicos: esqualeno, cariofileno (MERXMILLER, LEINS e ROESSLER, 1977), copaeno (BOHLMANN, BURKHARDT e ZDERO, 1977), 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, quatro derivados de geranilfloroglucinol (BURKART, 1974; HÄNSEL e OHLENDORF, 1971) e trihidroxilabdan-7,13-dieno (BOHLMANN et al., 1980). Além disso, dois novos floroglucinois estão presentes, ambos contendo um anel adicional de pirona.

Broussalis et al. (1988) elucidaram a constituição química (compostos fenólicos) de quatro espécies de *Achyrocline*. Foram encontrados em *A. alata* flavonas (Apigenina); flavonóides: Quercetina, 3-OMe-Quercetina, Quercetina-7-Glic., Gnafalina (5,7-diOH-3,8-diOMe-flavona) e Isognafalina (5-8-diOH-3,7-diOMe-flavona); flavononas (5-OMe-Naringenina); ácido caféico e seus estéres (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ésteres de ácido caféico).

Bauer et al. (1989), por meio de estudos fitoquímicos com inflorescências de *A. alata*, também isolaram e identificaram gnafalina, quercetina, quercetina-3-metiléter, quercetina-3-metiléter-7-O-glicosídeo e quercetina-3-metiléter-4'-O-glicosídeo. Este estudo apresentou o primeiro relato de glicosídeo para esse gênero.

Broussalis et al. (1989) determinaram as diferenças entre *A. saturoioides*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* e *A. alata* por meio de estudos cromatográficos com compostos polifenólicos (conteúdo de flavonóides e derivados de ácido caféico). A presença do composto apigenina ocorreu apenas em *A. alata*, derivados epoxibutoxi de flavonóides foram característicos de *A. flaccida*, cafeoilcalerianinas estavam presentes em *A. saturoioides*, luteolina e 5,7,4'-trihidroxi-8,3'-dimetoxiflavona foram



encontradas somente em *A. tomentosa*. Os autores enfatizaram que os compostos apigenina, luteolina, calerianinas e os derivados epoxibutoxi podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos para esse gênero.

Gerard et al. (1991) relataram sobre a obtenção de óleos essenciais em 8 amostras de *Achyrocline*, coletadas em diferentes regiões do Brasil e analisadas por Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa/Espectroscopia de Massa (CG e CG/EM). Foram identificados 32 compostos, representando cerca de 86 a 98% dos óleos. Em cada um dos óleos,  $\alpha$ -pireno constava sempre como o mais abundante (41 a 78%). A distribuição dos outros constituintes, principalmente (Z)- e – (E)- $\beta$ -ocimenes, 1,8-cineole,  $\beta$ -cariofileno, permitiu a classificação das oito amostras em três grupos. A composição do óleo essencial de *A. alata* mostrou-se muito parecida com a do óleo de *A. satureioides*.

Broussalis, Ferraro e Coussio (1993) isolaram das inflorescências de *A. alata* e identificaram os seguintes constituintes fenólicos: 7-hidroxy-3,5,4'-trimetoxylavanona, galangin-3-Me ether, apigenina, rhamnazin, isokaempferide, quercetina-3-Me éter (HARBORNE e MABRY, 1982), 3,5-diidroxy-6,7,8-trimetoxylavona (HANSEL e CUBUKCU, 1972); quercetina e ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ácido caféico e 1,5-ácido dicafeoilquínico.

Labuckas et al. (1999) relataram a composição dos óleos essenciais obtidos das inflorescências de *A. satureioides*, *A. alata* e *A. tomentosa*. As amostras foram coletadas nas áreas centrais da Argentina e foram analisadas por CG e CG/EM. Foram identificados 52 compostos, representando cerca de 93 a 98% dos óleos. Cariofileno foi o composto mais abundante de todos os óleos estudados (39 a 48%).

Rodrigues et al. (2002) determinaram a composição do óleo volátil obtido das folhas e flores de *A. alata* ao longo do dia, das 7 às 14 horas, em intervalos de hora em hora. Os óleos da folha e da flor foram obtidos por hidrodestilação e as análises por meio de GC/MS. Os principais componentes do óleo da folha variaram da seguinte forma: alfa-pineno (1,7-7,6%), 1 octeno-3-ol (1,7-5,6%), cineol 1,8 (0,4-5,1%), beta-cariofileno (14,6-16,7%), alfa-humuleno (20,6-25,1%) e bicyclogermacreno (7,3-12,4%). Na flor as variações dos óleos foram: alfa-pineno (5,4-21,9%), 1 octeno-3-ol (8,0-11,6%), cineol 1,8 (7,3-10,9%), beta-cariofileno (12,0-17,5%), alfa-humuleno (17,2-22,8%) e bicyclogermacreno (5,8-8,3%). Alfa-humuleno

e beta-cariofileno foram os dois principais compostos com teores de matéria seca que variaram de 20,6-25,1% e 12,0-17,5%, respectivamente.

Leal et al. (2006) avaliaram a composição e atividade antioxidante dos extratos de folhas e ramos finos de *A. alata* e *A. satureioides* obtidos por extração supercrítica fluida (SFE), etanol a baixa pressão (LPEE) e hidrodestilação (HD). Os principais compostos voláteis obtidos foram o trans-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno. O conteúdo de trans-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno nos extratos obtidos por HD foram maiores do que no SFE e extratos LPEE. A atividade antioxidante dos extratos SFE e LPEE foi duas vezes maior que o do óleo volátil (HD), este talvez estivesse associado a outros compostos fenólicos como os flavonóides. O conteúdo de trans-cariofileno em *A. alata* (extrato obtido a 200 bar e 300°C), foi cinco vezes maior do que nos extratos de *A. satureioides*. Todos os extratos de *A. alata* e *A. satureioides* exibiram atividade antioxidante mais forte do que  $\beta$ -caroteno. No entanto, a correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de trans-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno não pôde ser estabelecida.

### 2.B.3 Propriedades farmacológicas

Diferentes extratos (aquoso, etanólico, hidroalcolólico) e frações purificadas (polissacarídeos, flavonóides) das inflorescências, folhas e caules de *Achyrocline* têm sido extensivamente estudados, *in vitro* e *in vivo*, por diferentes autores, apresentando resultados promissores para várias atividades biológicas. O estudo de flavonóides é interessante não só pela investigação química, como também por sua importância farmacológica (ARAÚJO et al., 2005; COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Infusões das inflorescências de *A. satureioides* são muito utilizadas na medicina popular brasileira para tratar distúrbios gastrointestinais e reduzir os níveis de colesterol sanguíneo (GUGLIUCCI e MENINI, 2002; RITTER et al., 2002). Segundo Vendruscolo, Rates e Mentz (2005), essa espécie aparece entre as 10 medicinais mais utilizadas na forma de chá na medicina alternativa de uma comunidade de Porto Alegre, RS.

Segundo Hilgert (2001), o uso popular do infuso das partes aéreas frescas de *A. alata* foi descrito para o tratamento de infecções respiratórias e resfriados, em uma comunidade rural na Argentina.

A presença dos compostos fenólicos nas espécies de *Achyrocline* está correlacionada com as propriedades etnofarmacológicas. Estudos experimentais com *A. satureioides* demonstraram ação antiinflamatória, antiespasmódica e analgésica sobre a musculatura lisa genital de ratos (LANGELOH e SCHENKEL, 1982; SIMÕES, 1988; SIMÕES et al., 1988), imunoestimulante *in vitro* (SIMÕES, RECH e LAPA, 1986; PUHLMANN et al., 1992), mutagênica e genotóxica em procariontes (VARGAS et al., 1990), antioxidativa *in vitro* (DESMARCHELIER, COUSSIO e CICCIA, 1998), mutagênica sobre *Aspergillus nidulans* (FERRARI, GIUSTI e CARNEIRO, 1993), citotóxica contra carcinoma hepático humano *in vitro* (RUFFA et al., 2002), hepatoprotetora (KADARIAN et al., 2002) e anti-hiperglicêmica em ratos (CARNEY et al., 2002).

Segundo Almeida (1993), a atividade mutagênica *in vitro* em *Salmonella* e *Escherichia coli* pode explicar seu uso popular na disenteria, diarreia e infecções intestinais.

A atividade antiviral de espécies de *Achyrocline* pode ser representada por *A. flaccida* (Weinm.) DC. (GARCIA et al., 1995) e por *A. satureioides*, que possuem atividade antiviral para *Herpesvírus* (ZANON et al., 1999; BETTEGA et al., 2004) e HIV (ABDEL-MALEK et al., 1996).

Hnatyszyn et al. (2004) utilizando extratos etanólicos das partes aéreas de *A. satureioides* comprovaram o significativo efeito dose-dependente vasorelaxante dos flavonóides (quercetina e quercetina 3-metil éter) sobre a musculatura lisa dos corpos cavernosos de suínos da Guiné. Além disso, foi demonstrado que o número de grupos metil (Me) no núcleo da quercetina não teve influência significativa sobre a efetividade desses compostos.

Polydoro et al. (2004) avaliaram as propriedades antioxidantes de 5 diferentes extratos obtidos das inflorescências de *A. satureioides*. Todos os extratos apresentaram potencial antioxidante significativo, o qual aumentou na presença de plasma humano. A caracterização dos flavonóides em cada extrato demonstrou que FDP 80 (etanol 80%) e FFr (fração enriquecida de flavonóides), continham alto teor de flavonóides. A citotoxicidade dos extratos foi determinada em cultura de células de Sertoli, demonstrando que FDP 80 e FFr foram altamente tóxicos na maioria das concentrações testadas. Os extratos levaram a um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica em células de Sertoli. Os resultados sugerem que os extratos de ervas medicinais que contêm altas concentrações de flavonóides e mostram

maior proteção antioxidante *in vitro* nem sempre são os que podem produzir o maior benefício.

Demo et al. (2005) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais obtidos de 14 plantas medicinais da república da Argentina. Os microorganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e levedura de *Candida albicans*. O método de difusão de disco foi realizado para testar atividade antimicrobiana. *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foram inibidos pela maioria dos óleos essenciais. *Aloysia triphylla*, *Psila spartoides* e *Anemia tomentosa* tiveram os compostos mais efetivos contra *Bacillus cereus*, enquanto que *Aloysia triphylla* e *Baccharis flabellata* foram efetivos contra *Staphylococcus aureus*. Nenhum dos óleos inibiu *Pseudomonas aeruginosa*. *Baccharis flabellata* e *Pectis odorata* mostraram-se ativos apenas contra bactérias Gram-positivas. *Aloysia triphylla* e *Psila spartoides* inibiram todos os microorganismos testados, e os óleos essenciais remanescentes demonstraram atividade variada. O estudo contribuiu para ampliar o conhecimento etnobotânico e ajudar a descobrir substâncias com potencial terapêutico inibidor de patógenos.

Calvo et al. (2006) relatam que *A. saturoioides* (infusão) apresenta atividade antimicrobiana para *Staphylococcus* spp. (inibição de 95%) e efeitos imunomoduladores sobre linfócitos humanos (expansão de 40% das células T CD8+).

Segundo Brandão et al. (2006), a importância de *A. saturoioides* levou sua inclusão na primeira edição da Farmacopéia Brasileira.

De acordo com De Souza, Bassani e Schapoval (2007) os flavonóides quercetina, 3-O-metil quercetina e luteolina, presentes no extrato etanólico de *A. saturoioides*, são de fundamental importância no processo antiinflamatório, quando administrado por via intraperitoneal.

Segundo Fachinetti et al. (2007), as infusões de *A. saturoioides* possuem ação antiproliferativa sobre o ciclo celular de *Allium cepa* e ação inibitória da divisão celular que aumenta de acordo com a concentração, bem como após o armazenamento (30 meses).

Consentino et al. (2008) relatam que *A. saturoioides* (infusão) pode exercer diversos efeitos imunomoduladores como agente antiinflamatório em células

mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e em leucócitos polimorfonucleares.

Os produtos medicinais de origem vegetal (*Herbal Medicine Products - HMPs*), já possuem uma pequena documentação na literatura (Web of Knowledge, 2009). Independente da situação sócio-econômica, o relato de uso de plantas medicinais atinge diferentes países e geralmente predomina o conceito de que estes produtos são uma alternativa segura, desprovida de riscos (ERNST, 2002; LANINI et al., 2009), quando comparados a drogas convencionais.

Inúmeros produtos de origem vegetal são utilizados pela população, sendo que o percentual de grávidas usuárias em alguns países já foi registrado (ERNST, 2002). O uso desses produtos por grávidas e a ocorrência de efeitos indesejáveis como abortivos (LANINI et al., 2009), partos prematuros, problemas cardíacos no feto ainda necessitam de comprovação, entretanto uma série de ocorrências tem forte evidência de que as plantas podem induzir, por exemplo, malformação, aborto espontâneo, doenças hepato-veno-oclusiva, inclusive com relatos de mortes e outros (ERNST, 2002).

Apesar de alguns estudos já realizados, a possibilidade de efeitos tóxicos dos extratos de *A. alata* ainda é pouco conhecida, ainda mais quando se considera que é muito utilizada pela população e que o uso inadequado pode originar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos, interações medicamentosas ainda não estudadas e dificilmente reconhecidas, além de retardar o diagnóstico e o tratamento apropriado.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Malek SJ, Bastien W, Mahler Q, Jia M, Reinecke W, Robinson Jr, Shu Y y Zalles-Asin J. Drug leads from the Kallawaya Herbalists of Bolivia. 1. Background, Rationale, Protocol and Anti-HIV Activity. J. Ethnopharmacol. 1996; 50:157-166.

Almeida ER. Plantas Medicinais Brasileiras, conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Ed. Hemus Ltda; 1993. p. 341.

Araújo PWB, Quintans Júnior LJ, Vasconcelos HD, Almeida JRGS. Flavonóides e Hipertensão. Rev Bras Hipert. 2005; 12(3):188-9.

Barroso GM, Guimarães EF, Ichaso CIF, Costa CG, Peixoto AI. "Família Compositae". In: Sistemática de Angiospermas do Brasil. 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária; 1991. p. 237-74.

Bauer L, Simões CMO, De Siqueira NCS, Schenkel EP; Silva GAAB, Alice CB. Flavonoids of the inflorescences of *Achyrocline alata*. Rev Lat Am Quim. 1989; 20(2):68-9.

Bettega JMR, Teixeira H, Bassani V., Barardi CRM, Simões CMO. Evaluation of the Antiherpetic Activity of Standardized Extracts of *Achyrocline satureioides*. Phytother Res. 2004; 18(10):819-23.

Bohlmann F, Abraham WR, Robinson H, King RM. A new labdane derivative and geranylphloroglucinols from *Achyrocline alata*. Phytochemistry. 1980; 19:2475-77.

Bohlmann F, Burkhardt T, Zdero C. Naturally Occurring Acetylenes. London; Academic Press; 1977. p, 352.

Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16:408-420.

Bremer, K. Asteraceae: Cladistics and Classification. Portland. Oregon: USA; Timber Press. 1994. p. 752.

Broussalis AM, Ferraro GE, Coussio JD. Phenolic constituents of *Achyrocline alata*. *Biochem Systemat Ecol.* 1993; 21(2):306.

Broussalis AM, Ferraro GE, Gurni A, Coussio JD. Aspectos fitoquímicos de espécies argentinas del género *Achyrocline*. *Acta Farm Bonaerense.* 1989; 8:11-16.

Broussalis AM, Ferraro GE, Gurni A, Coussio JD. Phenolic constituents of Four *Achyrocline* Species. *Biochem Systemat Ecol.* 1988; 16(4):401-2.

Burkart A. Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina). Buenos Aires, Colecion Científica del INTA,. 1974; 6(6):106-554.

Calvo D, Cariddi M, Grosso M, Demo MS, Maldonado AM. *Achyrocline satuireioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2006; 48(3-4):247-55.

Carney JR, Krenisky JM, Williamson RT, Luo J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the south american medicinal plant *Achyrocline satuireioides*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65:203-7.

Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. vol. 5. Rio de Janeiro: IBDF, Imprensa Nacional; 1978. p. 16.

Cosentino M, Bombelli R, Carcano E, Luini A, Marino F, Crema F, Dajas F, Lecchini S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satuireioides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. *J Ethnopharmacol.* 2008; 116(3):501-7.

Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Ver Virtual Quim.* 2009; 1(3): no prelo.

Demo M, de Las MOM, Lopez ML, Zunino MP, Zygadlo JA. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical biology.* 2005; 43(2):129-34.

de Souza KC, Bassani VL, Schapoval EE. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine*. 2007; 14(2-3):102-8.

Desmarchelier C, Coussio J, Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31:1163-70.

Ernst E. Herbal medicinal product during pregnancy? *Phytomedicine*. 2002; 9(4):352-54.

Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, da Silva ACF, Tedesco SB. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn*. 2007; 17(1):49-54.

Ferrari N, Giusti SC, Carneiro MR. Mutagenic activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Compositae) detected by the bimeth system in *Aspergillus nidulans*. *Rev Bras Genet*. 1993; 16(2):275-82.

Ferraro GE, Norbedo C, Coussio JD. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochem*. 1981; 20:2053-4.

Garcia GH, Cavallaro L, Broussalis A, Ferraro G, Martino V, Torres R, Coussio J, Campos R. Antiviral activity of *Achyrocline fl accida* Wein DC aqueous extract. *Phytother Res*. 1995; 9:251-4.

Gerard L, Menut CM, Bessiere JM, Schenkel EP, Dos Santos MA, Bassani V. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. *Lab. Chim. Org. Phys., Univ. Montpellier II, Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, Fr. J Essential Oil Research*. 1991; 3(5):317-21.

Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. *Life Sci*. 2002; 71:693-705.

Hansel R, Cubukcu B. 3,5-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon aus *Helichrysum graveolens* *Phytochemistry*. 1972; 11(8): 2632.



Hansel R, Ohlendorf D. A new flavone from *Achyrocline satureioides* unsubstituted in ring B. Arch. Pharm. 1971; 304(12): 893-6.

Harborne JB, Mabry WTJ. The Flavonoids Advances in Research. London: Chapman and Hall; 1982.

Hilgert NI. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. J Ethnopharmacol. 2001; 76(1):11-34.

Hnatyszyn O, Moscatelli V, Rondina R, Costa M, Arranz C, Balaszczuk A, Coussio J, e Ferraro G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus Cavernosum. Phytomedicine. 2004; 11:366-9.

Kadarian C, Broussalis AM, Mino J, Lopez P, Gorzalczany S, Ferraro G, Acevedo C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C., Pharmacol Res. 2002; 45(1):57-61.

Kaloga MR, Hänsel EM, Cybulski EM. Isolierung eines kawapyrons aus *Achyrocline satureioides*. Planta Med. 1983; 48:103-104.

Labuckas DO, Maestri DM, Grosso NR, Zygodlo JA. Essential Oil of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. Planta Med. 1999; 65(2):184-6.

Langeloh A, Schenkel E.. Atividade antiespasmódica do extrato alcoólico de *Marcela (Achyrocline satureioides (Lam.) DC.)*: Compositae sobre a musculatura lisa genital de ratos. Cad Farm. 1982; 1(1):38-44.

Lanini J, Duarte-Almeida JM, Nappo S, Carlini EA. "O que vem da terra não faz mal" - relatos de problemas de uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. Rev Bras Farmacogn. 2009; 19(1A):121-29.

Leal PF, Queiroga LC, Rodrigues MVN, Montanari Jr I, Meireles MAA. PHCOG MAG.: Research Article Global Yields, Chemical Compositions, and Antioxidant activities of extracts from *Achyrocline alata* and *Achyrocline satureioides*. Pharmacognosy Magazine. 2006; 2(7):153-9.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum; 2002. p.131-2.

Lorenzo D, Atti-Serafini L, Santos A, Frizzo CD, Paroul N, Paz D, Dellacassa E, Moyna P. *Achyrocline satureioides* essential oils from southern Brazil and Uruguay. *Planta Med.* 2000; 66:476-7.

Marques FC, Barros IBI. Crescimento inicial de marcela (*Achyrocline satureioides*) em ambiente protegido. *Ciênc Nat.* 2001; 31(3):517-8.

Merxmiiller H, Leins P, Roessler H. The Biology and Chemistry of the Compositae. In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL. London; Academic Press; 1977. p. 577.

Mesquita AAL, Correa DB, Padua AP, Guedes MLO, Gottlieb OR. Flavonoids from four Compositae species. *Phytochem.* 1986; 25:1255-6.

Nunes GP, Silva MF da, Resende UM, Siqueira JM de. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2003; 13(2):83-92.

Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 2.ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF; 1984.

Polydoro M, de Souza KCB, Andrades ME, da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EES, Bassani VL, Moreira JCF. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sci.* 2004; 74(23):2815-26.

Puhlmann J, Knaus U, Tubaro L, Schaefer W, Wagner H. Immunobiologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry* 1992; 31(8):2617-21.

Ritter MR, Sobierajski GR, Schenkel EP, Mentz LA. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2002; 12:51-62.

Rodrigues RAF, Queiroga CL, Rodrigues MVN, Foglio MA, Sartoratto A, Montanari Jr. Study of the variation of the composition of the essential oil of leaves and flowers of *Achyrocline alata* (D.C.) along a period of the day. J. Essent. Oil Res. 2002; 14(4):280-1.

Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J. Ethnopharmacol. 2002; 79(3):335-9.

Simões CMO, Schenkel EP, Bauer L, Langeloh A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. J. Ethnopharmacol. 1988; 22(3):281-93.

Simões CMO. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. Fitoterapia. 1988; 59(5):419-421.

Simões CMO. Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela). Tese de Mestrado. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Farmácia); 1984. 186p.

Simões CMO, Rech N, Lapa AJ. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcelas). Cad Farm. 1986; 2:37-54.

Vargas VM, Motta VE, Leitão AC, Henriques JA. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureioides* on prokaryotic organism. Mutat Res. 1990; 240(1):13-18.

Vendruscolo GS, Rates S, Mentz LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Rev Bras Farmacogn 2005; 15:361-72.

Zanon SM, Ceriatti FS, Rovera M, Sabini LJ, Ramos BA. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. Rev. Latinoamer. Microbiol. 1999; 41(2):59-62.

## EXPERIMENTO II- *Achyrocline alata*

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Achyrocline* (Less.) DC., pertencente à família Asteraceae, inclui cerca de 30 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, não só no Brasil como também nas Américas do Sul e Central e na África, incluindo Madagascar (BREMER et al., 1994). Na América do Sul, são encontradas *A. alata*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* e *A. satureioides* (SONAGLIO, 1987; DE SOUZA, SCHAPOVAL e BASSANI 2002).

Muitas espécies de *Achyrocline* crescem em regiões secas; algumas em áreas muito extensas como, por exemplo, *A. satureioides* (Lam.) DC. e outras restritas, como *A. ramosissima* (Sch. Bip.) Rusby, encontrada na Argentina, Peru e Bolívia em altitudes acima de 2000 m (CORRÊA, 1978; BROUSSALIS et al., 1988).

A sistemática do gênero *Achyrocline* é muito problemática e a classificação de cada espécie ainda não está bem definida. Apesar de algumas espécies serem amplamente utilizadas, são poucas as informações disponíveis sobre suas propriedades terapêuticas, sendo que algumas podem estar relacionadas às altas concentrações de polifenóis (BROUSSALIS et al., 1988).

Em algumas regiões do Brasil, *Achyrocline alata* (Kunth) DC., é popularmente conhecida como marcela ou macela e no Mato Grosso do Sul (MS) como Jataí-Kaá, Jateí-Kaá ou jateí-ka-há. Por meio de um levantamento realizado em Campo Grande/MS foi detectado junto aos raizeiros informações referentes às partes usadas (raízes, caule ou casca de caule, fruto, semente etc), modo de preparo, vias de administração e indicações terapêuticas das plantas mais utilizadas pela população rural e urbana. Em 1992, *A. alata* era comercializada somente na forma de flores e apresentava um alto índice de contaminação por insetos e sujidades. A partir de 2002, à adição de caules e folhas passaram a totalizar mais de 50% do peso em todas as amostras adquiridas, motivo adicional para atestar sua reprovação para consumo humano. *A. alata* foi considerada a terceira planta mais solicitada pela população de Campo Grande/MS aos raizeiros e/ou por eles indicadas, sendo utilizada a parte aérea para infecção no útero e próstata, hérnia, apendicite, dores no estômago, labirintite e bronquite. Esta espécie, juntamente com outra do mesmo gênero – *A. satureioides* (Lam.) DC., são utilizadas de forma indistinta, sendo a primeira considerada sucedânea desta última (NUNES et al., 2003).

Segundo Lorenzi e Matos (2002), *A. alata* e *A. satureioides* apresentam propriedades e características muito semelhantes e, seus constituintes químicos (compostos fenólicos) estão associados a várias propriedades etnofarmacológicas de importância biológica.

Estudos experimentais com *A. satureioides* têm demonstrado ação antiinflamatória (DE SOUZA, BASSANI e SCHAPOVAL, 2007), antiespasmódica e analgésica sobre a musculatura lisa genital de ratos (LANGELOH e SCHENKEL, 1982; SIMÕES, 1988; SIMÕES et al., 1988), imunoestimulante *in vitro* (SIMÕES, RECH e LAPA, 1986; PUHLMANN et al., 1992), mutagênica e genotóxica em procariontes (VARGAS et al., 1990), antioxidativa *in vitro* (DESMARCHELIER, COUSSIO e CICCIA, 1998; POLIDORO et al., 2004), mutagênica sobre *Aspergillus nidulans* (FERRARI, GIUSTI e CARNEIRO, 1993), citotóxica contra carcinoma hepático humano *in vitro* (RUFFA et al., 2002), hepatoprotetora (KADARIAN et al., 2002), anti-hiperglicêmica em ratos (CARNEY et al., 2002), relaxante da musculatura lisa em porcos da Guiné (HNATYSZYN et al., 2004), antibacteriana e antifúngica (DEMO et al., 2005).

Em uma comunidade rural na Argentina, o uso popular do infuso das partes aéreas frescas de *A. alata* é indicado para o tratamento de infecções respiratórias e resfriados (HILGERT, 2001).

Calvo et al. (2006) relatam que *A. satureioides* (infusão) apresenta atividade antimicrobiana para *Staphylococcus* spp (inibição de 95%) e efeitos imunomoduladores sobre linfócitos humanos (expansão de 40% das células T CD8+).

Segundo Brandão et al. (2006), a importância de *A. satureioides* levou sua inclusão na primeira edição da Farmacopéia Brasileira.

De acordo com De Souza, Bassani e Schapoval (2007) os flavonóides quercetina, 3-O-metil quercetina e luteolina, presentes no extrato etanólico de *A. satureioides*, são de fundamental importância no processo antiinflamatório, quando administrado por via intraperitoneal.

Segundo Fachinetto et al. (2007), as infusões de *A. satureioides* possuem ação antiproliferativa sobre o ciclo celular de *Allium cepa* e essa ação inibitória da divisão celular aumenta de acordo com a concentração, bem como após o armazenamento (30 meses).

Consentino et al. (2008) relatam que *A. saturoioides* (infusão) pode exercer diversos efeitos imunomoduladores como agente antiinflamatório em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e em leucócitos polimorfonucleares.

Apesar de se observar certos avanços na literatura de plantas medicinais, poucos estudos químicos e biológicos foram conduzidos com *A. alata*, especialmente os que estão relacionados com a possibilidade de intoxicações. O conhecimento sobre os efeitos de *A. alata* no organismo é de fundamental importância, sobretudo, quando se considera que é muito utilizada pela população e não há informações disponíveis sobre posologia, tempo de utilização, possibilidade de ação tóxica e risco de malformações e/ou aborto em caso de desenvolvimento gestacional.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o risco toxicológico da exposição ao extrato hidroetanólico seco das sumidades floridas de *A. alata* no sistema reprodutivo de ratas Wistar e em seus fetos, a fim de confirmar sua segurança na dose preconizada pela utilização na medicina popular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os sinais indicativos de toxicidade materna: clínicos, consumo (ração e água filtrada), toxicidade de órgãos, perdas sanguíneas vaginais e ocorrência de morte;
- Avaliar o desempenho reprodutivo materno e o desenvolvimento dos seus fetos;
- Verificar a possibilidade de alterações anatômico-histológicas nos órgãos (baço, fígado e rins) das ratas e em seus fetos;
- Comparar o processo de ossificação, desenvolvimento do sistema nervoso e das vísceras dos fetos;
- Verificar a possibilidade de alterações histológicas nas placentas e variações e/ou malformações nos fetos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedência e Coleta do Material Botânico

As inflorescências de *A. alata* (Asteraceae) foram coletadas (abril de 2002) de mais de um espécime no Horto de Plantas Medicinais (HPM) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados/MS, pela Dra. Maria do Carmo Vieira.

A espécie vegetal já havia sido identificada pela Dra Lilian Auler Mentz (UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) e as exsicatas encontram-se depositadas como documento taxonômico no Herbário CGMS do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS / UFMS, Campo Grande, MS, Brasil) sob número de registro 11.486.

#### 3.2 Obtenção do Extrato Vegetal

As inflorescências de *A. alata* (Jateí-kaá) foram extraídas exaustivamente pelo processo de percolação, ou seja, maceração com etanol 70° GL por 6 h ao abrigo da luz, seguida de extração (gotejamento a 1 mL/min). Os extratos obtidos foram reunidos e concentrados em rotavapor, um sólido amorfo foi obtido e mantido em dessecador até a total secagem (6 dias). Obteve-se um sólido vítreo, que foi triturado em cápsula de porcelana, fornecendo um pó amorfo de coloração marrom-amarelado, com rendimento de 19% (Farmacopéia Brasileira, 4 ed.).

#### 3.3 Animais de Experimentação

Utilizou-se ratas albinas (*Rattus norvegicus*) Wistar nulíparas, heterogênicas, de padrão sanitário convencional, com cerca de dois meses de idade, pesando aproximadamente  $200 \pm 20$  g, cedidas pelo Biotério Central da UFMS.

O número total de animais fornecidos pelo Biotério foi de 62 fêmeas e 12 machos com idade de 63 e 92 dias de nascidos, respectivamente.

Os animais foram alojados em gaiolas (caixas) de polipropileno (49X34X26 cm), providas de camas de maravalha selecionadas (*Pinnus* sp – não esterilizada), bebedouro plástico para água e cocho para ração comercial do tipo peletizada. As gaiolas eram higienizadas três vezes por semana. Durante todo procedimento experimental, água filtrada e comida (ração peletizada para ratos Nuvilab CR1-Nuvital, Curitiba-PR) foram fornecidas “*ad libitum*”.



Os animais foram mantidos sob condições padronizadas de climatização (Estante ventilada): temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar entre 55 e 75% e fotoperíodo de 12 horas (ciclo invertido: 06:00 – 18:00 escuro, 18:00 – 06:00 claro).

Os experimentos foram conduzidos (março e abril/2008) no Laboratório de Biologia Geral do Departamento de Biologia (DBI) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFMS.

O protocolo para uso de animais em experimentação (nº 115/2006) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS. Foram seguidos os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo atual Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

### **3.4 Determinação da Dosagem**

A dosagem de 3,9 mg/animal/dia (mg/kg de peso corpóreo) foi determinada com base na dose preconizada pela utilização na medicina popular, consumo diário de três a quatro xícaras de chá preparado com as inflorescências em infusão (BALBACH, 1986; FREITAS, 1992), e fazendo a proporção em termos de peso corpóreo, tendo como base um adulto de 70 kg.

### **3.5 Grupos e Delineamento Experimental**

No rato, o implante do blastocisto no útero materno ocorre até o quinto dia de prenhez (DP), a organogênese vai do sexto ao décimo quinto dia e deste até o vigésimo primeiro ocorre o desenvolvimento fetal (MANSON e KANG, 1989). O período mais crítico do desenvolvimento é o da organogênese, quando tecidos e órgãos estão se diferenciando rapidamente, ficando susceptíveis a interferências de agentes externos (teratógenos) capazes de alterar seu desenvolvimento aumentando a incidência de anomalias congênitas (MOORE e PERSAUD, 2004).

Para a realização do experimento, 40 ratas prenhes foram distribuídas, randomicamente, em quatro grupos experimentais (dois grupos controles e dois grupos tratados) com 10 animais cada.

Os grupos foram submetidos ao seguinte esquema de tratamento diário:

- Grupo Controle 1 (C1): recebeu, via gavagem, 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º DP;
- Grupo Tratado 1 (T1): recebeu, via gavagem, extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada do 1º ao 20º DP;
- Grupo Controle 2 (C2): recebeu, via gavagem, 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP;
- Grupo Tratado 2 (T2): recebeu, via gavagem, extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada do 6º ao 15º DP.

Todos os demais subitens de Material e Métodos foram conduzidos e efetuados de forma idêntica ao do Experimento I – *Maytenus ilicifolia*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Toxicidade Materna

Quando os grupos experimentais foram comparados por meio de sinais clínicos de toxicidade, não foram registradas mortes maternas, eriçamento dos pêlos corporais, alteração da deambulação (hipo ou hiperatividade locomotora) e diarreia.

O acompanhamento diário da evolução gestacional demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto ao peso corpóreo, ganho de peso e ganho de peso líquido. Portanto, não houve variações, todas as ratas ganharam peso entre o início da gestação, o tratamento e a data da eutanásia, indicando uma gestação normal sem efeito dos tratamentos (Fig. 22 e 23).

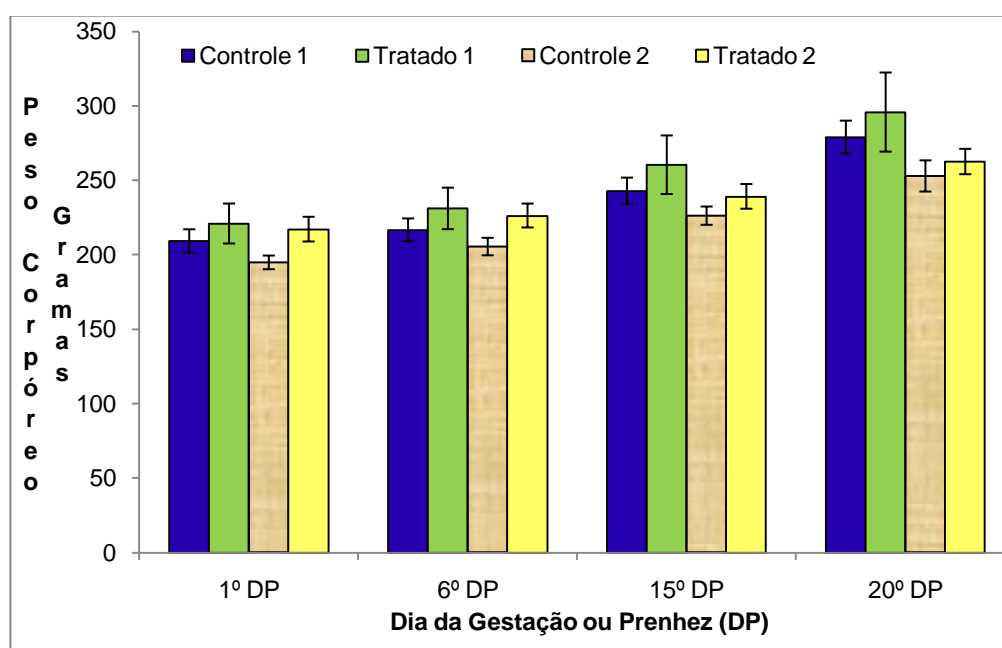


Figura 22 - Peso corpóreo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes no 1º, 6º, 15º e 20º dia(s) de prenhez (DP) nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009.

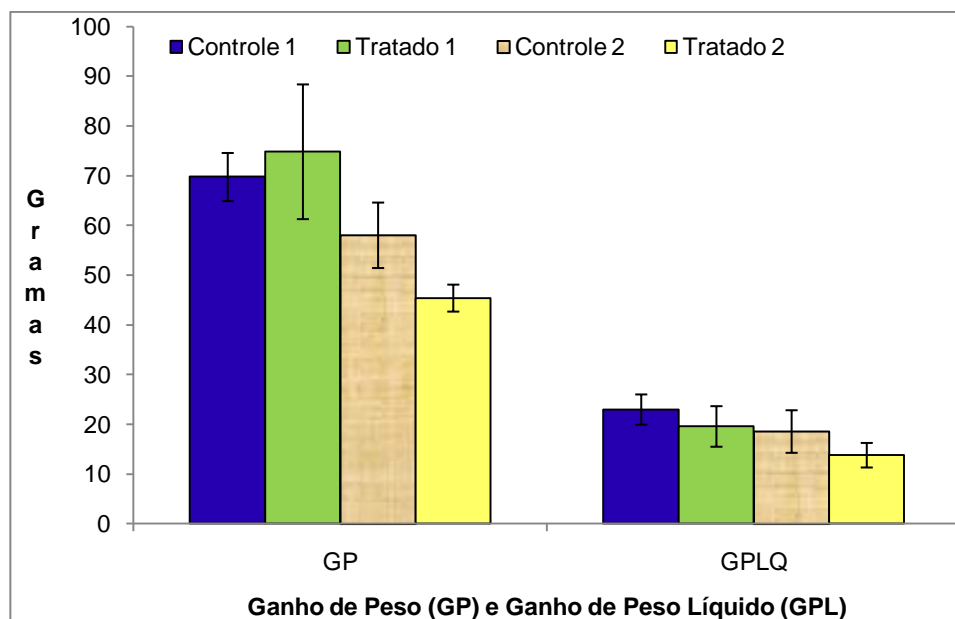


Figura 23 - Ganho de peso e ganho de peso líquido (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP e tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p > 0,05$ . Campo Grande (UFMS), 2009.

Outro critério indicativo de toxicidade materna refere-se às alterações no consumo de alimento e água. A estimativa do consumo médio de água filtrada do 2º ao 6º DP (M2-6) foi similar entre os grupos experimentais. Não houve efeito dos tratamentos, quanto ao consumo de água, durante os cinco primeiros dias (M2-6) de administração dos tratamentos. Por outro lado, considerando a estimativa do consumo médio de água do 7º ao 15º DP (M7-15) e do 2º ao 20º DP (M2-20), o grupo experimental T2 apresentou diferenças significativas em relação ao grupo C1 (Fig. 24), isto é, durante nove dias após o intervalo M2-6 e também considerando todo o intervalo M2-20 (19 dias). A redução no consumo de água do grupo tratado durante o período de organogênese (T2) só foi detectada quando comparada com o grupo controle que recebeu água durante todo período gestacional (C1).

Com relação à estimativa do consumo médio de água do 16º ao 20º DP (M16-20), os grupos experimentais C2 e T2 apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo C1 (Fig. 24). A redução no consumo de água nos últimos cinco dias (M16-20) de administração dos tratamentos foi detectada nos grupos controle e

tratado durante o período de organogênese (C2 e T2), quando comparada com o grupo controle que recebeu água durante todo período gestacional (C1).

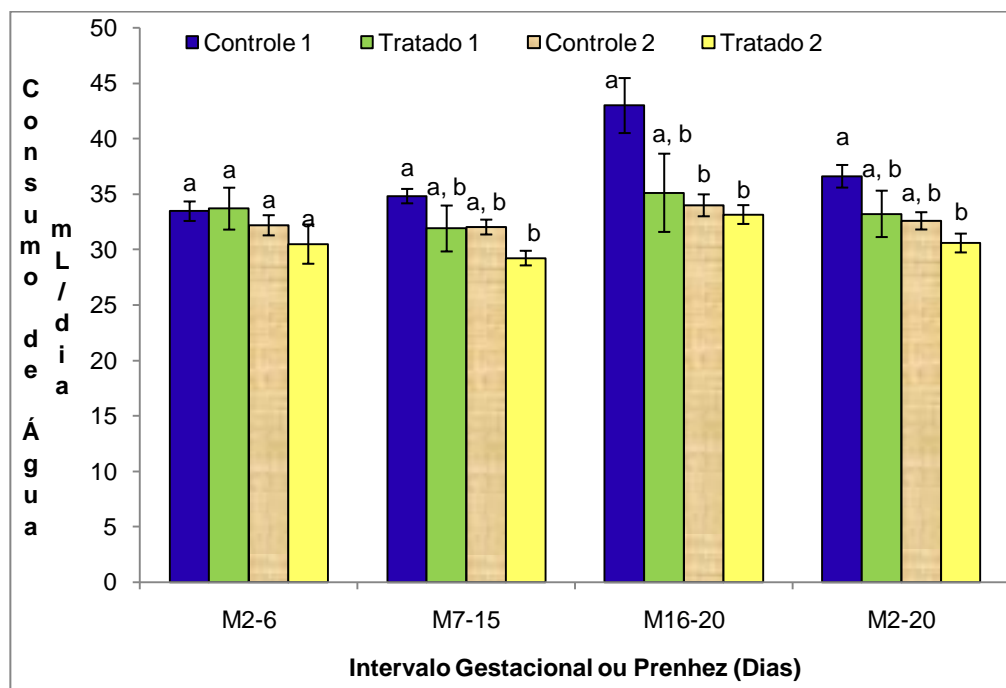


Figura 24 - Estimativa do consumo de água filtrada (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009.

Com relação à estimativa do consumo médio de ração comercial do 2º ao 6º DP (M2-6) e do 16º ao 20º DP (M16-20), os resultados foram similares entre os grupos experimentais (Fig. 25). Não houve efeito dos tratamentos, quanto a consumo de ração, durante os cinco primeiros (M2-6) e os últimos cinco dias (M16-20) de administração dos tratamentos. Entretanto, considerando a estimativa do 7º ao 15º DP (M7-15), os grupos experimentais C2 e T2 diferiram, significativamente, do T1 (Fig. 25). A redução no consumo de ração dos grupos C2 e T2 durante o período de organogênese só foi detectada quando comparada com o grupo tratado durante todo período gestacional (T1).

Considerando a estimativa do 2º ao 20º DP (M2-20), o grupo experimental T2 diferiu, significativamente, do T1 (Fig. 25). A redução no consumo de ração do grupo tratado durante o período de organogênese (T2) só foi detectada, quando comparada com o grupo tratado durante todo período gestacional (T1).

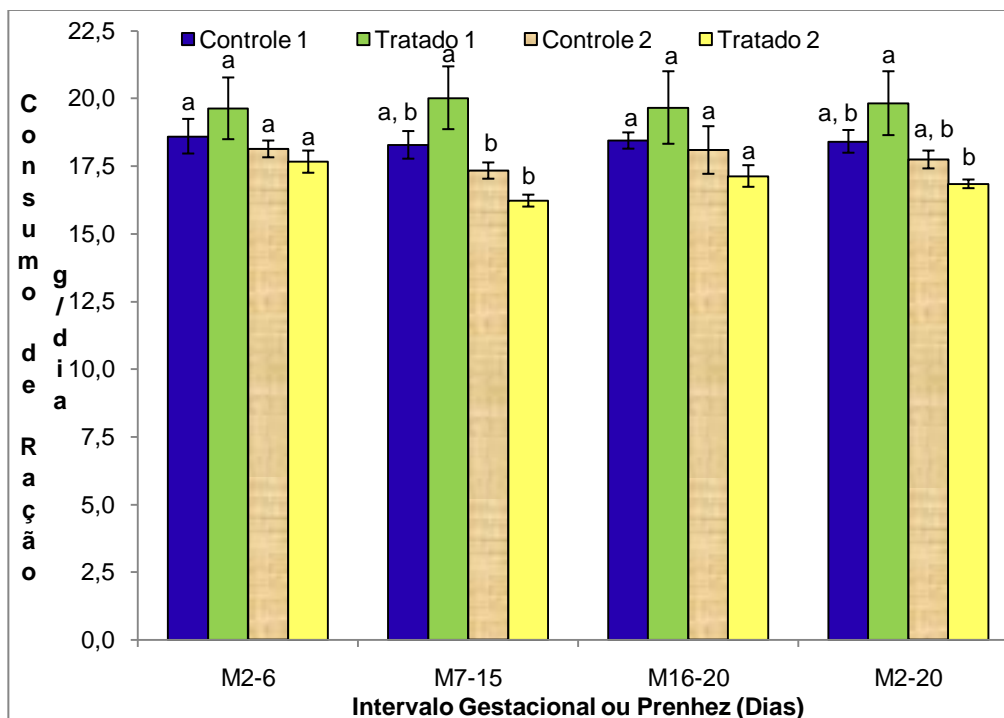


Figura 25 - Estimativa do consumo de ração comercial (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas prenhes nos grupos experimentais: controle 1 (C1) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); tratado 1 (T1) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; controle 2 (C2) - receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; tratado 2 (T2) - receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; média de consumo do 2º ao 6º DP (M2-6); média de consumo do 7º ao 15º DP (M7-15); média de consumo do 16º ao 20º DP (M16-20) e média de consumo do 2º ao 20º DP (M2-20). Letras diferentes no mesmo intervalo gestacional indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). Campo Grande (UFMS), 2009.

Tomados em conjunto, os resultados parecem indicar presença de efeitos tóxicos de *A. alata* relativos ao consumo de água durante o período de organogênese e relativos ao consumo de ração tanto no período de organogênese quanto durante todo período gestacional.

Encontram-se descritos na Tabela 5, os valores referentes ao peso absoluto e relativo dos órgãos maternos nos grupos experimentais.

Tabela 5. Peso (média  $\pm$  erro padrão da média) absoluto (PA) e relativo (PRel) dos órgãos maternos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
PA Baço (mg)	519,20 $\pm$ 10,70 <sup>b</sup>	622,50 $\pm$ 35,80 <sup>a</sup>	547,70 $\pm$ 15,20 <sup>a, b</sup>	577,00 $\pm$ 13,50 <sup>a, b</sup>
PRel	0,1878 $\pm$ 0,0056 <sup>a</sup>	0,2210 $\pm$ 0,0175 <sup>a</sup>	0,2195 $\pm$ 0,0097 <sup>a</sup>	0,2213 $\pm$ 0,0069 <sup>a</sup>
PA Fígado (g)	11,28 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	12,25 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	10,71 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	10,86 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
PRel	4,0585 $\pm$ 0,0960 <sup>a</sup>	4,2804 $\pm$ 0,4677 <sup>a</sup>	4,2343 $\pm$ 0,1184 <sup>a</sup>	4,1719 $\pm$ 0,1716 <sup>a</sup>
PA Ovários (mg)	170,40 $\pm$ 7,30 <sup>a</sup>	188,10 $\pm$ 15,10 <sup>a</sup>	175,50 $\pm$ 6,70 <sup>a</sup>	179,40 $\pm$ 9,50 <sup>a</sup>
PRel	0,0612 $\pm$ 0,0017 <sup>a</sup>	0,0661 $\pm$ 0,0059 <sup>a</sup>	0,0696 $\pm$ 0,0013 <sup>a</sup>	0,0687 $\pm$ 0,0037 <sup>a</sup>
PA Rins (mg)	1.569,30 $\pm$ 60,30 <sup>a</sup>	1.717,10 $\pm$ 155,70 <sup>a</sup>	1.536,90 $\pm$ 66,20 <sup>a</sup>	1.708,10 $\pm$ 66,60 <sup>a</sup>
PRel	0,5621 $\pm$ 0,0192 <sup>a</sup>	0,5989 $\pm$ 0,0520 <sup>a</sup>	0,6089 $\pm$ 0,0139 <sup>a</sup>	0,6556 $\pm$ 0,0301 <sup>a</sup>
PA Útero com fetos (g)	47,25 $\pm$ 5,22 <sup>a</sup>	55,22 $\pm$ 9,98 <sup>a</sup>	39,46 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>	31,58 $\pm$ 2,71 <sup>a</sup>
PRel	16,6216 $\pm$ 1,4080 <sup>a</sup>	19,0013 $\pm$ 3,2110 <sup>a</sup>	15,3453 $\pm$ 1,2270 <sup>a</sup>	12,0814 $\pm$ 1,0860 <sup>a</sup>
PA Útero sem fetos (g)	4,17 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	4,49 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	3,99 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	3,80 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
PRel	1,4934 $\pm$ 0,0507 <sup>a</sup>	1,6032 $\pm$ 0,1521 <sup>a</sup>	1,5796 $\pm$ 0,1046 <sup>a</sup>	1,4598 $\pm$ 0,0504 <sup>a</sup>

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados). Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

No modelo experimental e na dose utilizada, pode-se constatar que houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Houve efeito dos tratamentos com relação à variável peso absoluto do baço. Os demais órgãos (fígado, ovários, rins e útero materno com fetos e sem fetos) não apresentaram diferenças (Tab. 5).

A análise macroscópica externa dos órgãos maternos (baço, fígado e rins) não revelou nenhuma alteração morfológica perceptível (cor, tamanho, textura, hemorragias e cistos).

#### 4.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário

A Tabela 6 apresenta os valores relativos à fertilidade, desempenho reprodutivo das ratas e análise dos fetos nos grupos experimentais.

Tabela 6. Desempenho reprodutivo (média  $\pm$  erro padrão da média) das ratas e análise dos fetos nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
Nº de corpos lúteos no ovário direito <sup>1</sup>	6,50 $\pm$ 0,86	7,10 $\pm$ 0,92	5,90 $\pm$ 0,85	5,30 $\pm$ 0,45
Nº de corpos lúteos no ovário esquerdo <sup>1</sup>	5,80 $\pm$ 0,70	5,80 $\pm$ 0,53	6,10 $\pm$ 0,57	6,20 $\pm$ 0,83
<b>Nº de corpos lúteos nos ovários<sup>1</sup></b>	<b>12,30 <math>\pm</math> 0,88</b>	<b>12,90 <math>\pm</math> 1,02</b>	<b>12,00 <math>\pm</math> 0,58</b>	<b>11,50 <math>\pm</math> 0,70</b>
Nº de implantes no corno uterino direito <sup>1</sup>	6,00 $\pm$ 0,98	6,20 $\pm$ 1,32	5,30 $\pm$ 0,58	4,80 $\pm$ 0,51
Nº de implantes no corno uterino esquerdo <sup>1</sup>	6,00 $\pm$ 0,68	5,70 $\pm$ 0,54	5,20 $\pm$ 0,66	4,80 $\pm$ 1,02
<b>Nº de implantes nos cornos uterinos<sup>1</sup></b>	<b>12,00 <math>\pm</math> 0,92</b>	<b>11,90 <math>\pm</math> 1,49</b>	<b>10,50 <math>\pm</math> 0,87</b>	<b>9,60 <math>\pm</math> 0,76</b>
Nº de fetos vivos no corno uterino direito <sup>1</sup>	5,30 $\pm$ 0,87	5,60 $\pm$ 1,35	4,50 $\pm$ 0,43	3,70 $\pm$ 0,56
Nº de fetos vivos no corno uterino esquerdo <sup>1</sup>	4,70 $\pm$ 0,67	5,20 $\pm$ 0,53	4,20 $\pm$ 0,77	3,40 $\pm$ 0,70
<b>Nº de fetos vivos nos cornos uterinos<sup>1</sup></b>	<b>10,00 <math>\pm</math> 1,02</b>	<b>10,80 <math>\pm</math> 1,56</b>	<b>8,70 <math>\pm</math> 0,98</b>	<b>7,10 <math>\pm</math> 0,62</b>
Nº de reabsorções no corno uterino direito <sup>1</sup>	0,70 $\pm$ 0,30	0,60 $\pm$ 0,27	0,80 $\pm$ 0,29	1,10 $\pm$ 0,23
Nº de reabsorções no corno uterino esquerdo <sup>1</sup>	1,30 $\pm$ 0,72	0,50 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,21	1,40 $\pm$ 0,43
<b>Nº de reabsorções nos cornos uterinos<sup>1</sup></b>	<b>2,00 <math>\pm</math> 0,94</b>	<b>1,10 <math>\pm</math> 0,46</b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,44</b>	<b>2,50 <math>\pm</math> 0,52</b>
Peso Fetal <sup>1</sup> (g)	2,81 $\pm$ 0,15	2,76 $\pm$ 0,31	2,43 $\pm$ 0,11	2,31 $\pm$ 0,07
Adequação do peso a idade de prenhez		PAIP		PAIP
Comprimento Fetal <sup>1</sup> (cm)	3,59 $\pm$ 0,09	3,54 $\pm$ 0,14	3,45 $\pm$ 0,05	3,47 $\pm$ 0,09
Peso Placentário <sup>1</sup> (g)	0,50 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01
Índice Placentário <sup>1</sup>	0,18 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
Razão Sexual <sup>2</sup> (%)	104,08 $\pm$ 9,34	117,54 $\pm$ 20,67	106,43 $\pm$ 15,24	118,50 $\pm$ 21,74
Taxa de eficiência de implantação <sup>2</sup>	95,50 $\pm$ 1,78	88,73 $\pm$ 6,97	87,00 $\pm$ 5,77	86,20 $\pm$ 7,31
Taxa de perdas pré-implantação <sup>2</sup>	2,50 $\pm$ 1,78	11,27 $\pm$ 6,97	13,00 $\pm$ 5,77	13,80 $\pm$ 7,31
Taxa de perdas pós-implantação <sup>2</sup>	15,79 $\pm$ 8,06	9,26 $\pm$ 3,90	18,26 $\pm$ 4,08	25,66 $\pm$ 4,58
Taxa de reabsorção <sup>2</sup>	15,79 $\pm$ 8,06	9,26 $\pm$ 3,90	18,26 $\pm$ 4,08	25,66 $\pm$ 4,58
Taxa de viabilidade fetal <sup>2</sup>	84,21 $\pm$ 8,06	90,74 $\pm$ 3,90	81,74 $\pm$ 4,08	74,34 $\pm$ 4,58

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados); Recém nascido com peso adequado para a idade de prenhez (PAIP). Teste Estatístico: <sup>1</sup>ANOVA/Tukey, p>0,05; <sup>2</sup>Kruskal-Wallis, p>0,05.



De acordo com os resultados pode-se constatar que não houve diferenças significativas entre os grupos para número de corpos lúteos nos ovários e número de implantes, fetos vivos e reabsorções nos cornos uterinos (Tab. 6). Do mesmo modo, verificou-se que os resultados para tamanho dos fetos, assim como seu peso corpóreo e de suas placentas, índice placentário e taxas (implantação, perdas pré e pós-implantação, reabsorção e viabilidade fetal) encontravam-se semelhantes entre os grupos (Tab. 6). Sendo assim, os tratamentos não alteraram as condições fisiológicas e intra-uterinas relacionadas com a reprodução e desenvolvimento fetal.

Em nenhum dos grupos estudados foi registrado fetos mortos e desvio da proporção esperada de 1:1 para razão sexual (Tab. 6). Portanto, os tratamentos não afetaram os processos de organogênese e diferenciação sexual dos fetos.

### 4.3 Desenvolvimento das Ninhadas

#### 4.3.1 Análise Visceral

Não foram observadas alterações macroscópicas externas nos fetos dos grupos controles e tratados, assim como no sistema urogenital dos mesmos (Foto 17).

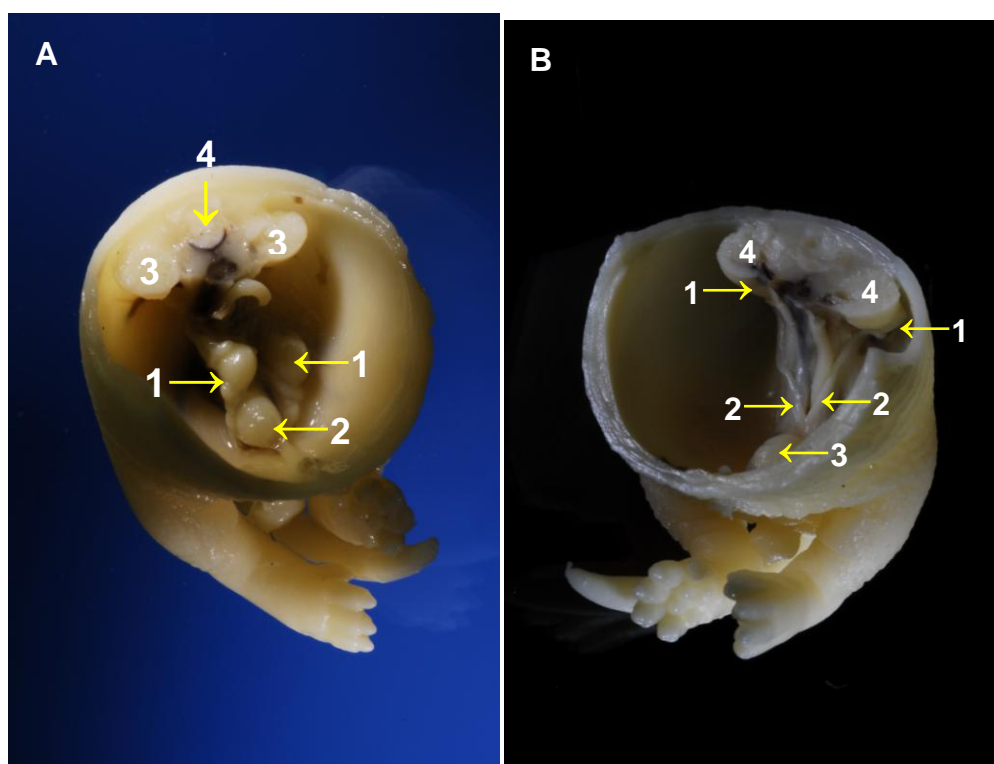


Foto 17 – Corte transversal na região pélvica normal em feto do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Aspecto Normal do Sistema Urogenital: (A) Maculino: 1 – Testículos, 2 – Bexiga, 3 – Rins, 4 – Medula espinhal; (B) Feminino: 1 – Ovários, 2 – Cornos uterinos (útero bicórneo), 3 – Bexiga, 4 - Rins. Campo Grande (UFMS), 2009.

Em todos os grupos estudados foram constatadas hidrocefalias (Foto 18).

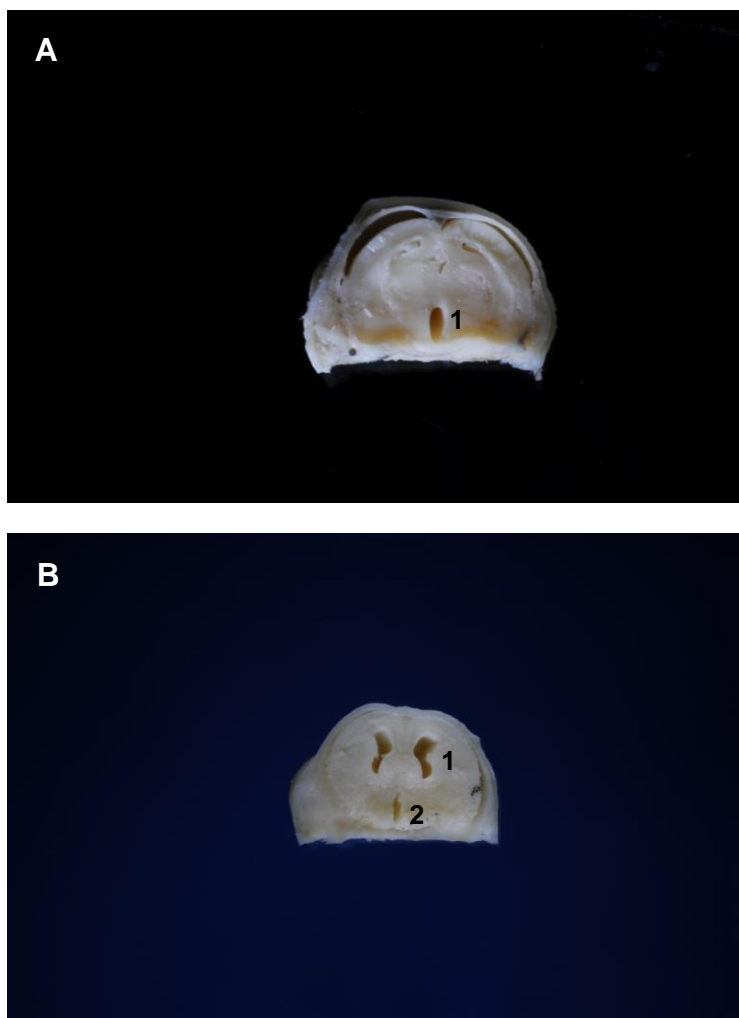


Foto 18 – Corte frontal na região do vértex em feto do grupo Controle 1 (C1) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. (A) Aspecto Alterado (Dismórfico): 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação do terceiro e quarto ventrículos; (B) 1 - Hidrocefalia à custa de dilatação dos ventrículos laterais, 2 - terceiro e quarto ventrículos. Campo Grande (UFMS), 2009.

Foi constatado um caso de hidronefrose nos grupos C1 e T1 e três casos nos grupos C2 (Foto 19) e T2.

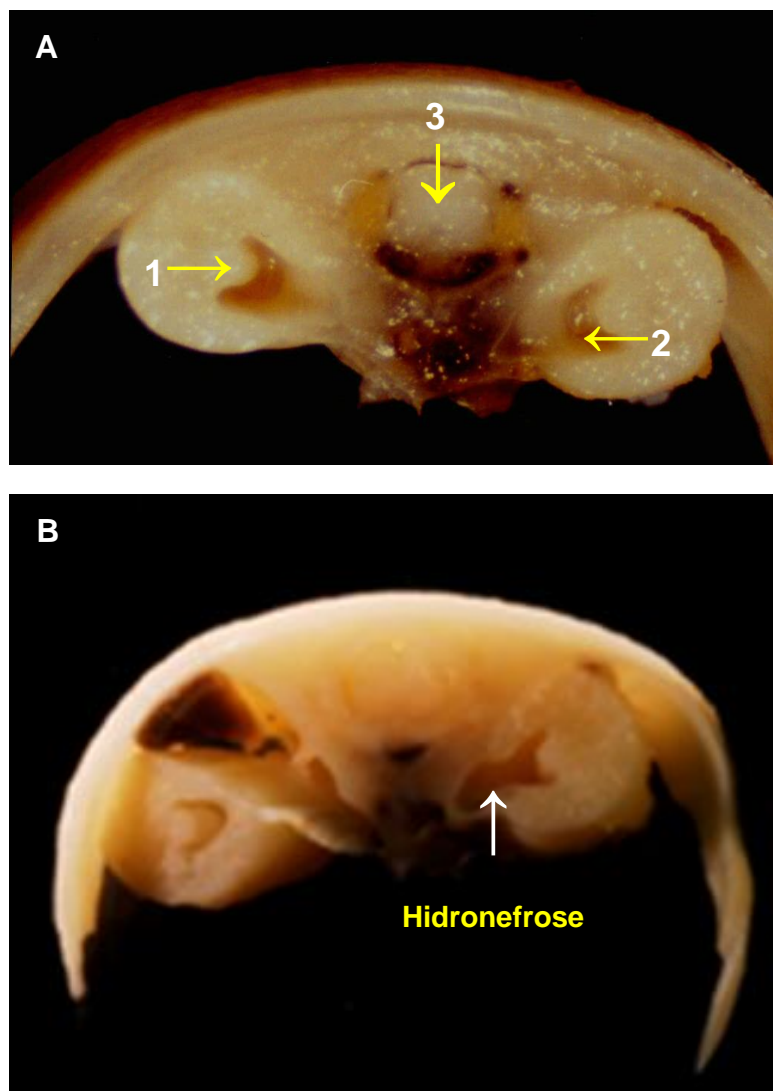


Foto 19 – Corte transversal de rim em feto do grupo Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. (A) Aspecto Normal do Rim: 1 – Papila renal, 2 – Pelve renal, 3 – Medula espinhal. (B) Aspecto dismórfico do rim - Hidronefrose. Campo Grande (UFMS), 2009.

As alterações foram consideradas variantes do normal, uma vez que, estatisticamente, não houve diferenças significativas entre os grupos controles e tratados (Tab. 7).

Tabela 7. Anomalias viscerais fetais (médias  $\pm$  erro padrão) observadas nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	C1 (n=10)	T1 (n=10)	C2 (n=10)	T2 (n=10)
Total de Fetos	34	35	29	24
Hidrocefalia	57,17 $\pm$ 10,85	56,00 $\pm$ 11,38	44,00 $\pm$ 10,84	59,67 $\pm$ 14,93
Hidronefrose	2,50 $\pm$ 2,50	5,33 $\pm$ 3,69	9,50 $\pm$ 5,40	22,50 $\pm$ 13,15
Total de Anomalias	59,67 $\pm$ 10,30	61,33 $\pm$ 10,50	53,50 $\pm$ 12,44	82,17 $\pm$ 10,67

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados). Teste Estatístico: Kruskal-Wallis/Dunn,  $p > 0,05$ .

### 4.3.2 Análise Esquelética

As variações observadas, em função da idade gestacional dos fetos, foram discriminadas por região anatômica e tipo (Foto 20 a 21).

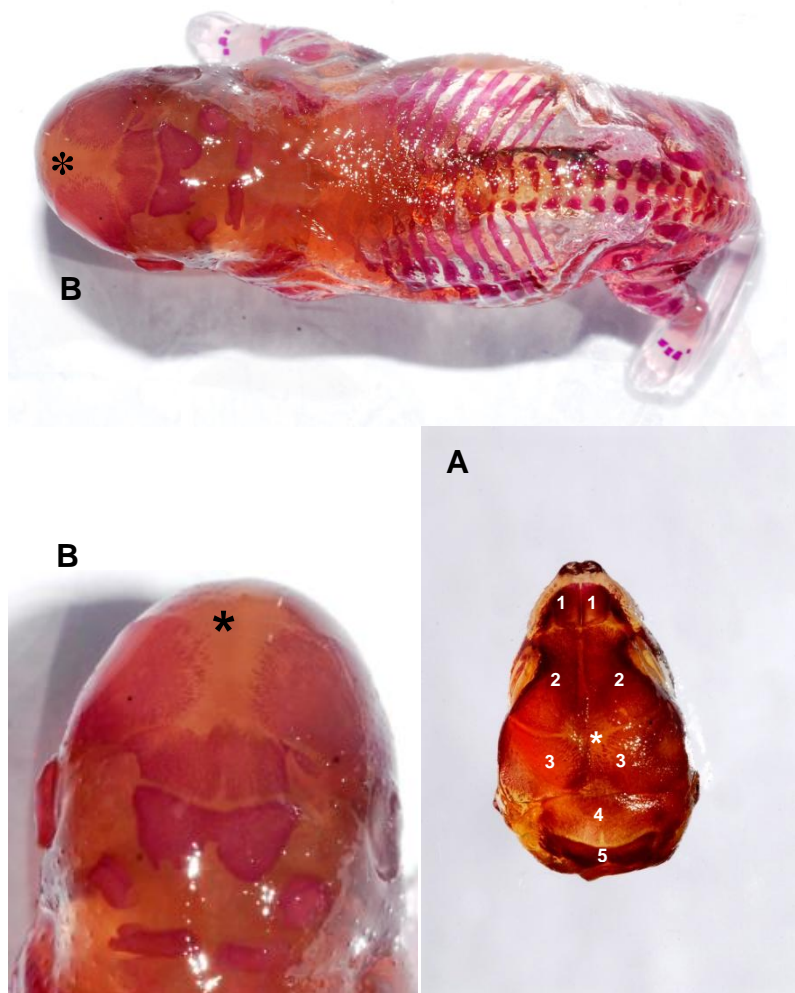


Foto 20 – Vista da ossificação craniana em feto do grupo Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP. (A) Fontanela Normal (\*), 1 - nasal, 2 - frontal, 3 - parietal, 4 - interparietal, 5 - supraoccipital. (B) Fontanela um pouco aumentada (\*). Campo Grande (UFMS), 2009.

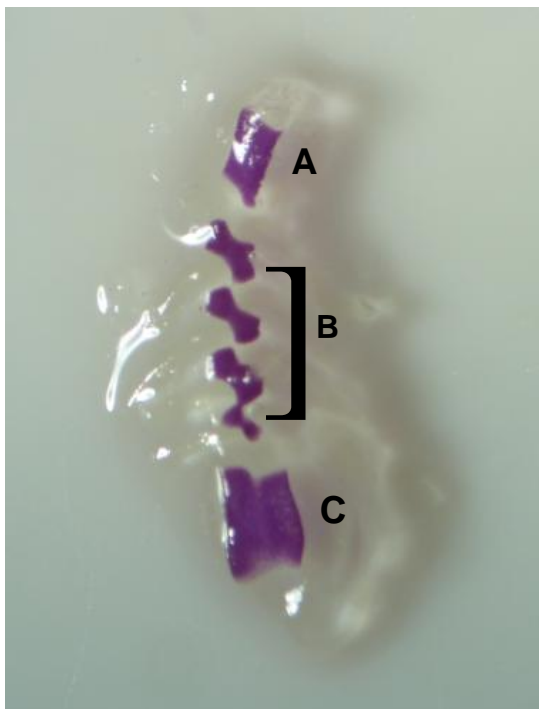


Foto 21 – Pontos de ossificação do esterno adulto em feto do grupo Controle (C2) receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> DP: (A) Manúbrio, (B) Centros Esternais (Esternébrios Assimétricos), (C) Processo Xifóide. Campo Grande (UFMS), 2009.

As alterações foram consideradas variantes do normal, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e controles (Tab. 8). Constatou-se nos grupos tratados uma tendência de aumento na incidência das alterações esqueléticas.

Tabela 8. Anomalias esqueléticas fetais (média  $\pm$  erro padrão da média) nos grupos experimentais. Campo Grande (UFMS), 2009.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C1 (n=11)	T1 (n=11)	C2 (n=11)	T2 (n=11)
Total de Fetos	33	35	28	24
Taxa de Anomalia Esquelética	100,00 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 5,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
<b>Alterações do Crânio</b>	<b>65,17 <math>\pm</math> 15,55</b>	<b>74,17 <math>\pm</math> 41,51</b>	<b>90,83 <math>\pm</math> 21,10</b>	<b>113,33 <math>\pm</math> 50,85</b>
Alterações do Nasal	14,17 $\pm$ 7,86	19,17 $\pm$ 9,94	19,17 $\pm$ 10,10	20,00 $\pm$ 11,06
Alterações do Frontal	6,67 $\pm$ 6,67	10,00 $\pm$ 10,00	12,50 $\pm$ 6,72	15,00 $\pm$ 10,67
Alterações do Parietal	13,33 $\pm$ 6,94	13,33 $\pm$ 10,18	24,17 $\pm$ 7,08	28,33 $\pm$ 13,16
Alterações do Interparietal	15,83 $\pm$ 10,13	18,33 $\pm$ 11,24	21,67 $\pm$ 7,47	30,00 $\pm$ 13,33
Alterações do Supraoccipital	11,83 $\pm$ 6,61	13,33 $\pm$ 5,85	13,33 $\pm$ 6,94	20,00 $\pm$ 13,33
<b>Alterações do Esterno</b>	<b>92,50 <math>\pm</math> 11,82</b>	<b>115,83 <math>\pm</math> 12,33</b>	<b>103,33 <math>\pm</math> 3,33</b>	<b>113,33 <math>\pm</math> 8,89</b>
Esternóbrios Ausentes	74,50 $\pm$ 11,47	80,00 $\pm$ 11,33	92,50 $\pm$ 7,50	100,00 $\pm$ 0,00
Esternóbrios Reduzidos	10,00 $\pm$ 5,53	24,17 $\pm$ 10,86	7,50 $\pm$ 7,50	6,67 $\pm$ 4,44
Esternóbrios Assimétricos	8,50 $\pm$ 6,24	11,67 $\pm$ 7,88	3,33 $\pm$ 3,33	6,67 $\pm$ 4,44

Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL de água filtrada do 1º ao 20º dia de prenhez (DP); Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP; Controle 2 (C2): receberam 0,5 mL de água filtrada do 6º ao 15º DP; Tratado 2 (T2): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 6º ao 15º DP; (nº de animais estudados). Teste Estatístico: Kruskal-Wallis/Dunn,  $p > 0,05$ .



### **4.3.3 Análise Histológica**

A análise microscópica dos baços maternos revelou que, somente o grupo das ratas tratadas durante todo período gestacional (T1) apresentou alteração histopatológica do tipo congestão vascular (Fig. 26).

Os demais grupos, tratado durante o período de organogênese (T2) e os controles, C1 (Fig. 27) e C2, não apresentaram nenhuma alteração morfológica no baço.

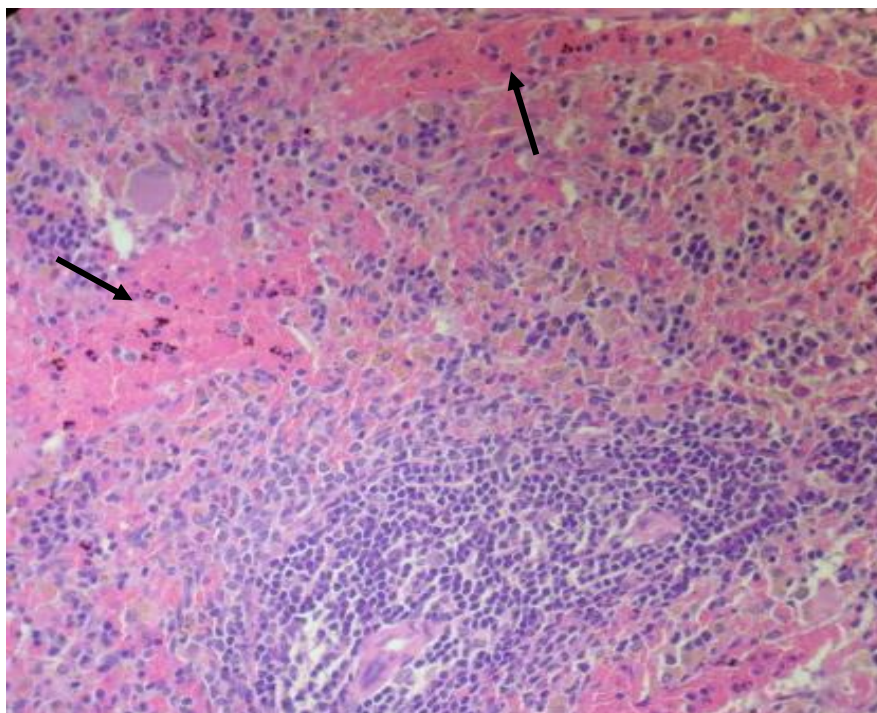


Figura 26 – Fotomicrografia de baço de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Congestão vascular (→). HE, 200X.

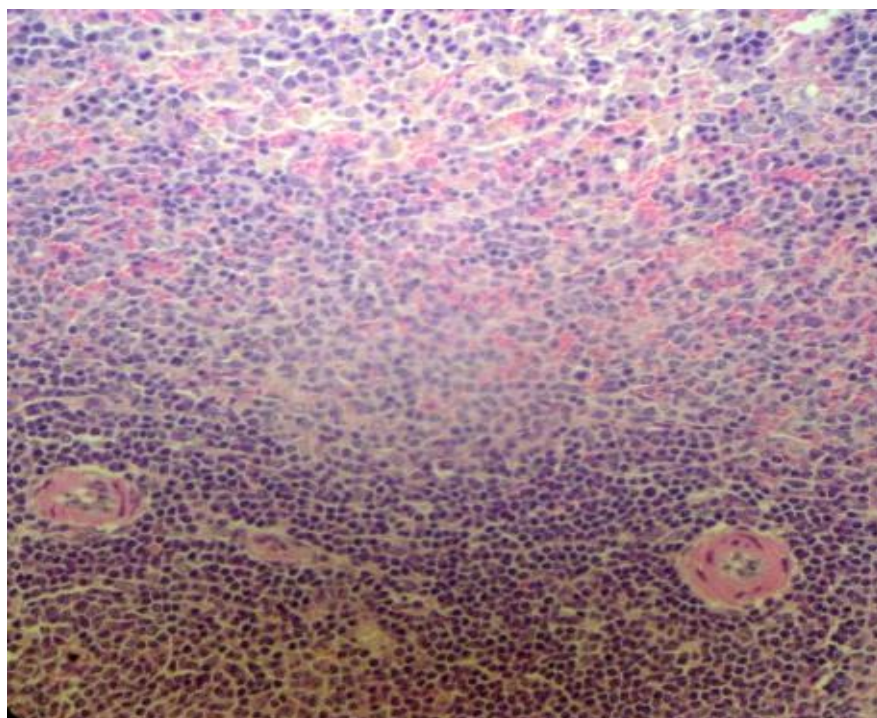


Figura 27– Fotomicrografia de baço de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 200X.

Quanto aos demais órgãos maternos, fígado (Fig. 28) e rins (Fig. 29), nenhum tipo de alteração morfológica foi observada nos grupos experimentais.

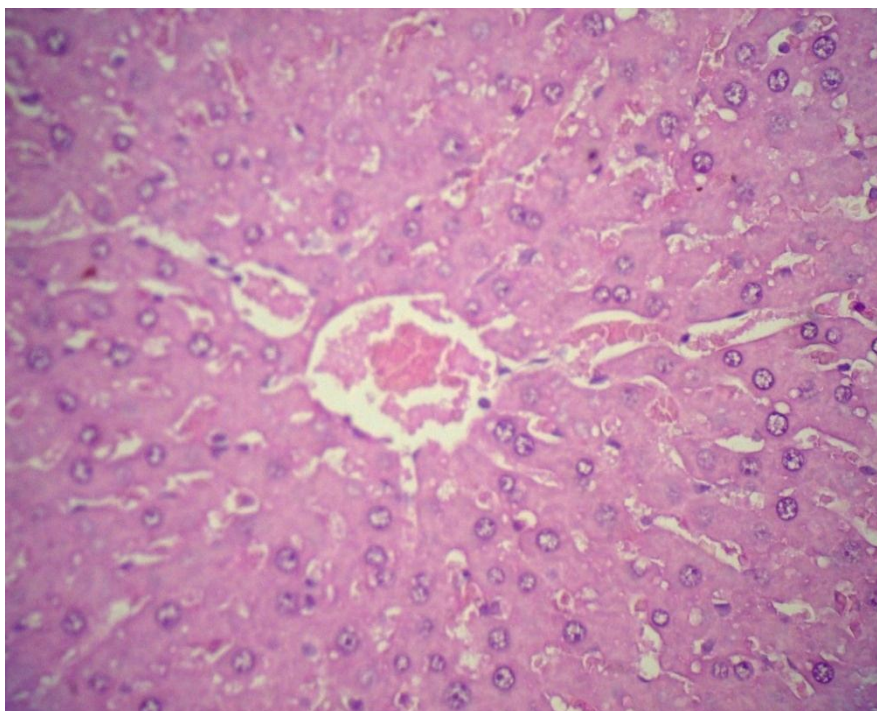


Figura 28 – Fotomicrografia de fígado de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X.

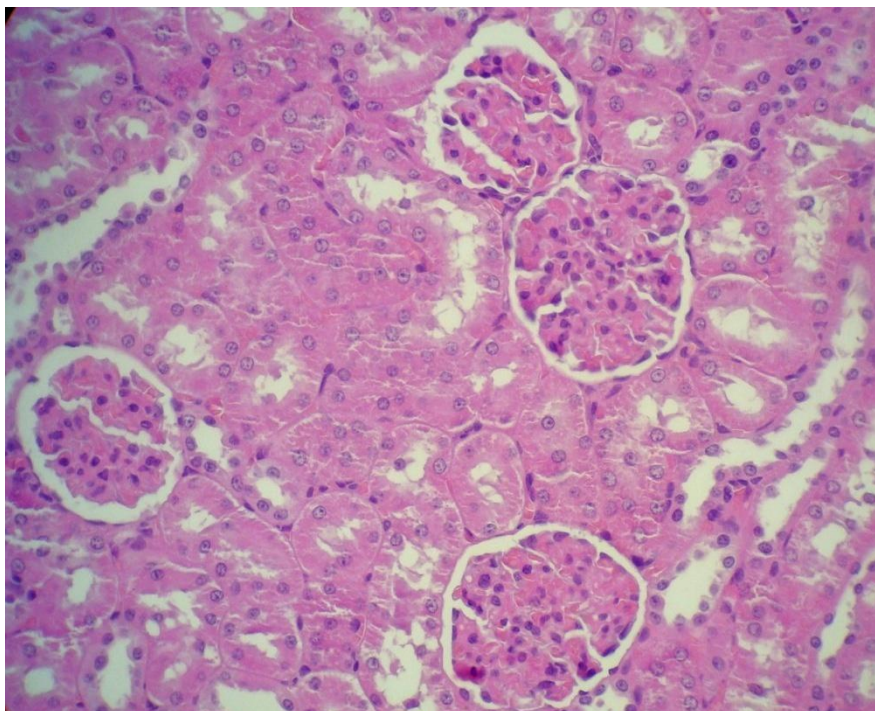


Figura 29 – Fotomicrografia de rim de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração. HE, 400X.

Com relação aos cortes histológicos da secção transversal do abdômen dos fetos, nenhuma alteração morfológica foi observada nos grupos experimentais quanto ao fígado (Fig. 30), peritônio (Fig. 31) e derme (Fig. 32).

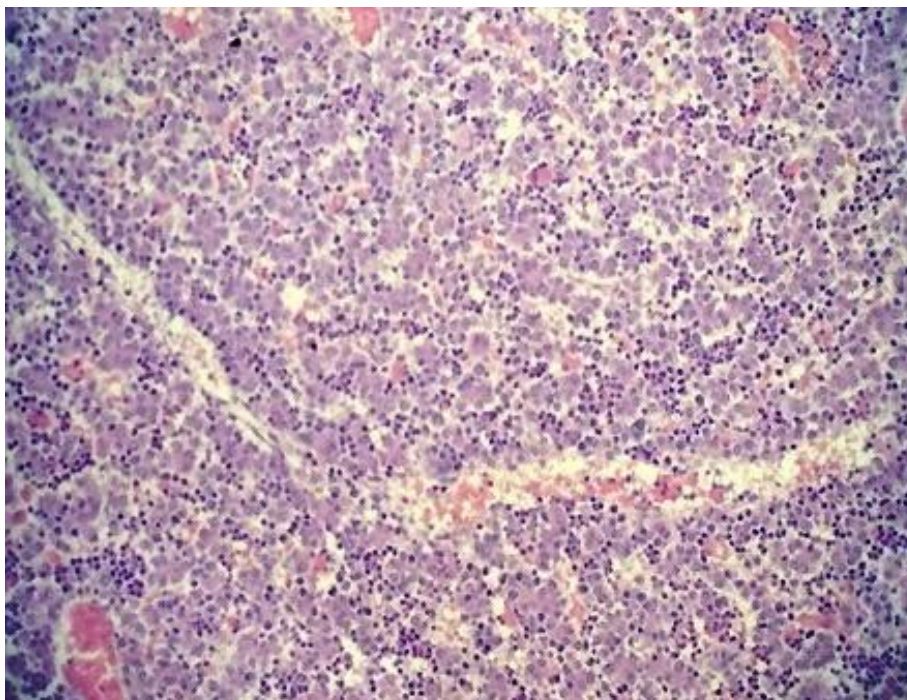


Figura 30 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Sem alteração hepática. HE, 200X.

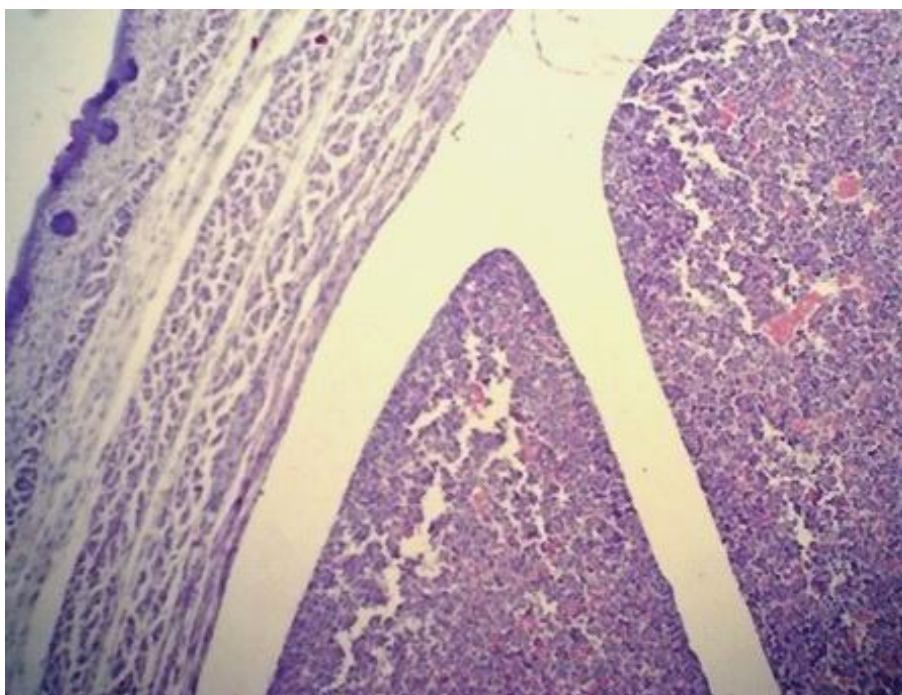


Figura 31 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam: *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavage do 1º ao 20º DP. Sem alteração no peritônio. HE, 200X.

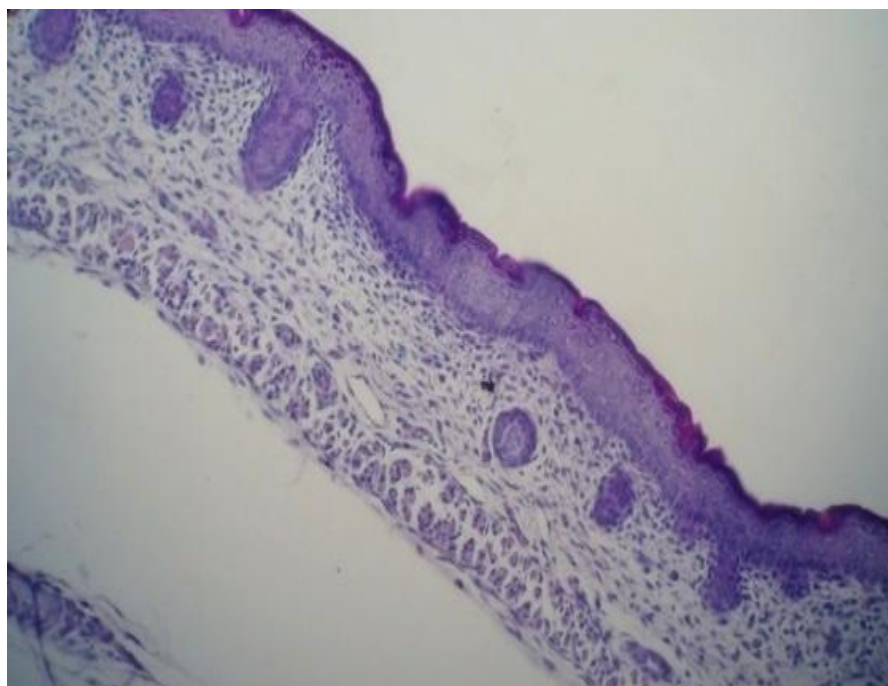


Figura 32 – Fotomicrografia da secção transversal do abdômen de feto de rata do grupo Controle 1 (C1): receberam 0,5 mL/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Sem alteração na derme. HE, 200X.

Foi observado processo inflamatório agudo na porção materna das placentas dos grupos T1 (Fig. 33) e C2 (Fig. 34). Os efeitos foram mais intensos no grupo dos animais tratados que receberam o extrato de *A. alata* durante todo o período gestacional (T1).

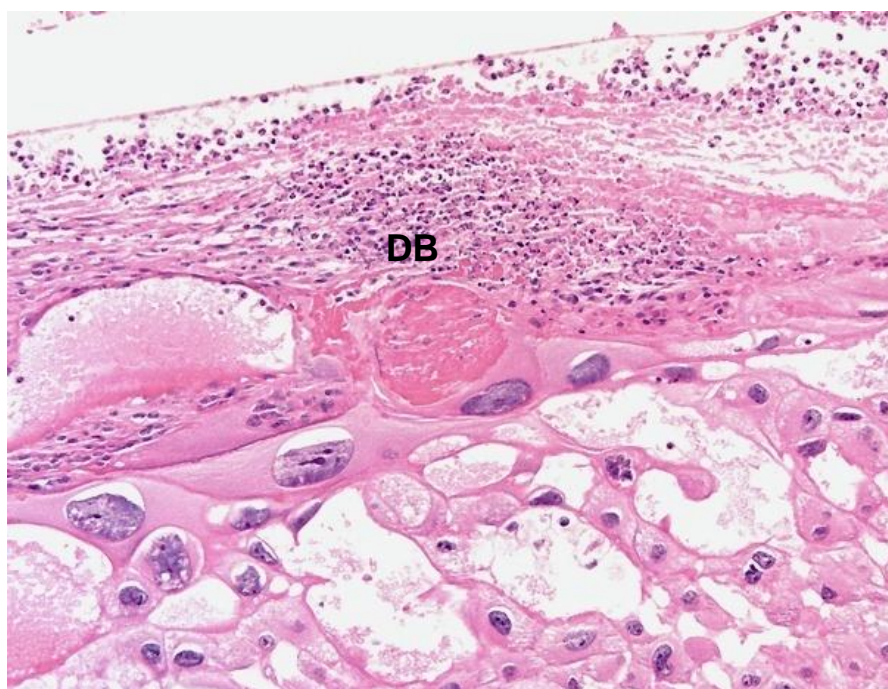


Figura 33 – Fotomicrografia da placenta de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Concentração de infiltrados de neutrófilos ao redor e na decídua basal (DB). HE, 200X.



Figura 34 – Fotomicrografia da placenta de rata do grupo Tratado 1 (T1): receberam extrato seco de *Achyrocline alata* (3,9 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em 0,5 ml/dia de água filtrada, via gavagem do 1º ao 20º DP. Concentração de infiltrados de neutrófilos ao redor e na decídua basal (DB). HE, 400X.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Toxicidade Materna

Considerando que não ocorreram mortes maternas, alteração na atividade locomotora, nem ocorrência de piloereção, diarreia, perdas sangüíneas vaginais e que em nenhum dos grupos pareceu existir indicação de desconforto ou estresse dos animais, pode-se inferir que a administração do extrato de *A. alata* às ratas prenhes não causou toxicidade, observável por critérios clínicos.

A gravidez é caracterizada por aumento progressivo do peso materno, decorrente do crescimento do feto e de seus anexos (em torno de 40%) e de adaptações próprias do organismo (os 60% restantes), caracterizadas por anabolismo no início e catabolismo no final da gestação (RUDGE, BORGES e CALDERON, 2000).

Neste trabalho, durante a evolução da gestação, foi verificado um aumento do peso das ratas muito semelhante entre os diferentes tratamentos. Provavelmente, este fato estava relacionado com o crescimento dos fetos e de seus anexos, indicando uma gestação normal, sem efeitos nocivos à saúde materna e fetal.

Alterações no consumo médio de água e ração constituem sinais clínicos que indicam toxicidade de um fármaco (MANSON e KANG, 1994).

Apesar dos resultados encontrados sugerirem indícios de toxicidade do extrato no período de organogênese (redução no consumo de água e ração) e durante todo período de prenhez das ratas (aumento no consumo de ração), os efeitos parecem ter sido transitórios, uma vez que não foram constatadas diferenças quanto ao peso corpóreo (1<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> DP), ganho de peso e ganho de peso líquido entre os grupos estudados.

Segundo Maciel, Pinto e Veiga (2002) as plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade.

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação e estudos farmacocinéticos pré-clínicos constituem grandes desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (GEBHARDT, 2000).

A análise do peso corpóreo visa avaliar possíveis efeitos tóxicos no organismo como um todo. Já o peso de órgãos e sua observação macroscópica são utilizados para avaliar efeitos tóxicos específicos em algum sistema ou órgão específico (MANSON e KANG, 1994).

Os resultados encontrados para peso absoluto (PA) e relativo (PRel) dos órgãos maternos (fígado, ovários, rins e útero com fetos e sem fetos) foram similares entre os grupos experimentais, com exceção do baço que foram discrepantes (PA significativo e PRel não significativo). Por meio do parâmetro peso relativo qualquer erro de conclusão quanto ao ganho ou perda de peso em relação a tratamento poderia ser corrigido. Desta forma, garantiu-se que os animais maiores ou menores não apresentariam as médias maiores ou menores, respectivamente.

A análise macroscópica dos órgãos maternos (baço, fígado e rins) não revelou nenhuma alteração morfológica perceptível referente à cor, ao tamanho, à textura (consistência) e à presença de cistos.

## **5.2 Desempenho Reprodutivo Materno e Desenvolvimento Embrionário**

Quando se analisa os efeitos tóxicos de alguma substância sobre um embrião em fase de desenvolvimento é importante verificar se as condições fisiológicas, relacionadas com a reprodução, encontram-se uniformes entre os grupos experimentais.

Khera (1987) definiu toxicidade materna como alterações transitórias ou permanentes na fisiologia materna (alteração na homeostasia, dos níveis hormonais das membranas fetais ou mesmo alterações comportamentais) com potencial para causar efeitos adversos nas proles durante o desenvolvimento embrio-fetal ou pós-natal. O mesmo autor, em 1985, já tinha correlacionado malformações fetais que ocorrem com baixa frequência (exencefalia, encefalocele, micro ou anoftalmia e outras) à redução do peso materno.

Embora essa relação tenha sido contestada por Chahoud et al. (1999), não existem dúvidas de que a toxicidade materna pode influir no desenvolvimento adequado do embrião.

O peso do ovário depende bastante do número e do volume dos corpos lúteos, visto serem eles as maiores estruturas no órgão (WAYNFORTH, 1971). Os corpos lúteos são a fonte principal de secreção de progesterona (KATO, MORISHIGE e ROTHCHILD, 1979); eles aumentam de volume durante a gestação,

tendo sido demonstrado que seu crescimento está intimamente correlacionado com o aumento de secreção de progesterona e 20-hidroxi-progesterona (UCHIDA et al., 1970), hormônios indispensáveis à manutenção da prenhez em rata.

Durante o início da prenhez, a secreção de estrogênios ovarianos é responsável tanto para estimular a proliferação de células epiteliais do endométrio como para tornar o estroma uterino receptivo para a implantação (PARIA et al., 2000; SMITH, 2001).

Em ratas, diferente do que acontece em humanos, os corpos lúteos mantêm-se ativos durante todo o período gestacional (KELLER, 2006).

Como o peso dos ovários não diferiu entre os grupos experimentais, é possível inferir que as ratas tiveram produção hormonal semelhante. Portanto, o ambiente hormonal materno não diferiu entre os tratamentos.

Uma das medidas que pode ser utilizada em estudos biológicos é a correlação entre o número de corpos lúteos e o de implantes, uma vez que a cada corpo lúteo, teoricamente, corresponderia um implante (INMAN e MARKIVEE, 1963; KATO, MORISHIGE e ROTCHILD, 1979). Quanto maior a proporção entre o número de corpos lúteos e o de implantes, maior será o número de ovulações que resultam em oócitos fertilizados e blastocistos implantados.

A implantação é o processo pelo qual o embrião realiza o contato físico e fisiológico íntimo com o endométrio materno para o estabelecimento da gestação. Apesar de haver variação neste processo entre espécies, certos eventos básicos são similares. A característica fundamental deste processo é o desenvolvimento sincronizado do embrião para o estágio de blastocisto e a diferenciação do útero para o estado receptivo. Em seguida, ocorrem interações entre o blastocisto ativado e o epitélio uterino para iniciar a implantação (PARIA et al., 2000).

O fato do número de implantes viáveis/rata não apresentar diferenças significativas entre os grupos, indica que os tratamentos, provavelmente, não afetaram o processo de implantação dos blastocistos.

A partir da implantação, o blastocisto pode continuar seu desenvolvimento normal, desenvolver-se de forma anormal ou então morrer. Reabsorção é nome que se dá para a lise *in situ* de um embrião ou feto (KALTER, 1980); quanto maior a proporção de reabsorções maior, evidentemente, o número de fetos cujo desenvolvimento foi interrompido.

Como o número de reabsorções/rata não apresentou diferenças significativas entre os grupos, pode-se inferir que os tratamentos não interferiram com o progresso do desenvolvimento embrionário após a implantação.

Sabe-se que o índice (proporção) de implantação correlaciona-se com o número de corpos lúteos, e é um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (FORD, 1982). Contrastando com o índice de implantação, a presença de reabsorções indica uma falha no desenvolvimento embrionário. Como os dois índices não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais estudados, pode-se inferir que a capacidade reprodutiva materna não foi afetada pelos tratamentos.

A placenta tem uma importância crucial para o desenvolvimento do feto, pois fornece os nutrientes necessários para seu crescimento, entre outras funções (REGNAULT et al., 2002). Distúrbios no suprimento sanguíneo uterino estão associados com alta morbidade pré-natal e neonatal e restrição de crescimento intra-uterino (AUGUSTIN, 2000; ZYGMUNT et al., 2003). Uma estreita relação entre o peso fetal e placentário já foi demonstrada em algumas espécies: humanos (THOMPSON, BILLEWICZ e HYTTEN, 1969), coelhos (BRUCE e ABDUL, 1973), roedores (GILBERT e LETURQUE, 1982) e porcos (SANIN et al., 2001).

O fato do tamanho dos fetos, assim como seu peso corporal e o de suas placentas terem sido semelhantes em todos os grupos experimentais estudados, indica que os tratamentos não alteraram a disponibilidade de nutrientes maternos necessários para a manutenção do metabolismo e desenvolvimento fetal. Tal suposição parece ser corroborada pela ausência de significância do índice placentário e pelo fato dos recém nascidos terem tido peso adequado para a idade gestacional.

### **5.3 Desenvolvimento das Ninhadas**

#### **5.3.1 Análises Esquelética e Visceral**

Certas variações esqueléticas ocorrem espontaneamente em fetos e recém nascidos. Sabe-se que a incidência dessas variantes anatômicas aumenta após o tratamento de fêmeas prenhes com agentes teratogênicos (TAYLOR, 1986).

Variações esqueléticas podem ser consideradas como efeito de drogas em doses maiores (14<sup>a</sup> costela extra) ou apenas variações normais (14<sup>a</sup> costela

rudimentar e variações de esternóbrios). Quando constituem os únicos sinais de embriotoxicidade, elas não devem ser classificadas como anormalidades. Variações do esterno, por exemplo, parecem ter um valor duvidoso na previsão do potencial teratogênico, pois só aumentam consideravelmente sua incidência quando também já se mostraram claramente teratogênicas por outros critérios. Deve-se enfatizar que algumas variações esqueléticas são consideradas espécie-específicas e, conseqüentemente, podem apresentar diferentes magnitudes de resposta em outras linhagens ou espécies (KIMMEL e WILSON, 1973).

Alguns tipos de malformações (fenda palatina em camundongos) podem resultar de distúrbios da homeostasia do organismo materno e, portanto, não representarem uma ação tóxica direta sobre o embrião ou o feto (MANSON, 1986).

Diversos fatores de crescimento (CUETO e GERTON, 2001) e citocinas (TORCHINSKY e TODER, 2004) relacionados ao desenvolvimento normal do embrião já foram identificados e caracterizados. Para que uma gestação seja bem sucedida, é necessário que haja um balanço intrauterino de citocinas. Trabalhos demonstram que o estresse embriopático modula a expressão de um grande número de citocinas e que dependendo de como a maquinaria apoptótica funciona, os estresses embrionários, independentemente de sua natureza, podem ou não resultar em desenvolvimento fetal inadequado ou perda gestacional (TORCHINSKY e TODER, 2004).

As anomalias encontradas, tanto esqueléticas como viscerais, apresentaram-se nos grupos tratados em quantidades e de natureza muito semelhante às aquelas observadas nos grupos controles. Dados da literatura que apontam a incidência dessas anomalias para esta espécie experimental estão de acordo com as encontradas neste estudo (KIMMEL e WILSON, 1973; SZABO, 1989).

Portanto, é possível inferir que as alterações encontradas nos ossos do crânio e do esterno, geralmente transitórias e reversíveis em roedores, podem constituir indicativos de leve atraso no desenvolvimento ósseo, não adversos a sobrevivência dos fetos, decorrentes da laparotomia no 20º DP.

Com relação às alterações viscerais, sabe-se que após o nascimento, as hidrocefalias leves e algumas vezes moderadas, podem regredir em algumas espécies, inclusive em humanos, e que as diferenças entre espécies podem ocorrer devido às possíveis transformações farmacocinéticas que se impõe a unidade materno/placentária/fetal (SPINOSA, GÔRNIÁK e BERNARDI, 1999). Portanto, é

possível inferir que as hidrocefalias nos graus encontrados (grupos tratados maior incidência que controles) nos fetos são variantes do normal e sugere-se que as mesmas até pudessem regredir caso a prenhez chegasse a termo e/ou depois de algum tempo após o nascimento.

Quanto à constatação de hidronefrose, é possível inferir que não resultou da ação dos tratamentos, uma vez que foi observada em todos os grupos, sendo um feto no grupo controle e um feto no tratado durante todo o período gestacional (C1 e T1) e três fetos no grupo controle e três fetos no tratado durante o período de organogênese (C2 e T2). Outro fato que reforça esta possibilidade é que, estatisticamente, não houve diferenças significativas entre os grupos (tratados e controles).

Portanto, de forma generalizada, pode-se inferir que as alterações viscerais e ósseas encontradas nos grupos são reversíveis e apresentam baixa gravidade, não representam riscos à vida e podem ser corrigidas ou adaptadas com o desenvolvimento e maturação do sistema ósseo e orgânico dos fetos no período pós-natal sem maiores consequências, se a laparotomia não tivesse sido realizada no 20º DP.

De acordo com as considerações anteriores, os resultados obtidos neste estudo e os encontrados na literatura pode-se inferir que o extrato hidroetanólico de *A. alata* não é tóxico para o organismo materno e não é teratogênico. Em síntese as alterações encontradas constituem variações da normalidade e não malformações propriamente ditas.

### **5.3.2 Análise Histológica**

Quando se testa um possível efeito tóxico de uma determinada substância em um conceito, faz-se necessário estabelecer se esses efeitos são causados direta ou indiretamente no mesmo. Por meio de alterações no organismo materno pode-se, secundariamente, interferir no desenvolvimento normal do conceito (CHANG et al., 2002).

A maioria das substâncias químicas consideradas como agentes tóxicos são substâncias exógenas conhecidas como xenobióticos. A planta medicinal utilizada como medicamento é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo, nele introduzido com finalidades terapêuticas. A maioria dos xenobióticos é lipossolúvel, característica que permite sua absorção por difusão passiva através da

membrana lipídica das células. O organismo remove os xenobióticos por meio de uma série de alterações estruturais mediante diversos processos de biotransformação. A biotransformação geralmente leva a formação de compostos mais polares, portanto, mais hidrofílicos. Conseqüentemente, mais facilmente excretados do que seu composto original (SMITH e CLARK, 1987; RAHMAN, RAILKAR e VENKATARARN, 1992; YUAN et al., 1995; VESSEY, 1996).

Para que um determinado xenobiótico provoque lesão, dependerá da dose, de sua forma estrutural e dos mecanismos que utilize o organismo para conferir-lhe polaridade e lhe excretar. Desta forma, a eficiência da eliminação de substâncias lipofílicas depende de sua conversão a substâncias polares e hidrossolúveis, fenômeno que é habitualmente o fator limitante na eliminação das drogas do organismo (SOUSA et al., 2003; SOUSA, 2004).

O órgão mais comumente envolvido com a biotransformação de xenobióticos é o fígado. O fígado atua na emulsão de gorduras por meio da produção da bile, na metabolização de substâncias presentes na corrente sanguínea, na regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, homeostasia e auxílio à resposta imune. Esta atuação é devida a sua posição estratégica e por suas células (hepatócitos) estarem entre as células mais ricamente perfundidas do organismo (OGA, 1995; VESSEY, 1996; GUYTON e HALL, 2002; SCHINONI, 2006).

Os xenobióticos são absorvidos por difusão passiva através da membrana lipídica das células e percorrem o organismo unido a proteínas plasmáticas, basicamente a albumina, ou se ligam a célula adiposa. Os sistemas de desintoxicação preferentemente hepáticos servem para dar maior polaridade, a fim de facilitar sua excreção. O fígado os modifica para aumentar sua polaridade e torná-los hidrossolúveis. As moléculas já hidrossolúveis podem voltar ao plasma e serem eliminadas pela urina, ou passar para a bile e serem eliminados com as deposições (OGA e BASILE, 1994; VESSEY, 1996; STURGILL e LAMBERT, 1997; MEEKS, HARRISON e BULL, 2000).

Considerando que na análise histológica do fígado das ratas não foi evidenciado nenhum tipo de alteração nos grupos, é possível inferir que as enzimas existentes nos microssomas hepáticos (ex: citocromo P<sub>450</sub>) e as enzimas não microssômicas tenham catalisado os processos de biotransformação (VESSEY, 1996; STRECK e DALLA COSTA, 1999; MEEKS, HARRISON e BULL, 2000) do extrato de *A. alata*, aumentando sua polaridade e facilitando sua excreção. O que

pode ser verificado pela ausência de alterações morfológicas no órgão (lóbulo hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineadas, os hepatócitos formavam cordões confluentes para a veia centro-lobular etc).

Com relação à alteração morfológica do tipo congestão vascular evidenciada no baço das ratas do T1 pode-se inferir que, a presença de algum componente do extrato de *A. alata* (metabólitos secundários) tenha sido tóxica para as células da parede dos vasos sanguíneos, ocasionando dilatação vascular e consequente fenômeno de congestão no órgão. É possível que no baço a célula endotelial fosse mais sensível ao do extrato da planta.

O baço como órgão linfóide, tem importante papel na defesa orgânica devido a seus mecanismos de filtração sanguínea e fagocitose, além da produção de fatores do complemento e imunoglobulinas (BABCOCK, AMOSCATO e NISHIODA, 1983; DOWNEY et al., 1987).

Quanto à morfologia dos rins maternos, não foi evidenciado nenhum tipo de alteração morfológica nos grupos. Portanto, não houve efeito dos tratamentos. Os corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais apresentaram padrões de normalidade, tanto no córtex quanto na medula, sem sinais de alteração celular.

Segundo Finco (1997), o rim é particularmente um órgão vulnerável aos efeitos de agentes tóxicos, devido à alta taxa de perfusão e à habilidade de concentrar muitas substâncias na luz tubular, o que pode se agravar na gestação, devido ao aumento fisiológico na taxa de filtração glomerular (HYTTEN, 1984).

Com relação aos cortes histológicos da secção transversal do abdômen dos fetos, nenhuma alteração morfológica hepática, peritoneal e de derme, perceptíveis à microscopia de luz, foram observadas nos grupos experimentais. Portanto, pode-se inferir que não houve efeito dos tratamentos. Foram observados núcleos de hepatócitos bem evidentes, células da linhagem eritrocitária em diferentes fases do desenvolvimento. Não foram evidenciados os limites dos lóbulos hepáticos, padrão compatível com a normalidade morfológica nessa etapa do desenvolvimento dos fetos.

Os compostos com ação bioativa de importância farmacológica são produzidos por meio da biossíntese dos metabólitos secundários. Do ponto de vista químico *A. alata* apresenta flavonóides (BROUSSALI et al., 1988 e 1993) e óleos essenciais (LABUCKAS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002). O estudo de flavonóides é interessante não só pela investigação química, como também por sua



importância farmacológica (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009; ARAÚJO et al., 2005) e atividade antiviral (SEMPLE, 1999).

Estudos experimentais com flavonóides presentes em *A. saturoioides* têm demonstrado efeito analgésico, antiinflamatório (DE SOUZA, BASSANI e SCHAPOVAL, 2007), antiespasmódico e sedativo (SIMÕES et al., 1988), além de efeito imunomodulatório (SANTOS et al., 1999), atividade mutagênica e genotóxica em microrganismos (VARGAS et al., 1990) e atividade antioxidante (POLYDORO et al., 2004).

A eficácia e a toxicidade das drogas usadas na gestação são difíceis de serem estimadas devido às alterações em muitos parâmetros fisiológicos (ex: hormonais) e pela variação das atividades enzimáticas no metabolismo das mesmas, ditadas pela presença da placenta e do feto. Quando a mãe é exposta a substâncias tóxicas durante a gestação, pode haver um mecanismo de indução, que aumenta a metabolização de drogas pelo feto (HODGE e TRACY, 2007; WEIER et al., 2008).

Em ratos e seres humanos o blastocisto rompe o epitélio uterino e invade o estroma endometrial, levando à formação da placenta que se caracteriza por uma íntima relação entre as circulações fetal e maternal (hemocorial). A implantação em ratos e seres humanos é caracterizada por uma pronunciada reação estroma-endométrio, referida como decidualização, a decídua forma o componente maternal da placenta (RASWEILER IV e BADWAIK, 1999; WITORSCH, 2002a, b; GRAY e col., 2004).

A placenta consiste em duas partes, uma porção fetal derivada do córion viloso e uma porção materna formada pela decídua basal. Ela apresenta três zonas distintas: labiríntica, juncional e basal. A zona labiríntica é formada por células gigantes trofoblásticas (citotrofoblasto), sinciciotrofoblasto e mesênquima fetal, no qual existem canais vasculares maternos e vasos fetais, responsáveis pelas trocas de substâncias entre a mãe e o feto. A zona juncional é composta por células gigantes secundárias trofoblásticas, de glicogênio e espongiotrofoblásticas que secretam hormônios imprescindíveis para a viabilidade fetal uma vez que sua ausência resulta em morte fetal. A zona da decídua basal, formada por células deciduais, no qual a porção fetal da placenta está ligada à parede uterina (CSAPO, DRAY e ERDOS, 1974; MUNTENER e HSU, 1977; LLUSIA, 1992; BARTHOLOMEUSZ, BRUCE e LYNCH, 1999; RIDER et al., 2000).

A placenta é um órgão vital para o crescimento e desenvolvimento fetal, pois transporta oxigênio e nutrientes, além de proteger contra possíveis traumas. Mediar a transferência de nutrientes da mãe para o feto e remover produtos de metabolismo da circulação fetal constitui uma de suas funções primordiais (ADAMSON et al., 2002; CROSS, 2005). No entanto, são ainda pouco conhecidos os mecanismos de transporte de substâncias bioativas na placenta, bem como a sua regulação. Sabe-se que é mediado por uma rede complexa de transportadores de membranas que se distribuem de uma forma polarizada no sincitiotrofoblasto e que depende de algumas características da droga, como lipossolubilidade e peso molecular (CROSS, 2005; WEIER et al., 2008; COX et al., 2009).

Em algumas situações, muitas substâncias podem interferir nas propriedades funcionais da placenta, e causar alterações em sua estrutura, levando a possíveis perdas ou danos ao feto (LEVARIO-CARRILO et al., 2004; HODGE e TRACY, 2007; WEIER et al., 2008).

Segundo Cox et al (2009) a placenta do ser humano e do rato apresentam similaridades estruturais interessantes, pois mais de 80% dos genes conhecidos por causar fenótipo placentário (envolvidos com a estrutura e/ou função) no rato são co-expressos no ser humano. Outros fatores como curto ciclo estral, breve período gestacional (ENDERS e BLANKENSHIP, 1999) e placenta do tipo hemocorial (igual à de humanos), tornam o rato um dos melhores modelos para se estudar os mecanismos da placenta e as patologias obstétricas (BURDON et al., 2007).

De acordo com os resultados encontrados, o processo inflamatório intenso evidenciado nas placentas (porção materna) das ratas do grupo tratado durante todo período gestacional (T1) e uma tendência para as ratas do grupo C2, indicam a necessidade da realização de medições morfométricas e análises histoquímicas nestas placentas (C2 e T1) para corroborar a possibilidade de *A. alata* apresentar efeitos tóxicos na placenta, uma vez que houve diferenças morfológicas entre os grupos. Novos estudos também serão necessários para avaliar as conseqüências destas alterações placentárias para os fetos.

A diferença significativa encontrada entre os grupos quanto à variável peso absoluto (PA) e relativo (PRel) do baço, também reforçam e tornam imprescindível o estudo farmacocinético do extrato de *A. alata*, uma vez que os parâmetros de toxicidade relativos à reprodução e embriofetotoxicidade geralmente apresentam variações inter e intra-espécies importantes.

Os resultados obtidos no presente estudo não excluem a possibilidade de toxicidade humana durante a gestação. Esta é a razão principal de se evitar o uso de medicamentos nessa fase (UIGNARD e JOHN, 1986; HODGE e TRACY, 2007; WEIER et al., 2008). Se a intenção é utilizar *A. alata* como medicamento, ela deve ser previamente validada, isto é, ter sua ação comprovada e sua toxicidade potencial avaliada cientificamente na espécie humana, como qualquer outro medicamento. Sua utilidade medicamentosa na gestação deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aquelas que a utilizam é suplantado pelos benefícios individuais que dela possam advir. Portanto, é preciso cautela, os efeitos da exposição em ambos os organismos, materno e fetal, devem ser considerados, respeitando-se a complexidade farmacológica e as possíveis transformações que se impõe a unidade materno/placentária/fetal.

## 6. CONCLUSÕES

Com base no modelo experimental, dose utilizada e face aos resultados expostos, concluiu-se que o extrato de *Achyrocline alata*:

1) Durante o período de organogênese (6<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> DP) e todo período gestacional (1<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> DP)

- não causou toxicidade materna clinicamente observável e morte;
- não alterou o consumo de água, ração e as condições fisiológicas e intra-uterinas relacionadas com a reprodução;
- não interferiu com o desenvolvimento fetal e a capacidade de levar a termo uma gestação;
- não provocou alterações anátomo-histológicas no fígado e rins maternos;
- não provocou alterações nas células fetais do fígado, região peritoneal e derme;
- não apresentou efeitos teratogênicos nos fetos.

2) Durante todo período gestacional (1<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> DP)

- apresentou-se tóxico para as células maternas do baço (vascular);
- apresentou-se tóxico para as células da face materna das placentas.

Portanto, é preciso muita cautela na utilização da planta durante o período de prenhez, deve-se levar em consideração os efeitos da exposição em ambos os organismos, materno e fetal, respeitando-se a complexidade farmacológica e as possíveis transformações que se impõe a unidade materno/placentária/fetal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2002; 250(2):358-73.

Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E, Leone VG, Mariani L. The extend of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology.* 1979; 20:237-42.

Augustin HG. Vascular morphogenesis in the ovary. *Baillières Clin Ob Gy.* 2000; 14(6):867-82.

Babcock GF, Amoscato AA, Nishioda K. Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis and differentiation of macrophages and granulocytes. *Ann N Y Acad Science.* 1983; 419:64-75.

Balbach, A. *A Flora Nacional na Medicina Doméstica.* 17 ed. São Paulo; 1986. p. 406-676.

Barrow MV, Taylor WI. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. *J. Morphol.* 1969; 127:291-306.

Bartholomeusz RK, Bruce NW, Lynch AM. Embryo survival and fetal and placental growth following elevation of maternal estradiol blood concentrations in the rat. *Biol. Reprod.* 1999; 61:46-50.

Bernardi MM. Exposição aos elementos durante o período perinatal. In: Souza-Spinoza H, Gorniak SL, Bernardi MM. (Eds.). *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 566-74.

Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16:408-420.

Bremer, K. *Asteraceae: Cladistics and Classification.* Portland. Oregon: USA; Timber Press. 1994. p. 752.

Broussalis AM, Ferraro GE, Gurni A, Coussio JD. Phenolic constituents of Four *Achyrocline* Species. *Biochem Systemat Ecol.* 1988; 16(4):401-2.

Bruce NW, Abdul K. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal circulation in the rabbit at different stages of gestation. *J Reprod Fertil.* 1973; 32:15-24.

Burdon C; Mann C; Cindrova-Davies T; Ferguson-Smith AC; Burton GJ. Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the Murine placenta. *Placenta.* 2007; 28(7):724-33.

Calvo D, Cariddi M, Grosso M, Demo MS, Maldonado AM. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2006; 48(3-4):247-55.

Carney JR, Krenisky JM, Williamson RT, Luo J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the south american medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65:203-7.

Chahoud I, Ligensa A, Dietzel I, Faqi AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol.* 1999; 13:375-81.

Chang CV, Felicio AC, Reis JEP, Guerra MO, Peters VM. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81:265-9.

Christian MS. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW. *Method of toxicology.* Philadelphia: Taylor e Francis; 2001. p. 1301-81.

Corrêa MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.* vol. 5. Rio de Janeiro: IBDF, Imprensa Nacional; 1978. p. 16.

Cosentino M, Bombelli R, Carcano E, Luini A, Marino F, Crema F, Dajas F, Lecchini S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. *J Ethnopharmacol.* 2008; 116(3):501-7.

Cox B, Kotlyar M, Evangelou AI, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Whiteley K, Jurisica I, Adamson SL, Rossant J, Kislinger T. Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology. *Mol Syst Biol*. 2009; 5:279-83.

Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice-a review. *Trophoblast Res*. 2005; 19:54-59.

Csapo A, Dray F, Erdos T. Letter: Oestradiol 17beta: Inhibitor of placental growth. *Lancet*. 1974; 6:51-2.

Cueto LD, Gerton GL. The Influence of Growth Factors on the Development of Preimplantation Mammalian Embryos. *Archives of Medical Research*. 2001; 32 (6):619-26.

D'Ercole AJ, Underwood, LE. Growth factors in fetal growth and development. In: Novy, MJ, Resko, JA. *Fetal endocrinology*. New York: Academic Press; 1981. p. 155-82.

Damasceno DC, Lemonica IP. Embryotoxicity and anti-implantation effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. *Rev Bras Toxicol* 1999; 12:47-54.

Demo M, de Las MOM, Lopez ML, Zunino MP, Zygadlo JA. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical biology*. 2005; 43(2):129-34.

Desmarchelier C, Coussio J, Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31:1163-70.

de Souza KCB, Bassani VL, Schapoval EES. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine*. 2007; 14:102–8.

de Souza KCB, Schapoval EE, Bassani VL. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. J Pharmaceut Biomed. 2002; 28:771-7.

Downey EC, Shackford SR, Fridlund PH, Ninnemann RN. Long-term Depressed Immune Function in Patients Splenectomized for Trauma. J Traum. 1987; 27(6):661-3.

Enders AC; Blankenship TN. Comparative placental structure. Adv Drug Deliver Rev. 1999; 38:3-15.

Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, da Silva ACF, Tedesco SB. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(1):49-54.

Farmacopéia Brasileira, 4ª ed. (2001) São Paulo: Atheneu, v.2.9., v.4.2.4., v.4.2.5.

Ferrari N, Giusti SC, Carneiro MR. Mutagenic activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Compositae) detected by the bimeth system in *Aspergillus nidulans*. Rev Bras Genet. 1993; 16(2):275-82.

Finco DR. Kindney function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5 ed. London: Academic Press; 1997.

Freitas F. Avaliação farmacobotânica de plantas medicinais comercializadas pelos raizeiros de Campo Grande, 65p. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (MS); 1992.

Ford WCL. The effect of deoxy-6-fluoroglucose on the fertility of males rats and mice. Contraception. 1982; 25:535-45.

Giavini E, Lemonica IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: cyclophosphamide, cis-platinum, adriamycin. Teratog Carcinog Mutagen 1990; 10:417-26.



Gebhardt R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Med.* 2000; 66(2):99-105.

Gilbert M, Leturque A. Fetal weight and its relationship to placental blood flow and placental weight in experimental intrauterine growth retardation in the rat. *J Dev Physiol.* 1982; 4:237-46.

Gleich J, Froberg H. General Teratological Techniques. In: Neubert D, Merker HJ, Kwasigroch TE. *Methods in prenatal toxicology*, Massachusetts: PSG Publishing Company; 1977. p. 94-102.

Gray Jr LE, Wilson V, Noriega N, Lambright C, Furr J, Stoker TE, Laws SC, Goldman J, Cooper RL, Foster PM. Use of the Laboratory Rat as a Model in Endocrines Disruptor Screening and Testing. *ILAR J.* 2004; 45(4):425-37.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*, 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2002.

Hanseman JK, Hogan MD. Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology.* 1995; 12:165-72.

Hilgert NI. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76(1):11-34.

Hnatyszyn O, Moscatelli V, Rondina R, Costa M, Arranz C, Balaszczuk A, Coussio J, Ferraro G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus Cavernosum. *Phytomedicine.* 2004; 11:366-9.

Hodge LS, Tracy TS. Alterations in drug disposition during pregnancy: implications for drug therapy. *Expert Opin Drug Met.* 2007; 3(4):557-71.

Hyttén FE, Paintin DB. Increase in plasma volume during normal pregnancy. *J Obstet Gyn Brit Em.* 1963; 70:402-7.

Hyttén FE. Physiological changes in the mother related to drug handling. In: Krauer, B. *Drugs and Pregnancy*. New York: Academic Press; 1984. p. 7.

Hyttén FE. Weight gain in pregnancy-30 year of research. S Afr Med J. 1981; 60(1):15-9.

Inman OR, Markivee CR. Gross effects on rabbit embryos and newborns of x – irradiation in the blastocyst stage. Anat. Rec. 1963; 174:139-47.

Kadarian C, Broussalis AM, Mino J, Lopez P, Gorzalczy S, Ferraro G, Acevedo C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C., Pharmacol Res. 2002; 45(1):57-61.

Kalter H. The relationship between congenital malformations and prenatal mortality in experimental animals. In: Potter I, Hook EB. Human embryonic and fetal death. New York: Academic Press; 1980. p. 29-44.

Kato H, Morishige WK, Rothchild I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rats. Endocrinology. 1979; 105:846-50.

Keller KA. Development and reproductive toxicology. Cap. 2, p. 305-55. In: \_\_\_\_\_, Jacobson-Kram D. Toxicological testing handbook. 2 ed. Informa Healthcare: New York; 2006.

Khera KS. Maternal toxicity – a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. Teratology. 1985; 31:129-53.

Khera KS. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders – a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1987; 17(4):345-75.

Kimmel CA, Wilson JG. Skeletal Deviations in Rats: Malformations or Variations? Teratology. 1973; 8:309-316.

Langeloh A, Schenkel E.. Atividade antiespasmódica do extrato alcoólico de *Marcela* (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.): Compositae sobre a musculatura lisa genital de ratos. Cad Farm. 1982; 1(1):38-44.

Lemonica IP, Damasceno DC, Stasi LC. Study of the embryotoxic effects of na extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1996; 29:223-7.

Lemonica IP; Alvarenga CMD. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC. and *Cajanus cajan* (L.) Millps. in pregnant rats. J Ethnopharmacol 1994; 43:39-44.

Levario-Carrillo M; Olave ME; Corral DC; Alderete JG; Gagiotti SM; Bevilacqua E. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. Exp Toxicol Pathol. 2004; 55:489-96.

Llusia JB. La placenta: Fisiología y patología. Buenos Aires: Díaz de Santos, 1992.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum; 2002. p.131-2.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. Quim. Nova. 2002; 25(3):429-38.

Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 3 ed. New York: Raven Press; 1994. Cap. 28. p. 989-1037.

Manson JM, Zenick H, Costlow RD. Teratology test methods for laboratory animals. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press; 1982. p. 141-84.

Manson JM. Teratogens. In: CD Klaasen, MO Amdur, J Doull. Casarett and Doull's Toxicology. MacMilan Publishing Company, New York, 1986.

Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ. Hepatotoxicology. CRV Press, Inc., Corporate Blvd., New York, Boca Raton, Florida. 2000. p. 700.

Morgan DJ. Drug disposition in mother and foetus. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1997; 24(11):869-73.

Muntener M, Hsu YC. Development of trophoblast and placenta of the mouse. *Acta Anat.* 1977; 98:241-52.

National Research Council. In: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington: National Academy Press, 1996. p. 140.

Nogueira FS, Coelho WMD, Caris CCP, Alves FA, Coelho NMD, Apolinário JC. Eutanásia Animal. *Ciê. Agr. Saúde, FEA.* 2002; 2(2):90-95.

Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2003; 13(2):83-92.

Oga S, Basile AC. *Medicamentos e suas Interações*. São Paulo: Atheneu; 1994. p. 199.

Oga S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu; 1995. p. 515.

Oliveira RJ, Salles MJS, Silva AF, Kanno TYN, Lourenço ACS, Freiria GA, Matiazi HJ, Ribeiro LR, Mantovani MS. Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regul Toxicol Pharm.* 2009; 53:164-73.

Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2000; 11(2):67-76.

Polydoro M, de Souza KCB, Andrades ME, da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EES, Bassani VL, Moreira JCF. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sci.* 2004; 74(23):2815-26.

Puhlmann J, Knaus U, Tubaro L, Schaefer W, Wagner H. Immunobiologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry* 1992; 31(8):2617-21.

Rahman YE, Railkar AM, Venkatararn S. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (DMPH or L1) in rat, rabbit and dog models. *Drug Today.* 1992; 28:55-63.

Rasweiler IVJJ, Badwaik NK. Discoidal Placenta. In: Knobil E, Neill JD. Encyclopedia of Reproduction. San Diego: Academic Press; 1999. p. 890-902.

Redline RW, Lu CY. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. Lab. Invest. 1989; 61(1):27-36.

Regnault TRH, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental Development in Normal and Compromised pregnancies – A Review. Placenta. 2002; 23 (Suppl A): Trophoblast Research. (16):119-29.

Rider V, Jones SR, Foster RT, Imakawa K. Changes in the temporal and spatial expression of H beta 58 during formation and maturation of the chorioallantoic placenta in the Rat. Biol Reprod. 2000; 63(6):1735-46.

Rudge MVC, Borges VTM, Calderon IMP. Adaptação do organismo materno à gravidez. In: Neme B, editor. Obstetrícia básica. São Paulo: Sarvier, 2000;42-51.

Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J. Ethnopharmacol. 2002; 79(3):335–9.

Sanin LH, López SR, Olivares ET, Terrazas MC, Silva MAR, Carrillo ML. Relation between Birth Weight and Placenta Weight. Biol Neonate. 2001, 80:113-117.

Schinoni MI. Fisiologia Hepática: Hepatic Physiology. Gaz Méd. 2006; 76 Suppl 1:85-89.

Simões CMO. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. Fitoterapia. 1988; 59(5):419-421.

Simões CMO, Schenckel EP, Bauer L, Langeloh A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae. J. Ethnopharmacol. 1988; 22:281-93.

Simões CMO, Rech N, Lapa AJ. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcelas). Cad Farm. 1986; 2:37-54.

Smith DA, Clark B. Pharmacokinetics and toxicity testing basic principles and pitfalls. In: Nau H, Scott WJ. (Ed.). Pharmacokinetics in teratogenesis. Florida: CRC Press.; 1987. p. 108-21.

Smith SK. Regulation of angiogenesis in the endometrium. Trends in Endocrin Met. 2001; 12(4):147-51.

Sonaglio D. Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). Porto Alegre: Dissertação de Mestrado Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1987.

Sousa AB, Manzano H, Soto-Blanco B, Gorniak SL. Toxicokinetics of cyanide in rats, pigs and goats after oral dosing with potassium cyanide. Arch toxicol. 2003; 77(6):330-4.

Sousa AB. Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal. Estudo em ratos. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Spinosa HS, Gorniak SM, Bernardi MM. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 2 ed. Guanabara Koogan; 1999, 556-74.

Spritzer DT, Sanseverino MTV, Schuler FL. Manual de Teratogênese. 1 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS; 2001.

Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. Stain Technol. 1964; 39:61-3.

Streck EL; Dalla Costa T. Isoformas do citocromo P450 e outros fatores que alteram a biotransformação de fármacos. Infarma. 1999; 11(11-12):36-41.

Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem.* 1997; 43:1512-26.

Szabo KT. Congenital malformations in laboratory and farm animals. San Diego: Academic Press, 1989.

Taylor P. Skeletal examination. *Practical teratology.* 1986; 10:77-100.

Tennant BC. Hepatic Function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5 ed. London: Academic Press; 1997. p. 327-52.

Thompson AM, Billewicz WZ, Hytten FE. The weight of placenta in relation to birthweight. *Brit J Obstet Gynaecol.* 1969; 76:865-72.

Torchinsky A, Toder V. To die or not to die: the function of the transcription factor NFkB in embryos exposed to stress. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 51:138-43.

Uchida K, Kadowaki M, Nomura Y, Myata K, Miyake T. Relationship between ovarian progesterin secretion and corpora lútea function in pregnant rat. *Endocri. JPN.* 1970; 17:499-507.

Uignard JP, John EG. Renal function in the tiny, premature infant. *Clin. Perinatol.* 1986; 13(2):377-401.

Vargas, VMF, Motta VEP, Leitão AC, Henriques JAP Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureoides* in prokaryotic organisms. *Mut. Res. Gen. Toxicol.* 1990; 240:13-8.

Vessey DA. Metabolismo of xenobiotics by the human liver. In: Zakin D, Boyer TD. *Hepathology: A Textbook of Liver Disease.* 3 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 257-305.

Waynforth HB. Changes in the volume of rats corpus luteum during pregnancy and after surgical interference with the uterus and placenta. *Acta Endocrinol.* 1971; 66:296-302.

Weier N, He SM, Li XT, Wang LL, Zhou SF. Placental drug disposition and its clinical implications. *Curr Drug Metab.* 2008; 9(2):106-21.

Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: Wilson JC, Warkany J. *Teratology principles and techniques.* Chicago: Univ. of Chicago Press; 1965. p. 262-77.

Witorsch RJ. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. *Food Chem Toxicol.* 2002a; 40(7):905-12.

Witorsch RJ. Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regul Toxicol Pharm.* 2002b; 36(1):118-30.

Yuan JH, Goehl TJ, Abdo K, Clark J, Espinosa O, Bugge C. Effects of gavage versus dosed feed administration on the toxicokinetics of benzyl acetate in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33(2):151-8

Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2003; 110 (Suppl 1):10-18.



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante destacar que o estudo da Toxicidade Reprodutiva de agentes naturais é uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva. Os estudos em animais e os estudos epidemiológicos são essenciais para a realização plena da avaliação de risco de uma dada substância. Tanto os estudos conduzidos em animais como os dados epidemiológicos apresentam algumas vantagens e, em contra partida, certo grau de limitação. Diferenças entre espécies são, sem dúvida, a maior limitação dos estudos conduzidos em animais.

Por razões óbvias, substâncias potencialmente tóxicas na gestação não são avaliadas em estudos clínicos prospectivos randomizados. Desta forma, os dados no homem são unicamente aqueles provenientes de condições de exposição pré-existentes e o tipo de informação mais frequente neste contexto é aquela originária de registros médicos. Além disso, algumas alterações reprodutivas, como malformações congênitas, são eventos raros e somente estudos muito extensos seriam capazes de detectá-los em associação com determinada exposição.

Independente da situação sócio-econômica, o relato de uso de plantas medicinais ocorre em diferentes países e geralmente predomina a crença de que produtos naturais não causam efeitos adversos, constituem alternativa segura e desprovida de riscos quando comparados a drogas convencionais. No Brasil, a maioria dos produtos derivados de plantas utilizados culturalmente não apresenta estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva. Portanto, o efeito desses produtos sobre o sistema reprodutivo é pouco conhecido.

Além de salientar que no presente trabalho os efeitos adversos da exposição ao extrato hidroacetônico de *M. ilicifolia* e hidroetanólico de *A. alata* foram causados com a dose preconizada pela utilização na medicina popular, é importante esclarecer à população em geral, e aos profissionais de saúde em particular, que a utilização de produtos provenientes destas plantas deve ser cautelosa ou até mesmo contra indicada para gestantes, até que sejam realizadas mais pesquisas para caracterização do risco toxicológico.

## 9. ANEXOS

1- Documento da Dra Ezilda Jacomassi (Coordenadora do Horto Medicinal do Campus 2 da Universidade Paranaense – UNIVPAR e Profa Titular do Curso de Farmácia) informando que as exsiccatas encaminhadas correspondem à espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek.

2- Protocolo para uso de animais em experimentação (nº 115/2006) aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS.

**UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR**

RECONHECIDA PELA PORTARIA – MEC N.º 1580, DE 09/11/93 – D.O.U. 10/11/93  
MANTENEDORA: ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE ENSINO E CULTURA – APEC

**CAMPUS – PARANAÍ**

Umuarama, 27 de junho de 2007.

Prezada Andrea,

Vimos por meio desta, informar que as exsicatas que nos foram encaminhadas tratam-se da espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ezilda'.

Prof. Dr. Ezilda Jacomassi  
Prof. Titular do Curso de Farmácia  
Coord. do Horto Medicinal do Campus 2 da UNIPAR

---



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 115/2006 referente ao projeto de pesquisa "**Efeitos da ingestão de extrato hidroetanólico de *Achyrocline alata* e *Maytenus ilicifolia* em ratas prenhes**", de responsabilidade da Pesquisadora **Andréa Luiza Cunha Laura**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolve diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 23 de junho de 2006.

Campo Grande (MS), 25 de janeiro de 2010.

  
Dr. Maria Araújo Teixeira  
Presidente da CEUA

Obs. 2ª via do certificado devido à substituição da planta *Duguetia furfuracea* por *Achyrocline alata*.