

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lia de Barros Leite Albuquerque

ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Plathymenia reticulata* Benth.

SOROCABA/SP

2009

Lia de Barros Leite Albuquerque

ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Plathymenia reticulata* Benth.

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes.

SOROCABA/SP

2009

Ficha Catalográfica

L311e Albuquerque, Lia de Barros Leite
Estudos *in vitro* e *in vivo* da *Plathymenia reticulata* Benth. / Lia de Barros Leite Albuquerque. -- Sorocaba, SP, 2009.
95 f. : il.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Santos Lopes
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2009.

1. *Plathymenia reticulata* Benth. 2. Citotoxicidade. 3. Plantas
medicinais. 4 Medicamentos fitoterápicos. I. Lopes, Patrícia Santos,
orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Lia de Barros Leite Albuquerque

ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Plathymenia reticulata* Benth.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA:

Ass.: _____
Pres.; Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes - UNISO

Ass.: _____
1^o Exam.: Prof^a. Dr^a. Priscila Randazzo de Moura - PUC - Sorocaba/SP

Ass.: _____
2^o Exam.: Prof^a. Dr^a. Andrea Cecília Dorion Rodas - IPEN/CNEN - SP

**Dedico este trabalho ao meu
marido André e aos meus pais
Roque e Telma.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a “Deus” por me iluminar nesta jornada.

Aos meus pais Roque e Telma que tanto me incentivaram.

Ao meu marido André que soube entender as horas de ausência.

À CAPES e a UNISO que me concederam a Bolsa de estudos.

Em especial à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Lopes pela compreensão e pelos ensinamentos proporcionados.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Ferreira de Almeida, pela orientação nos estudos estatísticos deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek do laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP), pela oportunidade de realizar os experimentos.

À Prof^a. Dr^a. Marli Gerenutti pela co-orientação nos experimentos de embriotoxicidade.

À Prof^a. Dr^a. Yoko Oshima Franco, a qual foi mentora deste trabalho.

Às pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração deste trabalho, tais como Nicole Moreira Farrapo, Aline Carla Farrapo Xavier, Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, Prof^a Dr^a Priscila Randazzo de Moura, Diego Baratelli, Natália Mencacci Esteves, Prof^a Dr^a Andréa Cecília Dorión Rodas, Renato.

Trabalho edificante em andamento no Plano Físico, onde se reúnem milhões de criaturas diferentes entre si, não se desenvolve sem críticas.

Sabemos todos que a infinita Bondade de Deus que nos sustentou ontem, nos sustentará igualmente hoje e, dentro de semelhante convicção manteremos a certeza de que com Deus venceremos.

Francisco C. Xavier.

RESUMO

A *Plathymenia reticulata* Benth. (*Pr.*) pertence à família Leguminosae, é uma planta típica do cerrado conhecida vulgarmente como vinhático. A entrecasca do caule é utilizada popularmente no tratamento de processos inflamatórios. Segundo normas vigentes no Brasil (RDC nº 17), para o registro de medicamento fitoterápico é necessário apresentação de relatório técnico com informações que incluem estudos científicos que comprovem a segurança de seu uso. O presente trabalho avaliou a segurança do extrato hidroalcoólico da *Pr.* através de testes *in vitro* avaliando a citotoxicidade utilizando Células de Ovário de Hamster Chines (CHO) e *in vivo* durante a gestação de ratas. A citotoxicidade foi avaliada, expondo células CHO a diferentes concentrações do extrato. As células viáveis foram quantificadas utilizando o corante vital MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4 sulfofenil)- 2H-tetrazólio)/(Phenazine methosulfate). A concentração não tóxica foi de 0,113 mg/mL, e a concentração tóxica, que mata 50% das células viáveis foi de 0,331 mg/mL o que predeterminou a dose letal que mata 50% dos animais (DL 50 = 1.379,67 mg/Kg) do extrato, reduzindo o número de animais utilizados nos testes *in vivo*. O extrato hidroalcoólico da planta foi administrado diariamente as ratas prenhes, por via oral (0,5 g/Kg e 1 g/Kg), do primeiro ao décimo oitavo dia de gestação. No décimo nono dia realizou-se a cesária, onde foi observado o desempenho reprodutivo das ratas. Considerando que as Leis vigentes do País determinam que sejam realizados testes complementares de determinação do potencial teratogênico das diversas espécies vegetais medicinais, nossos resultados indicam que o extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth., não apresentam a possibilidade de causar má formação congênita, porém observou-se algumas alterações estatisticamente significativas quando comparado com o controle, sendo assim, são necessários mais estudos complementares sobre o extrato para determinar o potencial tóxico do mesmo e assim ser um indicativo para o uso seguro.

Palavras chave: *Plathymenia reticulata* Benth. Segurança. Citotoxicidade. Embriotoxicidade. Gestação.

ABSTRACT

The *Plathymenia reticulata* Benth. (*Pr.*) is a typical plant of the Cerrado areas commonly known as Vinhático which belongs to the Leguminosae family. The bark is used for the treatment of inflammatory conditions. According to current Brazilian Standards (DRC No. 17) in order to register medicinal phytotherapies the submission of a technical report containing information which includes scientific studies about the safety of its use is required. The present study evaluated the safety of the *Pr.* hydroalcoholic extract through in vitro tests assessing the cytotoxicity using Chinese hamster ovary (CHO) cells as well as in vivo assays carried out in pregnant rats. The cytotoxicity was evaluated by exposing the CHO cells to different extract concentrations. The viable cells were quantified using a vital dye known as MTS /PMS. The non-toxic concentration (IC 10) corresponded to 0113 mg/ml, and the toxic concentration (IC 50) to 0331 mg/ml which predetermined the extract lethal dose (LD = 1379.67 mg/kg) leading to a reduction in the animals amount to be used in further in vivo tests. The hydroalcoholic extract was orally administered daily to pregnant rats (0.5 g / kg and 1g/kg) on the first to the eighteenth gestation day. The cesarean was performed on the nineteenth day of the pregnancy period and the rats reproductive performance was observed. Based on national laws that demand additional tests in order to determine the teratogenic potential of various medicinal plant species, our results indicate that the *Pr.* hydroalcoholic extract holds no teratogenic potential, although some relative statistical changes were observed when the experimental groups were compared to the control. Thus further complementary studies are indeed necessary as an attempt to determine the toxicity potential of the plant and therefore represent a reliable indicative for its safety use.

Keywords: *Plathymenia reticulata* Benth. Security. Cytotoxicity. Toxicity. Pregnancy.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | <i>Plathymenia reticulata</i> Benth..... | 21 |
| Figura 2 | Fluxograma dos métodos utilizados nos estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth..... | 38 |
| Figura 3 | Cascas de <i>Plathymenia reticulata</i> Benth..... | 39 |
| Figura 4 | Estufa de circulação de ar..... | 39 |
| Figura 5 | Moinho de facas e martelos..... | 39 |
| Figura 6 | Percolador..... | 40 |
| Figura 7 | Rotaevaporador..... | 40 |
| Figura 8 | Liofilizador..... | 40 |
| Figura 9 | Fluxo laminar..... | 41 |
| Figura 10 | Fluxograma referente do cultivo e determinação da proliferação celular da CHO (Chinese Hamster Ovary)..... | 43 |
| Figura 11 | Sistema Micro-Ambiental..... | 45 |
| Figura 12 | Administração oral (gavagem) da extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth..... | 46 |
| Figura 13 | Técnica de evisceração e diafanização..... | 48 |
| Figura 14 | Esquema de feto mostrando o esquema de cortes de Wilson..... | 49 |
| Figura 15 | Extrato liofilizado..... | 50 |
| Figura 16 | Extrato liofilizado visto em microscópio óptico invertido (Axiovert mod. 40), objetiva 10X..... | 50 |
| Figura 17 | Curva representativa da porcentagem de viabilidade celular, IC 50 e IC 10 das células em contato com o extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. frente as concentrações descritas na tabela 2..... | 51 |
| Figura 18 | Exemplo de ensaio colorimétrico em placa de 96 poços..... | 52 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 19 | Confirmação da prenhez: presença de espermatozóides em esfregaço vaginal de ratas..... | 54 |
| Figura 20 | Efeitos da administração do extrato hidrolcólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. sobre o ganho de peso de ratas durante o período gestacional. (n=05, $p \geq 0,05$, Teste <i>One-Way ANOVA</i>)..... | 54 |
| Figura 21 | Média do ganho de peso dos fetos e placentas expostos ao extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. (n: 05,* $p \leq 0,05$ em relação ao controle, Teste <i>One-Way ANOVA</i>)..... | 56 |
| Figura 22 | Representação fotográfica do útero gravídico de rata: corno uterino direito (CUD), corno uterino esquerdo (CUE), ovário direito (OD), ovário esquerdo (OE)..... | 57 |
| Figura 23 | (A) ovários de ratas, (B) corpos lúteos de ratas..... | 57 |
| Figura 24 | Fetos (F) envoltos em saco gestacional e placenta (PL): Contagem do número de fetos..... | 58 |
| Figura 25 | Exposição de fetos (F) e placenta (PL) para avaliação do número de implantações uterinas..... | 58 |
| Figura 26 | Fetos (F) envoltos em saco gestacional e ponto de reabsorção (R)..... | 59 |
| Figura 27 | Avaliação dos parâmetros morfológicos externos dos fetos fixados em Bouin – (A) crânio-caudal, (B) cauda, (C) ântero-posterior do crânio (D) latero-lateral do crânio, (E) antero-posterior do tórax, (F) latero-lateral do tórax..... | 60 |
| Figura 28 | Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. nas doses de 0,5 g/Kg e 1,0 g/Kg no período gestacional de ratas, sobre os parâmetros morfológicos externos de fetos. (A) crânio-caudal, (B) cauda, (C) antero-posterior do crânio, (D) látero-lateral do crânio, (E) antero-posterior do tórax, (F) látero-lateral do tórax..... | 62 |
| Figura 29 | Vista lateral de feto diafanizado: (ESC) escápula, (PE) pelve, (CV) coluna vertebral, (CR) crânio e (M) mandíbula..... | 62 |
| Figura 30 | Vista posterior de feto diafanizado: (ESC) escápula, (PE) pelve, (CV) coluna vertebral e (CR) crânio..... | 63 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 31 | Vista frontal de feto diafanizado: (M) presença de mandíbula e (EST) esterno..... | 63 |
| Figura 32 | Cortes na região da cabeça e do pescoço: (A) Corte transversal da boca, (B) Corte frontal da cavidade nasal, (C) Corte frontal dos hemisférios cerebrais, (D) Corte frontal do olho..... | 65 |
| Figura 33 | Corte transversal abdominal..... | 66 |
| Figura 34 | Corte transversal na região dos rins..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Esquema da disposição das células CHO na placa de 96 poços (NIH, 2001)..... | 42 |
| Tabela 2 | Concentrações do extrato de <i>Plathymenia reticulata</i> adicionadas nas placas de 96 poços..... | 42 |
| Tabela 3 | Avaliação do desempenho reprodutivo de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth..... | 55 |
| Tabela 4 | Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. na dose de 0,5 /Kg e 1,0 g/Kg no período gestacional de ratas, sobre os parâmetros morfológicos externos dos fetos..... | 61 |
| Tabela 5 | Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. na dose de 0,5g/kg e 1g/Kg no período de gestação de ratas, sobre o número de ossificação do esterno nos fetos..... | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - American Type Culture Collection
- β -HCG – Beta Gonadotrofina Coriônica Humana
- CHO - Células de Ovário de Hamster Chinês
- CNS - Conselho Nacional de Saúde
- COX - Ciclooxigenase
- DL 50 - Dose letal para matar 50% da população
- EC 50 - Dose efetiva média para 50% da população
- ECVAM - Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos
- EDTA - Ethylene Diamine Tetracetic Acid
- EPI - Equipamento de Proteção Individual
- IC 10 - Concentração Inibitória Máxima para matar 10% das células
- IC 50 - Concentração Inibitória Máxima para matar 50% das células
- ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
- ISO - International Standard Organization
- MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4 sulfofenil)- 2H-tetrazólio)
- NICEATM - The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
- NIH - National Institutes of Health
- nm - nanômetro
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBS - MCF - Phosphate Buffer Solution – Magnesium and Calcium free
- PGE₂ - Prostaglandinas E₂
- PGF₂ α - Prostaglandinas F₂ α
- PMS - Phenazine methosulfate (Acoplador de elétrons)
- Pr.* - *Plathymenia reticulata* Benth.
- RC - Registro de citotoxicidade
- RPMI-SFB - Meio de cultura para CHO desenvolvido pelo **Instituto Roswell Memorial** - Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.1 <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. | 17 |
| 2.2 Legislação..... | 22 |
| 2.3 Citotoxicidade..... | 25 |
| 2.4 Toxicologia da Reprodução..... | 28 |
| 3 OBJETIVOS..... | 33 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 33 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 33 |
| 4 MATERIAL..... | 34 |
| 4.1 Plantas / Extrato..... | 34 |
| 4.1.1 Equipamentos..... | 34 |
| 4.2 Avaliação <i>in vitro</i>..... | 34 |
| 4.2.1 Reagentes..... | 35 |
| 4.2.2 Equipamentos..... | 35 |
| 4.3 Avaliação <i>in vivo</i>..... | 35 |
| 4.3.1 Sistema micro-ambiental..... | 36 |
| 4.3.2 Avaliação morfológica dos fetos..... | 36 |
| 4.3.2.1 Reagentes..... | 36 |
| 4.3.3 Anestésico para cesária..... | 37 |
| 4.3.4 Avaliação visceral dos fetos..... | 37 |
| 5 MÉTODOS..... | 38 |
| 5.1 Material vegetal e obtenção da droga..... | 39 |
| 5.2 Preparo do extrato hidroalcoólico..... | 39 |
| 5.3 Avaliação <i>in vitro</i>..... | 40 |
| 5.4 Determinação da proliferação celular..... | 42 |
| 5.5 Avaliação <i>in vivo</i>..... | 44 |
| 5.6 Estudos da toxidade da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth. No período gestacional de ratas..... | 45 |
| 5.6.1 Acasalamento e constatação da prenhes..... | 45 |
| 5.6.2 Índice de fertilidade de ratas prenhes..... | 46 |
| 5.6.3 Parâmetros morfológicos dos fetos..... | 47 |
| 5.6.4 Avaliação visceral dos fetos..... | 48 |
| 5.7 Análise Estatística..... | 49 |
| 6 RESULTADOS..... | 50 |
| 6.1 Material vegetal e obtenção da droga..... | 50 |
| 6.2 Preparo do extrato hidroalcoólico..... | 50 |
| 6.3 Avaliação <i>in vivo</i>..... | 51 |
| 6.4 Avaliação <i>in vivo</i>..... | 53 |
| 6.4.1 Toxidade na gestação de ratas..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 6.4.1.1 Acasalamento, constatação da prenhez e avaliação do ganho de peso de ratas prenhes..... | 53 |
| 6.4.1.2 Índice de fertilidade e reprodutivo de ratas prenhes..... | 55 |
| 6.4.1.3 Parâmetros morfológicos dos fetos..... | 59 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 67 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 76 |
| REFERÊNCIAS | 77 |
| ANEXO A: Aprovação do Comitê Ética em Pesquisa..... | 85 |
| ANEXO B: VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the life Sciences..... | 86 |
| ANEXO C: 7TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES..... | 90 |
| ANEXO D: 12º EPIC – Encontro de Pesquisadores de Iniciação Científica – UNISO..... | 94 |
| ANEXO E: Publicação no Jornal Cruzeiro do Sul – Medicamentos fitoterápicos vc. segurança..... | 95 |

1 INTRODUÇÃO

As savanas brasileiras, conhecida como cerrado, compreendem uma das maiores biodiversidades encontradas no Brasil. A expansão das áreas agrícolas vêm provocando a extinção de várias espécies vegetais e muitas dessas espécies com aplicações biotecnológicas de alto interesse na medicina e na indústria de alimentos. (DRUMOND, 1982)

A *Plathymenia reticulata* Benth. (*Pr.*), pertencente à família Leguminosae, é uma planta típica do cerrado brasileiro, conhecida vulgarmente como vinhático (FERNANDES, 2002), é uma árvore de aproximadamente 15 metros de altura. A entrecasca do caule desta espécie é utilizada popularmente no tratamento de diversos processos inflamatórios. Os extratos brutos hidroalcoólicos de *Plathymenia reticulata* apresentam coloração avermelhada, podendo produzir resultados falso positivos em testes fitoquímicos, já que muitas substâncias são detectadas pela mudança de cor das reações. Nessas condições, os principais grupos detectados através da triagem fitoquímica, foram flavonóides, taninos, antocianinas e saponinas. (FERNANDES, 2002)

Todo medicamento para ser comercializado no Brasil deve ser registrado no órgão competente, ou seja, na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os medicamentos fitoterápicos devem contemplar as exigências da RDC nº 17, publicada em 24 de Fevereiro de 2000, que Dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos. Segundo a RDC nº 17, para o registro de medicamento fitoterápico novo deverá ser apresentado relatório técnico com informações quanto à natureza da matéria prima de partida, como a planta fresca, droga vegetal e derivados da matéria prima vegetal e quanto ao medicamento acabado, incluindo a apresentação de estudos científicos que comprovem a segurança do uso do medicamento, de acordo com as exigências estipuladas pelo CNS (Conselho Nacional de Saúde) (Resolução 196/96) e apresentação de estudos científicos que comprovem a eficácia terapêutica do medicamento, de acordo com as exigências estipuladas pelo CNS. (ANVISA, 2000)

Seguindo as diretrizes mundiais que preconizam a diminuição do número de animais, antes de iniciar os experimentos *in vivo*, realizou-se teste *in vitro* de

citotoxicidade utilizando células de Ovário de Hamster Chinês (CHO). Estas células foram escolhidas, pois são de linhagem celular facilmente cultivada e por serem derivadas de ovário de hamster.

A Concentração Inibitória Máxima para matar 50% das células (IC 50) é a forma de avaliar o potencial tóxico da amostra frente às células em análise. Já a IC 10, ou seja, a Concentração Inibitória Máxima para matar 10% das células é um recurso para mostrar a concentração máxima não tóxica da amostra quando em contato com as células. (DOYLE; GRIFFITHS, 2000)

Neste sentido, esta pesquisa avaliou os efeitos do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. em modelos *in vitro* avaliando a citotoxicidade, e *in vivo*, durante a gestação das ratas para verificar os efeitos do extrato nas mães e posteriores efeitos teratogênicos nos fetos.

Considerando que as Leis vigentes do país determinam que sejam realizados testes complementares de determinação do potencial teratogênico das diversas espécies vegetais medicinais, os resultados indicam que o extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth., não apresenta potencial teratogênico, porém observou-se algumas alterações em determinados parâmetros, como os pesos das placentas e dos fetos, sendo, portanto, necessários estudos complementares sobre a planta para determinar a segurança do uso da *Plathymenia reticulata* Benth. como possível medicamento fitoterápico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Plathymenia reticulata* Benth.

A utilização das plantas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga (YUNES; CALIXTO, 2001). Os estudos da arqueologia indicam que há mais de 3.000 anos as ervas eram utilizadas para este fim. (TESKE; TRENTINI, 2001)

A fitoterapia é o método de tratamento de enfermidades que emprega vegetais frescos, drogas vegetais ou, ainda, extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matérias-primas. (OLIVEIRA; AKISUE, 1997)

Segundo Teske e Trentini (2001), o descobrimento das propriedades curativas das plantas foi, no início, meramente intuitivo ou, observando os animais que, quando doentes, buscavam nas ervas cura para suas afecções. O autor ainda afirmar que, 2000 anos antes do aparecimento dos primeiros médicos gregos, já existia uma medicina egípcia organizada. Os conhecimentos médicos iniciados no antigo Egito difundiram-se mais tarde para a Mesopotâmia. Foram, sobretudo os gregos, e mais tarde os romanos, que herdaram e aperfeiçoaram os conhecimentos egípcios. Hipócrates reuniu a totalidade dos conhecimentos médicos de seu tempo no conjunto de tratados conhecidos pelo nome de *Corpus Hipocraticum*, onde, para cada enfermidade, descreve um remédio vegetal e o tratamento correspondente.

Ainda segundo Teske e Trentini (2001), no início da era cristã, Dioscórides inventariou, no seu tratado *De Materia Medica*, mais de 500 drogas de origem vegetal, mineral ou animal. Finalmente, o grego Galeno, ligou o seu nome ao que ainda se denomina "farmácia galênica", onde as plantas não são mais usadas na forma de pó e sim em preparações, nas quais são usadas solventes como álcool, água ou vinagre, e servem para conservar e concentrar os componentes ativos das plantas, utilizados para preparar unguentos, emplastros e outras formas galênicas.

A partir de século XV houve uma preocupação em catalogar um grande número de vegetais, identificando-os e classificando-os de acordo com a procedência, e características dos princípios ativos. Finalmente, os esforços de

classificação culminaram, em 1735, com a publicação de *Systema Naturae*, de Lineu. (TESKE; TRENTINI, 2001)

No início do século XVI o médico suíço Paracelso, tentou relacionar as virtudes das plantas com as suas propriedades morfológicas, sua forma e sua cor, elaborando uma teoria conhecida como a "teoria dos sinais" ou "teoria da similitude". Paracelso considerava que uma doença se podia curar com aquilo que com ela tivesse semelhança. (TESKE; TRENTINI, 2001)

No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. (GARCIA et al., 2008)

De acordo com Yunes e Calixto (2001), em todo o mundo observou-se um aumento expressivo no mercado dos medicamentos fitoterápicos, especialmente nos países industrializados. Somente na Europa, o mercado dos medicamentos fitoterápicos atinge cerca de 7 bilhões de dólares ao ano, sendo a Alemanha responsável por cerca de 50% deste. O mercado asiático é também muito expressivo, atingindo cerca de 4 bilhões de dólares. As pesquisas indicam que cerca de 60 milhões de americanos recorrem aos medicamentos fitoterápicos para o tratamento de suas enfermidades, o que corresponde a um consumo per capita de cerca de 54 dólares/ano. Em consequência do expressivo crescimento do mercado mundial dos medicamentos fitoterápicos, as maiores indústrias farmacêuticas multinacionais, muitas delas americanas, passaram a se interessar por esse mercado, até então formado predominantemente por pequenas empresas européias e asiáticas. Os autores afirmam ainda que até o ano 2001 poucos medicamentos fitoterápicos haviam sido estudados cientificamente, visando à confirmação de suas eficácias clínicas e a segurança. Com o crescimento desse mercado em todo o mundo, alguns medicamentos fitoterápicos, comercializados principalmente na Europa, passaram a ser estudados cientificamente, através de ensaios pré-clínicos e clínicos.

No Brasil 20% da população consomem 63% dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação. O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas

mundiais mantinha programas nesta linha e atualmente isto tem sido prioridade na maioria delas. (FOGLIO et al., 2006)

Várias espécies de plantas se destacam como alimentícias, medicinais, madeiras, artesanais, além de outros usos. No entanto, há ainda necessidade de estudos profundos mostrando a utilidade das plantas de forma mais ampla. Estes estudos podem incentivar o seu uso e manejo adequado, visando à valorização desses recursos e combatendo o extrativismo predatório. (AQUINO; WALTER; RIBEIRO, 2007)

Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal: a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer; estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies; falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas. Por outro lado, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de efeitos colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença na sua eficácia. Acompanhando esses fatos, houve o ressurgimento de algumas práticas alternativas como: cromoterapia, florais, homeopatia, medicina chinesa e outros, de eficácia duvidosa e que, muitas vezes, prometem milagres sem ocorrência de efeitos colaterais. A falsa crença na absoluta segurança do uso dos fitoterápicos é bastante disseminada. Há uma tendência em acreditar que tudo o que existe na natureza foi feito para satisfazer as necessidades humanas, não existindo riscos em seu consumo. (CARVALHO, 2001)

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise. Geralmente têm início com um botânico, etnobotânico ou ecólogo que coleta e identifica a planta. Essa coleta geralmente é realizada para plantas que podem ter algum composto ativo, pois estão relacionadas taxonomicamente às espécies com compostos ativos já conhecidos ou que são utilizadas na medicina popular de uma região. Os fitoquímicos preparam os extratos dessa planta e submetem esse material à triagem biológica em ensaios farmacológicos. A presença de efeito farmacológico direciona o processo de isolamento do princípio ativo através do biomonitoramento pelos testes de atividade. Para a descoberta do mecanismo de ação desses compostos a biologia molecular disponibiliza ferramentas que permitem determinar os sítios celulares e ou fisiológicos envolvidos nesse processo. Isso mostra que esse trabalho

é necessariamente multidisciplinar e abrange todos os campos do conhecimento aqui citados. (BALUNAS; KINGHORN, 2005)

O desenvolvimento de métodos de manejo, cultivo e melhoramento genético representa uma nova tendência no estudo de plantas medicinais, pois asseguram maior qualidade e eficácia à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas. (CALIXTO, 2000)

Dias (1996) afirma que o Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000.

Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais, pois formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Estes complexos também são responsáveis pelas suas propriedades, como controle de crescimento de insetos, fungos e bactérias, bem como por seus usos industriais. (GAULEJAC; GLORIES; VIVAS, 1999)

Os flavonóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza contribuindo para a coloração das flores, frutos e folhas. Existem muitos trabalhos que descrevem os efeitos farmacológicos, entre eles: atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana e anticancerígena. (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000)

Segundo Simões et al. (2000), as saponinas são componentes importantes para ação de muitas drogas vegetais, destacando-se aquelas tradicionalmente utilizadas como expectorantes e diuréticas.

Os compostos fenólicos como as antocianinas apresentam ação antioxidante, anticancerígena, antiinflamatória e contribuem na manutenção da permeabilidade vascular. (GAULEJAC; GLORIES; VIVAS, 1999)

Pio Correa (1969), destaca que as espécies desse gênero apresentam folhas bipinadas, flores pequenas dispostas em espigas cilíndricas, frutos em vagens e sementes aladas. O vinhático é muito apreciado por sua madeira bonita, de cor amarela, durável e fácil de trabalhar, sendo muito utilizada na marcenaria.

Neto (2006), em seu estudo menciona a utilização da casca do caule e ramos da *Plathymenia reticulata* Benth. (Figura 1), em banhos para o tratamento de varizes.



Figura 1: *Plathymenia reticulata* Benth.
Fonte: ÁRVORES..., 2009.

Segundo estudos realizados por Aquino, Walter e Ribeiro (2007), a *Pr.* apresentou potencial para sete categorias: medicinal, madeireira, tintorial, ornamental, artesanal, tanífera e apícola. Caramoni, Lima e Fernandes (2004) encontraram no vinhático uma alta concentração de proteína solúvel, além do alto nível de atividade enzimática.

Em estudos realizados por Fernandes e Pimenta (2005), foi verificado a atividade antimicrobiana dos extratos da *H. courbaril*, *P. reticulata* e *G. ulmifolia*, cujos extratos apresentaram atividade antimicrobiana para a maioria das bactérias gram-positivas analisadas. O extrato hidroalcoólico da *P. reticulata* inibiu 91% das bactérias gram-positivas, enquanto que o extrato da *G. ulmifolia* e *H. courbaril* inibiram 72,7% e 63,3%, respectivamente. O *B. stearothermophilus* ATCC (American Type Culture Collection) 1262, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 2722 e o *S. aureus* ATCC 10495 foram inibidos pelos extratos hidroalcoólicos destas três plantas.

Fernandes e Pimenta (2005), foram os primeiros a detectarem frações bioativas e substâncias com atividade antimicrobiana da *P. reticulata* sobre bactérias gram-positivas, porém, os mesmos afirmam a necessidade de avaliar a toxicidade e a ação farmacológica desta planta e torná-la alternativa como medicamento fitoterápico.

No Laboratório de Biociência da Universidade de Sorocaba (UNISO), pesquisadores verificaram a ação do extrato bruto hidroalcoólico das cascas de *Plathymenia reticulata* Benth. como bloqueador neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (informação verbal)¹.

¹ Notícia fornecida por Farrapo et al. em seus estudos em Outubro de 2008 no Laboratório de Biociências da Universidade de Sorocaba – UNISO.

2.2 Legislação

A RDC nº 17 determina as exigências para o registro de medicamento fitoterápico tradicional e registro com base na similaridade. A isenção de registro de medicamento fitoterápico, segundo a RDC nº 17, será concedida àquele cuja formulação esteja inscrita na Farmacopéia Brasileira ou códigos oficiais aceitos. Para finalizar, há as exigências referentes à embalagem e bula e as considerações finais que diz que qualquer membro da sociedade poderá apresentar, para avaliação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sugestões de inclusão, supressão ou modificação da lista de medicamentos constante do Anexo I da RDC nº 17. (ANVISA, 2000)

A Portaria nº 116, de 08 de Agosto de 1996, publica proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (ANVISA, 1996). O estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos, bem como seus protocolos, deverá seguir as determinações da Resolução nº 01/88 do Conselho Nacional de Saúde ou da legislação que a substituir, bem como atender aos princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios de farmacologia clínica humana (Normas de Boas Práticas Clínicas). Os ensaios toxicológicos devem ser realizados em seres humanos saudáveis e em espécies animais de linhagens bem definidas, não devendo ser usadas linhagens com características genéticas especiais. O protocolo experimental de cada estudo deverá ser elaborado de forma a permitir a demonstração da ausência ou da eventual toxicidade do produto fitoterápico. Os ensaios em seres humanos serão realizados empregando-se cada produto fitoterápico na forma farmacêutica em que será comercializado. Uma vez aprovados pelos Comitês de Ética, os protocolos de ensaios clínicos toxicológicos propostos para cada produto deverão ser encaminhados, pelo respectivo fabricante, à Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, para registro e controle. A portaria determina que sejam realizados testes complementares de avaliação de efeitos adversos sobre a fertilidade e a performance reprodutiva causada por drogas administradas durante a gametogênese e fecundação (em uma espécie de mamífero), determinação de efeitos adversos, sobre fetos durante a vida intra e extra uterina, por drogas administradas durante a gestação (em duas espécies de mamíferos); determinação

de efeitos adversos, sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período (em uma espécie de mamíferos); determinação de carcinogenicidade se a droga em estudo: apresentar analogia com substância que se suspeita ou que seja reconhecidamente cancerígena, afetar mitose, aparentemente seja retida em tecidos corpóreos por longos períodos e deva ser usada por longos períodos, especialmente em jovens; determinação de mutagenicidade se a droga em estudo: for usada por longos períodos (acima de um ano), ter analogia com substância que se suspeita ou que seja reconhecidamente mutagênica, provocar depressão de medula óssea, em doses toleráveis, deprimir a gametogênese ou reduza a fertilidade e produzir efeitos cancerígenos. (ANVISA, 1996)

O uso de plantas medicinais em ratas tem sido estudado para verificar os efeitos na reprodução das mesmas. A Resolução nº 116, de 8 de agosto de 1996, mostra a importância da realização de testes toxicológicos e de eficácia de produtos feitos a partir de plantas medicinais. Esta resolução determina que o protocolo experimental a ser empregado deverá ser elaborado de forma a permitir a demonstração ou ausência da eventual toxicidade do produto fitoterápico. Dentre as considerações gerais sobre os experimentos toxicológicos, a determinação de efeitos adversos, sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período, são de grande importância. Deve-se enfatizar que tal necessidade satisfaz a exigência da legislação atual que considera (ANVISA, 1996):

- O potencial tóxico, teratogênico e abortivo de diversas espécies vegetais medicinais;
- A necessidade de assegurar qualidade, segurança e eficácia para o uso terapêutico de plantas medicinais;
- A necessidade de esclarecer à população em geral, e aos profissionais de saúde em particular, sobre os riscos do uso indiscriminado de espécies medicinais;
- Que gestantes e lactantes constituem grupo populacional que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais;

A mesma Portaria nº 116, de 08 de Agosto de 1996 indica que para produtos já registrados e comercializados serão exigidos ensaios no ser humano, podendo ser dispensados os estudos pré-clínicos de caracterização farmacodinâmica.

Admite-se que os estudos pré-clínicos toxicológicos sejam realizados concomitantemente aos estudos clínicos. No caso de produtos novos serão exigidos, além de estudos no ser humano, estudos de farmacologia pré-clínica. Em ambos os casos, a evidência de que o produto não apresenta toxicidade, ou que a eventual toxicidade é compatível com o uso na espécie humana, deve ser cientificamente comprovada. Uma vez aprovados pelos Comitês de Ética, os protocolos de ensaios clínicos propostos para cada produto deverão ser encaminhados pelo respectivo fabricante, à Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, para registro e controle. Além dessas normas, poderá ser consultado o Roteiro de ensaios pré-clínicos e clínicos da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento Científico da Central e Medicamentos do Ministério da Saúde e as duas referências a seguir:

- WORLD Health Organization Regional Office for the Western Pacific, Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. WHO: Manila, 1993.

- Proposed WHO Guidelines for Good Clinical Practice (GCP) for Trials on Pharmaceutical Products, WHO Drug Information, v.6, n.4, p.170-188, 1992. (ANVISA, 1996)

Em 16 de março de 2004 foi publicada a RDC nº 48, que visa atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos, abordando as medidas antecedentes ao registro de medicamentos fitoterápicos, o registro e as medidas do pós-registro. (ANVISA, 2004d)

A Resolução RE nº 88 e Resolução RE nº 89, também de 16 de março de 2004, determinam a publicação da "LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE FITOTERÁPICOS" e a publicação da "LISTA DE REGISTRO SIMPLIFICADO DE FITOTERÁPICOS", respectivamente. (ANVISA, 2004 a, b)

Em 16 de Março de 2004 a Resolução RE nº 90 determina a publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". Este guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a Resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos. Os estudos de toxicidade devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido. (ANVISA, 2004c)

No ano de 2006, no dia 22 de Junho, conforme o Decreto nº 5813, o presidente da república aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, tendo como objetivo geral garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, e como objetivos específicos ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais, construir o marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos a partir dos modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países, promover pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva, promover o desenvolvimento sustentável das cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos e o fortalecimento da indústria farmacêutica nacional neste campo e promover o uso sustentável da biodiversidade e a repartição dos benefícios decorrentes do acesso aos recursos genéticos de plantas medicinais e ao conhecimento tradicional associado. (ANVISA, 2006)

2.3 Citotoxicidade

O desenvolvimento dos testes de citotoxicidade *in vitro* e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como "Food and Drug Administration", em 1993 e " Organization for Economic Cooperation and Development", em 1987 (HUGGET et al., 1996), tem favorecido a substituição dos ensaios que utilizam animais em experimentação.

Atualmente as substâncias selecionadas pelos testes em cultura de células estão sendo avaliadas em modelos experimentais de câncer utilizando animais de laboratório. (CARVALHO, 2006)

Segundo Freshney (2005), antes de serem lançados no mercado, substâncias ativas farmacêuticas e cosméticas devem ser analisadas através de testes que comprovem a ausência de toxicidade destes produtos. A toxicidade é um evento

complexo *in vivo*, podendo haver um dano celular direto gerando respostas fisiológicas, tais como: efeitos inflamatórios locais ou sistêmicos. No entanto, é difícil monitorar efeitos sistêmicos *in vitro*, a maioria dos testes desta natureza, determina os efeitos a nível celular, ou seja, a citotoxicidade.

Foglio et al. (2006), ressaltam a necessidade de uma atuação multidisciplinar em estudos com plantas, incluindo desde testes fitoquímico, agrotecnológico, microbiológico, farmacológico e biotecnológico, de tal forma que esta integração possa propiciar uma ampliação nas possibilidades na busca de novas moléculas ativas. Apesar de contar com uma enorme biodiversidade, o Brasil dispõe de uma infra-estrutura que deve ser melhorada para adequar a produção e a extração racional das espécies. Para o estudo fitoquímico, todas estas especialidades têm papel importante na pesquisa com plantas medicinais. Qualquer profissional ou instituição que deseja trabalhar com plantas medicinais esbarra na dificuldade em produzi-las ou adquiri-las com confiabilidade na identificação botânica ou mesmo em obter informações sobre em quais condições a espécie foi cultivada. Nas áreas microbiológica e farmacológica encontram-se o apoio necessário à caracterização da atividade *in vitro* e *in vivo* das plantas em estudo, na busca da determinação da atividade antimicrobiana destes produtos e o controle de qualidade fitopatológico das espécies e seus produtos acabados. As plantas não são unicamente uma fonte potencial de princípios ativos quimicamente definidos. O uso de extratos é também possível e, para isto, a atividade farmacológica deve estar definida, assim como os compostos responsáveis por esta atividade (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Do ponto de vista farmacológico é imprescindível a avaliação da atividade em diversos modelos como o antiulcerogênico, antiinflamatório, anticâncer em cultura de células tumorais humanas e em modelos experimentais utilizando animais de laboratório, anticonvulsivante, analgésico e outros, bem como avaliação toxicológica (citotoxicidade, toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas - toxicidade crônica, irritação dérmica primária e cumulativa, irritação ocular, sensibilidade cutânea e fototoxicidade).

Castell, Gomez-Lechón e Ponsoda (2000) destacam que o desenvolvimento de protocolos para toxicidade deve-se basear em pesquisas sobre a citotoxicidade basal dos parâmetros de *endpoint* (viabilidade celular, sobrevivência celular, efeitos do metabolismo, etc.). O primeiro passo para calcular a toxicidade, deve-se basear não somente no enfraquecimento ou morte celular causado por xenobióticos e sim

nos cálculos de IC 50 (Concentração Inibitória Máxima para matar 50% das células) e IC 10 (Concentração Inibitória Máxima para matar 10% das células) de modelos *in vitro*.

Outra aplicação da cultura celular, descrita por Phillips (1996), é sua utilização para testar plantas. Extratos de cinco vegetais foram testados utilizando hepatócitos e células de ovário de hamster chinês (CHO). Os resultados sugeriram diversas aplicações da cultura celular, que pode ser empregada para a detecção de efeitos de toxinas e antitoxinas em produtos naturais.

De acordo com Freshney (2005) existem alguns parâmetros a serem considerados para selecionar a linhagem celular utilizada nos experimentos de citotoxicidade, tais como linhagens finitas ou contínuas, se são normais ou transformadas, quais são as características de crescimento e cultivo, disponibilidade e estabilidade, entre outros.

O uso de culturas de células *in vitro*, como alternativa a previsão da letalidade aguda *in vivo*, está em estudo por mais de 50 anos. (EAGLE; FOLEY, 1956; POMERAT; LEAKE, 1954; SMITH; GRADY; NORTHAM, 1963)

As CHO foram obtidas pela primeira vez de um hamster adulto em 1957 (BUTLER, 1991). Conforme Doyle E Griffiths (1998) os hamster e os humanos tem mecanismos de glicosilação de proteínas por serem eucariotos, por esse fato as células CHO, por ser eucariota, são muito utilizadas para expressar proteínas. Ainda segundo os autores o sistema eucariota dessas células possui organelas que glicosilam proteínas, além destas células apresentarem um bom desenvolvimento, incluindo um baixo tempo de duplicação, e a característica de ser célula ancorante, sendo considerada as mais utilizadas para expressão de proteínas glicosiladas, as células CHO-K1 são capazes de produzir proteínas heterólogas, o que aliada à sua adaptação ao desenvolvimento em meio com soro facilita a secreção do produto para meio extracelular.

De acordo com Kratje (2004) as CHO são sistemas de expressão predominantemente empregado para a produção de biofármacos pelo amplo conhecimento fisiológico e de cultivo que se tem dessas células, bem como pela segurança que oferece em relação à suscetibilidade a patógenos humanos. A linhagem de CHO é bem caracterizada, relativamente estável, capaz de produzir proteínas heterólogas com eficiência, e pode crescer tanto em suspensão, como aderida a suportes.

As CHO pertencem a uma linhagem celular derivada de um subclone de linhagem iniciada por uma biopsia de ovário de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) adulto. (PUCK; CIECIURA; ROBINSON, 1958).

Seguindo as diretrizes mundiais que preconizam a diminuição do número de animais, a CHO foi escolhida para realização dos estudos de citotoxicidade por ser de linhagem celular facilmente cultivada e por ser derivada de ovário de hamster.

Segundo NIH (National Institutes of Health) (1996), dados *in vitro* podem ser úteis na estimativa das doses iniciais para os testes *in vivo* de toxicidade aguda, que irão reduzir o número de animais necessários para tais determinações.

Spielmann et al. (1999) sugerem que, antes de iniciar qualquer teste *in vivo* para uma letalidade química, um ensaio *in vitro* de citotoxicidade deve ser conduzido para estimar a DL 50 do produto químico. A DL 50 prevê a partir do registro de citotoxicidade (RC) uma regressão na equação que deve então ser utilizada para escolher a melhor dose inicial adequada para o ensaio *in vivo*. A estimativa da DL 50 RC é baseada em quantidades molares da substância química, especificamente um valor em mmol/Kg.

Para determinar o efeito de um extrato sobre a proliferação celular, é contado o número de células em cada colônia e após 72 horas de tratamento das células com o extrato. As células são coradas com 0,2% (p/v) cristal violeta preparado em 20% de etanol. (CHIGANÇAS et al., 2000)

2.4 Toxicologia da Reprodução

De acordo com Neubert et al. (1987) a toxicologia é uma ciência que muito tem evoluído, fazendo com que novas áreas surjam e ganhem destaque. Entre várias áreas, desponta a toxicologia relacionada ao desenvolvimento ou também chamada de toxicologia da reprodução.

Considerando que há dificuldade, ainda em se estabelecerem os limites desta área de conhecimento da toxicologia, estudos das ações dos agentes tóxicos sobre diversas fases do processo reprodutivo e do desenvolvimento, visam, fundamentalmente, efeitos sobre: a fertilidade, o transporte e implantação do ovo, a

embriogênese e a fase fetal, o parto, o recém nascido, e as funções placentária e uterina. (GERENUTTI; DE-SOUZA SPINOA; BERNARDI, 1992)

As anomalias congênitas podem ter origem genética, ambiental ou multifatorial. Os fatores genéticos são divididos em duas categorias: alterações gênica e cromossômicas, já os fatores ambientais podem ser físicos, químicos ou biológicos. (DAMASCENO et al., 2008, p. 2-99)

O desenvolvimento inicial do organismo é o período em que este se encontra mais susceptível a ação de agentes exógenos. Tal fato ocorre porque, neste período, surgem grandes mudanças em curtos espaços de tempo, em consequência da intensa multiplicação celular (MANSON, 1986). Aqui estão incluída as fases de implantação dos blastocistos, embriogênese, fase fetal e fase neo natal.

Durante a fase de pré-implantação ocorrem mudanças bioquímicas no endométrio uterino que são controladas pela progesterona e estrógeno, tornando o endométrio mais sensível ao blastocisto. Os primeiros sinais de implantação do blastocisto são o aumento da permeabilidade vascular, com aumento da produção de prostaglandinas ($\text{PGF}_2\alpha$ e PGE_2) (KENNEDY; ARMSTRONG, 1981). Outro hormônio importante é a Gonadotrofina Coriônica, o qual é universalmente reconhecida como teste de diagnóstico da gravidez. A Gonadotrofina Coriônica é um hormônio glicoprotéico, produzido pelas células trofoblásticas da placenta durante a gravidez. Em mulheres o β -HCG (Beta Gonadotrofina Coriônica Humana) é secretado seis a oito dias após a concepção, aumentando rapidamente até um pico de 50.000 a 200.000 mUI/mL na 6^a a 8^a semanas. (FIDALGO; GONÇALVES; BANDONI, 2004)

A constatação de que agentes químicos podem interferir no desenvolvimento embrionário levou a realização de testes em animais de laboratório e de estudos epidemiológicos. esses estudos tem como finalidade identificar substâncias embriotóxicas que a população esteja ou venha a estar exposta. (DAMASCENO et al., 2008, p. 2-99)

Segundo Cumming (1990) uma percepção do mecanismo de fracasso da pré e pós-implantação do blastocisto por toxicidade em experimentos com droga é necessária para avaliar melhores riscos reprodutivos. Pesquisas estão sendo feitas, para provar tal situação, com baterias de testes desenvolvidos para sondar estes mecanismos pelos quais substâncias químicas puras isoladas de plantas afetam a fertilidade em roedores. O protocolo de prenhez provê informação dose-resposta sobre os efeitos de exposição, em curto prazo, de animais com indução de prenhez.

O efeito da embriotoxicidade na fase de prenhez (5º ao 9º dia) é mais complexo do que geralmente é assumido pelos pesquisadores. (SPIELMANN; EIBS; MERKER, 1977)

Em 1966, a Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos – *Food and Drug Administration* (FDA), introduziu as diretrizes para estudos preditivos de toxicidade reprodutiva em três segmentos e tornaram referência internacional para as pesquisas de segurança de novos medicamentos, pesticidas e aditivos alimentares. (DAMASCENO et al., 2008, p. 2-99)

O segmento I é o mais abrangente e investiga os efeitos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo geral, incluindo efeitos adversos, maturação fetal, parto e desenvolvimento pós-natal durante a lactação. Neste segmento, de modo geral, a exposição de roedores é longa, portanto, que se estende nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. Nos outros dois segmentos a exposição é restrita ao período da embriogênese (segmento II) ou ao período da maturação fetal, parto e lactação (segmento III). (DAMASCENO et al., 2008, p. 2-99)

O segmento II investiga o potencial embriotóxico ou teratogênico de uma substância, onde o início do tratamento das fêmeas prenhes coincide com a implantação uterina dos blastocisto; o tratamento continua durante o período da pós-implantação e termina após o período de organogênese ou embrionário, não incluindo o período fetal. A cesariana é realizada antes da data provável do nascimento. Os ovários das mães e os úteros gravídicos são removidos. Os fetos são sistematicamente avaliados quanto à presença de malformações externas, pesados e em seguida, fixados para posterior exame de alterações viscerais e esqueléticas. (DAMASCENO et al., 2008, p. 2-99)

No segmento III a exposição tem início no terço final da gravidez, continua durante o parto e estende-se pelo período de lactação até o desenvolvimento da prole. (DAMASCENO et al., 2008, p. 2-99)

A toxicidade aguda avalia a exposição após uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas. Deve ser usada uma espécie de mamífero evitando-se animais com características genéticas especiais, devem ser utilizados machos e fêmeas adultos, sendo no mínimo 6 fêmeas e 6 machos por dose de produto. Deve ser utilizada a mesma via proposta para o uso do produto, as doses devem ser suficientes para observação de possíveis efeitos adversos e estimativa da DL 50. Se não forem observados efeitos adversos, utilizar a dose máxima possível. Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas devem ser anotados. Observar o maior número possível de parâmetros, tais como: alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos.

O período de observação deve ser durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, visando observar reversão ou não destes sinais. Desde a 24^a hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser observados a variação de peso e o consumo de alimentos. Ao fim deste período, todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e necropsiados. Caso sejam observadas alterações nas necrópsias, realizar estudos histopatológicos dos órgãos acometidos. (ANVISA, 1996). No caso de toxicidade de doses repetidas (longa duração), avaliar exposição em pelo menos duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não-roedora. As linhagens devem ser definidas evitando-se animais com características genéticas especiais. Devem ser utilizados machos e fêmeas adultos, sendo no mínimo 10 machos e 10 fêmeas por dose do produto para os roedores e no mínimo 3 machos e 3 fêmeas adultos por dose do produto para os não-roedores. Deve ser utilizada a mesma via de administração proposta para o uso do produto, o período de administração nos animais segue relação com o período proposto para utilização terapêutica. No mínimo três doses devem ser utilizadas, a saber, a dose que produza o efeito terapêutico (menor dose), a maior dose que produza um efeito adverso detectável (limitada pelo volume da dose), e uma dose intermediária, por exemplo a média geométrica entre a dose maior e menor dose. (ANVISA, 1996)

Os parâmetros a serem observados nos grupos experimentais e controle são: alterações comportamentais, variação do peso corpóreo (semanal), hemograma completo e análises bioquímicas de sangue (sódio, potássio, gama-glutamiltanspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, glicose, proteínas totais e bilirrubina). Exames macroscópicos devem ser realizados em todos os animais para todas as doses. Os exames histopatológicos devem ser realizados obrigatoriamente nos animais tratados com a maior dose. O material retirado dos animais deve ser mantido em estado de conservação por até cinco anos. Na ausência de alterações histopatológicas nos animais tratados com a maior dose e de alterações macroscópicas com as doses menores, torna-se desnecessária a realização de exames histopatológicos para as demais doses baixa e intermediária. Recomenda-se que sejam analisados macro e microscopicamente os órgãos abaixo relacionados: fígado, rins, pulmão, coração, esôfago e estômago, intestinos, órgãos

sexuais, pâncreas, adrenal, tireóide. Finalmente, no caso de avaliação toxicológica de uso tópico, cumprir as exigências da toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, e quando indicado estudo de genotoxicidade, além de realizar os testes adicionais de sensibilização dérmica, irritação cutânea e irritação ocular. (ANVISA, 1996)

Segundo Foglio et al. (2006) grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, apresenta uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas.

A *Plathymenia reticulata* Benth. apresentou efeito farmacológico impedindo o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno da *Bothrops jararacussu*, portanto apresentando um potencial fitoterápico, sendo assim, esta pesquisa visou determinar o efeito do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. em modelos *in vitro*, avaliando a citotoxicidade, e *in vivo*, avaliando a toxicidade da planta durante a gestação das ratas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos (*in vitro*) e tóxicos (*in vivo*) do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth.

3.2 Específicos

- Obtenção de extrato hidroalcoólico provenientes de cascas de *Plathymenia reticulata* Benth.
- Determinar a IC 50 e IC 10 do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. utilizando células de ovário de hamster chinês (CHO).
- Determinar a DL 50 do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth.
- Estudar o desempenho reprodutivo de ratas expostas ao extrato de *Plathymenia reticulata* Benth., no período gestacional.
- Avaliar os efeitos da administração do extrato hidroalcoólico de *Plathymenia reticulata* Benth. sobre os parâmetros físicos e morfológicos dos fetos.

4 MATERIAL

4.1 Plantas / Extrato

§ As cascas da planta *Pr.* foram cedidas pelo Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo da Universidade Federal do Pampa, Centro de Ciências Rurais de São Gabriel, CCRSG;

§ Álcool 70% (Merck®).

4.1.1 Equipamentos

- § Estufa de circulação de ar (Fanen® mod. MAO35);
- § Moinho de facas e martelos (Marconi® mod. O35);
- § Percolador (Permutation®);
- § Rotaevaporador (Tecnal® mod. TE-210);
- § Balança semi-analítica (Marte® mod. AS2000C);
- § Liofilizador de bancada (Thermo Savant® mod. VLP200) - FAPESP processo nº 2007/53883-6).

4.2 Avaliação *in vitro*

- § CHO – ATCC CCL – 61 (American Type Culture Collection);
- § Câmara de Neubauer;
- § Garrafas de cultura celular (25 cm² de dimensão);
- § Placas de 96 poços (0,28 cm² de área de cada poço);
- § Micropipetas;
- § Multipipetador;

- § EPI (Equipamento de Proteção Individual: jaleco, luvas, touca, máscara e pró-pé).

4.2.1 Reagentes

- § MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4 sulfofenil)-2H-tetrazólio) (Promega[®]) e PMS - (Phenazine methosulfate) (Sigma[®]);
- § RPMI 10% (v/v) (RPMI 1640-Gibco n.31800-014; suplementado com 10% de soro fetal bovino-SFB-Gibco n.1765-054 e 1% (v/v) da solução de Penicilina-Estreptomicina-PS-Gibco n.15140-122;
- § Solução Tampão Fosfato (PBS - *Phosphate Buffer Solution*);
- § Solução de Tripsina 0,05% (p/v) - EDTA (Ethylene Diamine Tetracetic Acid) 0,02% (p/v) (Sigma[®]).

4.2.2 Equipamentos

- § Banho de água termostaticado (Quimis[®]) (banho-maria);
- § Estufa de CO₂ (Tecnal[®] Mod. - TE-399);
- § Espectrofotômetro de placas de Elisa (Biotek[®] Mod. ELx800);
- § Fluxo laminar biológico (Trox – technik[®] M536-AD4);
- § Microscópio Invertido (Zeiss[®] Modelo - AXIOVERT 40).

4.3 Avaliação *in vivo*

Utilizou-se ratos adultos machos e fêmeas Wistar, adquiridos no Biotério Animais de Laboratório (ANILAB-Paulinia, Brasil) e mantidos no Biotério de Experimentação Animal da UNISO. Sendo utilizadas 15 fêmeas as quais foram

divididas em três grupos: um grupo controle (água destilada) e dois grupos experimentais (0,5 g/mL e 1,0 g/mL de extrato) e 10 ratos machos para o acasalamento.

4.3.1 Sistema micro-ambiental

Utilizou-se a padronização do ambiente dos animais para a execução desta experimentação o sistema micro-ambiental (Smaflex/Argon[®] - FAPESP processo nº 2007/53883-6). Este ambiente de criação é um ambiente de extrema significância na garantia das condições de salubridade para os animais.

4.3.2 Avaliação morfológica dos fetos

Para a avaliação dos parâmetros morfológicos dos fetos foram realizadas duas técnicas: Fixação em Bouin e Diafanização.

4.3.2.1 Reagentes

Utilizou-se os seguintes reagentes para avaliação morfológica dos fetos:

a) Técnica de fixação em Bouin: Ácido Pícrico 750 mL (Cinética[®]); Formaldeído 37% PA 250 mL (Ecibra[®]); Ácido Acético Glacial 50 mL (Ecibra[®]).

b) Técnica de evisceração e clarificação – diafanização: Etanol (Ecibra[®]); Acetona (Synth[®]); Álcool Etílico (Ecibra[®]); Solução de KOH 1% (Merck[®]); Alizarina (Merck[®]); Solução de Glicerol 20% (Nuclear[®]); Solução de glicerol 50% (Nuclear[®]); Solução de glicerol 100% (Nuclear[®]); Formaldeído 0,05% (Ecibra[®]) (Figura 13).

4.3.3 Anestésico para cesária

§ Éter etílico (Ecibra[®]).

4.3.4 Avaliação visceral dos fetos

§ Lâmina de corte (Gillete[®]);

§ Esteromicroscópio (Nikon[®]).

5 MÉTODOS

O delineamento dos métodos utilizados neste trabalho científico estão exemplificados na figura 2.

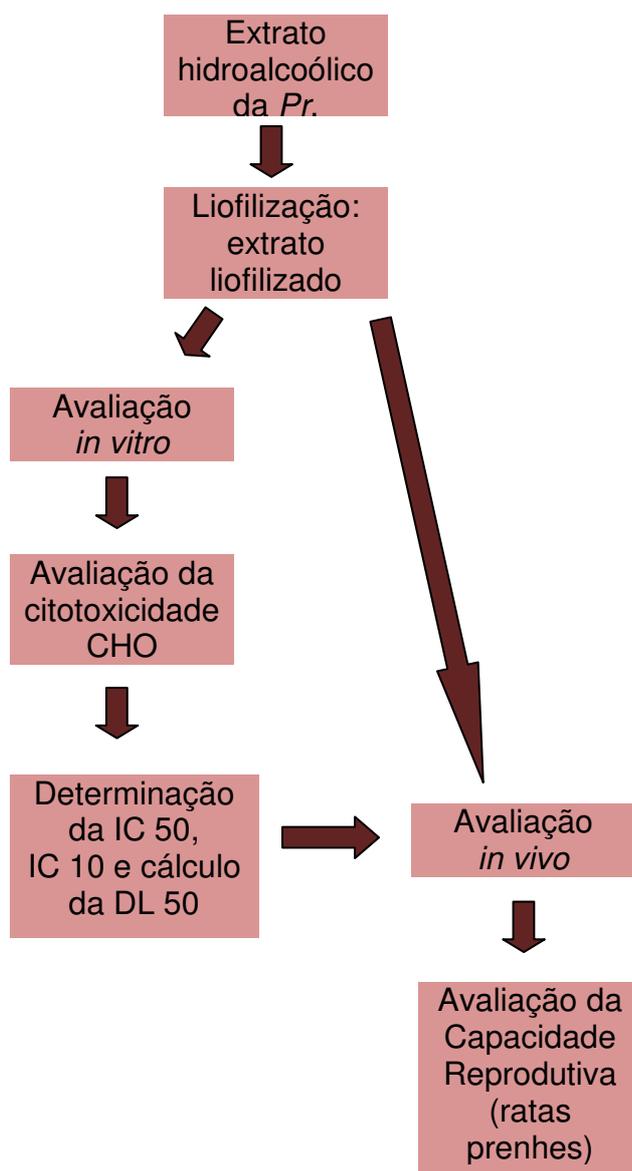


Figura 2: Fluxograma dos métodos utilizados nos estudos *in vitro* e *in vivo* da *Plathymenia reticulata* Benth.

5.1 Material vegetal e obtenção da droga

As cascas de *Plathymenia reticulata* Benth. (Figura 3) foram desidratadas em estufa de circulação de ar (Figura 4), a 40°C durante uma semana e, pulverizadas em moinho de facas e martelos (Figura 5).



Figura 3: Cascas da *Plathymenia reticulata* Benth.



Figura 4: Estufa de circulação de ar



Figura 5: Moinho de facas e martelos

5.2 Preparo do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi preparado através do processo de percolação (Figura 6), empregando-se como líquido extrator álcool etílico a 70%. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo da (Figura 7) e liofilizado em Liofilizador (Figura 8).



Figura 6: Percolador



Figura 7: Rotaevaporado



Figura 8: Liofilizador

5.3 Avaliação *in vitro*

Os ensaios foram realizados sob condições assépticas em ambiente controlado por fluxo laminar biológico (Figura 9), utilizando materiais e reagentes esterilizados, por filtração esterilizante, calor seco ou úmido, radiação esterilizante ou óxido de etileno, de acordo com a natureza de cada um. Foram empregadas técnicas assépticas para a garantia da viabilidade celular.



Figura 9: Fluxo laminar

Obteve-se as células de ovário de hamster chinês (CHO) da *American Type Culture Collection* (ATCC), crescidas em meio de cultura RPMI –SFB (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% (v/v) de Penicilina-Estreptomicina e incubadas a 37°C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂ em garrafas de 25 cm². (MAIZATO et al., 2001)

Após a confluência em monocamada, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com uma solução tampão fosfato livre de magnésio e cálcio (PBS). Para a remoção das células utilizou-se uma solução de Tripsina–EDTA (Tripsina 0,05% (p/v) – EDTA (*Ethylene Diamine Tetracetic Acid*) 0,02% (p/v)). Após a tripsinização, transferiu-se as células para um tubo cônico, as quais foram lavadas duas vezes com PBS-MCF, ressuspendidas em meio RPMI-SFB em seguida semeadas em poços de 0,28 cm² da placa de 96 poços (Tabela 1).

Solubilizou-se o extrato no meio RPMI, filtrou-se e obteve-se as concentrações que foram dispostas na placa de 96 poços de C1 a C8 (Tabela 2). Foram feitas duas placas, uma para leitura após 24 horas de contato do extrato com as células e a outra após 48 horas, ambas com as mesmas concentrações.

Tabela 1: Esquema da disposição das células CHO na placa de 96 poços (NIH, 2001)

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| B | B | VC | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | VC | B |
| C | B | VC | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | VC | B |
| D | B | VC | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | VC | B |
| E | B | VC | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | VC | B |
| F | B | VC | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | VC | B |
| G | B | VC | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | VC | B |
| H | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |

Legenda: **B** = *Blanks*, poços referentes ao controle do MTS/PMS; **VC** = controle de células; **C1-C8** = *Test Chemical*, poços referente às diluições da amostra (C1 = amostra menos concentrada/ C8 = amostra mais concentrada)

Tabela 2: Concentrações do extrato de *Plathymenia reticulata* Benth. adicionadas nas placas de 96 poços

| Amostras | [] mg/mL |
|----------|-----------|
| C1 | 0,156 |
| C2 | 0,312 |
| C3 | 0,625 |
| C4 | 1,25 |
| C5 | 2,5 |
| C6 | 5 |
| C7 | 10 |
| C8 | 20 |

5.4 Determinação da proliferação celular

Com o intuito de quantificar a proliferação celular, aplicou-se o método colorimétrico intitulado *Cell Titer 96 - Ensaio Aquoso não radioativo de proliferação celular* (PROMEGA, 2008), que tem o seguinte princípio: o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazólio (MTS) é biorreduzido pelas

enzimas desidrogenases, encontradas nas células ativas de CHO, a um produto (formazana) que é solúvel no meio de cultura celular e que absorve fortemente a 490 nm. Desta forma, a absorbância da formazana foi medida diretamente nos poços da placa *Multiwell 96*, sem nenhum processo adicional. A quantidade de formazana medida pela absorbância da solução a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células vivas, em cultura. (BARLTROP et al., 1991)

Para evitar que a coloração avermelhada do extrato influenciasse na leitura do teste, após o tempo de contato pré-determinado entre as células e o extrato, o mesmo foi retirado e as células lavadas por três vezes com solução salina estéril, previamente a realização da leitura em leitor de microplacas.

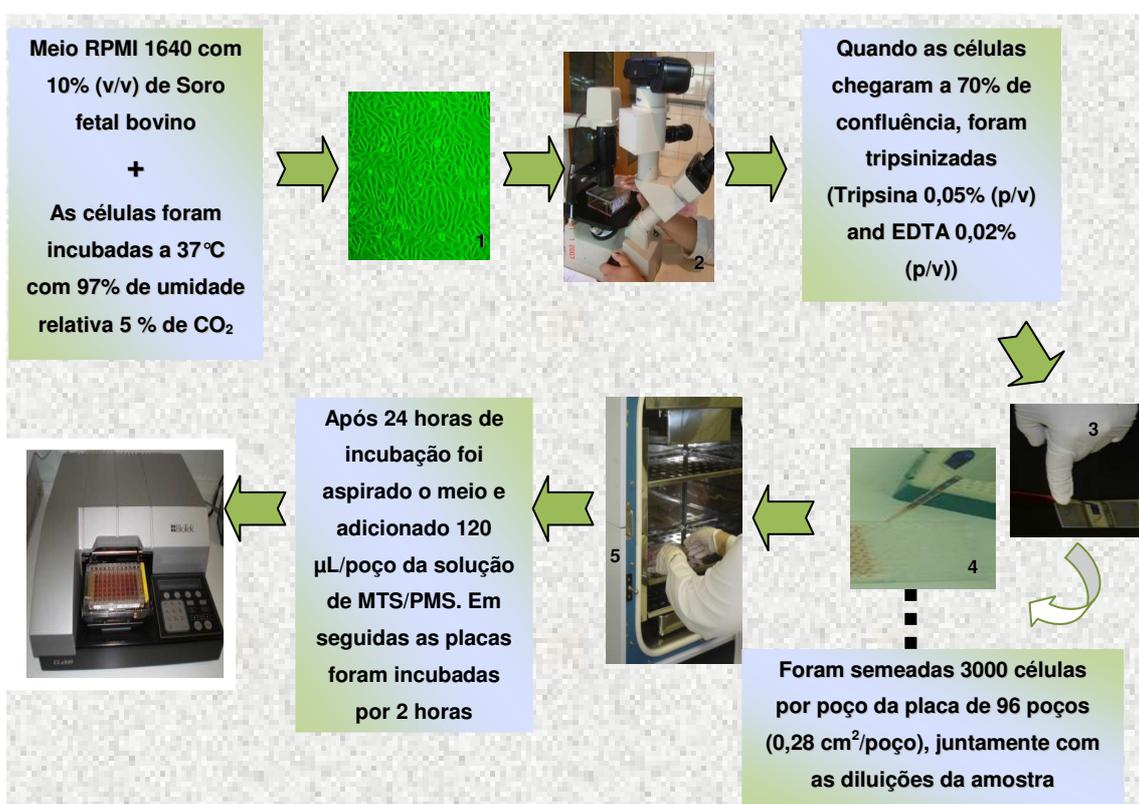


Figura 10: Fluxograma do cultivo e determinação da proliferação celular da CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Iniciando pelas células (1) que foram semeadas em garrafas de 25 cm² em meio RPMI a 10% ((v/v) de Soro Fetal Bovino) e incubadas sob condições controladas de CO₂, temperatura e umidade. Após a confluência celular de aproximadamente 70%, visualizada ao microscópio óptico (2), foi realizada a tripsinização e contagem das células em Câmara de Neubauer (3). Para a determinação da proliferação celular frente a amostra, foram semeadas 3000 células por poço (0,28cm²) da placa de 96 poços juntamente com as diferentes concentrações da amostra (4). Completada às 24 horas de incubação (5), foi aspirado o meio das células e adicionado 120 µL da solução de MTS/PMS em RPMI e, novamente, as placas foram incubadas por mais 2 horas para em seguida serem efetuadas as leituras em Espectrofotômetro de placa de Elisa acoplado à impressora (6).

Para preparação das soluções de MTS/PMS em RPMI as soluções de MTS e PMS foram descongeladas em banho termostático, a 37 °C, por 10 minutos. Para se obter solução suficiente para uma placa de 96 poços (120 µL da solução colorimétrica por poço), foi transferido 2,0 mL de solução MTS para um tubo de fundo cônico contendo 10,5 mL de meio de cultura celular (RPMI). Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução PMS e agitou-se a solução vigorosamente.

Cada poço teve volume final de 100 µL. Incubou-se a placa em estufa de atmosfera controlada a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95 % de umidade relativa. Após 72 horas, aspirou-se as soluções, contidas nos poços e adicionou-se alíquotas de 120 µL da solução MTS/PMS em RPMI em todos os poços da placa, os quais foram imediatamente acondicionada em estufa de atmosfera controlada a 37 °C, com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade relativa, por 2 horas. Decorrido este período inicial, realizou-se a medida de absorvância, a 490 nm, em espectrofotômetro de microplaca (Biotek[®] Mod. ELx800). Todo o processo de cultivo e determinação da proliferação celular de CHO estão descritos no fluxograma (Figura 10).

5.5 Avaliação *in vivo*

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, o qual foi aprovado sob o número do protocolo A11/CEP/2008 em 10 de junho de 2008. (ANEXO A)

Utilizou-se ratos Wistar machos e fêmeas adultos, pertencentes a mesma linhagem, provenientes do Biotério Animais de Laboratório (ANILAB-Paulinia Brasil)) e alojados no Biotério de Experimentação animal da UNISO. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com o “*The Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*” (National Research Council, 1996) and “*European Community guidelines*” (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Os animais estavam entre 3 a 4 meses de idade, pesando entre 180 a 240g, e foram alojados no Sistema Micro-Ambiental Smaflex/Argon[®] (Figura 11).



Figura 11: Sistema Micro-Ambiental

5.6 Estudos da toxicidade da *Plathymenia reticulata* Benth. No período gestacional de ratas

5.6.1 Acasalamento e constatação da prenhez

Para o acasalamento, alojou-se 02 machos com 05 fêmeas por um período noturno de 12 horas em gaiolas plásticas 40x50x20cm com tampa metálica. Por meio de observações microscópicas foram determinadas as fases do ciclo estral das fêmeas e a indicativa do primeiro dia da prenhez foi a presença de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal, este realizado utilizando-se pipetas contendo solução fisiológica a 0,9%, inserida na vagina para aspirar o líquido com as células do epitélio vaginal, o qual é depositado em lâmina histológica para possibilitar o exame microscópico.

Os animais prenhes foram alojados em número de um animal por gaiola e divididos em 03 grupos de cinco, sendo dois experimentais e um controle. Um grupo experimental foi exposto ao extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth.

na dose de 0,5g/Kg e o outro 1,0g/Kg, sendo o liofilizado reconstituído em água destilada; ao grupo controle administrou-se água destilada. Administrou-se a droga por via oral através da agulha de gavagem (Figura 12), do primeiro ao décimo oitavo dia de prenhez, no período da manhã. Forneceu-se água e comida *ad libitum* durante todo experimento.



Figura 12: Administração oral (gavagem) do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth.

5.6.2 Índice de fertilidade de ratas prenhes

Verificou-se a performance reprodutiva de ratas e no 19º dia de prenhez, realizou-se a cesária, a qual foi realizada posteriormente à anestesia das mães, através de uma incisão longitudinal na linha alba para exposição do útero e dos ovários; o útero foi retirado com todo o seu conteúdo, bem como os ovários, que foram colocados em placa de vidro, mantendo-se a posição original dos cornos uterinos (diretos e esquerdo); em seguida os ovários foram separados do útero, removidos e examinados para contagem dos corpos lúteos gravídicos, estes são maiores e indicam o número de óvulos fecundados. Com o auxílio de tesoura com ponta boleada e pinça, a parede uterina foi aberta e os sacos amnióticos foram

rompidos, os cornos uterinos foram inspecionados quanto ao número de fetos e de reabsorções visíveis e respectivamente as placentas (DAMASCENO et al., 2008).

Analisou-se a vitalidade fetal (Figura 22), número de corpo lúteo (Figura 23), perdas pré-implantação e perdas pós-implantação e pesou-se as placentas e os fetos.

Calculou-se o índice de fertilidade das fêmeas e a vitalidade da prole por meio das fórmulas:

% Perdas Pré-implantação = n° de corpos lúteos – n° de implantações / n° de corpos lúteos

% Perdas Pós-implantação = n° de implantações – n° de fetos vivos / n° de implantações

Vitalidade da prole = n° de fetos vivos x 100% / n° de fetos vivos e não vivos

5.6.3 Parâmetros morfológicos dos fetos

Os fetos retirados foram divididos em dois grupos iguais, sendo 50% em Bouin (investigação patológica fetal através de métodos de fixação (BARROW, 1990; HAYES, 1994). Com o auxílio de um paquímetro, foram realizadas as seguintes medidas dos fetos mantidos em bouin: antero-posterior do crânio, látero-lateral do crânio, antero-posterior do tórax, látero-lateral do tórax, crânio-caudal, cauda (Figura 27). (STERZ; LEHMANN, 1985; BARROW, 1990)

Nos 50% restante dos fetos realizou-se o processo de diafanização, descrito na figura 13. Cabe ressaltar que o processo realizado apresentou inconvenientes, tais como, contaminação fúngica dos fetos devido utilização da concentração de formaldeído em água ao invés de glicerol, assim indicamos a alteração do processo para próximo experimentos. Nos fetos diafanizados foram observados os seguintes parâmetros:

- Vista posterior do feto diafanizado: presença de escápula (ESC), pelve (PE), coluna vertebral (CV) e crânio (CR);

- Vista lateral do feto diafanizado: presença de escápula (ESC), pelve (PE), coluna vertebral (CV), crânio (CR) e mandíbula (M);

- Vista frontal do feto diafanizado: presença de mandíbula (M) e esterno (EST).

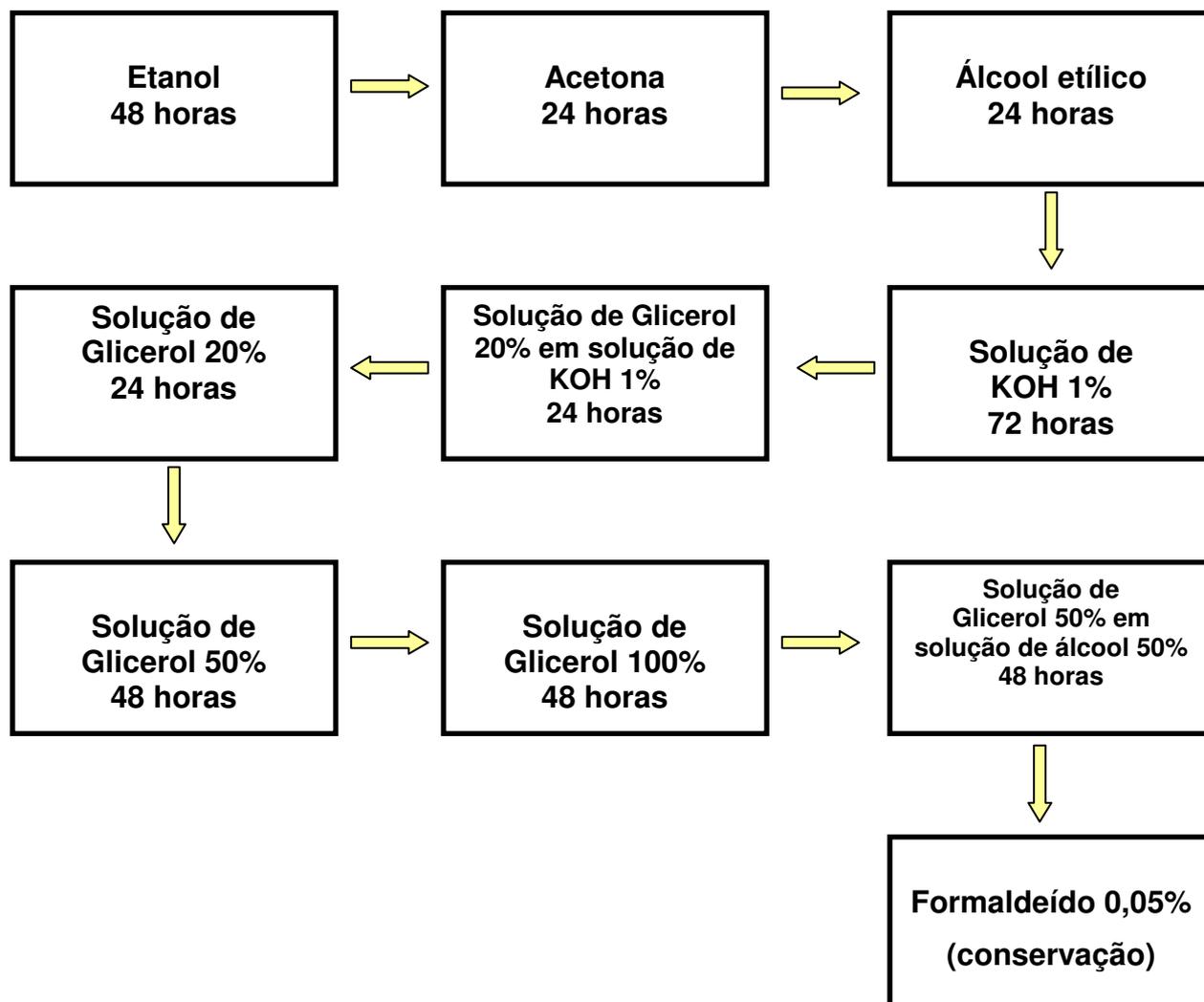


Figura 13: Técnica de evisceração e diafanização

5.6.4 Avaliação visceral dos fetos

A avaliação visceral foi realizada em 20 fetos de cada grupo (controle e grupos experimentais 0,5 g/Kg e 1,0 g/Kg), mantidos em Bouin; os cortes foram feitos de acordo com a proposta descrita por Wilson (DAMASCENO et al., 2008) (Figura 14), onde realizou-se primeiramente corte na região da cabeça e do pescoço, seguido do corte transversal na região abdominal e corte na região dos

rins. O exame das vísceras fetais foi realizado com estereomicroscópio com iluminação direta.

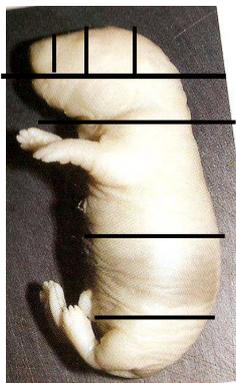


Figura 14: Exemplo de feto mostrando o esquema de cortes de Wilson.
Fonte: DAMASCENO et al., 2008.

5.7 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através de análises estatísticas, onde o nível de significância crítico admitido para a rejeição da hipótese de nulidade foi de uma probabilidade de até 5% ($p \leq 0,05$) em todas as análises empregadas. (DAWSON, 2001)

Para análise do ganho de peso das ratas no período gestacional, peso dos fetos e das placentas utilizou-se o teste *One-Way ANOVA*, individualmente, o qual é um teste de análise de variância e paramétrico, pois a variância baseia-se em parâmetros tradicionais, tais como a média e a variância dos dados em relação à média. (DAWSON, 2001)

Para análise estatística das perdas pré e pós-implantação e vitalidade dos filhotes utilizou-se individualmente o *Teste Exato de Fisher* (versão exata do teste Qui – Quadrado), isso devido aos resultados obtidos, pois foi o melhor teste para verificar a independência entre o controle e os grupos experimentais. (DAWSON, 2001)

6 RESULTADOS

6.1 Material vegetal e obtenção da droga

Das cascas de *Plathymania reticulata* Benth. desidratadas em estufa de circulação de ar (Figura 4), a 40°C por uma semana obteve-se 1.276,32 g de casca seca na coloração marrom claro, depois de pulverizadas em moinho de facas e martelos obteve-se 1.256,37g de planta moída.

6.2 Preparo do extrato hidroalcoólico

Obteve-se 16 Litros de extrato hidroalcoólico preparado através do processo de percolação, empregando-se como líquido extrator álcool etílico a 70%, o qual obteve coloração vinho. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo sendo reduzido a um volume de 780 mL o qual foi liofilizado rendendo 327,725 g (Figura 15 e 16).

O extrato obtido foi acondicionado em frascos de vidros e vedados com parafilm nas tampas, para que não ocorresse nenhum tipo de contaminação e conservados em geladeira para testes posteriores.



Figura 15: Extrato liofilizado da *Pr.*

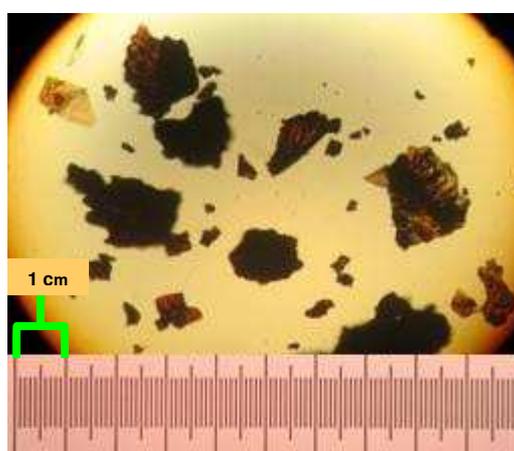


Figura 16: Extrato liofilizado visto em microscópio óptico invertido, objetiva de aumento 10X

Em relação ao processo de preparo do extrato, no primeiro momento de desidratação e obtenção do pó da planta registrou-se uma perda de 1,56% (p/p), o que foi considerada uma perda relativamente pequena.

6.3 Avaliação *in vitro*

Para o teste de citotoxicidade não foi necessário avaliar o solvente, pois o extrato é solúvel em água, sendo assim, solúvel no meio RPMI.

Foi realizado o ensaio de citotoxicidade, para obtenção da IC 50, resultando no gráfico mostrado na Figura 17.

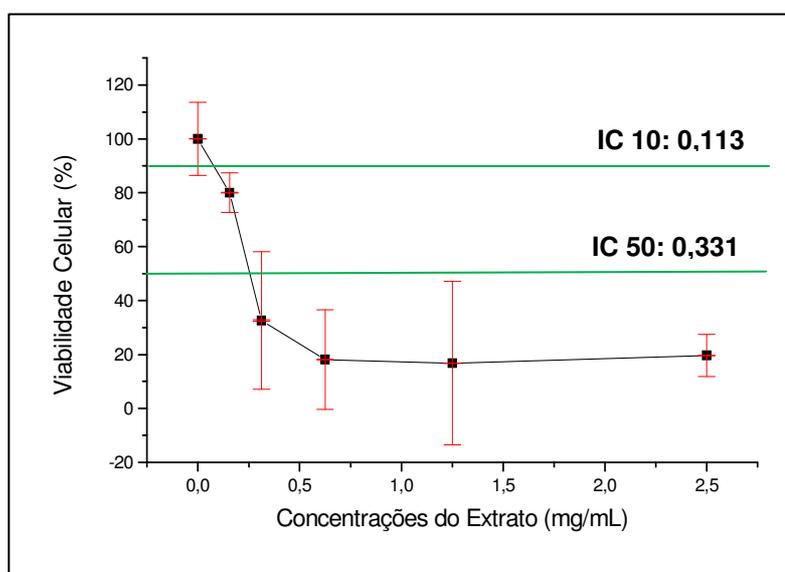


Figura 17: Curva representativa da porcentagem de viabilidade celular, IC 50 e IC 10 das células em contato com o extrato hidroalcolico da *Plathymenia reticulata* Benth. frente as concentrações descritas na tabela 2

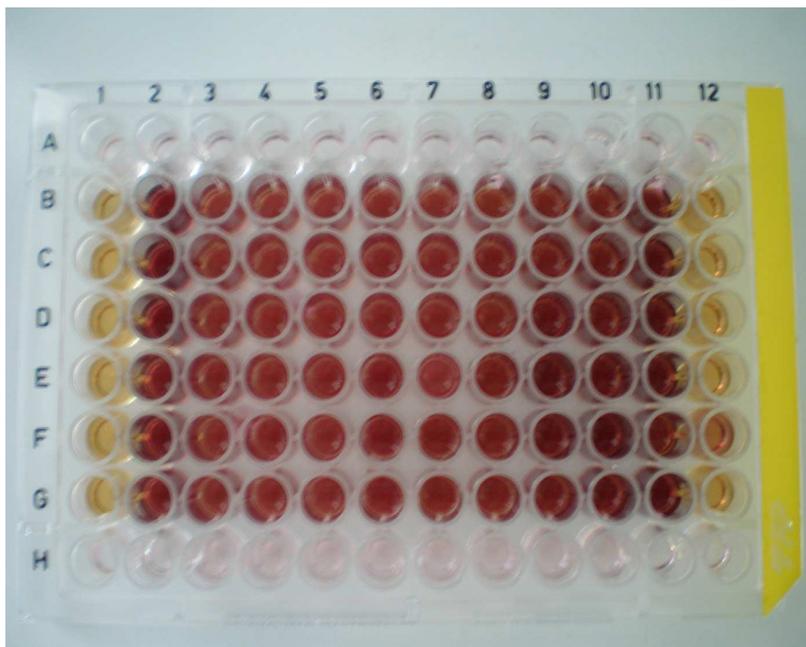


Figura 18: Exemplo de ensaio colorimétrico em Placa de 96 poços

A solução de MTS/PMS de coloração amarelo claro, ao entrar em contato com as enzimas desidrogenases presentes nas células vivas de CHO se torna avermelhada sendo absorvida em 490 nm. Macroscopicamente, a Figura 18, ilustra a mudança de coloração da solução de MTS/PMS frente à ação das células viáveis de CHO.

Após a obtenção da curva de viabilidade celular, efetuou-se os cálculos da IC50. Estes resultados não são lineares, formando uma linha sigmoidal no gráfico. Para determinação da IC50 e IC10, utilizou-se um software livre, o Phototox (2008).

Segundo o Guia do Instituto Nacional de Saúde - NIH (2001), para determinar o valor da DL 50 a partir da IC 50 é utilizada a equação 1:

Equação 1:

$$\log (\text{DL } 50 [\text{mmol/Kg}]) = 0,435 \times \log (\text{IC } 50 [\text{mmol/L}]) + 0,625$$

Esta fórmula é utilizada para substâncias químicas com estrutura molecular conhecida, porém estamos avaliando a citotoxicidade de um extrato, o qual possui várias substâncias em sua composição. Os valores da DL 50 em caso de misturas e substâncias com peso molecular desconhecido torna-se possível a partir da utilização da seguinte equação 2 (ICCVAM, 2006):

Equação 2:

$$\log (\text{DL } 50 [\text{mg/Kg}]) = 0,372 \times \log \text{IC } 50 (\mu\text{g/mL}) + 2,2024$$

O valor da IC 50 obtido no experimento realizado foi de 0,331 mg/mL, portanto, estas unidades de concentração foram substituídas pelas unidades vigentes da fórmula resultando em 331 $\mu\text{g/mL}$. Ao transpor este valor à fórmula foi obtida a seguinte equação:

$$\log (\text{DL } 50 [\text{mg/Kg}]) = 0,372 \times \log \text{IC } 50 (\mu\text{g/mL}) + 2,2024$$

$$\log (\text{DL } 50 [\text{mg/kg}]) = 0,372 \times \log 331 + 2,2024$$

$$\log (\text{DL } 50 [\text{mg/kg}]) = 0,372 \times 2,519827994 + 2,2024$$

$$\log (\text{DL } 50 [\text{mg/kg}]) = 3.1397760$$

$$\text{DL } 50 [\text{mg/kg}] = 10^{3,1397760}$$

$$\text{DL } 50 = 1.379,67$$

$$\text{DL } 50 \sim 1.379,67 \text{ mg/Kg}$$

6.4 Avaliação *in vivo*

6.4.1 Toxicidade na gestação de ratas

6.4.1.1 Acasalamento, constatação da prenhez e avaliação do ganho de peso de ratas prenhes

Constatou-se a prenhez pela presença de espermatozóides (Figura 19) no esfregaço proveniente do lavado vaginal.

A avaliação do ganho de peso das ratas durante os dezenove dias de gestação estão demonstrados na figura 20.

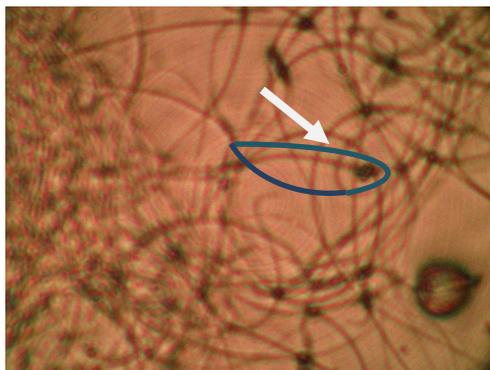


Figura 19: Confirmação da prenhez: presença de espermatozoides em esfregaço vaginal de ratas. A seta indica o gameta masculino

A avaliação do ganho de peso das ratas durante os dezenove dias de gestação estão representados na figura 20. Os resultados obtidos sob o ganho de peso das ratas no período de gestação indicam que a administração do extrato hidroalcoólico de *Pr.* na dose de 0,5 g/Kg e de 1,0 g/Kg quando comparados estatisticamente com o controle, não apresentaram diferença significativa.

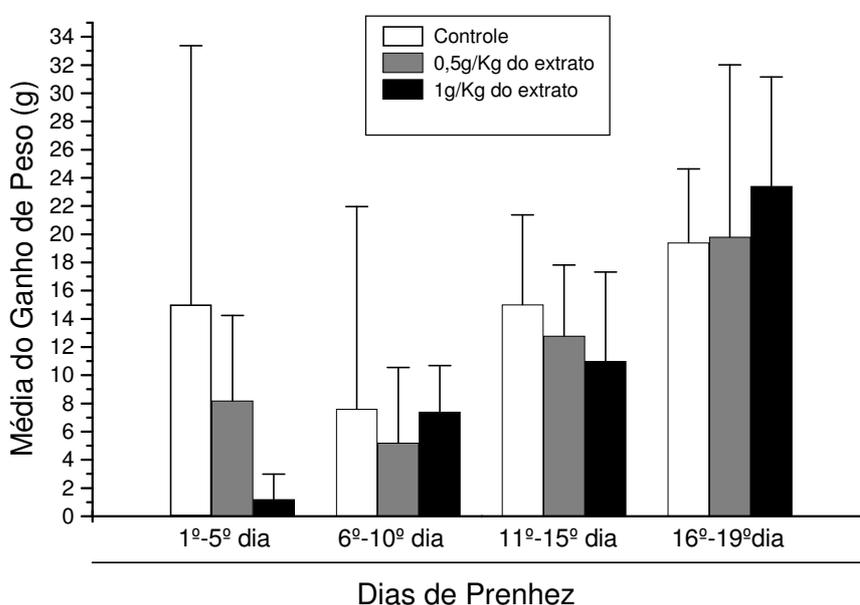


Figura 20: Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. sobre o ganho de peso de ratas durante o período gestacional. (n=05, $p \geq 0,05$, Teste *One-Way ANOVA*)

6.4.1.2 Índice de fertilidade e reprodutivo de ratas prenhes

A tabela 3 indica que a administração do extrato hidroalcoólico de *P. reticulata* Benth. no período de gestação, na dose de 0,5 g/Kg e de 1,0 g/Kg, estatisticamente, não alterou significativamente a porcentagem de perdas pré-implantação, pós-implantação e a vitalidade dos filhotes segundo o *Teste Exato de Fisher*, pois, não existem evidências suficientes para rejeitar a hipótese de igualdade entre os tratamentos, portanto, aceita-se a hipótese de igualdade.

Tabela 3: Avaliação do desempenho reprodutivo de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth.

| Parâmetros de Teratogenicidade | Controle | 0,5 g/Kg de Extrato da <i>Pr.</i> | 1,0 g/Kg de extrato da <i>Pr.</i> |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Perda de Pré-implantação (%) | 0 | 0 | 0 |
| Perda de Pós-implantação (%) | 0 | 1,69 | 5,55 |
| Peso da placenta (gramas) | 0,494 ± 0,07 (n=59) | 0,542 ± 0,09* (n=58) | 0,530 ± 0,07* (n=51) |
| Peso do feto (gramas) | 1,336 ± 0,25 (n=59) | 1,433 ± 0,20* (n=58) | 1,456 ± 0,15* (n=51) |
| Vitalidade dos filhotes (%) | 100 | 98,30 | 94,44 |

Peso dos fetos e das placentas - teste *One-Way ANOVA*, *p ≤ 0,05 em relação ao controle, Teste *One-Way ANOVA*.

Perdas pré e pós-implantação e vitalidade dos filhotes - *Teste Exato de Fisher*, p ≥ 0,05 em relação ao controle.

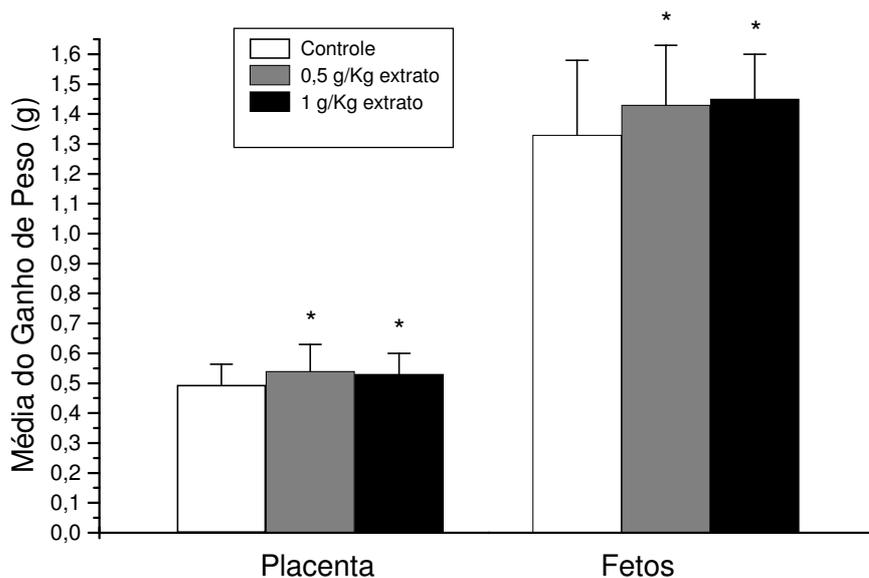


Figura 21: Média do ganho de peso dos fetos e placentas expostos ao extrato hidroalcoólico da *Plathymeria reticulata* Benth. (n: 05, * $p \leq 0,05$ em relação ao controle, Teste *One-Way ANOVA*)

A figura 21 indica que houve diferença significativa no peso das placentas e dos fetos em relação ao controle, mesmo ao observarmos que a barra do desvio padrão não indique diferença, pois na área da saúde uma diferença de $p \leq 0,05$ é significativa.

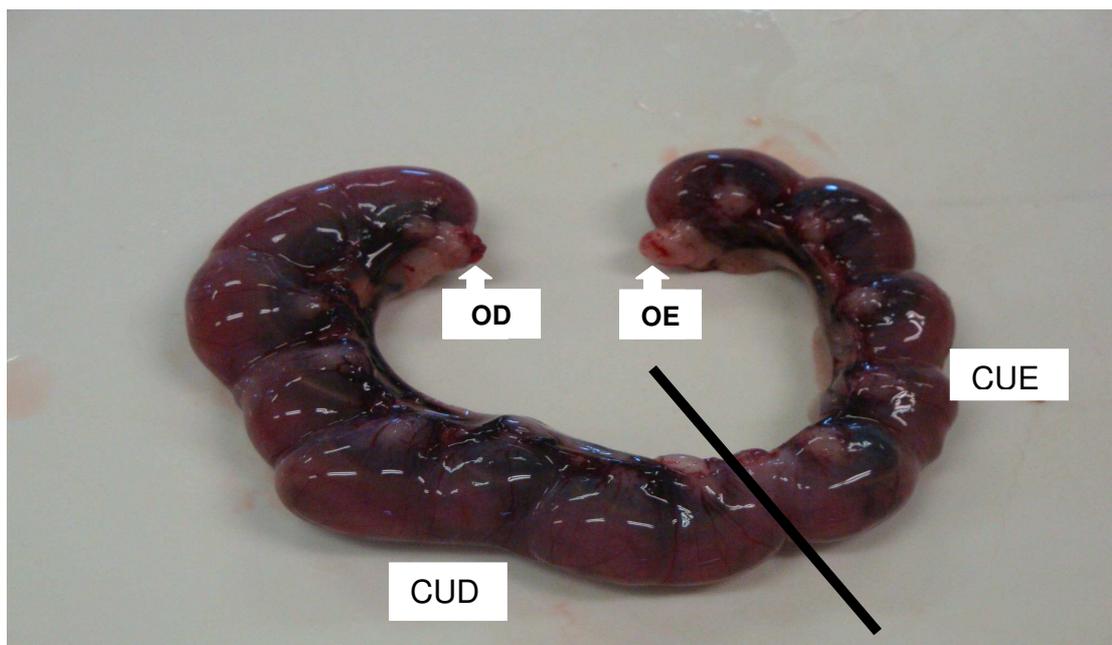


Figura 22: Representação fotográfica do útero gravídico de rata: corno uterino direito (CUD), corno uterino esquerdo (CUE), ovário direito (OD), ovário esquerdo (OE)

Analisou-se macroscopicamente a vitalidade fetal (Figura 22) e separou-se e contou-se o número de corpo lúteo de cada rata após a cesária (Figura 23).

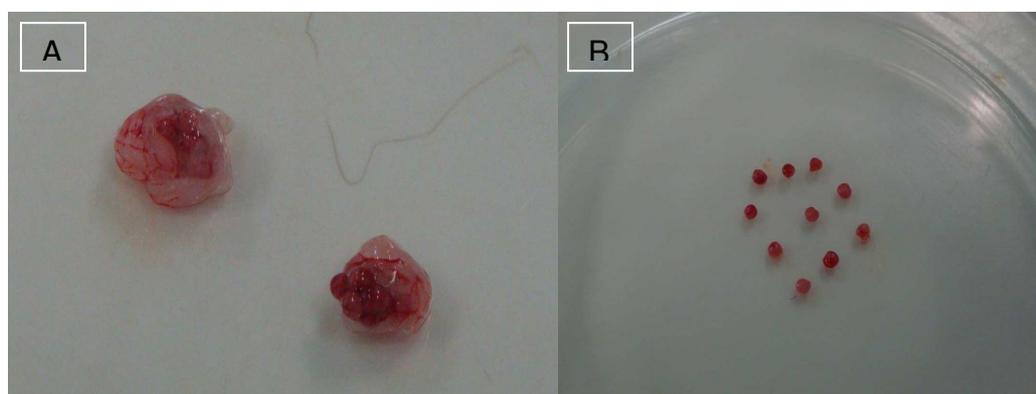


Figura 23: (A) ovários de ratas, (B) corpos lúteos de ratas

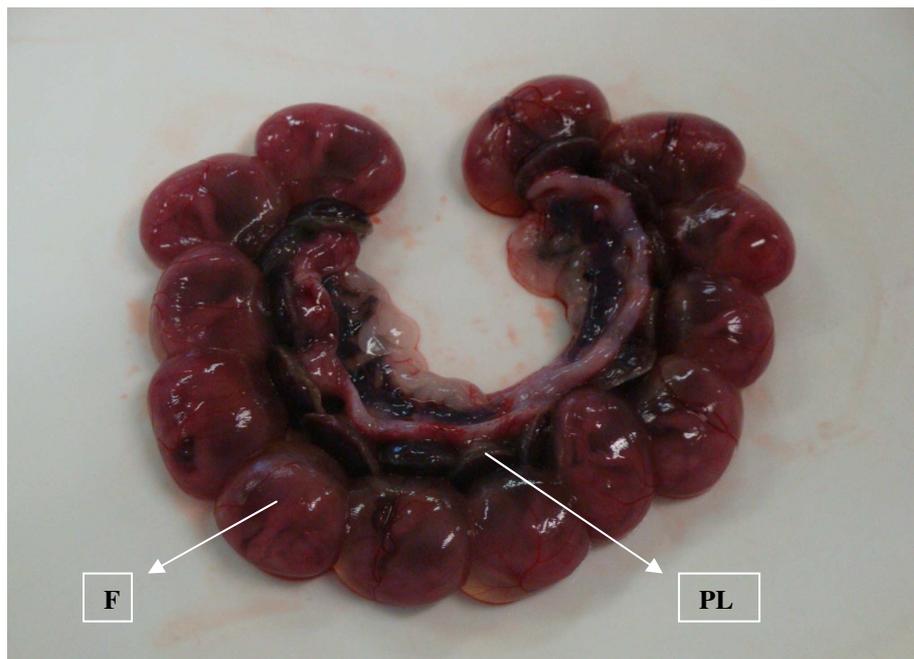


Figura 24: Fetos (F) envolvidos em saco gestacional e suas respectivas placentas (PL): Contagem do número de fetos

Os fetos e as placentas (Figura 24 e 25) foram retirados, separados e pesados (tabela 3). As reabsorções foram observadas (Figura 26).

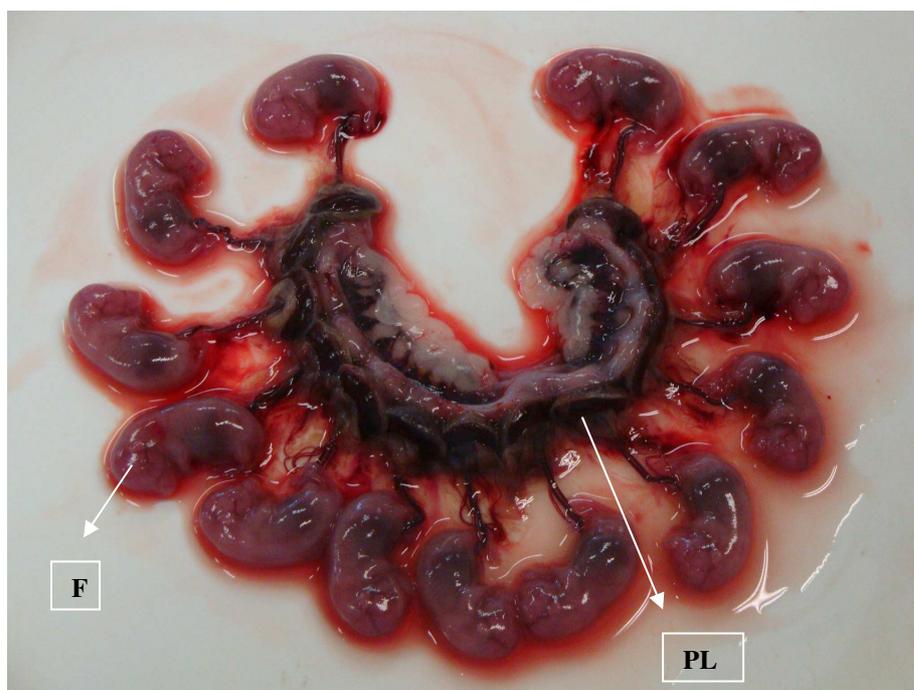


Figura 25: Exposição de fetos (F) e placenta (PL) para avaliação do número de implantações uterinas

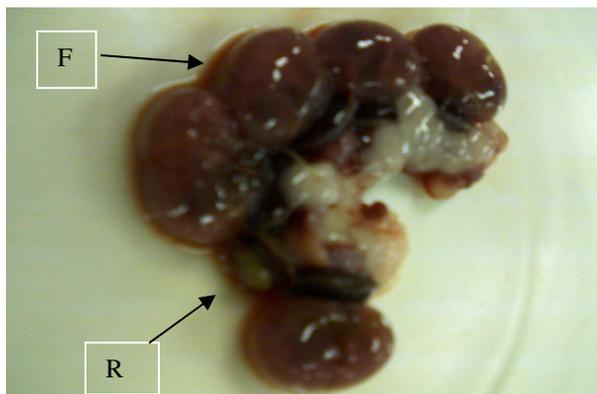


Figura 26: Fetos (F) envoltos em saco gestacional e ponto de reabsorção (R)

6.4.1.3 Parâmetros morfológicos dos fetos

Nos fetos que foram submetidos à técnica de fixação de Bouin, realizou-se as seguintes medidas com o auxílio do paquímetro: antero-posterior do crânio, látero-lateral do crânio, antero-posterior do tórax, látero-lateral do tórax, crânio-caudal e cauda, cada um em seu grupo, tais medidas estão descritas na figura 27. (STERZ; LEHMANN, 1985; BARROW, 1990)

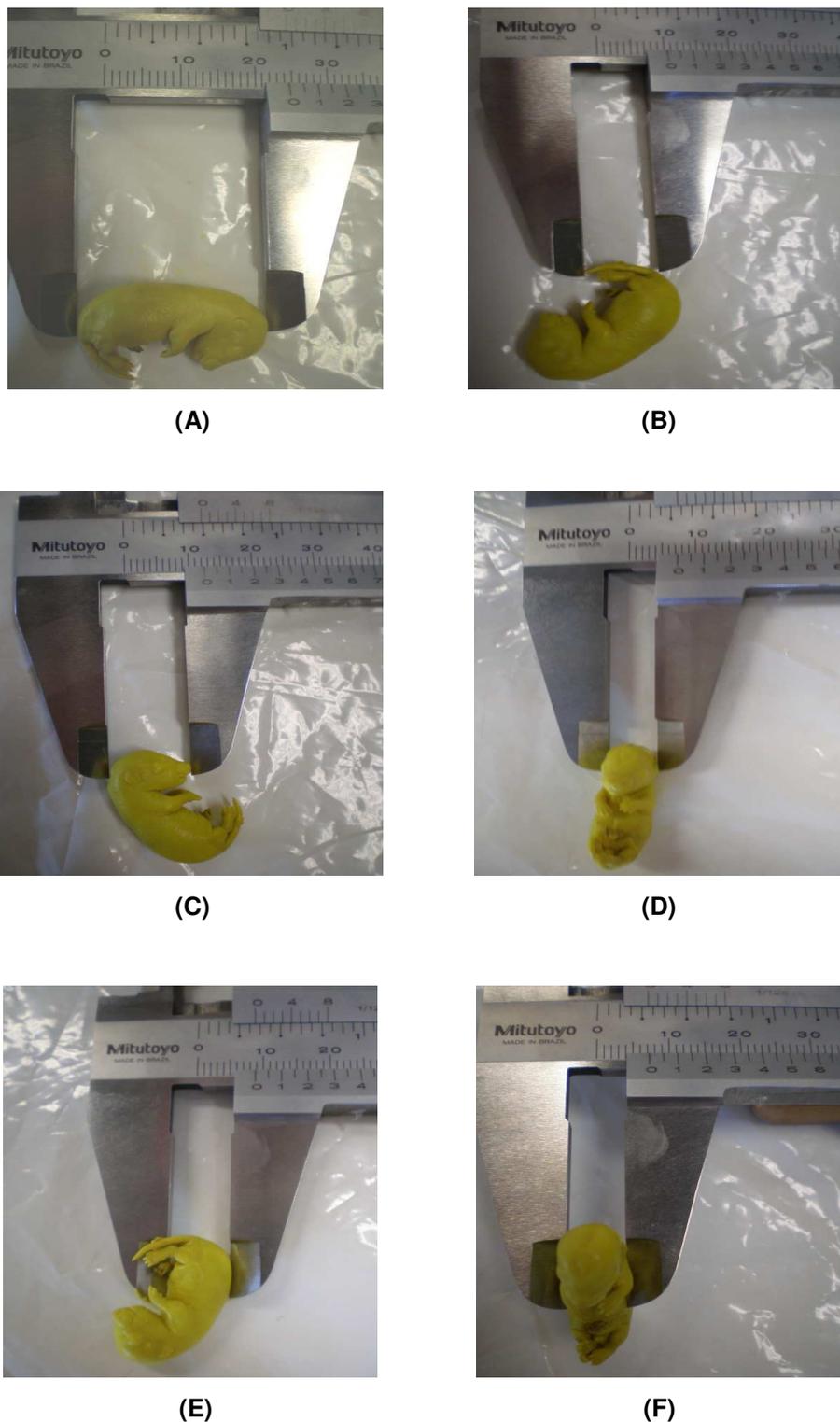


Figura 27: Avaliação dos parâmetros morfológicos externos dos fetos fixados em Bouin – (A) crânio-caudal, (B) cauda, (C) ântero-posterior do crânio (D) latero-lateral do crânio, (E) antero-posterior do tórax, (F) latero-lateral do tórax

A administração do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. na dose de 0,5 g/Kg e 1,0 g/Kg no período de gestação de ratas, promoveu alterações significativas nas medidas de parâmetros morfológicos externos dos fetos (figura

28), pois observou-se o aumento em todas as medidas realizadas nos fetos (tabela 4), quando comparados com o controle, porém, ao comparar as doses não houve diferença significativa. Não observou-se alterações nas implantações de olhos e orelhas, bem como não houve indução de sindactilia e fenda palatina. Também não houve alteração da estrutura óssea dos fetos, não sendo observadas alterações sobre tecidos moles e ossos do crânio; ossificação da cartilagem entre o quadril e o fêmur e o desenvolvimento ósseo do crânio, coluna vertebral, escápula, pelve, crânio e mandíbula dos fetos também não sofreram alteração.

Tabela 4: Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. na dose de 0,5 g/Kg e 1,0 g/Kg no período gestacional de ratas, sobre os parâmetros morfológicos externos dos fetos

| | PADRÃO | Controle (água) | 0,5g/Kg | 1,0 g/Kg |
|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|
| Medidas | Antero-posterior do crânio | 10,09 ± 1,21 | 12,24 ± 1,21* | 11,84 ± 1,00* |
| | Latero-lateral do crânio | 6,05 ± 0,82 | 7,31 ± 0,80* | 8,23 ± 0,71* |
| Dos | Antero-posterior do tórax | 8,16 ± 0,94 | 9,17 ± 0,88* | 9,07 ± 0,56* |
| | Latero-lateral do tórax | 7,46 ± 1,27 | 8,58 ± 1,01* | 8,84 ± 0,54* |
| Fetos | Crânio-caudal | 20,46 ± 2,93 | 23,51 ± 2,02* | 22,73 ± 1,31* |
| | (cm) Cauda | 8,03 ± 1,54 | 8,93 ± 0,79* | 9,15 ± 0,88* |

* p ≤ 0,05, em relação ao controle, teste *One-Way ANOVA*.

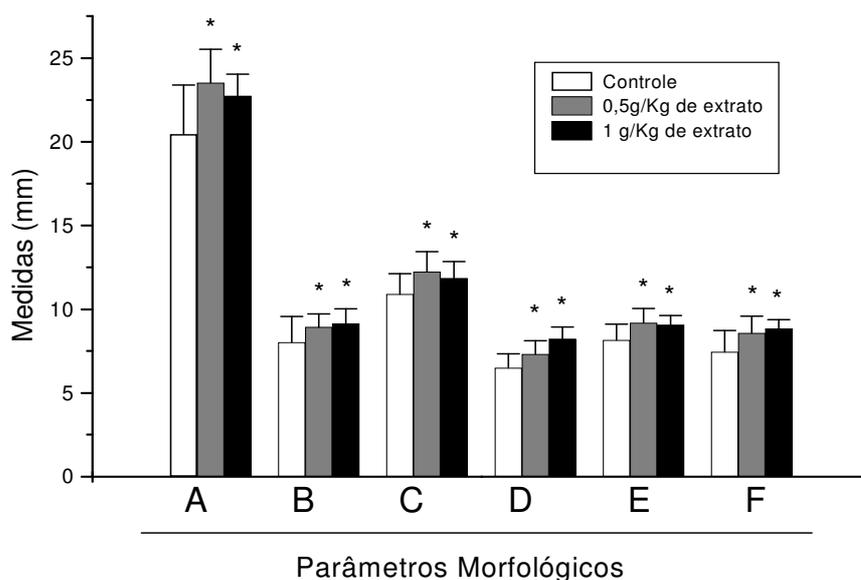


Figura 28: Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da *Plathyenia reticulata* Benth. nas doses de 0,5 g/Kg e 1,0 g/Kg no período gestacional de ratas, sobre os parâmetros morfológicos externos de fetos. (A) crânio-caudal, (B) cauda, (C) antero-posterior do crânio, (D) látero-lateral do crânio, (E) antero-posterior do tórax, (F) látero-lateral do tórax. (* $p \leq 0,05$ em relação ao controle, teste *One-Way ANOVA*)

Analisou-se os parâmetros ósseos indicados nas figuras 29, 30 e 31, os fetos submetidos ao processo de evisceração e diafanização.

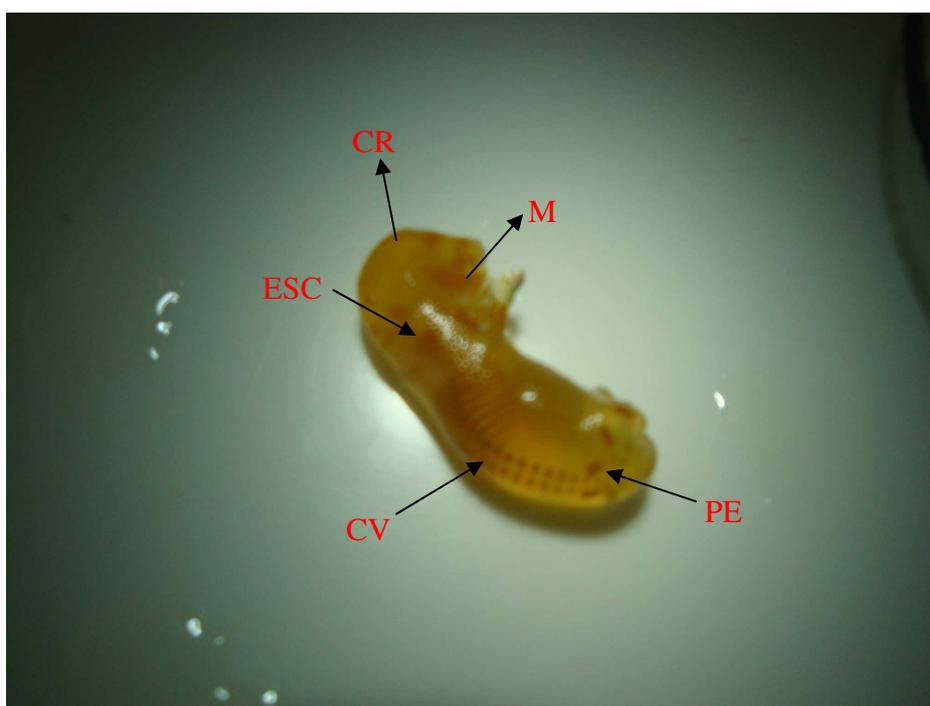


Figura 29: Vista lateral de feto diafanizado: (ESC) escápula, (PE) pelve, (CV) coluna vertebral, (CR) crânio e (M) mandíbula

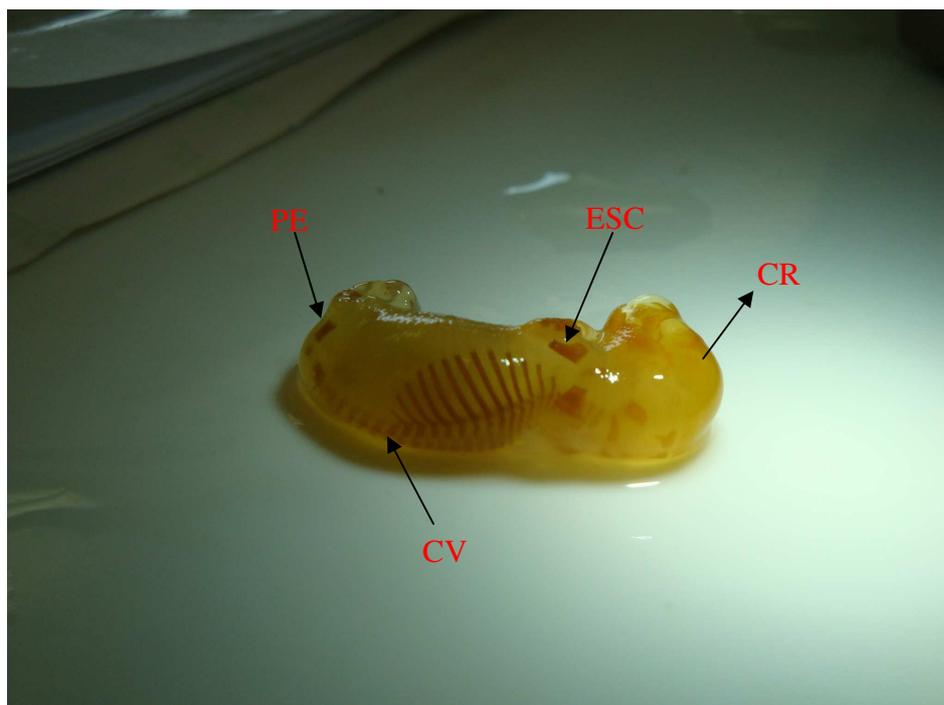


Figura 30: Vista posterior de feto diafanizado: (ESC) escápula, (PE) pelve, (CV) coluna vertebral e (CR) crânio

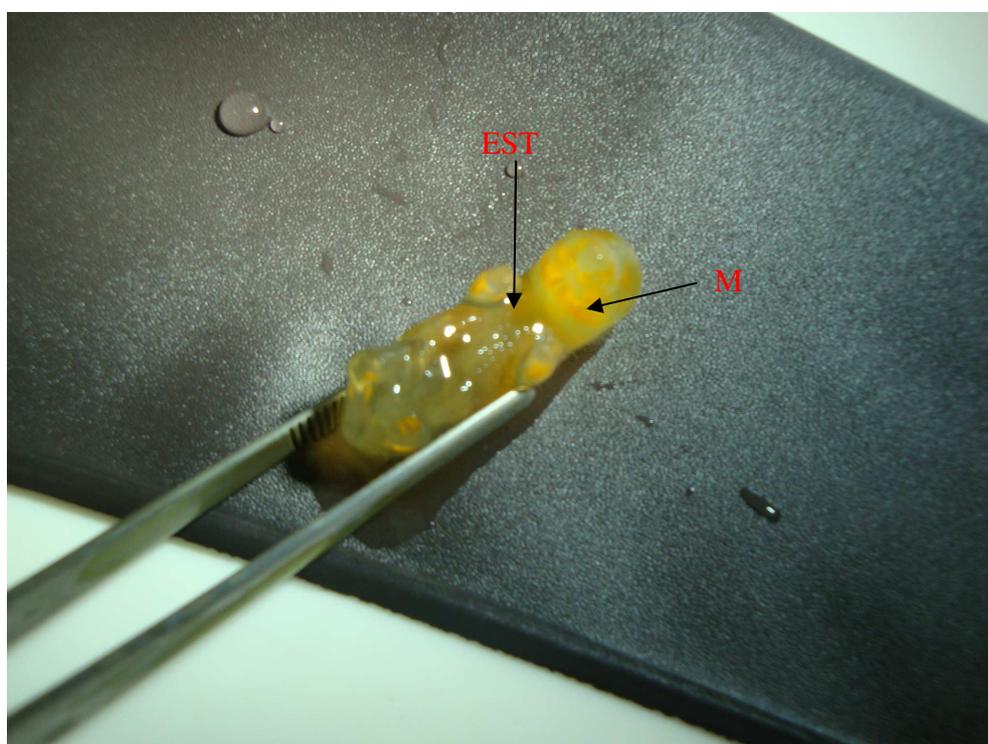


Figura 31: Vista frontal de feto diafanizado: (M) presença de mandíbula e (EST) esterno (possível localização)

Tabela 5: Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth. na dose de 0,5 g/kg e 1,0 g/Kg no período gestacional de ratas, sobre o número de ossificação do esterno nos fetos

| Nº ossificação do esterno | Controle Nº feto | 0,5 g/Kg Nº feto | 1,0 g/Kg Nº feto |
|---------------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 7 | 9 | 8 |
| 1 | 7 | 12 | 8 |
| 2 | 6 | 7 | 3 |

Em relação ao número de ossos esterno implantados nos fetos, não houve retardo na implantação.

6.4.1.4 Avaliação das vísceras

Nos cortes da região da cabeça e do pescoço, observou-se o palato, narinas, órbitas e globos oculares, ouvido interno, córtex e ventrículos cerebrais, medula, traquéia e esôfago (Figura 32), todas essas estruturas estavam implantadas corretamente e a cavidade oral estava desobstruída e delimitada pelo palato, tanto no grupo controle quanto nos experimentais.

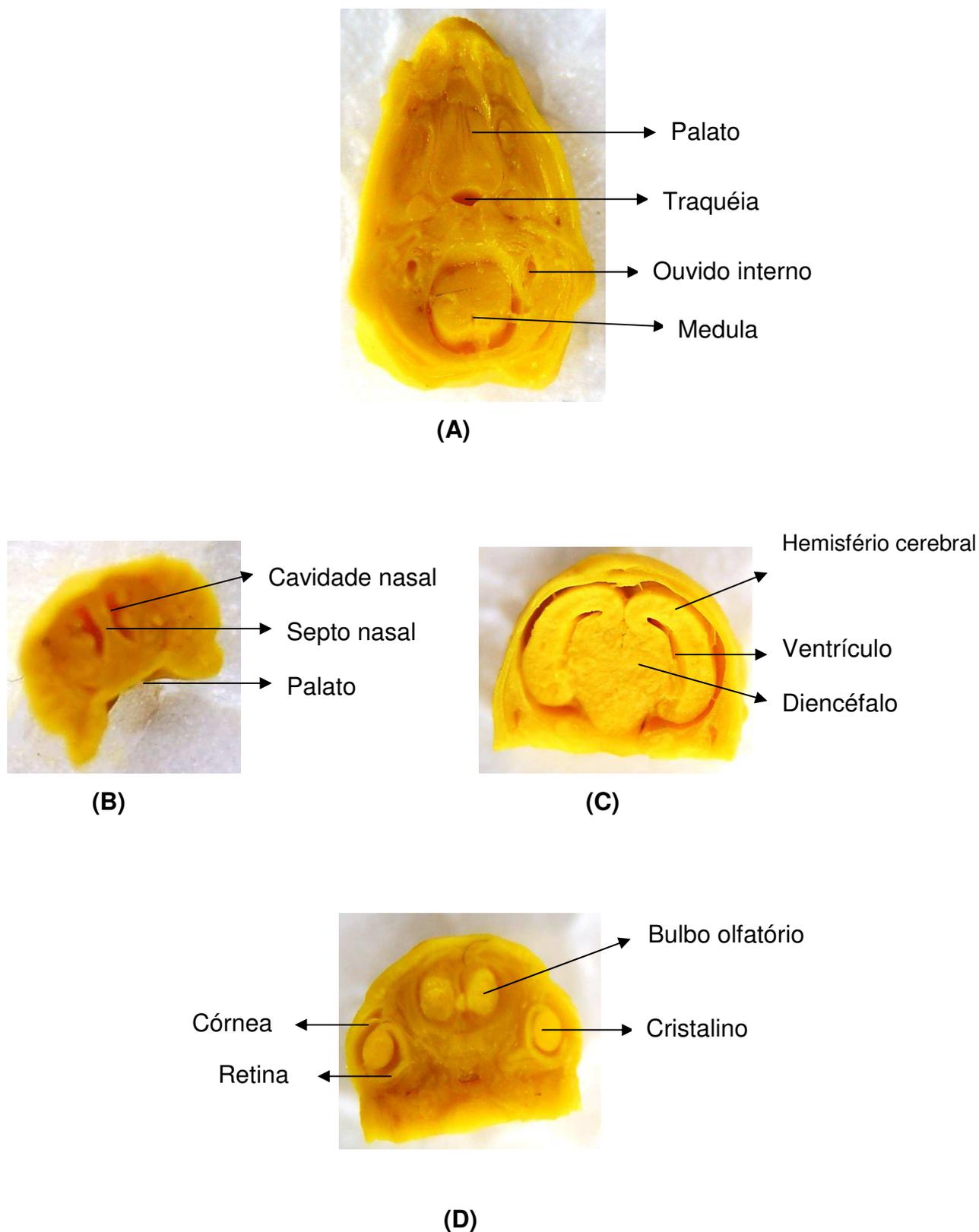


Figura 32: Cortes na região da cabeça e do pescoço: (A) Corte transversal da boca, (B) Corte frontal da cavidade nasal, (C) Corte frontal dos hemisférios cerebrais, (D) Corte frontal do olho. As setas indicam as estruturas visualizadas

Realizou-se um corte transversal na região do abdome, onde observou-se o duodeno, fígado e estômago (Figura 33), essas vísceras estavam normais tanto no grupo controle quanto nos experimentais.

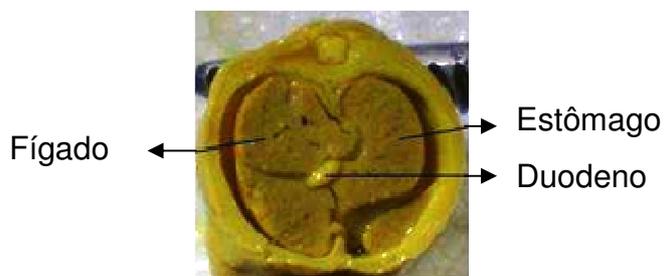


Figura 33: Corte transversal abdominal

Através de um corte transversal, também foi observado os rins (Figura 34), os quais estavam implantados no local correto no grupo controle e nos grupos experimentais.

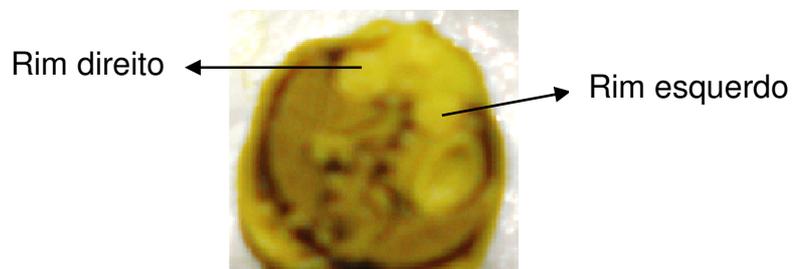


Figura 34: Corte transversal na região dos rins

7 DISCUSSÃO

Até o ano de 2001, poucos medicamentos fitoterápicos haviam sido estudados cientificamente, visando à confirmação de sua eficácia clínica e segurança. Com o crescimento deste mercado em todo o mundo, alguns medicamentos fitoterápicos, comercializados principalmente na Europa, passaram a ser estudados cientificamente, através de ensaios pré-clínicos e clínicos. (YUNES; CALIXTO, 2001)

Segundo Fraser e Nora (1986) as plantas são amplamente utilizadas como medicamento natural, porém sem a correta avaliação da toxicidade de seus componentes, principalmente os efeitos teratogênicos. Alterações no desenvolvimento embrio-fetal e malformações podem ser decorrentes da exposição materna a toxinas, de agentes mutagênicos que alteram o material genético das células germinativas ou agentes teratogênicos que danificam os tecidos somáticos do organismo em desenvolvimento.

Muitas das alterações observadas durante o nascimento, crescimento e desenvolvimento são, devido principalmente à exposição da mãe a agentes químicos (GERENUTTI; DEL FIOL; GROPPPO, 2006).

Como bem estipulado, a maioria dos agentes antimicrobianos sintéticos são proibidos durante a gestação e mulheres grávidas utilizam plantas como remédio, o que sem estudos prévios pode causar danos ao feto. Devido a essas atividades farmacológicas descritas, a determinação da segurança se faz necessária.

Fernandes (2002) afirma que a *Plathymentia reticulata* Benth., possui como componentes químicos entre outros, os taninos e flavonóides. Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, capazes de inibir o desenvolvimento de insetos, fungos e bactérias. Os flavonóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza e são importantes por possuírem efeitos biológicos, incluindo atividade antimicrobiana e cardiovascular (MARTINI; KATERERE; ELOF, 2004). Como já citado, os trabalhos descrevem os efeitos farmacológicos desta planta (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Por esses efeitos farmacológicos, é necessário o estudo desta planta para assegurar o seu uso, pois esta pode ser utilizada em infecções por gestantes.

Em relação ao processo de preparo do extrato, no primeiro momento de desidratação e obtenção do pó da planta registrou-se uma perda de 1,56 % (p/p), considerada uma perda insignificante.

A coloração do extrato bruto e do liofilizado obtido em nosso projeto, foi avermelhado. Provavelmente seu nome popular vinhático deve-se a tal coloração. Esta coloração esta relacionada aos flavonóides contidos em sua composição, pois segundo Middleton, Kandaswami e Theoharides (2000) estes são substâncias amplamente distribuídas na natureza contribuindo para a coloração das flores, frutos e folhas.

Existem muitos trabalhos que descrevem os efeitos farmacológicos do vinhático, entre eles: atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana e anticancerígena. Também estão registrados dados relacionando as características químicas da *Pr.* com atividade antiinflamatória (FERNANDES, 2002). Fernandes (2005) relatou atividade antimicrobiana da *P. reticulata*, *G. ulmifolia* e *H. courbaril* sobre bactérias Gram-positivas. Porém, outras análises são necessárias para avaliar a toxicidade e a ação farmacológica de tais plantas e torná-las alternativas no controle microbiano.

Segundo Rogero et al. (2003), com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de produtos para uso em seres humanos. A validação de tais testes só é possível após a geração extensiva de dados, os quais possam ser consultados por vários laboratórios em todo o mundo.

De acordo com a National Toxicology Program, (ICCVAN, 2008) a validação do estudo da citotoxicidade *in vitro* foi um esforço conjunto entre NICEATM (The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) e o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM). Isso só foi possível através da geração de dados utilizando ensaios *in vitro* da citotoxicidade basal com células de roedor (fibroblasto) e humanas (queratinócitos) predizendo a DL50, de modo a promover o desenvolvimento de modelos preditivos *in vitro* da toxicidade aguda para uso humano. Os valores da IC50 foram utilizados em fórmulas de regressão desenvolvidas a partir do RC (Registro de citotoxicidade) para predizer teste toxicidade de dose aguda por via oral.

Em 28 de fevereiro de 2008, a ICCVAM recomendou a utilização de métodos de ensaio *in vitro* para estimar doses para iniciar testes de toxicidade oral aguda sistêmica. Dados de métodos de ensaio devem ser utilizados em uma abordagem para determinar doses e assim iniciar estudos *in vivo*. Usando esses métodos *in vitro*, quando apropriado, espera-se reduzir o número de animais necessários para ensaios de toxicidade.

Dentre os pontos que Marques (2005) descreveu para escolher a CHO, reside o fato desta linhagem de células já ser utilizada extensivamente e com sucesso. Esta célula é muito bem caracterizada com respeito a uma variedade de aspectos, incluindo o cariótipo, estrutura cromossomal, mapeamento genético, condições de cultivo e meios de cultura requeridos, além de ser uma linhagem de fácil manipulação e controle de cultivo. Além dessas características práticas e importantes, escolheu-se a CHO por ser originada de roedores, pois os experimentos realizados para determinação da embriogenicidade empregarem ratas prenhes. Apesar dessas células não terem sido utilizadas na validação realizada pelo ICCVAM, a mesma foi escolhida na tentativa de gerar dados para uma possível inclusão devido as características previamente citadas.

Segundo NIH (2001), para a utilização da placa de 96 poços deve-se seguir as normas operacionais de procedimentos para evitar erros, pois quando as placas são colocadas na estufa pode ocorrer a evaporação do conteúdo presente nas extremidades da mesma, portanto é recomendado o uso desses poços apenas como branco. Tal procedimento foi utilizado em todos os experimentos realizados.

O método empregado para determinação da viabilidade celular é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio (MTS) e um agente acoplador de elétrons (PMS). O MTS é biorreduzido pelas células a um produto que é solúvel no meio de cultura e, então, efetuada uma análise espectrofotométrica do corante incorporado, de acordo com Barltrop et al. (1991). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

A relação entre dose-resposta da maioria dos *endpoints* farmacológicos e toxicológicos estudados apresentam resposta não linear, geralmente no formato sigmóide, que pode ser linearizada através da conversão logarítmica do eixo das ordenadas. O uso da determinação das doses testadas em progressão geométrica é

indicado, em detrimento da progressão aritmética, já que a mesma possibilita a distribuição igualitária dos pontos testados (NIH, 2001).

A partir de um software PHOTOTOX[®] foi determinado o valor da concentração máxima tóxica (IC50) e não tóxica (IC10) às células, para o cálculo da DL 50 o qual foi utilizado no delineamento dos experimentos *in vivo*.

A determinação da IC 50 é uma informação importante tanto em pesquisa quanto na avaliação da inocuidade de produtos, pois, a partir da IC 50 pode-se determinar a dose inicial da DL 50 para toxicidade oral aguda, o que é um dos objetivos deste experimento. Portanto, a partir da determinação da IC 50 (Figura 20) que correspondeu a 0,331 mg/mL, foi possível determinar a concentração da dose letal, imprescindível para o uso controlado de animais no teste *in vivo*.

Nos testes de citotoxicidade é possível obter informações primárias fundamentais para o estabelecimento da capacidade citotóxica da amostra, sendo assim, a determinação da DL 50 através da concentração de 1.379,67 mg/kg, permitiu que a etapa do projeto referente ao estudo da embriotoxicidade fosse beneficiada, já que foi possível a utilização diminuída de ratas para tal experimento.

Segundo Rogero (2003), os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto.

Portanto, os estudos da citotoxicidade *in vitro* antes dos testes toxicológicos *in vivo* possibilitaram a diminuição do número de animais utilizados garantindo o atendimento às novas diretrizes mundiais permitindo o cumprimento às expectativas de mercado, que buscam medicamentos com menor potencial de toxicidade, resultando na diminuição da incidência de irritações e alergias.

Com esses estudos descritos anteriormente e com os resultados obtidos da DL 50 a partir da IC 50, partimos para a parte *in vivo* do estudo. A qual foi beneficiada utilizando-se um número reduzido de animais.

Fernandes (2002) realizou em seu estudo o teste da formalina com o objetivo de melhor caracterizar a atividade antinoceptiva do extrato bruto de *P. reticulata*, onde o pré-tratamento por via oral reduziu a dor neurogênica e a inflamatória induzidas pela formalina. Segundo o autor, os resultados obtidos em seu trabalho mostraram a atividade antiinflamatória dos extratos hidroalcoólicos de *P. reticulata* e indicaram que esta ação pode estar relacionada com a inibição da cicloxigenase

(COX), enzima responsável pelo metabolismo do ácido araquidônico e síntese de prostaglandinas. Estes resultados são de grande importância para este estudo, uma vez que esta droga pode ser utilizada por gestantes.

Para o início dos estudos os animais foram alojados no biotério em que os experimentos foram realizados, pois, segundo, Damasceno et al. (2008), o transporte para o biotério de experimentação e o novo ambiente causam estresse e desencadeiam uma série de alterações fisiológicas, por esses motivos, antes de iniciar o experimento, houve um período de adaptação dos animais as condições locais.

A metodologia utilizada no presente estudo foi semelhante ao de outros estudos que observaram a toxicidade aguda (PEREZ – GUERRERO et al., 2001), a capacidade reprodutora (GERENUTTI; DEL FIOLE; GROppo, 2006; RAYBURN; CHRISTENSEN; GONZALES, 2000), e o desenvolvimento físico dos filhotes de rato. (GERENUTTI; DE-SOUZA SPINOSA; BERNARDI, 1992)

As doses de 1,0 g/Kg e de 0,5 g/Kg administradas nas ratas durante a gestação foram estipuladas utilizando cálculos baseados nos estudos de citotoxicidade, ou seja, a partir da IC 50 calculou-se a DL 50 a qual foi cerca de 1,379 g/Kg, sendo assim, determinou-se uma dose de 1,0 g/Kg que seria teoricamente a dose tóxica e a de 0,5 g/Kg como a terapêutica.

Os resultados mostram que não houve alterações significativas em relação ao ganho de peso das ratas durante a gestação, sendo assim, o extrato não influencia no ganho de peso das ratas no período gestacional, porém, observamos que entre o 16º ao 19º dias de gestação, foi o período em que as ratas obtiveram um maior ganho de peso, tanto as tratadas quanto aquelas do controle, podendo indicar ser mais provável que o ganho de peso das ratas estejam relacionados com o desenvolvimento natural do que com a droga em si. O ganho de peso dos animais expostos a qualquer agente químico durante um período específico é de grande importância, pois é um dos parâmetros mais utilizados para determinar os efeitos toxicológicos (GERENUTTI et al., 1992, 2008).

Segundo Damasceno et al. (2008), diferentes procedimentos podem ser utilizados para anestésiar e matar os animais, o deslocamento cervical, inalação excessiva de dióxido de carbono (CO₂), barbitúricos ou outros anestésicos são procedimentos em geral admitidos pelos Comitês de Ética de Experimentação Animal, porém, em nossos experimentos utilizou-se o éter etílico, pois testes prévios

realizados nos laboratórios da UNISO com o anestésico Tiopental não se mostraram adequados para garantir a anestesia dos animais, desta forma, visando preservar os animais optou-se por utilizar o éter etílico.

Muitas vezes alterações hormonais ou mesmo a passagem de drogas para o endométrio uterino no período de pré-implantação, podem interferir na implantação e resultar em embriofetividade, ou seja, promover reabsorção. Em estudos realizados com cultura de embriões notou-se severa toxicidade nesta fase, levando o embrião à morte (BRINSTER, 1975). Sendo assim, o desempenho reprodutivo materno é um importante parâmetro para a análise da toxicidade perinatal de drogas (LEMONICA; DAMASCENO; DI-STASI, 1996). Assim, considerando que os corpos lúteos são as principais fontes para a secreção de progesterona (KATO; MORISHIGE; ROTCHILD, 1979), a contagem dos mesmos é de profunda importância em experimentos onde é avaliado o desempenho reprodutivo (WAYNFORTH, 1971).

A pré e pós-implantação dos blastocistos sofrem efeitos fisiológicos diferenciados sob o efeito de tais substâncias químicas, servindo para distinguir embriotoxicidade, ou seja, toxicidade para o embrião, de efeitos tóxicos diretos nas funções uterinas. Pode-se avaliar, por exemplo, a perda embrionária por aceleração ou retardo das implantações dos embriões no útero, o que comprova então, que efeitos tóxicos podem influenciar na fertilidade, seguida de prenhez precocemente interrompida. Além disso, a toxicidade da mãe é também um possível fator de malformações fetais em ratas. (CUMMING, 1990; KHERA, 1984)

Nossos resultados mostram que não houve alteração no número de implantações em relação ao número de corpos lúteos. A taxa de perdas pré-implantação estabelece a relação entre duas variáveis: número de corpo lúteo e número de implantações. O tamanho (ou peso) dos corpos lúteos correlaciona-se com a concentração de progesterona circulante (UCHIDA et al., 1970), que é um dos principais hormônios para manutenção da gestação (KATO; MORISHIGE; ROTCHILD, 1979). Sabe-se que o índice de implantação correlaciona-se com o número de corpos lúteos, e é um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (FORD, 1982).

Nossos dados mostram que a administração do extrato hidroalcoólico de *Pr.* nas doses de 0,5 g/Kg e de 1,0 g/Kg não alteraram a taxa de perdas pré-implantação quando comparadas ao controle. Em relação às perdas pós-implantação, apesar da constatação de reabsorção, estatisticamente não houve

diferença significativas quando comparados os grupos experimentais com o controle. No decorrer do experimento observou-se reabsorção de fetos, contrastando com o índice de implantação, a presença de reabsorções indica uma falha no desenvolvimento embrionário, provavelmente ocasionada pela administração do extrato. Observou-se maior número de reabsorções nos grupos experimentais especialmente com a dose 1,0 g/Kg o que sugere que a toxicidade da *Pr.* é dose dependente, corroborando com os estudos de citotoxicidade.

Em teratogenia o estudo dos efeitos tóxicos de algumas drogas podem se manifestar em desenvolvimento fetal retardado com redução de peso fetal. A implantação do blastocisto em mamíferos prenhes requer uma série de fenômenos integrados que incluem a preparação uterina, transporte do embrião, anexos embrionários, transformação uterina, desenvolvimento placentário e sistema hormonal para apoiar cada passo (ALIVERT et al, 1979). Como órgão fetal, a placenta está exposta às mesmas influências do ambiente intra-uterino e a inúmeras agressões, de natureza diversa, que atingem o feto (BEEBE; COWAN; ALTSHULER, 1996). O bom funcionamento placentário é fundamental para o desenvolvimento do concepto, e o padrão de alteração morfológica encontrada pode indicar alterações clínicas maternas e fetais relacionadas ao desenvolvimento intra-uterino.

A barreira placentária entre mãe e feto tem função de proteção, porém, limitada, visto que muitas drogas podem atravessá-la, seja por difusão simples, difusão facilitada ou mesmo transporte ativo (HARGEMAN; VILLE, 1960).

Em nossos experimentos, o peso das placentas e dos fetos apresentou diferenças significativas quando comparados com o grupo controle, sendo assim, observou-se o aumento do peso dos fetos quando administrado o extrato nas doses de 0,5 g/Kg e 1,0 g/Kg, com isso, o extrato da *Pr.* pode ter exercido algum efeito, devido a pouca ou quase nula capacidade de biotransformação do feto (GERENUTTI; DE-SOUZA SPINOSA; BERNARDI, 1992). Também deve-se considerar que o período fetal é caracterizado pelo rápido ganho de peso ocasionado pelo grande acúmulo de tecido adiposo subcutâneo, evento predominante no segundo terço desse período (MOORE; PERSAUD, 2004). Além disso, muitos agentes químicos são acumulados na placenta e a concentração do agente é mais alta no cordão umbilical do que no soro materno (RUISÁNCHEZ et al., 1993).

Após a realização da técnica de diafanização descrita na figura 13, observou-se que esta deveria ser modificada, uma vez que algumas das etapas realizadas não permitiram uma boa conservação dos fetos, tal fato foi comprovado com a busca de referências (DAMASCENO et al., 2008), onde manter os fetos em solução de KOH 1% em 72 horas seria excessivo, o correto seria manter por 24 horas e a conservação em formaldeído 0,05 %, sugere-se que é uma solução em água, porém o correto é em glicerol. Tais fatos não alteraram os resultados, porém em experimentos futuros esses detalhes devem ser alterados.

Para análise visceral o primeiro corte realizado nos fetos mantidos em Bouin foi o que passa pela região da boca, onde se observou o palato, ouvido interno e a medula, já que, segundo Damasceno et al. (2008), a cavidade oral deve estar desobstruída e delimitada pelo palato e não deve apresentar rupturas em sua superfície até seu limite posterior, onde se identificou a traquéia, dessa forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois tanto o controle quanto os grupos experimentais estavam normais. No septo nasal dos fetos estudados estava localizado na porção anterior da cabeça separando as cavidades nasais, as quais estavam desobstruídas, nos cortes realizados na altura das órbitas oculares, se observou simetria dos olhos e os bulbos olfatórios, tanto no controle quanto nos grupos experimentais estes estavam de acordo com a literatura. A implantação das orelhas, olhos e fissura de palato bem como nos parâmetro morfológicos relacionados aos ossos dos fetos como descrito nos resultados, não mostraram alterações tanto na dose de 0,5 g/Kg quanto na dose de 1,0 g/Kg quando comparadas com o controle.

Em relação ao número de ossos esterno implantados nos fetos, encontramos fetos com nenhuma, uma e duas ossificações, podemos dizer então que não houve retardo na implantação, porém os ossos ainda não estavam completamente formados, uma vez que retiramos os fetos no 19º dia de gestação, pois segundo Damasceno et al. (2008), o esterno adulto consiste de seis pontos de ossificação, e ele é estudado quanto a ausência ou adição do número dos centros esternais, fusão, forma, alinhamento e quantificação da calcificação dos mesmos.

Ao observarmos as vísceras e ossos dos fetos dos grupos experimentais e do grupo controle, constatou-se que não houve alterações.

Pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da

comercialização, pelos órgãos fiscalizadores em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Neste sentido, ao observarmos a Portaria nº 116 (ANVISA, 1996) de Agosto de 1996 que determina que sejam realizados testes complementares para avaliação de efeitos adversos sobre a performance reprodutiva causada por drogas administradas durante a fecundação, determinação de efeitos adversos, sobre fetos durante a vida intra-uterina, por drogas administradas durante a gestação e a determinação de efeitos adversos, sobre a mãe e o produto. Sendo assim, os efeitos da administração do extrato, quanto ao estudo de fertilidade parece não apresentar potencial tóxico, porém são necessários mais estudos para definição da segurança do extrato (GERENUTTI; DEL FIOL; GROppo, 2006). O que é o propósito deste estudo, ou seja, assegurar o uso dessa planta.

A resolução nº116, de 8 de agosto de 1996 (ANVISA, 1996), mostra a importância da realização de testes toxicológicos e de eficácia de produtos feitos a partir de plantas medicinais. Esta resolução determina que o protocolo experimental a ser empregado deve ser elaborado de forma a permitir a demonstração ou ausência da eventual toxicidade do produto fitoterápico. Dentre as considerações gerais sobre os experimentos toxicológicos, a determinação de efeitos adversos, sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período, são de grande importância.

O trabalho permitiu a utilização de técnicas já preconizadas *in vivo* além de possibilitar o emprego de novas técnicas *in vitro* o que minimizou a utilização de animais. As perspectivas mundiais indicam que num futuro próximo a avaliação do potencial toxicológico de produtos obtidos a partir de plantas medicinais poderá ser realizada totalmente *in vitro*, considerando que fetos humanos são mais sensíveis que os de animais. Dessa forma, espera-se que os resultados obtidos nessa pesquisa possam ter contribuído para esse futuro.

8 CONCLUSÃO

A partir dos dados deste estudo, considerando que as Leis vigentes do País determinam que sejam realizados testes complementares de determinação do potencial teratogênico das diversas espécies vegetais medicinais, nossos resultados indicam que o extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth., não apresentam a possibilidade de causar embriotoxicidade, porém observou-se algumas alterações estatisticamente significativas quando comparado os grupos experimentais com o controle, sendo assim são necessários mais estudos complementares sobre a planta para determinar o potencial tóxico da mesma e assim ser um indicativo para o uso seguro.

REFERÊNCIAS

ALIVERT, V. et al. The extent of fetal occification aa na indexo f delayed developmment in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v.20, p.237-242, 1979.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 88, de 16 de março de 2004a**. Determina a publicação da "LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE FITOTERÁPICOS". 2004b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RE nº 89, de 16 de março de 2004b**. Determina a publicação da "LISTA DE REGISTRO SIMPLIFICADO DE FITOTERÁPICOS". 2004c. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004c**. Determina a publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". 2004d. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996**. Publica proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (anexos I e II). 1996. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. 2006. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2000. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004d**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

AQUINO, F. G.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J. F. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado - Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 147-149, 2007.

ÁRVORES do Brasil: *Plathymenia Reticulata* Benth. Disponível em: <<http://eadmelo.sites.uol.com.br/vinhat1/index.htm>> Acesso em: 11 de fev. 2009.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants, **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.

BARLTROP, J. A.; OWEN, T. C.; CORY, A. H.; CORY, J. G. "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple water-soluble Formazans as cell-viability Indicators", **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 11, p.611-614, 1991.

BARROW, P. Technical procedures in reproduction toxicology. **Laboratory animals Handbooks**, London, n. 11, 1990.

BEEBE, L.A.; COWAN, L.D.; ALTSHULER, G. The epidemiology of placental features: associations with gestacional age and neonatal outcome. **Obstet Ginecol**, v. 87, p. 771-778, 1996.

BRINSTER, R. L. Teratogen testing using preimplantation mamalian embryos. In: SHEPARD, T. H.; MILLER, J. R.; MARDIS, M. (ed.) **Methods for detection of environmental agents that produce congenital defects**. New York: Elsevier, 1975.

BUTLER, M. **Mammalian cell biotechnology**. USA: Oxford University Press, 1991.

CALIXTO, J. B. et. al. Kinins in pain and inflammation. **PAIN**, v.87: p. 1-5, 2000.

CARAMONI, S. S.; LIMA, C. S; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. **Brazilian Archives Of Biology And Technology, An International Journal**, v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

CARVALHO, J. E. Fitoterápicos: alimento ou medicamento? In: MERCADANTE, A. Z. et al. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, v. 3, p. 196-202, 2001.

CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **MultiCiência**, Campinas v. 7, p. 18, 2006.

CHIGANÇAS, V.; MIYAJI, E. N.; MUOTRI, A. R.; JACYSYN, J. F.; AMARANTE-MENDES, G. P.; YASUI, A.; MENCK, C. F. M. Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial photolyase gene. **Cancer Research**, Estados Unidos, v. 60, p. 2458-2463, 2000.

CUMMING, A. M., Toxicological mechanisms of implantation failure. **Fundamental applied Toxicology**, v.15, p. 571-579, 1990.

DAMASCENO, D. C.; Kempinas, W. G. **Anomalias Congênitas** – estudos experimentais. Belo Horizonte-MG: Coopmed, p. 2-99, 2008.

DAWSON, B.; TRAPP, R. G. **Bioestatística Básica e Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001.

DIAS, B. F. S. **A implementação da conservação sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, p.10, 1996.

DOYLE, A.; GRIFFITHS J. B. **Cell and tissue culture**: laboratory procedure in biotechnology. New York: John Wiley e sons, 1998.

CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHÓN, M. J.; PONSODA, X. In Vitro toxicity testing. In: DOYLE, A.; GRIFFITHS. J. B. **Cell and Tissue Culture for Medical Research**. New York: Wiley-Liss, p. 403-409, cap. 5.6, 2000.

DRUMOND, M. A. **Potencialidade das essências nativas do trópico semi-árido**. São Paulo: Silvicultura, v.16, p. 766-781, 1982.

EAGLE, H.; FOLEY, G. E. The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. **Am. J. Med.** v. 21, p. 739-745, 1956.

EEC Directive of 1986; 86/609/EEC. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. **EEC Official Journal** L 358, 18/12/1986; 0001-0028.

FERNANDES, A. T. **Atividade farmacológica dos extratos obtidos de *Plathymenia reticulata* Benth. (leguminose)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas: 2002.

FERNANDES, T. T.; FERNANDES, A. T.; PIMENTA, F. C. Atividade Antimicrobiana Das Plantas. *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*; **Revista De Patologia Tropical**, v.34, n. 2, p. 113-122, 2005.

FIDALGO, T. R. F.; GONÇALVES, R. A. B.; BANDONI, R. C. P. S.; BETA HCG: Estudo Comparativo dos Testes Imunocromatográficos e de Quimioluminescência; 63. ed. **NewsLab**, p. 102-103, 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar; Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP. **Multiciência**. Campinas, v. 7, 2006.

FORD, W. C. L. The effect of deoxy-6-fluoroglucose on the fertility of male rats and mice. **Contraception**, v. 25, p. 535-45, 1982.

FRASER, F.C.; NORA, J.J. **Genética Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 5. ed. New Jersey: Wiley-Liss, 2005.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B. **Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloi.html>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

GAULEJAC, N. S. C.; GLORIES, Y; VIVAS, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v.32, p. 327-333, 1999.

GERENUTTI, M.; DE-SOUZA SPINOSA, A. H.; BERNARDI, M. M. Effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L Kuhn) feeding during the development of female rats and their offspring. **Vet Hum Toxicol**, v. 34, p. 307-310, 1992.

GERENUTTI, M.; DEL FIOL, F.; GROPPPO, F. C. Performance reprodutiva de ratas grávidas e efeitos embriotóxicos da ciprofloxacina. **Pharmazie**, v. 61, n.1, p.79-80, 2006.

GERENUTTI, M.; DEL FIOLE, F.; GROppo, F. The effect of *Cecropia glazioui* Snethlage on the physical and neurobehavioral development of rats. **Pharmazie**, v. 63, p. 398-404, 2008.

HAGERMAN, D. D.; VILLE, C. A. Transport functions of placenta. **Physiol. Rev.**, v. 40, p. 313-320, 1960.

HAYES, A. W. **Principles and Methods of toxicology**. 3. ed. New York: Raven, 1994.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos, SP: EdUFSCar, 2003. (Série de textos da Escola de Verão em Química-IV).

HUGGET, A. C.; SCHILTER, B.; ROBERFROID, M.; ANTIGNAC, E.; KOEMAN, J. H. Comparative methods of toxicity testing. **Food. Chem. Toxic**, v. 34, p. 183-192, 1996.

ICCVAM, 2006. **Peer review panel report**: The use of *in vitro* basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. NIH publication nº: 07-4519. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/panelrpt/ATpanelrpt.htm>>. Acesso em: 25 jul. 2008.

ICCVAM, 2008. **National toxicology program**. Disponível em: <http://www.iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_scpeerrev.htm>. Acesso em: 12 de mar. de 2008.

KATO, H.; MORISHIGE, W. K.; ROTCHILD, I. A relação quantitativa entre o número de determinado experimentalmente conceptuses e corpus luteus actividade em ratas grávidas. **Endocrinology**, v.105, n.3, p. 846-850, 1979.

KENNEDY, T. Q.; ARMSTRONG, D. T. The role of prostaglandins in endometrial vascular changes at implantation. In: GLASSER, S. R.; BULLOCK, D. W., (ed.). **Cellular and molecular aspects of implantation**. New York: Plenum Press, 1981, p. 349-361.

KHERA, K. S., Maternal toxicity-a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v. 29, p. 411-416, 1984.

KRATJE, R. Modificaciones Post-Traducciones. In: Seminário Production of Biopharmaceuticais in Animal Cell Cultures, 2004. **COPPE/UFRJ**, 2004 jul. 12 a 23, RJ, Brasil, 2004

LEMONICA, I. P.; DAMASCENO, D. C.; DI-STASI, L. C. Estudo dos efeitos embriotóxicos de um extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.

MAIZATO, M. J. S.; HIGA, O. Z.; MATHOR, M. B.; PITOMBO, R.; ZAVAGLIA, C. A. C.; LEIRNER, A. A. Lyophilization Of Treated Bovine Pericardium And Cytotoxic Evaluation. COLAOB 2001. In: **II Congresso Latino Americano de Biomateriais e de Órgãos Artificiais**. Belo Horizonte/MG – Brasil, 2001.

MANSON, J. M. Teratogens. In: DOULL, J.; KLAASSEN, O.; AMOUR, M. O., (ed.) **Casare and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 3. Ed. New York: Mac Millian, , 3. ed., 1986. p.195-220.

MARQUES, C. H.; Aspectos **Fundamentais à Implantação da Tecnologia de Anticorpos Monoclonais Humanizados com Potencial Aplicação Terapêutica**. Instituto Oswaldo Cruz, Instituto de tecnologia em imunobiológicos; Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular; **Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**, Rio de Janeiro, 2005.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol**, v 93, p. 207-212, 2004.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implication fo inflammation. Hert Disease and Câncer. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 673-751, 2000.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7. ed..Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

NETO, G. G. O Saber Tradicional Pantaneiro: As Plantas Medicinais E A Educação Ambiental; **Rev. eletrônica Mestr. Educ. Ambient.** v.17, 2006.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I.; PLATZEK, T.; MEISTER, R. Principles and problems in assessing prenatal toxicity. **Toxicology**, v. 60, p. 218-245, 1987.

NIH Public Access. “**The Guide for the Care and Use of Laboratory Animal**” (National Research Council, 1996). Disponível em: < <http://publicaccess.nih.gov/> > Acesso em: 02 de Abr. 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1997.

PEREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M.D.; ORTIZ, R.; ALVAREZ DE SOTOMAYOR, M.; FERNANDEZ, M.A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. **J Ethnopharmacol**, v. 76, p. 279–284, 2001.

PHILLIPS, B. J. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 10, p. 69-76, 1996.

PHOTOTOX[®] version 2.0. Disponível em: <http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html> Acesso em: 12 set. 2008.

PIO CORRÊA, M.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Inst. Brás. Desenv. Florestal, Rio de Janeiro v. 5, 1969.

POMERAT, C. M.; LEAKE, C. D. Short term cultures for drug assays: general considerations. Ann. New York: **Acad. Sci.**, v.58, p. 1110-1128, 1954.

PROMEGA CORPORATION. **Technical Bulletin n° 169: Cell titer 96[®] aqueous non-radioactive cell proliferation assay**. Revisado em 07/2001. Disponível em: <<http://www.promega.com>>. Acesso em 05 dez. 2008.

PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; & ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells, III: Long term cultivation of euploid cells from and animal subjects. **J. Exp. Med.** 108, p. 945-956, 1958.

RAYBURN, W. F.; CHRISTENSEN, H. D.; GONZALEZ, C. L. Effect of antenatal exposure to Saint John's wort (*Hypericum*) on neurobehavior of developing mice. **Am J Obstet Gynecol**, v.183, p. 1225–1231, 2000.

ROGERO, S. O.; LUGÃO A. B.; IKEDAB T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos, v. 6, n. 3, 2003.

RUISÁNCHEZ, N.; CONDE, C.; ORTIZ, A.R.; LENCE, J. J.; RAMOS, S. Efectos trasplacentarios del condensado del humo de cigarrillos negros sobre el genoma de roedores. **Rev. Cubana Oncol.** v. 9, n. 1, p. 21-24, 1993.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** – da planta ao medicamento; São Carlos – SP: Editora da UFSC, 2. ed., p. 609, 2000.

SMITH, C. G.; GRADY, J. E.; NORTHAM, J. I. Relationship between cytotoxicity *in vitro* and whole animal toxicity. **Cancer Chemoth. Rep.**, v. 30, p. 9-12, 1963.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **ATLA**, v. 27, p. 957-966, 1999.

SPIELMANN, H., EIBS, H. G., MERKER, H. J. Effects of cyclophosphamide treatment before implantation on development of rat embryos after implantation. **Journal of Embriology Experimental Morphology**, v.41, p. 65-78, 1977.

STERZ, H., LEHMANN, H. A critical comparison of the freehand razor-blade dissection method according to Wilson with an in-situ sectioning method for the rat fetuses. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 5, p. 347-354, 1985.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 2001.

UCHIDA, K.; KADOWARI, M.; NOMURA, Y.; MIYATA, K.; MIYAK, T. Relationship between ovarian progesterin secretion and corpora lutea function in pregnant rat. **Endocrinol Jpn**, v. 17, p. 499-507, 1970.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. ; MACIEL, M. A. M. . Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 3, 2005.

WAYNFORTH, H. B. Alterações do volume de corpo lúteo de ratos durante a gravidez e após a intervenção cirúrgica com o útero e da placenta. **Acta Endocrinol**, v. 66, p. 296-302, 1971.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (eds.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ANEXO A: Aprovação do Comitê Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

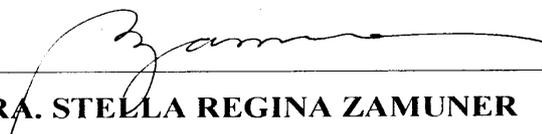
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A11/CEP/2008, sobre "*Estudo da sequença do uso de Plathymenia reticulada durante a gestação de ratas*" sob a responsabilidade de *profa. Dra. Yoko Oshima-Franco e Lia de Barros Leite Albuquerque*, foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 10 de junho de 2008.



PRFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade do Vale do Paraíba – Univap

ANEXO B: VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the life Sciences

Wednesday, June 10, 2009

Dear Dr. ESTEVES,

as Organizing Secretariat of the WC7 Congress and on behalf of the two congress co-chairs, Dr. Thomas Hartung and Dr. Herman Koëter, we are pleased to inform you that the abstracts revision process has been completed and that your abstract **“CYTOTOXICITY EVALUATION OF PLATHYMENIA RETICULATA BENTH HIDROALCOHOOLIC EXTRACT USING CHO CELLS”** has been selected as **poster**.

Please read carefully the relevant information here below:

- Size of the poster boards: cm 95 (base) x cm 240 (height). Best poster size: cm 70 x 100
- Poster set up: August 30, from 16:00 to 20:00; poster dismantling: September 3, after 13.00
- Authors are responsible for set up and dismantling of their poster(s)
- Your **poster ID: 295**. Please note that your poster should be hanged up on the poster board reporting this identification code
- The poster exhibition will be working over the whole duration of the conference, in particular during lunch time. We invite you to be available for discussion or explanations close to your poster
- The section category in which your poster will be displayed is **Basic Research**
- your abstract is going to be printed in the Abstract Book of the Congress, edited by ALTEX

For your convenience the above mentioned information are available on line clicking on the following link:
<https://services.aimgroup.it/ASPClient/home.asp?EventoID=2472>

(do not forget to have your *user id* and *password* available for log-in)

Considering the above mentioned information we warmly invite you to finalize your registration through the congress web site: www.aimgroup.it/2009/wc7.

Please note that the deadline for early bird registration fee expires on June 30.

Looking forward to meeting you in Rome we remain at your disposal for any further assistance you may require.

Best regards

The WC7 Organizing Secretariat



Abstracts 7th World Congress Rome 2009

Volume 26, Spec. Issue
ISSN 1868-596X
1-376 (2009)

ALTEX

ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTATION

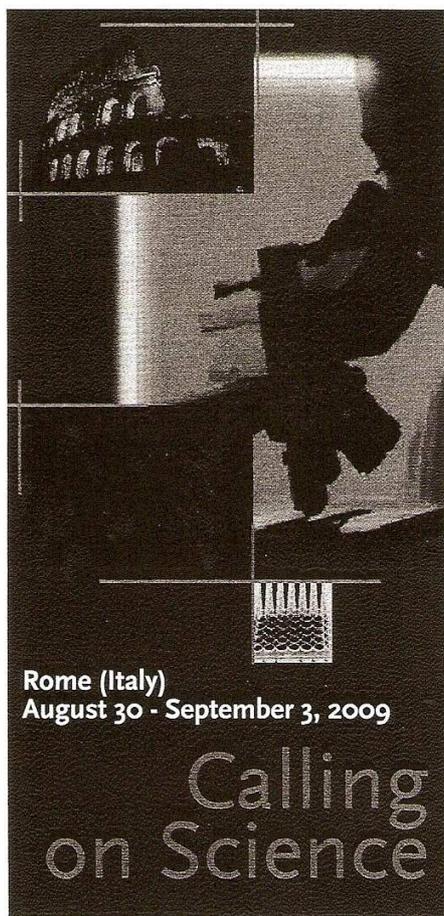
Thomas Hartung
and Herman B. W. M. Koëter:
Welcome

Theme 1 Innovative technologies, concepts and approaches

Integrated approaches
Chemical and physical
methods
High throughput technologies
Omics and systems biology
Non-invasive technologies
Non-vertebrate models
In silico models
Databases: scientific
approaches
In vitro technologies
Current and evolving concepts
for the validation
of safety assessment methods

Theme 2 Areas of animal use

Basic research
Chemicals and pesticides
Cosmetics
Pharmaceuticals
Food improving agents
Genetically modified organisms



Nanomaterial toxicity testing
Vaccines and biologicals
Education and training
Animal use policies

Theme 3 Progress in life science domains

Skin and eye toxicity
Systemic toxicity and target
organs
Genotoxicity and
carcinogenicity
Reproduction, development
and fertility
Disease models
Environmental science
Animal welfare science
Immunology
Neuroscience

Poster sections to

Theme 1
Theme 2
Theme 3

Invitation to WC8

August 21-25, 2011
Montréal, Canada



feature are also able to activate the AhR. In the present work, we studied the ability of pifithrin, an inhibitor of signaling by the tumor suppressor protein p53, to activate AhR. This will give new information about the structural features necessary for activation of AhR that can be helpful for the understanding of AhR mediated processes. Pifithrin was able to activate EROD activity in a fish cell line. *Ab initio* computational calculations showed that pifithrin meets the requirements to act

as an AhR activator. The possible interaction of the activated AhR with specific DNA responsive elements was studied in a rat hepatoma cell line expressing luciferase as a reporter gene under the indirect control of AhR. The binding of pifithrin to the AhR was observed using marked antibodies directed against the AhR-activated complex. The concrete mechanism of AhR activation was studied by means of co-incubation with AhR and cytochrome P450 activators and inhibitors.

ID ABS: 293

Focus on alternatives: a consortium for an advanced and ethical research

S. Farnaud¹, R. Seabra², J. Korotoga³ and C. Dodkin³

¹Dr Hadwen Trust, Science Department, Hitchin, UK; ²FRAME, Nottingham, UK; ³Lord Dowding Fund, Research Department, London, UK

Focus on Alternatives (FoA) is a consortium of British non-profit organisations that fund the development of methods which replace the use of laboratory animals in research, education and testing. FoA has been proactive on several topics, the most recent of which include:

- Human tissue campaign – Survey results

A survey was conducted to understand the limitations and challenges scientists face when using human cells and tissues. The survey results will prove useful in overcoming existing barriers regarding the donation and availability of human tissues for research.

- Foetal calf serum-free table

An updated list of commercially available foetal calf serum (FCS)-free media for a wide range of defined cell lines is now available from FoA. This is an invaluable tool for scientists aiming at defin-

ing culture media to improve the control and consistency of culture conditions, and decrease the risk of contamination.

- Human Volunteers – Replacing Animal Experiments in Pain Research

A workshop was organised with leading experts, from both industry and academia, to assess the validity of the animal model in pain research. The conclusions were published in a report in the journal *Neuroimage*, exploring how studies with volunteers, in combination with *in vitro* methods, can address human pain conditions whilst replacing the use of animals.

- Replacing Primates in Medical Research

Members of FoA produced a report available through our website, which highlights the use of primates together with current and future potential replacement techniques, in five areas of medical research – malaria, stroke, hepatitis C, AIDS and cognition research.

ID ABS: 295

Cytotoxicity evaluation of *Plathymenia reticulata* Benth hydroalcoholic extract using CHO cells

N. Esteves¹, L. Albuquerque¹, A. Rodas², Y. Oshima-Franco¹ and P. Lopes¹

¹University of Sorocaba, Brazil; ²Ipen/Cnen, São Paulo, Brazil

Plathymenia reticulata Benth is a typical plant from Brazilian savanna areas, popularly known as “vinhático”, which belongs to the *Leguminosae* family. Its stems are used in anti-inflammatory treatments. According to Brazilian standards, in order to register a medicinal plant, it is required that a technical bulletin containing scientific data assures its safe use. The present work evaluated the cytotoxicity of a hydroalcoholic extract obtained from samples collected in Tocantins, Brazil, using Chinese hamster ovary cells (CHO). The tests were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) L-glutamine and 1% (v/v) penicillin-streptomycin, and incubated at 37°C, 97% humidity and 5% CO₂ in cell culture flasks. The cytotoxicity was evaluated by exposing CHO

cells to different concentrations of the extract. The viable cells were quantified using MTS/PMS. The regression formula used to estimate the starting dose was based on gram units, so it was applicable to mixtures and unknown substances, as described in the peer review panel report from ICCVAM and NICEATM in 2006. The IC₁₀ corresponded to 0.331 mg/ml and the IC₅₀ to 0.598 mg/ml. These values established the starting doses for the acute oral systemic toxicity test of the hydroalcoholic extract (1719.26 mg kg⁻¹), reducing the required number of animals for further scientific investigations. Although reports suggest the use of 3T3 cell culture and the NRU method to detect cell viability, data generated using different cells brings new perspectives to the *in vitro* methodology validation.

ANEXO C: 7TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES



Ribeirão Preto, August 3rd, 2009.

Dear
LIA DE BARROS LEITE ALBUQUERQUE

The Organizing Committee of the 7th INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES is pleased to announce that your abstract WAS ACCEPTED.

Control Number: TO 004
Poster Set-up date: 06/09/2009*CHECK INSTRUCTIONS BELOW.

**STUDIES ON THE SAFETY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Plathymenia reticulata* Benth. IN PREGNANT RATS
ALBUQUERQUE,LBL, GERENUTTI,M, LOPES,PS, FRANCO,YO;**

*** GENERAL INSTRUCTIONS:**

1. Poster date/time:
(Check the specified set-up date above)

SET-UP DATE: 6/9/2009
SET-UP TIME: 2:00 PM
Removal: September 7 at 6:30 PM
Official Visit: September 7, from 5:00 to 6:00 PM

SET-UP DATE: 8/9/2009
SET-UP TIME: 8:30 AM
Removal: September 9 at 11:00 AM
Official Visit: September 9, from 8:30 to 10:00 AM

2. Maximum poster size: 0.90 m width x 1.50 m height
3. Language: The poster must be written in English. The presence of the presenting author LIA DE BARROS LEITE ALBUQUERQUE is required, with fluency in English, during the Official Visit.
4. Identification: The poster will be identified with the corresponding abstract's control number.
5. Poster set-up and Poster removal:
 - Date: See date and time in the schedule
 - Bring the material needed for set-up. There will be a pin in the panel to hang the poster
 - Posters not removed by the established date and time will be removed and destroyed by the organizers.
6. Certificate: Only the presenting author LIA DE BARROS LEITE ALBUQUERQUE will receive a certificate of presentation, after the Official Visit, at the Secretariat of the Congress.
7. Awards: Each area will receive the Best Poster Award. The winners will be announced at the CIFARP closing session, on September 9th, at 12:30 PM. Best Regards,

ORGANIZAÇÃO





STUDIES ON THE SAFETY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Plathymentia reticulata* Benth. IN PREGNANT RATS

ALBUQUERQUE, LBL; GERENUTTI, M; LOPES PS; OSHIMA-FRANCO, Y

Master's Degree in Pharmaceutical Sciences
Universidade de Sorocaba, SP, Brazil

1. INTRODUCTION

In the past decades an expressive worldwide increase in the market of phytotherapeutic drugs has been noted. Till recently, few phytotherapeutic drugs have been scientifically studied with focus on their safety and clinical efficiency. According to the RDC n° 17 (Brazil), for registering a new phytotherapeutic drug it is requested the submission of a technical report with information on its nature, including presentation of scientific studies that prove the safety of its use. *Plathymentia reticulata* Benth (Pr) belongs to the Leguminosae family, being a typical vegetation of the Brazilian interior ordinarily known as vinhatic. The stem bark is popularly used for treatment of inflammatory processes. Previous studies in our laboratories, with ethanolic extract of this plant showed: pharmacological activity (ability to prevent neuromuscular block induced by the *Bothrops jararacussu* poison), antimicrobial and anti-inflammatory activities.

2. OBJECTIVE

This study evaluated the safety of the hydroalcoholic extract effects of Pr during rats pregnancy.

3. METHODOLOGY

Previous studies of cytotoxicity were carried out for definition of the extract DL50. In the studies about pregnancy, the hydroalcoholic extract of the plant was daily administered to the pregnant rats, orally (0,5g/kg and 1g/kg), from the first to the eighteenth day, in the nineteenth day a cesarean was made, when the reproductive performance of the rats was observed. The following items were observed: in-term pregnancy; number of offspring per female; offspring weight at birth and physical development parameters.

4. RESULTS

4.1. EFFECTS OF THE ADMINISTRATION OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Plathymentia reticulata* Benth. IN THE WEIGHT GAIN OF PREGNANT RATS.

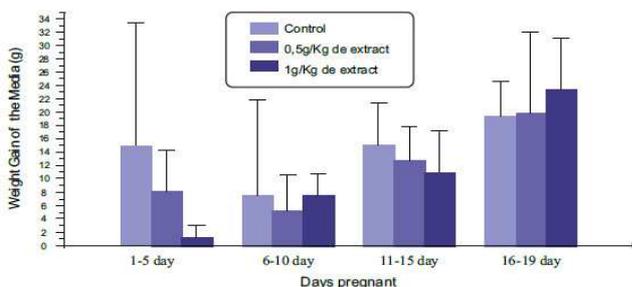


Figure 1 - Effects of *Plathymentia reticulata* Benth. on the pregnant rats weight (n: 05, $p < 0,05$, Teste de "F").

4.2. REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF PREGNANT RATS EXPOSED TO *Plathymentia reticulata* Benth.

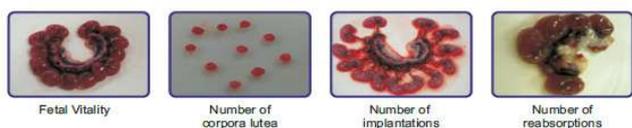


Table 1. Effects of *Plathymentia reticulata* Benth. on the reproductive performance of female rats. It presents the parameters used in teratogenicity tests * $p < 0,05$, em relação ao controle, teste One-Way ANOVA. (* $p < 0,05$ in relation to control sample, One-Way ANOVA Test)

| Teratogenicity Parameters | Control | 0,5g/Kg de extract da Pr. | 1g/Kg de extract da Pr. |
|----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|
| Pre-implantation loss (%) | 0 | 0 | 0 |
| Post-implantation loss (%) | 0 | 1,69 | 5,55 |
| Placenta weight (grams) | 0,494±0,07 (n=59) | 0,542±0,09* (n=58) | 0,530±0,07* (n=51) |
| Fetus weight (grams) | 1,336±0,25 (n=59) | 1,433±0,20* (n=58) | 1,456±0,15* (n=51) |
| Offspring vitality (%) | 100 | 98,30 | 94,44 |

4.3. EFFECTS OF *Plathymentia reticulata* Benth. ON THE OFFSPRING EXTERNAL MORPHOLOGIC PARAMETERS.

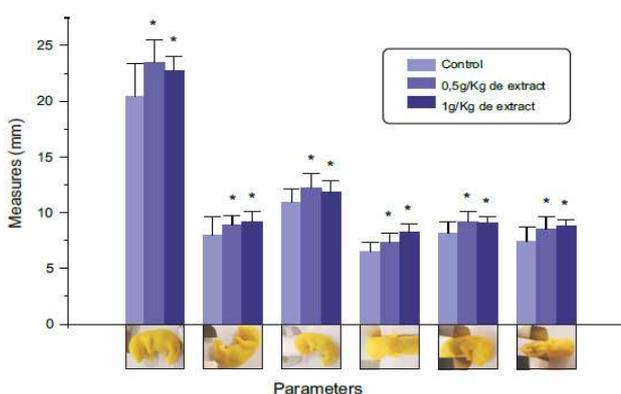


Figure 2 - Effects of *Plathymentia reticulata* Benth. (0,5 g/Kg e 1 g/Kg) on offspring external morphologic parameters. Here are presented the average and standard deviations (in cm) of the fetus measures (* $p < 0,05$ em relação ao controle, teste One-Way ANOVA.



Figure 3. Effects of the administration of hydroalcoholic extract of *Plathymentia reticulata* Benth. (0,5g/Kg and 1g/Kg), during rats pregnancy period, over morphological parameters of fetuses.

The administration of hydroalcoholic extract of *Plathymentia reticulata* Benth in de dosages of 0,5 g/Kg and 1g g/Kg during rats pregnancy period, has not promoted significant alterations in the eyes and ears implantation, nor syndactylia induction or cleft palate. It has not yet generated any alteration in the bones structure of the fetuses and no alterations were observed on the soft tissues and skull bones; ossification of the cartilage between the hip and femur and also the development of the fetuses skull bones, spine, scapula, pelvis, skull and jaw has not suffered any alteration.

5. CONCLUSION

Our studies indicate that, although the results show significant statistical difference in the reproductive performance evaluation of pregnant rats and in the morphological internal and external parameters of the fetuses as well, the exposure to the hydroalcoholic extract of *Plathymentia reticulata* Benth., in the dosages of 0,5 g/Kg and 1 g/Kg is safe during the rats pregnancy periods, because these results represent a small biological meaning.

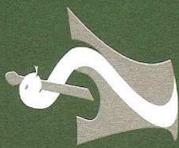
6. ACKNOWLEDGEMENT



To CAPES for the Master's Degree scholarship.

Project approved by the Committee of Ethics and Research of the Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) Protocol n° A11/CEP/2008

e-mail: liabl@itelefonica.com.br



CIFARP 2009
7th INTERNATIONAL CONGRESS
OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

**"Biodiversity in the technological
and health development"**



1st Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health



Faculdade de Ciências Farmacéuticas
de Ribeirão Preto - USP



Certificate

This is to certify that

LIA DE BARROS LEITE ALBUQUERQUE

attended the 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2009), held on
September 6 - 9, 2009, in the Convention Center of Ribeirão Preto, Brazil.

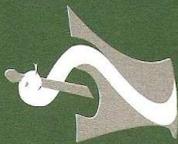
Ribeirão Preto, September 9, 2009.

A. Cim Spadaro

Augusto César C. Spadaro
DEAN - FCFRP - USP

Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Maria Vitória Lopes Badra Bentley
Organizing Committee



CIFARP 2009
7th INTERNATIONAL CONGRESS
OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

**"Biodiversity in the technological
and health development"**



1st Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health



Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto - USP



Certificate

This is to certify that

LIA DE BARROS LEITE ALBUQUERQUE

presented the PCSTER entitled: "STUDIES ON THE SAFETY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF
Plathymenia reticulata Benth. IN PREGNANT RATS"

ALBUQUERQUE, LBL; GERENUCCI, M; LOPES, PS; FRANCO, YO

during a Poster Session in the 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP
2009), held on September 6 - 9, 2009, in the Convention Center of Ribeirão Preto, Brazil.

Ribeirão Preto, September 9, 2009.

A. César Spadaro

Augusto César C. Spadaro
DEAN - FCFRP - USP

Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Maria Vitória Lopes Badra Bentley
Organizing Committee

ANEXO D: 12º EPIC – Encontro de Pesquisadores de Iniciação Científica – UNISO



ANEXO E: Publicação no Jornal Cruzeiro do Sul – Medicamentos fitoterápicos vs. segurança

ARTIGO - [29/09] Medicamentos Fitoterápicos vs. Segurança

Lia de Barros Leite Albuquerque

Notícia publicada na edição de 29/09/2009 do Jornal Cruzeiro do Sul, na página 2 do caderno A - o conteúdo da edição impressa na internet é atualizado diariamente após as 12h.

Há uma tendência em acreditar que tudo o que existe na natureza foi feito para satisfazer as necessidades humanas, não existindo riscos em seu consumo

A descoberta das propriedades curativas das plantas deu-se, no início, de forma meramente intuitiva, ou através de observação dos animais que, quando doentes, buscavam nas ervas a cura para suas afecções. A fitoterapia é o método de tratamento de enfermidades que emprega vegetais frescos, drogas vegetais ou, ainda, extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matérias-primas. No Brasil, 20% da população, consomem 63% dos medicamentos na forma industrializada, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas, uma fonte alternativa de medicação. O interesse da pesquisa nessa área tem aumentado nos últimos anos, quando estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Em todo o mundo houve um aumento expressivo no mercado dos medicamentos fitoterápicos, especialmente nos países industrializados. Em consequência do expressivo crescimento do mercado mundial, as maiores indústrias farmacêuticas multinacionais passaram a se interessar por esse mercado, até então formado predominantemente por pequenas empresas europeias e asiáticas. Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal, como a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas, mais baratas, sejam oferecidas. Por outro lado, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de reações colaterais graves ou o insucesso do tratamento, causando descrença na sua eficácia. Há uma tendência em acreditar que tudo o que existe na natureza foi feito para satisfazer as necessidades humanas, não existindo riscos em seu consumo. Assim, devemos nos assegurar quanto ao uso indiscriminado de produtos naturais, pois o mau uso pode ocasionar problemas como, por exemplo, alterações na pressão arterial, problemas no sistema nervoso central, fígado e rins, que podem levar a internações hospitalares e até mesmo à morte. É interessante observar alguns cuidados com fitoterápicos, tais como, buscar informações com os profissionais de saúde; informar ao seu médico sobre qualquer reação desagradável que aconteça enquanto estiver usando o produto e, se o está utilizando, principalmente antes de cirurgias; adquiri-lo apenas em farmácias e drogarias autorizadas pela Vigilância Sanitária; seguir as orientações da bula e rotulagem; observar a data de validade; seguir corretamente os cuidados de armazenamento; desconfiar de produtos que prometem curas milagrosas. Mulheres grávidas ou que estejam amamentando devem buscar orientação de profissionais da saúde antes de utilizar qualquer planta medicinal ou medicamento fitoterápico, já que existem estudos que podem garantir a segurança do uso nestas situações. Da mesma forma, antes de utilizar qualquer planta medicinal ou fitoterápica em crianças, deve-se buscar orientação de profissional de saúde. Crianças menores de dois anos não devem utilizar esses tipos de medicamentos, uma vez que não há estudos que possam garantir a segurança para essa faixa etária. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou recentemente novas normas para farmácias e drogarias (RDC44/09), aprovando que os medicamentos fitoterápicos sejam isentos de prescrição e que possam permanecer ao alcance dos usuários para obtenção por meio de autosserviço em farmácias e drogarias, porém, como qualquer medicamento, o mau uso pode ocasionar problemas de saúde, sendo imprescindível a orientação farmacêutica, pois este profissional é habilitado a orientar quanto ao uso de tal medicamento. Portanto, o correto é sempre procurar orientação farmacêutica para o uso adequado dos medicamentos prescritos, assim como para aqueles que são isentos de prescrição.

Lia de Barros Leite Albuquerque, farmacêutica formada pela Uniso e mestranda em Ciências Farmacêuticas na Uniso. Profa. Dra. Patricia Santos Lopes, coordenadora do curso de Farmácia e docente do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Uniso. (patricia.lopes@prof.uniso.br)

Esta matéria foi acessada 212 vez(es).