

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE
Himatanthus drasticus (APOCYNACEAE) EM RATAS EM GESTAÇÃO**

São Luis-MA
2012

Verônica Saraiva César

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE
Himatanthus drasticus (APOCYNACEAE) EM RATAS EM GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciência Animal como
requisito para obtenção do grau de mestre
em Ciência Animal

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Clara Gomes dos Santos

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rosane Maria Trindade de Medeiros

São Luis-MA

2012

Cesar, Verônica Saraiva.

Avaliação toxicológica do extrato bruto hidroalcoólico de *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) em ratas em gestação / Verônica Saraiva César.– São Luís, 2012.

62 f

Dissertação(Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Profa. Ana Clara Gomes dos Santos.

1.*Himatanthus drasticus*. 2.Fitoterapia. 3.Ratas prenhas. I.Título

CDU: 615.9:599.233

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *Himatanthus drasticus* (APOCYNACEAE) EM RATAS EM GESTAÇÃO

Verônica Saraiva César; Ana Clara Gomes dos Santos; Rosane Maria Trindade de Medeiros

RESUMO

A fitoterapia vem ganhando cada vez mais espaço no tratamento das doenças, tanto humanas como em animais, sendo muitas plantas utilizadas sem o conhecimento de sua verdadeira eficácia e causando eventuais agravos à saúde. O *Himatanthus drasticus* é empregada na medicina popular no combate da febre, inflamação, câncer, na cicatrização e vermifugação. Objetiva-se estudar os efeitos da administração do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA) de *H. drasticus* durante o período gestacional de ratas. Para o experimento foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas da linhagem Wistar, onde nas fêmeas do grupo tratado (GT) foram administrados 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus* via oral por *gavage* do 6º ao 19º dia de gestação e o grupo controle (GC) foi administrado água filtrada utilizando a mesma via e no mesmo período de gestação. O consumo total de água e ração, e o ganho de peso total das mães não apresentaram diferença significativa do GT com o GC. Não foi apresentado nenhum sinal de intoxicação materno durante a administração do EBHA. O peso relativo dos órgãos maternos também não apresentou diferença entre os grupos. Foi avaliado o peso da ninhada e comprimento dos fetos de cada grupo, onde o teste estatístico não mostrou diferença estatística significativa entre o GT e o GC. O desempenho reprodutivo das fêmeas dos GT não sofreu interferências com a administração do EBHA, assim como não apresentou nenhuma alteração histológica nos órgãos analisados. Quanto às análises ósseas, não foram encontradas alterações que caracterizassem malformações fetais.

Palavras-chaves: *Himatanthus drasticus*, fitoterapia, ratas prenhes

ASSESSMENT OF TOXICOLOGICAL CRUDE HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Himatanthus drasticus* (APOCYNACEAE) IN RATS IN PREGNANCY

Verônica Saraiva César; Ana Clara Gomes dos Santos; Rosane Maria Trindade de Medeiros

ABSTRACT

The herbal medicine is gaining more space in the treatment of diseases, both human and animals, many plants being used without knowledge of their true effectiveness and causing any health problems. The *Himatanthus drasticus* is used in folk medicine to combat fever, inflammation, cancer, healing and worming. This study focuses on the effects of administration of crude hydroalcoholic extract (EBHA) *H. drasticus* during pregnancy in rats. For the experiment were used rats (*Rattus norvegicus*), male and female Wistar, where females in the treated group (TG) were administered 250 mg/kg EBHA *H. drasticus* by oral gavage from the 6th to the 19th day of gestation and the control group (CG) was given filtered water using the same route and at the same gestation period. The total consumption of water and food, and total weight gain of mothers showed no significant difference in the TG with the CG. There has been presented no sign of toxicity during the administration of breast EBHA. The maternal organ weights did not differ between groups. We evaluated the litter weight and length of fetuses in each group, where the statistical test is not got no significant difference between TG and CG. The female reproductive performance of the TG suffered no interference with the administration of EBHA, and showed no histological changes in the organ analyzed. Concerning to bone, there were no changes that characterize fetal malformations.

Keywords: *Himatanthus drasticus*, phytotherapy, pregnant rats

VERÔNICA SARAIVA CÉSAR

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE
Himatanthus drasticus (APOCYNACEAE) EM RATAS EM GESTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado aprovada em ____ de março de 2012 pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Francisco Carneiro Lima – Doutor em Zootecnia (Produção Animal)
(Universidade Estadual do Maranhão)

Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra – Doutora em
Biologia Parasitária
(Universidade Estadual do Maranhão)

Profa. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos - Parasitologia Veterinária
(Universidade Estadual do Maranhão)

Dedico essa dissertação a minha mãe Cleonice, meu pai César, meus irmãos, Rodrigo e Hiolanda e aos meus sobrinhos Gustavo e Enzo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter sido o responsável por esta caminhada, me capacitando, me formando e dando coragem para seguir em frente.

À minha família por ter acreditado em mim.

À minha orientadora-amiga-mãe, Prof^a Ana Clara Gomes dos Santos que cuidou de mim no meio científico, mostrando que os caminhos não seriam fáceis, mas me incentivou a desbravá-los mesmo assim.

À prof^a Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra, por não ter me orientado na vida científica mesmo de longe, com seus conselhos simples e práticos, mas de resultados transformadores.

Aos meus professores do mestrado, por terem se colocado à disposição quando precisei.

À minha Co-orientadora, Prof^a Rosane Maria Trindade de Medeiros por ter me adotado como filha científica, me mostrando o caminho da toxicologia brilhantemente. Agradeço também a todas as pessoas que me acompanharam no meu experimento realizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus Patos, UFCG, os meus muito obrigada à Danilo, Micheline, Ana Priscila, Franci e Cibele.

À minha família paraibana, Gilcélia, Maciel, Heloísa, Seu Zé e dona Galega que me deram todo o suporte de família e amizade.

Ao meu amigo Leonardo Moreira de Oliveira que foi meu companheiro e meu socorro em todos os momentos do meu experimento em Patos. Muito obrigada meu amigo.

À prof^a Silvana Lima Górnjak pelo apoio no estágio realizado no VPT/UFMVZ/USP e também aos meus amigos do VPT em especial Luciana Lippi que tanto contribuiu com seus conselhos e ajudas no meu experimento.

Aos meus amigos de turma do Mestrado Ciência Animal, aprendi muito com todos eles, sua com

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Consumo médio de água (mL) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG.....

Tabela 2 - Consumo médio de ração (gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG.....

Tabela 3 - Ganho médio de peso (gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG.....

Tabela 4 - Peso relativo dos órgãos (gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 19° DG.....

Tabela 5 - Desempenho reprodutivo médio de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 19° DG.....

Tabela 6 - Exame esquelético dos fetos de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 19° DG.....

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Consumo de água (mL) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG. Com as médias e os respectivos desvio padrão. Teste t.
- Figura 2 - Consumo de ração (g) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG. Com as médias e os respectivos desvio padrão. Teste t.
- Figura 3 - Ganho de peso (g) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG. Com as médias e os respectivos desvio padrão. Teste t.
- Figura 4 - Consumo total de água (mL), consumo total de ração (g) e ganho de peso total (g) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG. Com as médias e os respectivos desvios padrão. Teste t.

LISTA DE SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EBHA	Extrato Bruto Hidroalcoólico
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
MA	Maranhão
EB	Extrato Bruto
EtOH	Etanol
H ₂ O	Água
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatográfico em Camada Delgada
v.o.	via oral
p.v.	peso vivo
DG	dia de gestação
PBS	Tampão fosfato salino
H.E.	Hematoxilina-Eosina
KOH	Hidróxido de potássio
dt	dias de tratamento
d	dia
PM	peso materno

PU	peso do útero
PM-U	peso materno, menos o peso do útero
PP	peso placentário por ninhada
PF	peso fetal por ninhada
CF	comprimento fetal por ninhada
NFv	número de fetos vivos por ninhada
SI	sítios de implantação por ninhada
Fv	porcentagem de fetos vivo por ninhada
Pré-I	perda pré-implantação por ninhada
Pós-I	perda pós-implantação por ninhada

SUMÁRIO

	página
1	INTRODUÇÃO..... 14
2	JUSTIFICATIVA..... 16
3	REVISÃO DE LITERATURA..... 17
3.1	Fitoquímica das plantas..... 21
3.1.1	Flavonóide..... 21
3.1.2	Taninos..... 22
3.1.3	Saponinas..... 23
3.1.4	Alcalóides..... 24
3.1.5	Fenóis..... 25
3.1.6	Triterpenos..... 26
3.2	Família Apocynaceae..... 27
3.3	<i>Himatanthus drasticus</i> 27
4.	OBJETIVOS..... 29
4.1	Geral..... 29
4.2	Específicos..... 29
5	MATERIAL E MÉTODOS..... 30
5.1	Local de execução da pesquisa..... 30
5.2	Coleta do vegetal e preparação do extrato botânico Hidroalcoólico (EBHA)..... 30
5.3	Análise fitoquímica..... 31
5.4	Criação e manutenção dos animais..... 32
5.5	Acasalamento..... 32
5.6	Protocolo experimental..... 33
5.7	Tratamento..... 33
5.8	Avaliação do ganho de peso, do consumo de ração e água das ratas..... 33
5.9	Cesariana..... 34
5.10	Histopatologia 34
5.11	Análise dos fetos no 20º dia de gestação: avaliação de

	malformações ósseas.....	35
5.12	Análise estatística.....	35
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.1	Fitoquímica.....	36
6.2	Avaliação da administração do EBHA de <i>H. drasticus</i> a ratas gestantes: estudo dos efeitos na mãe e feto durante o período pré-natal.....	37
6.2.1	Avaliação macroscópica e histológica dos órgãos maternos.....	37
6.2.2	Avaliação toxicológica materna.....	37
6.2.3	Consumo de água.....	38
6.2.4	Consumo de ração.....	39
6.2.5	Ganho de peso.....	40
6.2.6	Peso relativo dos órgãos.....	43
6.2.7	Desempenho reprodutivo.....	44
6.2.8	Análise óssea dos fetos.....	46
7.	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	Apêndice.....	62

1. INTRODUÇÃO

O emprego das plantas medicinais no tratamento de enfermidades tem sido registrado desde a antiguidade. No Egito antigo, relatos no Livro do Vivos descrevem sobre o uso das propriedades curativas de extratos vegetais, utilizados para o tratamento de enfermidades diversas (NEVES, 2001).

Até o início do século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e/ou extratos vegetais e esses recursos sofreram grandes alterações dos fármacos utilizados atualmente na medicina popular (SCHENKEL et al., 2002). Com o desenvolvimento da farmacologia, da química orgânica e da bioquímica, os medicamentos de origem sintética, aos poucos ocuparam o lugar das plantas medicinais. Apesar dessa constatação, nas últimas décadas, alguns fatores contribuíram para mudar esse cenário, dentre eles: os efeitos colaterais dos fármacos sintéticos (SIMÕES et al., 1998; CALIXTO, 2000).

A preocupação com os efeitos tóxicos de diferentes agentes sobre a reprodução, desenvolvimento embriofetal e o recém-nascido, além da especificidade das metodologias usadas para estudar tais efeitos determinaram o surgimento de uma nova ciência – a Toxicologia Reprodutiva - que passou a integrar os estudos complementares dos efeitos tóxicos de diversos agentes (FERNANDES, 2009).

Os estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva consistem em testes realizados em animais com o objetivo de verificar o potencial de um novo produto ou substância química em promover efeitos adversos sobre as etapas do processo reprodutivo: ciclo estral, fertilidade, acasalamento, desenvolvimento embriofetal, parto e desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade reprodutiva (ICH, 2001; PINTO, 2005). Testes envolvendo animais tratados durante estágios definidos da reprodução refletem com certa segurança os efeitos da exposição de produtos medicinais ao homem e permite uma maior identificação dos estágios do desenvolvimento reprodutivo sujeito a riscos.

Drogas vegetais têm sido utilizadas não somente como agentes terapêuticos, mas também com fins alimentícios (SULLIVAN; HAGEN, 2002), para a caça e para a guerra, (BISSET, 1989; PRANCE, 2005) bem como para rituais religiosos e abortivos (SCHULTES, 2001).

Apesar do aumento dos estudos com fitoterapia, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

O emprego de plantas medicinais com fins curativos é uma prática que se tem utilizado ao longo da história. A OMS (2000) reconhece que 80% da população mundial ainda recorre às plantas medicinais dentro do sistema de atenção primária da saúde.

Na família Apocynaceae as espécies do gênero *Himatanthus*, são encontradas exclusivamente no continente sul-americano, destacam-se tanto pelo seu difundido uso como planta medicinal quanto pela diversidade de compostos farmacologicamente ativos encontrados. O nome do gênero *Himatanthus* deriva de uma expressão grega que significa “manto-de-flor”, referindo-se às brácteas que envolvem os botões florais das espécies (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Himatanthus drasticus é uma Apocynaceae da subfamília Plumeriodeae, presente geograficamente no Brasil nos estados Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Pará e Roraima, a qual também é encontrada na Guiana Francesa, Suriname e Guiana (PLUMEL, 1991). No Maranhão o gênero *Himatanthus* é conhecido como janaúba; em outros estados recebe outras denominações como Pau-de-leite no Piauí, Joana-Guba no Rio Grande do Norte e Sucuúba na Amazônia (AMARO et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Na tentativa de resolver o problema de parasitas que acometem os animais domésticos e silvestres, têm-se utilizado intensivamente de maneira indiscriminado vários grupos de compostos químicos como medida de controle das parasitoses, contribuindo dessa forma para o aparecimento de populações resistentes. A fitoterapia é uma prática milenar que tem se mostrado bastante eficiente no trato de várias enfermidades veterinárias, dentre as quais citam as nematodioses gastrintestinais e representa uma alternativa ecologicamente viável, contribuindo inclusive para o aumento da lucratividade pecuária, uma vez que reduz o uso de anti-helmínticos convencionais, diminuindo a toxidez do animal e o impacto do meio ambiente.

Na literatura consultada não foram encontradas referências sobre avaliações do efeito toxicológico do vegetal *H. drasticus* na gestação, desse modo essa pesquisa vem a contribuir para a avaliação do risco reprodutivo, considerando-se que o uso indiscriminado do vegetal pelos criadores de pequenos ruminantes, como controle de verminose tem sido utilizado nos municípios do Estado do Maranhão.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A fitoterapia tem sido considerada um método de cura ideal pois estudos científicos comprovam sua eficácia, estando ela ao alcance de toda a população devido ao baixo custo, além de promoverem menores efeitos colaterais. No Brasil existe um grande número de plantas com propriedades terapêuticas, porém poucas espécies já foram cientificamente estudadas (CARVALHO et al., 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), indica que nas últimas décadas é notório a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas (WHO, 2001). Observando esta tendência, seguimentos da indústria farmacêutica passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos em escala industrial com o objetivo de explorar um possível mercado em elevada expansão.

Na África, estima-se que, 80% da população dependem do uso de produtos oriundos de plantas medicinais, os quais representam terapias alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (ASCHWANDEN, 2001). Na Alemanha em 1997, as plantas medicinais eram utilizadas para tratar resfriados (66%), gripe (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), insônia (25%), úlcera estomacal (36%), nervosismo (21%), bronquite (15%), doenças de pele (15%), fadiga e exaustão (12%). Nesse mesmo país, foi verificado que a automedicação com preparações à base de plantas medicinais era muito comum (CALIXTO, 2000).

O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de US\$ 43 bilhões anuais. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões anuais, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano (ASCHWANDEN, 2001). Na Alemanha no ano de 1997, se consumia metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa (cerca de US\$ 3,5 bilhões do total de US\$ 7 bilhões, ou US\$ 42,90 *per capita*) (CALIXTO, 2000).

No Brasil as estatísticas indicam que os laboratórios privados crescem a uma taxa de aproximadamente 20% ao ano, com relação a sua capacidade produtiva de fitoterápicos (BRASIL, 2001).

O Brasil participa expressivamente do mercado internacional de plantas medicinais. Segundo dados da Carteira de Comércio Exterior, o Brasil exportou no ano de

1984 um valor estimado de US\$ 20 milhões em produtos naturais obtidos de plantas. A exploração de recursos medicinais no Brasil, no entanto, está relacionada, em grande parte, à coleta extensiva e extrativa de material silvestre. Apesar da exportação de várias espécies medicinais na forma bruta ou de seus subprodutos, poucas espécies atingiram o ponto para cultivo. O fato é mais marcante quando consideramos as espécies nativas, cujas pesquisas básicas são ainda incipientes, não existindo o cultivo em grande escala (NEVES, 2001).

Os fitoterápicos ainda sofrem restrição quanto ao uso e aceitação por parte da população, devido ao reduzido número de estudos que comprovam sua ação biológica e segurança quanto a efeitos tóxicos agudos, crônicos ou sobre a reprodução (SHARAPIN, 1999; SONAGLIO, 1987). Os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia de tais medicamentos (LAPA, 1999).

Ao pesquisar a possibilidade de uma droga ou um composto químico causar uma malformação (efeito teratogênico), três princípios importantes devem ser considerados: A) períodos críticos do desenvolvimento – o período mais crítico é o período da organogênese, quando a divisão e a diferenciação celular e a morfogênese estão em seu ponto máximo; B) dosagem da droga ou composto químico – pesquisas em animais mostram uma relação dose-resposta para os teratogênicos, indicando que quanto maior a exposição durante a gestação, mais grave é o efeito fenotípico e C) o genótipo do embrião – numerosos exemplos em animais experimentais e vários casos suspeitos em seres humanos demonstram existir diferenças genéticas na resposta a um teratogênio, indicando que o genótipo do embrião determina se um agente teratogênico perturbará seu desenvolvimento (PERSAUD, 2004).

Os efeitos adversos para o desenvolvimento podem resultar da exposição a um agente tóxico antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou no período de maturação sexual (U.S. EPA., 1996). Durante o período de gestação, a exposição materna a um agente tóxico pode levar à respostas diversas e seu efeito final variar desde a morte até o nascimento de um indivíduo normal (LEMONICA, 2008).

O desenvolvimento embrionário é muito sensível a diversos tipos de substâncias químicas, especialmente durante o período da organogênese. Quantidades

elevadas de agentes oxidantes podem provocar a exaustão dos mecanismos anti-oxidativos, e provocar danos fetais. Dependendo da extensão dos danos fetais, é possível verificar suas manifestações no período pós-natal através de quadros de malformação (ORNOY, 2007).

De acordo com Chahoud et al (1999), as anormalidades estruturais podem ser variações ou malformações. O termo variação é usado para indicar uma divergência no desenvolvimento estrutural usual, podendo não afetar adversamente a saúde ou a sobrevivência. A malformação é usualmente definida como mudança estrutural permanente que afeta adversamente a sobrevivência e o desenvolvimento das espécies sob investigação. Os agentes capazes de causar malformações são considerados teratogênicos, ao passo que agentes causadores de variações são considerados embriotóxicos (MANSON ; KANG, 1989).

Além das ações antiulcerogênica e antiinflamatória (SOUZA-FORMIGONI, 1991; JORGE, 2004) estudos recentes, realizados com ratas prenhes, apontaram o efeito colateral abortivo da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), planta medicinal de comprovada baixa toxicidade (OLIVEIRA et al., 1991). Porém, extratos hidroalcoólicos dessa planta mostraram-se abortivos por atuarem no período de pré-implantação dos embriões no útero (MONTANARI, 2002).

Almeida et al (2000), relataram os efeitos tóxicos do boldo ou falso boldo (*Coleus barbatus*). Ocorreu redução no número de implantes, comprovando suas propriedades abortivas. No mesmo estudo também foi avaliada a existência de possível efeito teratogênico, contudo notou-se apenas redução no número de pontos de ossificação óssea, ou seja, nenhum efeito foi verificado com relação a malformações externas ou viscerais.

Recentemente observa-se o crescimento do número de trabalhos que exploram as possíveis propriedades teratogênicas de plantas. Substâncias capazes de aumentar o índice de perdas embrionárias, ou causar aborto, comumente podem induzir malformações fetais (KALTER, 2003). Maruo et al (2003) descreveram que o fruto da planta *Solanum lycocarpum* possui a capacidade de induzir aumento de alterações nas esternébras e aumento de hemorragia nos bulbos olfatórios dos animais.

Estudos realizados com o extrato hidroalcoólico da planta *Lantana câmara* demonstraram que esta planta foi capaz de aumentar a frequência de retardo na ossificação de fetos (MELLO et al., 2005).

Nana et al (2008) verificaram que o extrato das folhas da planta *Acanthus montanus* foi capaz de induzir redução no tamanho das caldas, redução do massa fetal e retardo de ossificação fetal. Fenda palatina foi o principal sinal de malformação fetal encontrados experimentalmente por Medeiros et al (2008) quando administraram as sementes da planta *Mimosa tenuiflora*.

A Portaria nº 116 da ANVISA, propôs um roteiro para os estudos toxicidade e eficácia de fitoterápicos, mas apenas em março de 2004, sob forma de Resolução nº 90, foi publicado o “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos”. Este guia contém os parâmetros para realização de toxicologia pré-clínica e os testes complementares fazem parte desse roteiro (BRASIL, 1996; BRASIL, 2004).

Estão descritos como Complementares os seguintes testes:

- Determinação de efeitos adversos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo causados por drogas administradas durante a gametogênese e fecundação (uma espécie de mamífero).
- Determinação de efeitos adversos sobre fetos durante a vida intra e extra uterina, por drogas administradas durante a gestação (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 (uma espécie de mamíferos).

3.1 Fitoquímica das Plantas

3.1.1 Flavonóides

Os flavonóides são compostos naturais, derivados da benzo-gama-pirona, apresentando a estrutura química C6-C3-C6. Ocorrem no estado livre ou, mais comumente, como O-glicosídeos, embora exista um número considerável de C-glicosídeos. São conhecidos mais de 2000 flavonóides, sendo o maior grupo de

compostos fenólicos naturais encontrados na natureza e, por isso, são usados como compostos marcadores quimiossistemáticos. Apesar do termo “flavonoide” derivar do latim *flavus*, que significa amarelo, observa-se que os grupos flavonóis e flavonas são incolores e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (LOPES et al., 2000)

Terapeuticamente sua função não está ainda claramente esclarecida. O grupo é conhecido pelos seus efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos e vasoprotetores (tratamento de trombozes). Rutina e hesperidina são importantes flavonóides empregados em tratamentos de fragilidade capilar (LOPES et al., 2000).

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON ; DWYER, 1998).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6. O esqueleto C15 dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6). Portanto, flavonóides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (YOKOZAWA et al., 1997), podendo haver facilmente interconversão entre eles .

A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é explicada pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (KOES et al., 1994).

Os efeitos antiinflamatório e analgésico, do extrato aquoso de *Baccharis trimera*, sendo considerados, o flavonóide rutina e uma mistura de saponinas, os principais componentes ativos na prevenção da biossíntese de prostaglandinas via cicloxigenase, produzindo uma inibição de edema semelhante à inibição promovida pelos antiinflamatórios não esteroidais (GENÉ et al., 1996), assim como Torres et al (2000), mostraram a ação do flavonóides eupatorina e um diterpeno como responsáveis pelo bloqueio das contrações da musculatura lisa da veia porta de ratos, efeito que

correlaciona a vasodilatação e a melhora na circulação sanguínea referida na medicina popular.

3.1.2 Taninos

Os taninos são componentes polifenólicos distribuídos em plantas, alimentos e bebidas (MAKKAR ; BECKER, 1998; SANTOS et al., 1997).

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas (HARTISH ; KOLODZIEJ, 1997), gelatinas e alcalóides (MELLO ; SANTOS, 2001).

De acordo com Zucker (1983), os taninos encontram-se distribuídos em plantas superiores, ocorrendo aproximadamente em 30% das famílias das plantas aromáticas e medicinais. Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas em geral, através da complexação entre taninos e proteínas, que é à base de algumas de suas propriedades biológicas, tais como controle de insetos, fungos e bactérias (AERTS et al., 1999).

Os taninos são usados tradicionalmente contra moléstias do tipo diarreia, hipertensão, reumatismo, hemorragias e em processos inflamatórios, possuem atividades comprovadas tais como: bactericida, fungicida, antiviral, moluscicida e antitumoral (SIMÕES et al., 2004).

Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, em concentrações mínimas (0,5 g/L), dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (CASTRO et al., 1999).

Estudos realizados por Pansera et al (2003) analisando os taninos totais de plantas medicinais, foram encontrados para *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba* teores de tanino de 0,01 e 18,90%, respectivamente.

Pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos (SCALBERT, 1991), como agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática (CHUNG et al., 1998). Estes últimos efeitos, sem

dúvida, dependem da dose e do tipo de tanino ingerido. A ingestão de chá verde e de dietas ricas em frutas que contêm taninos tem sido associada com atividade anticarcinogênica (CHUNG et al., 1998). Além disso, podem agir como antiinflamatórios e cicatrizantes (MELLO ; SANTOS, 2001), e como inibidores da transcriptase reversa em HIV (KILKUSKIE et al., 1992).

3.1.3 Saponinas

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes (SCHENKEL et al., 2007).

O primeiro composto pertencente ao grupo dos saponósidos foi designado por saponina, por ter isolado da *Saponaria officinalis* L., planta conhecida popularmente como “saboeira” e utilizada para uso doméstico. Quimicamente as saponinas são heterósidos de genina esteróide ou triterpênica que tem como característica comum a propriedade de reduzirem a tensão superficial da água, o que explica sua ação detergente, emulsificante, de formação de espuma persistente e a sua elevada toxicidade para os peixes. Muitos dos saponósidos têm propriedades hemolíticas ao desorganizarem a membrana dos glóbulos vermelhos do sangue. Outra característica é o poder de complexar com esteróides, o que pode explicar a ação antifúngica e hipocolesterolmiante (CUNHA ; ROQUE, 2005).

As saponinas estão presentes em pelo menos 400 espécies de plantas pertencentes a 60 famílias diferentes e em alguns animais, dentre eles o pepino do mar (WINA et al., 2005). São substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, relacionados com o sistema de defesa. São encontradas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos (WINA et al., 2005).

As saponinas têm ação antimicrobiana, prevenindo o crescimento de fungos, podendo ser consideradas uma parte do sistema da defesa das plantas e indicadas como “fitoprotetoras” (PIZARRO, 1999). Possuem ação antifúngica e o mecanismo principal

sugerido para esta atividade é a interação com os esteróis da membrana (ALVARES, 2006). Possuem a capacidade de estimular a resposta inflamatória. Em estudos tem sido relatado com sucesso o uso de saponinas como adjuvantes em vacinas contra leishmaniose canina e murina (NICO, 2006; SANTOS, 2007).

As saponinas têm grande atividade como surfactantes, ou seja, diminuem a tensão superficial. Esta propriedade parece ser importante na absorção dos nutrientes pela mucosa intestinal (FRANCIS et al., 2002).

As saponinas naturais e sintéticas inibem a absorção de colesterol no intestino e reduzem a concentração do colesterol do plasma em animais de laboratório e são utilizadas por seu potencial farmacológico no tratamento da hipercolesterolemia (HARWOOD Jr et al., 1993).

Em estudo realizado por Santiago et al. (2005), avaliaram a atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra maculoba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*, mostrando as saponinas como possíveis agentes larvicidas naturais.

3.1.4 Alcalóides

Os alcalóides possuem atividades biológicas, tais como: antiinflamatória, antioxidante (SHAHEEN et al., 2005).

Os alcalóides podem ser definidos como sendo bases nitrogenadas orgânicas encontradas principalmente em plantas, porém em menor extensão em animais e microorganismo. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, sendo tipicamente classificado como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que confere o caráter básico dos alcalóides, facilitando seu isolamento e purificação. O grau de basicidade varia extensamente, dependendo da estrutura do alcalóide e da presença e localização de outros grupos funcionais (DEWICK, 2002).

Os alcalóides apresentam sempre ação farmacológica ou tóxica quando administrado em animais (HENRIQUES et al., 1999).

No estudo fitoquímico da *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson foi isolado e identificado três alcalóides indólicos denominados uleína, epiuleína, ioimbina e uma substância caracterizada como sendo a sacarose (SOUZA, 2008).

3.1.5 Fenóis

Os compostos fenólicos de vegetais enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK ; SHAHIDI, 2004). Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

Os vegetais superiores sintetizam e acumulam uma grande diversidade de compostos fenólicos, cujo papel no metabolismo da planta não está inteiramente elucidado (JULKUNEN-TIITTO, 1985).

Os fenóis vegetais são numerosos e variados, estando representados em quase todas as classes de metabólitos secundários (SMITH, 1976). Na classificação de Waterman; Mole (1994) são descritos fenóis simples (com um único anel aromático), metabólitos mais complexos baseados no esqueleto C₆C₃, metabólitos com o esqueleto carbônico C₆C₀-2C₆, metabólitos com o esqueleto C₆C₃C₆, quinonas, benzofenonas e substâncias afins, alcalóides, terpenos e, finalmente, fenóis mascarados.

3.1.6 Triterpenos

Os triterpenos são divididos em várias famílias com estruturas de base diferentes. Lupeol, betulina, ácido betulínico e calenduladiol são triterpenos pertencentes à família lupano. Tanto quanto suas atividades biológicas estão em causa, os triterpenos pentacíclicos incluindo lupeol são um grupo promissoras de metabólitos secundários de plantas (LASZCZYK, 2009).

Os triterpenos apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais destacam-se: cardioprotetora (SUDHAHAR et al., 2007), gastroprotetora (PERTINO et al., 2007), antiinflamatória (MEDEIROS et al., 2007), antitumoral (BRAGA et al., 2007), leishmanicida (DELGADO-MENDEZ et al., 2008) e anti-hiperglicêmica (SATO et al., 2007).

O látex de várias espécies do gênero *Himatanthus* incluindo *H. drasticus* é rico em triterpenos. Estes são moléculas formada por 36 átomos de carbono unidades isoprenóides, com cinco átomos de carbono cada (PATOČKA, 2003).

Já foram identificados nas cascas do caule de *H. sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, o triterpeno lupeol e os ésteres triterpênicos cinamato de lupeol, acetato de lupeol, beta-fenilpropionato de lupeol, cinamato de alfa-amirina e cinamato de beta-amirina (SILVA et al., 1998; WOOD et al., 2001; SOUZA et al., 2006).

3.2 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae possui cerca de 400 gêneros e 3700 espécies, no Brasil ocorrem 95 gêneros e 850 espécies (SOUZA ; LORENZI, 2005). É uma família vastamente disseminada em regiões tropicais e subtropicais e com poucos gêneros atingindo as regiões temperadas.

Muitas espécies da família têm grande importância econômica, como fornecedoras de madeira ou até na alimentação e algumas são utilizadas com finalidades medicinais (JUDD, 2009).

A família Apocynaceae é caracterizada por espécies que apresentam em sua constituição química, inúmeros compostos terapeuticamente importantes, entre eles glicosídeos cardiotônicos e alcalóides indólicos (BARATTO, 2010), essa família pode ser considerada uma das mais importantes fontes de vegetais de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna. Os gêneros mais importantes dessa família são *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancornia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Wrightia*, *Plumeria*, *Himatanthus* e *Rauvolfia* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

3.3 *Himatanthus drasticus*

O vegetal *Himatanthus drasticus* é uma Apocynaceae da subfamília Plumeriodeae, presente geograficamente no Brasil nos estados Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Pará e Roraima, a qual também é encontrada na Guiana Francesa, Suriname e Guiana (PLUMEL, 1991). No Maranhão o gênero *Himatanthus* é conhecido como janaúba, em outros estados como Pau-de-leite no Piauí, Joana-Guba no Rio Grande do Norte e Sucuúba na Amazônia (AMARO et al., 2006).

Lorenzi ; Matos (2002), Modesto (1997) e Plumel (1991), destacam que a janaúba é uma espécie arbórea que pode atingir sete metros de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos, folhas obovais, subcoriáceas, brilhantes, glabras, verde escuro, com ápice arredondado a obtuso e pecíolos curtos. Possui flores brancas, aromáticas, fruto tipo folículo, em forma de chifre, medindo entre 15 e 20 cm de comprimento por 2,5cm de largura e sementes com alas concêntricas.

A janaúba é uma planta que produz látex, um tipo de suco leitoso, de cor branca, obtido do tronco e galhos. É comercializado nas regiões de ocorrência desta planta inclusive na região do Cariri. O látex, assim como a casca, é usado na medicina

popular no tratamento de tumores, verminoses, gastrites, artrites e também contra o câncer (COLARES et al., 2008a). A proteína de látex de *H. drasticus* não tem nenhum efeito citotóxico *in vitro* ou caráter hemolítico, mas tem efeitos antitumorais *in vivo* (MOUSINHO et al., 2008).

Há poucas citações na literatura descrevendo a constituição química e as propriedades biológicas das espécies de *Himatanthus* (BARRETO et al., 1998, RATTMAN et al., 2005). O gênero destaca-se principalmente pela presença de alcalóides, iridoides e ésteres triterpenos, isolados principalmente das cascas do caule, mas também presentes em menor quantidade no látex, nas folhas e nas raízes.

Com o aumento da procura por fitoterápicos na prevenção ou tratamento de doenças, a segurança desses produtos necessita ser estudada, inclusive quanto à toxicologia do desenvolvimento. Dada à utilização da planta na medicina popular tanto para humanos quanto para animais e a escassez de estudos realizados *in vivo* para avaliar a ocorrência de efeitos embriotóxico ao se administrar o extrato de *H. drasticus* em ratas Wistar durante a prenhez.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Estudar os efeitos toxicológicos do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) de *H. drasticus* durante o período gestacional em ratas (*Rattus norvegicus*).

4.2 Específicos

- Verificar o efeito embriotóxico da administração do EBHA de *H. drasticus*.
- Avaliar alterações macroscópicas no esqueleto de fetos em ratas tratadas com EBHA de *H. drasticus*.
- Avaliar a ação toxicológica do EBHA de *H. drasticus*, através do estudo histopatológico no coração, fígado, baço e rins.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de execução da pesquisa

O experimento foi desenvolvido no Biotério do Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos/ Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) - Paraíba, no laboratório Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), no período de março de 2010 a fevereiro de 2012.

5.2 Coleta do vegetal e preparação do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA)

A coleta de *H. drasticus* foi realizada nas áreas florestais do município de Caxias, MA. localizado nas coordenadas (latitude 4°51'32" S e longitude 43°21'22" O), altitude de 66m, em um ecossistema típico de cerrado, na mesorregião Leste Maranhense (IBGE, 2008). As folhas, sementes, frutos e casca do vegetal foram acondicionados em sacos de papel, enviadas aos laboratórios de Nutrição (UEMA), de Botânica e de Produtos Naturais (UFMA), para identificação e processamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA) e triagem fitoquímica.

A identificação e classificação botânica do vegetal *H. drasticus* foi realizada através de chaves analíticas, comparações com as descrições e ilustrações da literatura específica, segundo a classificação padronizada por Spina, (2004) e Lorenzi, (1992), utilizando-se folhas, flores, frutos e sementes, sendo realizada no Laboratório de Botânica, Herbário Ático Seabra (UFMA), onde se encontra catalogada e depositada em exsicata sob o registro nº 01032.

As cascas foram desidratadas à sombra em temperatura ambiente (27°C), acondicionadas em sacos de papel, para desidratação em estufa com triagem de ar úmido, à temperatura de 45°C por um período de 48 horas. A moagem foi realizada em

moinho elétrico de facas, obtendo-se a matéria-prima (pó), que foi pesada e acondicionada em sacos de papel, mantido em temperatura ambiente em local seco.

Os ensaios fitoquímicos foram realizados no laboratório de Produtos Naturais (UFMA). O EBHA de *H. drasticus* (Janaúba) foi preparado segundo a metodologia proposta por Moreira, (1979) e modificada por Nakashima, (1993).

A partir do vegetal moído, desidratado e pesado (3 kg) foi realizado o preparo do extrato bruto (EB). O material foi colocado sob maceração a frio por um período de 96h em uma mistura hidroalcoólica de EtOH:H₂O (7:3), e submetido a agitação mecânica esporádica. O macerado após filtração foi concentrado em evaporador rotativo de Southesher, determinando-se o peso seco, obtendo-se o EBHA-Janaúba. Em seguida separou-se uma alíquota para ser concentrada em rotavapor para redução do volume, obtendo-se assim maior concentração do extrato.

A triagem fitoquímica do vegetal da espécie *H. drasticus* foi realizada através das determinações do resíduo seco e rendimento, e principais grupamentos químicos, de acordo com metodologia descrita por Matos (1999).

5.3 Análise fitoquímica

A extração do macerado foi realizada mediante quatro trocas sucessivas a cada 24 horas com renovação do solvente, até a exaustão da extração, por um período de 96h. A somatória dos filtrados foi concentrada em evaporador rotativo de Southesher e em seguida determinou-se o peso seco, obtendo-se assim o EBHA-Janaúba, no qual foi filtrado em funil de vidro com papel de filtro, separando-se uma alíquota e, transferido a um balão apropriado para ser concentrado em rotavapor até que seu volume fosse reduzido a aproximadamente um terço do original na concentração do extrato para diminuir a interferência deste no processo de particionamento.

A abordagem fitoquímica foi realizada por meio da triagem fitoquímica com o vegetal *H. drasticus* que foi realizada as determinações do resíduo seco e rendimento, principais grupamentos químicos, perfil cromatográfico do EBHA-Janaúba e dos subextratos, que foi utilizado eluentes no fracionamento aplicado em ordem crescente de

polaridade em Coluna Cromatográfica (CC) de subextrato Acetato de Etila e o perfil Cromatográfico em Camada Delgada (CCD) das frações do Subextrato Acetato de Etila, de acordo com metodologia descrita por Matos (1999).

5.4 Criação e manutenção dos animais

Os ensaios foram realizados em ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com idade média de dois meses, no biotério/UFCG. Antes da realização dos experimentos para melhor adaptação, os animais foram mantidos por um período de 10 dias em caixas plásticas padrão com cama de maravalha, onde foram acompanhados diariamente, mantidos a uma temperatura média de $\pm 23^{\circ}\text{C}$. A base da dieta era ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (UEMA), sob o registro nº 31/2010.

5.5 Acasalamento

As ratas foram submetidas ao acasalamento “over night”, na proporção de duas fêmeas para um macho. Na manhã seguinte ao acasalamento foram realizados lavados vaginais para a verificação da presença de espermatozoides. O esfregaço foi realizado com auxílio de uma micropipeta. A abertura vaginal foi lavada superficialmente com 50 μL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, e posteriormente foi avaliado à fresco em microscopia ótica (200x). As fêmeas que apresentaram espermatozoides no lavado vaginal foram selecionadas para o acompanhamento da possível gestação e este dia foi designado como o primeiro pós-fertilização de acordo com técnicas preconizadas por Kato et al (1979) e Gleiche ; Frohberg (1977).

5.6 Protocolo experimental

Foram utilizadas 24 ratas albinas linhagem heterogênica Wistar, peso médio de 200 g e idade média de dois meses. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com 12 animais cada e submetidos à administração dos tratamentos por gavagem.

As ratas foram distribuídas em dois grupos tratados. No grupo tratado com EBHA, as ratas receberam 250 mg/Kg/p.c. do extrato do 6º ao 19º dia de gestação (DG). O grupo controle, as ratas receberam 0,5 mL/dia de água filtrada do 6º ao 19º DG.

5.7 Tratamento

Para observação dos efeitos tóxicos nas fêmeas foi utilizado o critério clínico descrito por Manson; Kang (1994), que consiste em observações diárias das ratas, visando à constatação dos sinais de toxicidade, contemplando os seguintes itens: estresse, hipoatividade, respiração acelerada, irritação, tremores musculares, hipotonia, prostração, piloereção, paralisia posterior, cromodaciorrêia, convulsões, respiração abdominal, epistaxis, vocalização, salivação, lacrimejamento, diarreia, resposta a estímulo exterior e perda de pêlo. Qualquer manifestação anormal e diferente das contidas no protocolo foi registrada adicionalmente.

5.8 Avaliação do consumo de água, ração e ganho de peso das ratas

As ratas foram pesadas no 1º dia de gestação e a cada dois dias durante o período de tratamento. O peso dos animais foi mensurado, bem como o consumo de ração e água.

5.9 Cesariana

No 20º dia de gestação (DG), os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico e realizando-se a laparotomia. Durante o procedimento cirúrgico, o útero e os ovários de cada fêmea foram expostos, mantendo-se a posição original (direito e esquerdo). O número de fetos vivos e mortos, de sítios de implantação, de reabsorções e corpos lúteos gravídicos foi registrado. Após a abertura do útero, os fetos foram extraídos de cada vez, mensurados no sentido crânio-caudal e uma análise visual macroscópica para verificar malformações. Foram considerados fetos vivos aqueles que apresentaram movimentos das patas após estímulos mecânicos e sinais respiratórios.

As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação, foram calculadas por meio da seguinte proporção:

$$\% \text{ perda pré-implantação} = (\text{CL-IM}) \times 100/\text{CL}$$

$$\% \text{ perda pós-implantação} = (\text{IM-FV}) \times 100/\text{IM}$$

onde:

CL = número de corpos lúteos

IM = número de implantações

FV = número de fetos vivos

5.10 Histologia

Após a cesariana foi realizada a retirada dos órgãos: útero, fígado, baço, rins e placentas, que foram coletados e pesados em balança analítica de precisão, em seguida acondicionados em coletor universal de plásticos, individualizados, identificados e fixados em formalina neutra tamponada a 10% PBS 0,01M (pH 7,2) por 48 horas.

Os fragmentos foram submetidos à clivagem, sendo em seguida processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 3-4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.) realizados no Laboratório de Histopatologia (UFMG) seguindo-se os métodos de Carlton; McGavin, (1998) e Luna (1968). A análise histopatológica foi realizada para verificação de alterações nos tecidos, após administração do EBHA-janauba.

5.11 Análises dos fetos no 20º dia de gestação: avaliação de malformações ósseas

A análise óssea os fetos de cada fêmea foram colocados em acetona, permanecendo nesta solução por 12 horas. Em seguida, o palato de cada animal foi examinado e eviscerado, iniciando-se assim o processo de diafanização em Hidróxido de Potássio (KOH), corados em Alizarina e Hidróxido de Potássio (KOH a 4%), por cinco dias, sendo realizadas trocas diárias, conforme o método proposto por Staples ; Schenell, (1964). Após, foram lavados em água destilada, repassados para uma solução de etanol, glicerol e álcool benzílico (2:2:1), onde foram mantidos por 24 horas. Terminado o processo de coloração, os fetos foram colocados em glicerina pura para posterior análise segundo Taylor (1986).

5.12 Análise estatística

Para a análise das porcentagens, utilizou-se o teste Teste Exato de Fisher. Em todos os casos as diferenças sendo considerados significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos estatístico foram realizados por meio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Fitoquímica

A análise fitoquímica da casca do vegetal *H. drasticus* evidenciou a presença de diversos grupos de metabólitos secundários de interesse farmacológico como, flavonóides, taninos, saponinas, alcalóides, esteróides e triterpenos.

Colares et al (2008) isolaram e identificaram através de um extrato etanólico da casca do caule de *H. drasticus*, o triterpeno lupeol cinamato, que é provavelmente uma substância com potencial para a atividade antitumoral. O látex coletado a partir de sua casca do caule é usado para vários fins, incluindo propriedades antiinflamatórias e presentes entre os seus componentes bioativos do triterpeno lupeol pentacíclicos (LUCETTI et al., 2010).

O princípio ativo de *H. sucuuba* também foi isolado (um iridóide fulvoplumerim) e este também mostrou atividade contra o carcinoma epidermóide da nasofaringe de humano (PERDUE; BLOMSTER, 1978).

O látex de várias espécies do gênero *Himatanthus* incluindo *H. drasticus* é rico em triterpenos, estes são moléculas formada por trinta e seis átomos de carbono unidades isoprenóides (com cinco átomos de carbono cada) (PATOČKA, 2003). Os triterpenos são divididos em várias famílias com estruturas de base diferentes. Lupeol, betulina, ácido betulínico e calenduladiol são triterpenos pertencentes à família lupano.

O Lupeol é um constituinte importante da espécies *H. drasticus* e talvez esteja estreitamente relacionado com a sua ação antiinflamatória. Além de triterpenos pentacíclicos, *H. sucuuba* é outra espécie descrita que tem em sua composição os iridoides e alcalóides (SILVA et al., 1998).

6.2 Avaliação da administração do EBHA de *H. drasticus* em ratas gestantes: Estudo dos efeitos na mãe e feto durante o período pré-natal

6.2.1 Avaliação macroscópica e histológica dos órgãos maternos

Nos órgãos das ratas do grupo controle e do grupo tratado com EBHA-Janaúba analisados histologicamente, nenhuma alteração foi detectada, semelhante ao estudo em ratos, utilizando o suco do noni (*Morinda citrifolia* Linn) que não induziu toxicidade hepática (WANG et al., 2002). No entanto, foi evidenciada a toxicidade para células renais e hepáticas maternas em ratas prenhes tratadas com extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera*, administradas na concentração de 8,4 mg/kg (GRANCE, 2007).

Quanto à presença de fenda palatina, todos os fetos do grupo controle e tratado foram avaliados, onde não foi encontrado presença de fenda palatina. Sabe-se que o ácido acetilsalicílico é capaz de induzir alterações significativas no esqueleto assim como provocar malformações externas como fenda labial, fenda palatina, espinha bífida em ratos (COOK et al., 2003).

Provavelmente, que a dose de 250 mg/kg de EBHA-janaúba, administrada do 6º ao 19º dia de gestação das ratas, não foi suficiente para causar toxicidade nos órgão avaliados, onde também não ocasionou alterações anatômicas externas como, polidactilia, ausência de cauda ou qualquer outra malformação e/ou variação, resultados semelhantes também encontrados por Pinto (2005) em estudos com a beta-ionona.

6.2.2 Avaliação toxicológica materna

Toxicidade sistêmica pode ser diagnosticada pela diminuição da massa corporal dos animais, diminuição do desenvolvimento ponderal, do consumo de água e ração, pelo aparecimento de alterações comportamentais como apatia, prostração, pelos arrepiados, além de alterações na massa relativa dos órgãos (MELLO, 2001).

As fêmeas gestantes testada com o EBHA-janaúba, não apresentaram alterações comportamentais, sinais de toxicidade perceptível por critérios clínicos, não determinando qualquer alteração nas variáveis relacionadas com toxicidade sistêmica, resultados semelhantes aos obtidos por Castro et al (2005) em estudos com o extrato de *Ginkgo biloba* e por Pinto et al. (2007) utilizando *Piper methysticum*, onde não encontraram nenhum efeito tóxico materno do extrato quando administrados durante a gestação em ratas.

A toxicidade materna foi percebida através da administração de 1000 mg/kg beta-ionona também pelo aparecimento de sinais de toxicidade, tais como piloereção, vocalização e cromodaciorréia, observados durante a gestação (PINTO, 2005).

6.2.3 Consumo de água

O consumo de água avaliado do 6º ao 18º dia de gestação (DG) de fêmeas tratadas com o EBHA de *H. drasticus* observou-se uma discreta diminuição no consumo de água do grupo EBHA no início do tratamento comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1 e Figura 1).

O Consumo de água, não apresentou qualquer diferença significativa quando utilizado *G. biloba* em ratas prenhes (CASTRO et al., 2005) e *P. methysticum* (PINTO et al., 2007).

Tabela 1 – Consumo médio de água (mL) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6º ao 18º DG

Grupos	Tratamento em dias na gestação (dt)					
	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18
	X ±DP	X ±DP	X ±DP	X ±DP	X ±DP	X ±DP
Controle (n=12)	78,33±23,77	77,08±23,20	95,00±47,19	80,42±16,85	89,58±18,64	87,08±17,64
EBHA (n=12)	50,00±23,16*	56,25±19,32	89,17±35,73	101,7±44,48	105,8±33,36	105,5±36,15

tratamento; EBHA: Extrato Bruto Hidroalcoólico; * $p < 0,05$ versus grupo controle (Teste t)

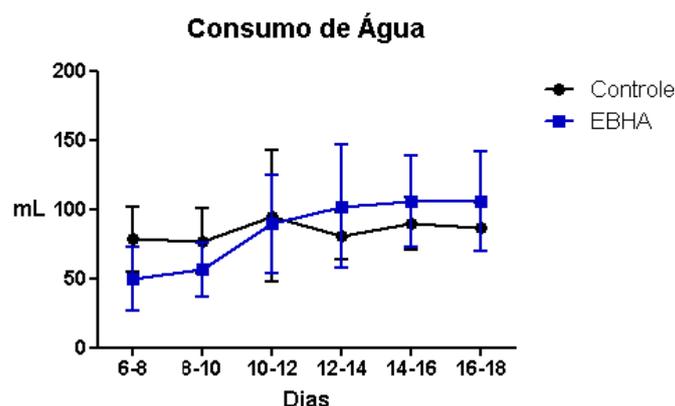


Figura 1 - Consumo de água (mL) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6º ao 18º DG. Com as médias e os respectivos desvio padrão. Teste t.

6.2.4 Consumo de ração

Quanto ao consumo de ração foi verificada diminuição no consumo do sexto ao décimo dia ($p < 0,05$), enquanto o grupo controle apresentou diminuição somente na última mensuração (16-18d). (Tabela 2 e Figura 2).

Em estudos com beta-ionona indicaram que na dose de 1000 mg/kg de peso corpóreo/dia, causou discreta toxicidade materna, evidenciada tanto pela redução do ganho de peso das mães durante o período de tratamento, como pelo surgimento de alterações clínicas comportamentais. Entre os dias de seis e 11 de gestação, o ganho de peso das ratas com a maior dose de beta-ionona foi cerca de três vezes menor que aquele observado no grupo controle. Porém o estudo constatou que ao término a recuperação das fêmeas do grupo de 1000mg/kg de peso corpóreo/dia e, ao final da gestação, não houve mais diferença estatística entre o peso médio das ratas tratadas com beta-ionona e o grupo controle (PINTO, 2005).

Não houve alteração no consumo de ração quando utilizado o extrato de *G. biloba* em ratas prenhes (CASTRO et al., 2005) e *P. methysticum* (PINTO et al., 2007).

Tabela 2 - Consumo médio de ração (gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6º ao 18º DG

Grupos	Consumo de ração em dias (dt)					
	6-8 X ±DP	8-10 X ±DP	10-12 X ±DP	12-14 X ±DP	14-16 X ±DP	16-18 X ±DP
Controle (n=12)	54,33±18,03	47,58±7,751	52,75±17,25	47,92±14,68	45,63±4,168	40,21±7,165***
EBHA (n=12)	36,96±13,49*	28,21±15,55**	47,21±16,81	53,17±15,03	59,38±14,41	58,17±10,89

(dt) dias de tratamento; EBHA: Extrato Bruto Hidroalcoólico; * $p < 0,05$ versus grupo controle (Teste t)

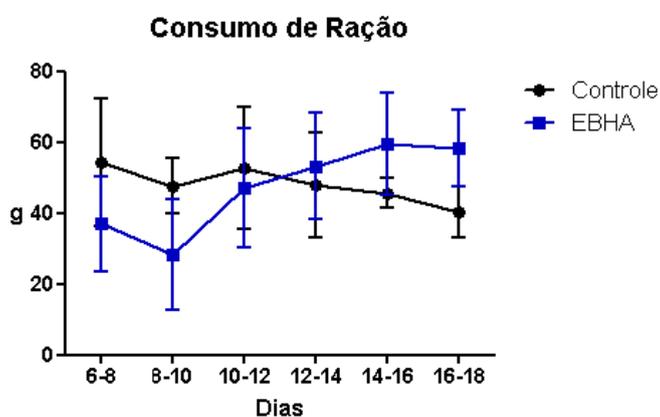


Figura 2 - Consumo de ração (g) de ratas prenhas tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6º ao 18º DG. Com as médias e os respectivos desvio padrão. Teste t .

6.2.5 Ganho de peso

O ganho de peso avaliado do 6º ao 18º DG de fêmeas tratadas ou não com o EBHA do 6º ao 18º DG. No início do tratamento o grupo EBHA-janaúba apresentou uma diminuição significativa no ganho de peso comparado ao grupo controle, onde este, durante a sua penúltima mensuração (14-16d) apresentou uma diminuição no ganho de peso quando comparado com os animais do grupo EBHA-janaúba ($p < 0,05$) (Tabela 3 e Figura 3).

Em estudos, utilizando *H. sucuuba* na dose de 40 mg/kg, administrados a ratas Wistar do sexto ao décimo quinto dia, que compreende o período da organogênese, Guerra ; Peters (1991) não observaram alterações significativa no ganho de peso materno, portanto, não apresentou efeito tóxico às ratas na dose empregada.

Tabela 3 - Ganho médio de peso (gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG

Grupos	Ganho de peso em dias (dt)					
	6-8 X ±DP	8-10 X ±DP	10-12 X ±DP	12-14 X ±DP	14-16 X ±DP	16-18 X ±DP
Controle (n=12)	7,417± 6,03	6,750± 4,28	8,167±7,12	10,75±7,21	14,00±5,76*	11,25±5,51
EBHA (n=12)	-7,083± 13,57 **	3,750±7,55	8,750±15,79	14,75±7,20	20,42±6,15	17,42±8,03

tratamento; EBHA: Extrato Bruto Hidroalcoólico; * p< 0,05 versus grupo controle (Teste t).

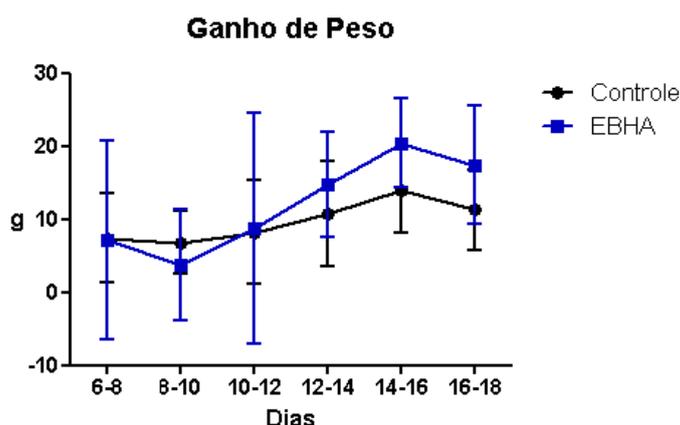


Figura 3 - Ganho de peso (g) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 18° DG. Com as médias e os respectivos desvio padrão. Teste t.

A figura 4 ilustra os resultados do consumo total de água, consumo total de ração e ganho de peso total, avaliado do 6º ao 18º dia de gestação (DG) de ratas tratadas ou não com o EBHA-janaúba. O teste *t* mostrou que não houve diferença significativa entre os animais do grupo controle e grupo EBHA-janaúba nos parâmetros acima citados.

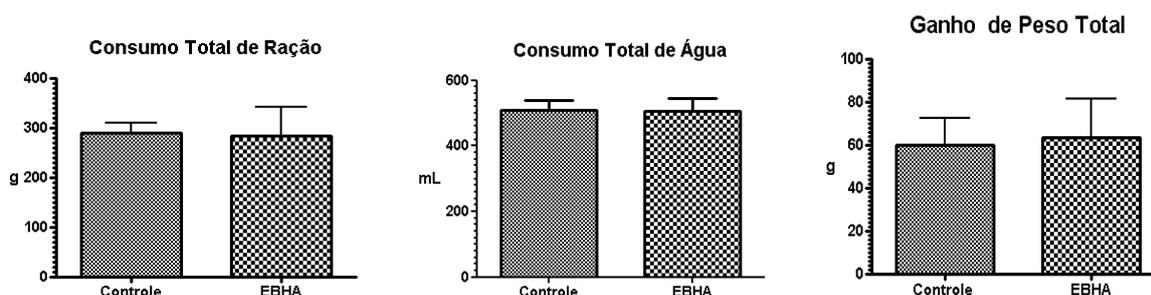


Figura 4 - Consumo total de água (mL), consumo total de ração (g) e ganho de peso total (g) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA de *H. drasticus*, por gavagem, do 6º ao 18º DG. Com as médias e os respectivos desvios padrão. Teste *t*.

6.2.6 Peso relativo dos órgãos

Quanto ao peso relativo do fígado, rins, coração e baço das fêmeas gestantes tratadas com o extrato EBHA-janaúba, durante o período de gestação, não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Tabela 4) ($p < 0,05$), também não foi observada nenhuma alteração macroscópica e microscópica nesses órgãos. Em estudos realizados por Castro et al (2005), utilizando o vegetal *G. biloba*, não apresentou alterações morfológicas nos órgãos internos, cuja massa relativa também não diferiu do controle. Resultados semelhantes também foram encontrados por Pinto et al. (2007) com o *P. methysticum*.

Embora tenha ocorrido redução do peso relativo de órgãos como: os rins, baço e fígado em animais expostos a beta-ionona, esta alteração não se mostrou dose-relacionada. Uma única exceção foi a redução do peso relativo do coração, que ocorreu a partir do nível de dose de 500mg beta-ionona/kg de peso corpóreo (PINTO, 2005).

Tabela 4 - Peso relativo dos órgãos (gramas) de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 19° DG

Grupos	Peso dos órgãos (g) após tratamento				
	Fígado X ±DP	Rim direito X ±DP	Rim esquerdo X ±DP	Coração X ±DP	Baço X ±DP
Controle (n=12)	15,10±1,67	1,15±0,08	1,07±0,11	0,91±0,09	0,73±0,28
EBHA (n=12)	15,90±0,75	1,17±0,07	1,06±0,03	0,96±0,062	0,68±0,09

(g) gramas; EBHA: Extrato Bruto Hidroalcoólico

6.2.7 Desempenho reprodutivo

As taxas reprodutivas proporcionam em conjunto um excelente indicador da interferência de diferentes substâncias químicas sobre a reprodução, podendo inclusive identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos ocorreram.

A tabela 5 ilustra os resultados obtidos do estudo do desempenho reprodutivo médio entre os grupos tratados ou não com o extrato EBHA do 6° ao 19° DG. A análise de variância mostrou não haver diferença significativa entre a comparação entre os grupos e os parâmetros observados ($P > 0,05$).

Em estudos com o *G. biloba*, constataram a não diminuição do número e massa corporal de filhotes normais, onde não diferiram significativamente das fêmeas usada no grupo controle (CASTRO et al., 2005).

A beta-ionona na dose de 1000 mg/kg, afetou adversamente o desenvolvimento embriofetal de ratos, causando embriofetalidade, evidenciada pelo aumento de perdas pré- e/ou peri-implantação e pelo discreto aumento na proporção de reabsorções por implantações, observações essas realizadas por Pinto (2005).

O peso fetal do grupo tratado com a EBHA-janaúba, não mostrou diferença estatística significativa com os fetos do grupo controle, não havendo portanto ação embriotóxica, assim como os animais tratados com beta-ionona (PINTO, 2005).

Guerra; Peters (1991), estudando *H. sucuuba* não observaram efeito embriotóxico, assim como não teve diferença estatística no número de reabsorções e nem no número de fetos vivos e mortos com os animais do grupo controle. Não foram identificadas malformações, demonstrando que o extrato de *H. sucuuba* não causa prejuízos no desenvolvimento fetal.

Em estudos com *P. methysticum* foram testadas as doses de 5; 35 e 50 mg/kg, do sexto ao décimo quinto dia de gestação, onde o extrato se mostrou seguro até a dose de 35 mg/kg, não sendo portanto, observados diferenças estatísticas significativas quanto as reabsorções embrionárias, peso dos fetos, número de fetos por ninhada e alterações macroscópicas externas (PINTO et al., 2007).

O índice placentário e o peso das placentas dos animais de ambos os tratamentos com extrato hidroetanólico de *B. trimera* diferiram estatisticamente do grupo controle (GRANCE, 2007).

Tabela 5 - Desempenho reprodutivo médio de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 19° DG

Parâmetros	CONTROLE (n=12) ^a	EBHA (n=12) ^a
	X ±DP (LI - LS)	X ±DP (LI - LS)
PM	290,4±25,61	310,8±20,43
PU	48,00±10,75	53,67±8,24
PM-U	242,4±20,20	257,2±21,52
NFv	10,42±2,99	10,92±1,73
PP	0,51±0,16	0,45±0,047
PF	2,49±0,43	2,48±0,50
CF	2,89±0,37	3,17±0,35

SI	87,92 (43-100)	95,08 (78-100)
Fv	10,42 (4-14)	10,92 (7-13)
Pré-I	11,92 (0-57)	4,583 (0-21)
Pós-I	11,42 (0-43)	6,00 (0-41)

^a número de animais; EBHA: Extrato Bruto Hidroalcoólico; PM= peso materno no 20ºDG (g); PU= peso do útero (g); PM-U= peso materno – peso do útero (g); PP= peso placentário por ninhada (g); PF= peso fetal por ninhada (g); CF= comprimento fetal por ninhada (cm); NFv= número de fetos vivos por ninhada; SI= sítios de implantação por ninhada (%); Fv= porcentagem de fetos vivo por ninhada (%); Pré-I= perda pré-implantação por ninhada (%); Pós-I= perda pós-implantação por ninhada (%)

6.2.8 Análise óssea dos fetos

As anomalias esqueléticas evidenciadas podem ser classificadas como variações e não malformações, pois são transitórias e não adversas à sobrevivência (CHAHOUUD et al., 1999).

As alterações esqueléticas podem ser consideradas variações do normal, retardos do desenvolvimento do esqueleto e malformações. As variações individuais consistem na ausência dos centros de ossificação esperados no momento da cesariana. Os retardos do desenvolvimento ósseo estão relacionados com a ausência dos centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma e/ou tamanho claramente sugestivo de um estágio precoce de desenvolvimento. Incluem-se nesta classificação as ossificações incompletas dos ossos do crânio e fontanelas aumentadas. Já as malformações do esqueleto estão relacionadas com a ausência parcial ou total de ossos importantes, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias, fusões, fendas (PINTO et al., 2007).

Em nosso estudo não foi evidenciado diferenças estatísticas dos fetos do grupo tratado com EBHA-Janaúba comparados aos fetos do grupo controle, considerando-se o aparecimento de variações. Em relação às malformações encontradas em ambos os

grupos analisados, mostraram um número baixo do aparecimento de costelas onduladas e esternóbrios assimétricos (Tabela 6), isso indica que há uma tendência ao aparecimento espontâneo dessas alterações na linhagem de ratos utilizada neste estudo. É importante ressaltar, que o significado desses achados tem pouca relevância em termos de um possível efeito embriotóxico ou teratogênico da dose utilizada no experimento. As variações, que por vezes são alterações geralmente reversíveis, ocorrem com frequência alta em grupos controles e tratados, e são caracterizadas por não apresentarem riscos à vida e por envolverem alterações estruturais de menor significado funcional, variações essas que também foram encontradas em estudos realizados por Pinto (2005) com beta-ionona nas doses de 125; 250; 500 mg/kg onde apresentaram as mesmas variações encontradas em nosso estudo.

No entanto, não se pode caracterizar um efeito teratogênico de uma substância simplesmente pelo aparecimento de malformações menores, mais sim pelo grau de comprometimento na saúde do animal, por sua incidência elevada e malformações grosseiras.

Em estudos com *B. trimera* (8,4 mg/kg) em ratas durante a gestação mostrou que o fitoterápico causava efeito tóxico materno e nos fetos, causando também o aparecimento anormal na forma do esternóbrio e na ossificação, não sendo recomendado o seu uso durante o período gestacional (GRANCE, 2007).

Pinto et al (2007) e Marques (2009) evidenciaram o aparecimento de variações esqueléticas fetais, como costelas extras na vértebras cervicais, esterno desalinhado e a não ossificação das esternébras, contudo não foram anormalidades que apresentaram diferenças significativas comparando com os animais dos grupos controles, demonstrando que tais aparecimentos de variações fetais, não foram influenciadas pelo extrato.

Tabela 6 – Exame esquelético dos fetos de ratas prenhes tratadas com 0,0; 250 mg/kg do EBHA da *H. drasticus*, por gavagem, do 6° ao 19° DG

	CONTROLE	EBHA
Malformações Esqueléticas por feto (%)	0 (125) ^a 0%	0 (131) ^a 0%
Malformações Esqueléticas por ninhada (%)	0 (12) ^b 0%	0 (12) ^b 0%
Variações esqueléticas por feto (%)	3 (125) ^{aC} 2,4%	2 (131) ^{aC} 1,52%
Variações esqueléticas por ninhada (%)	2 (12) ^{bC} 16,5%	2 (12) ^{bC} 16,5%
Costela ondulada por feto (%)	1 (125) ^{aC} 0,8%	3 (131) ^{aC} 2,29%
Esternébrio assimétrico por feto (%)	3 (125) ^{aC} 2,4%	2 (131) ^{aC} 1,52%

^a número de fetos analisados por grupo; ^b número de ninhadas avaliadas; o número de fetos acometidos está representado fora do parênteses. Letras maiúsculas iguais: sem diferença estatística ($p > 0,05$). Teste Exato de Fisher .

7. Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que o extrato hidroalcoólico de *Himatantus drasticus* na dose de 250 mg/kg não foi tóxico para ratas prenhes, pelo não aparecimento de sinais clínicos de toxicidade durante o período do tratamento.

A administração do extrato de janaúba em ratas durante a gestação não causa efeito embriotóxico em fetos, confirmados em análise observatória macroscópica, assim como embriofetividade e malformações ósseas fetais.

Na avaliação histológica dos órgãos vitais maternos, como: fígado, rim, coração e baço não há alteração em células teciduais que caracterizassem toxicidade pelo extrato de *Himatantus drasticus*.

REFERÊNCIAS

AMARO, M.S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARAES, R.; TEOFILO, E.M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. – Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p. 63-71, 2006.

AERTS, T.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environmet.** v. 75, p. 1-12, 1999.

ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA, I.P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.

ALVARES, A.A.A. Influência da adição de extrato de *Yucca schidigera* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais. 2006. 47p. **Dissertação** (Mestre em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bull. W.H.O.**, Geneva, v.79, n.7, p.691-692, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin>> Acesso em: 20 dez 2011

BARATTO, L.C. Estudo Químico-analítico e Morfoanatômico de Espécies Medicinais Brasileiras da Família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) WOODSON e *Rauvolfia sellowii* MÜLL. ARG. 2010. 157 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.

BARRETO, A.S.; CARVALHO, M.G.; NERY, I.D.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 9: 430-434, 1998.

BISSET, N.G. Arrow and dart poisons. **Journal of Ethnopharmacology**, v.25, n.1, p.1-41, 1989.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTASS, C.R.; CAPELLA, M.A.M. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. **Cancer Letters**, v.248, n.1, p.147-152, 2007.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. **Proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (anexos I e II)**. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasil, DF, 12 ago. 1996. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determinar a publicação do "**GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS**". Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>> Acesso em: 14 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de políticas de saúde. **Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. 1 ed. Brasília – DF: Ministério da Saúde, 2001.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, 2000.

CARVALHO, G.D.; SOUZA, E.D.; SOUZA, L.A. Perfil de famílias interioranas que fazem uso de plantas medicinais. **PUBVET**, v.2, n.12, 2008.

CASTRO, A.P.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33, n.3, p.265-269, 2005.

CASTRO, H.G.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A.; CECON, P.R. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* DC.), em diferentes épocas de colheita em Viçosa MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.1, n.29, 1999.

CHAHOUD, I.;BUSCHMANN, J.; CLARK, R.; DRUGA, A.; FALKE, H.; FAQI, A.; HANSEN, E.; HEINRICH-HIRSCH, B.; HELLWIG, J.; LINGK,W.; PARKINSON, M.; PAUMGARTTEN, F. J.R.; PFEIL, R.; PLATZEK, T.; SCIALLI, A. R.; SEED, J.; STAHLMANN, R.; ULBRICH,

B.; XIANDONG, W.; YASUDA, M.; YOUNES, M.; SOLECKI, R. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. **Reproductive Toxicology**, v.13, n.1, p.77-82, 1999.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M.G. Are tannins a double-edged sword in biology and health. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v.9, n.4, p.168-175, 1998.

COLARES, A.V.; CORDEIRO, L.N.; COSTA, J.G.M.; SILVEIRA, E.R.; CAMPOS, A.R.; CARDOSO, A.H. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Pharmacognosy Magazine**, v.4, n.14, p.73-77, 2008.

COLARES, A.V.; CORDEIRO, L.N.; COSTA, J.G.M. da; CARDOSO, A.H.; CAMPOS, A.R. Efeito gastroprotetor do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Infarma** v.20, n. 11/12, 2008a.

COOK, J.C.; JACOBSON, C.F.; GAO, F.; TASSINARI, M.S.; HURTT, M.E.; DESESSO, J.M. Analysis of the nonsteroidal anti-inflammatory drug literature for potential developmental toxicity in rats and rabbits. Birth Defects part. B. **Reproductive Toxicology**, v.68, p.5-26. 2003.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. **Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardioprotetores, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos**. In: CUNHA, A.P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 432-482.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.16, n.3, p.1425-1430, 2008.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products**. A Biosynthetic Approach. England: John Wiley & Sons LTD, v.1. 2002. p. 515.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.. **Gentianales medicinais**. In: DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP, 2002. p. 375-385.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, p. 587-605, 2002.

GENÉ, R.M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, p.232-235, 1996.

GLEICHE, J.; FROHBERG, H. **An introduction to research techniques**. In: Neubert, D. Ed. Methods in prenatal toxicology, Massachusetts, PSG Publishing Co, 1977. p. 94-102.

GRANCE, S.R.M. Efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* em ratas prenhes e seus conceptos. 2007. 79f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himathanthus sucuuba* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**. v.34, p.195-199, 1991.

HARWOOD Jr, H.J.; CHANDLER, C.E.; PELLARIN, L.D.; BANGERTER, F.W.; WILKINS, R.W.; LONG, C.A.; COSGROVE, P.G.; MALINOW, M.R.; MARZETTA, C.A.; PETTINI, J.L.; SAVOY, Y.E.; MAYNE, J.T. Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin P-tigogen in cel lobioside. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 377-395, 1993.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **The Journal of Natural Products**. v.59, n.2, p.205-15, 1996.

HARTISH, C.; KOLODZIEJ, H. Galloylhamameloses and proantocyanidins from *Hamamelis virginiana*. **Phytochemistry**. v. 42, n.1, p. 191-198, 1997.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades e Aspectos básicos. In: Claudia Maria Oliveira Simões; Eloir Paulo Schenkel; Grace Gossman; João Carlos Palazzo de Mello; Lilian Auler Mentz; Pedro Ros Petrocick.

Farmacognosia, da Planta ao Medicamento. 1 ed. Porto Alegre/Florianopolis: Editora da UFSC/Editora da Universidade-UFRGS, 1999. p. 641-656.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais.** Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Caxias_\(Maranh%C3%A3o\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Caxias_(Maranh%C3%A3o))>. Acesso em: 10 jun. 2011.

ICH. **Detection of toxicity to reproduction for medicinal products.** Guideline for Industry ICH – S5A, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>> Acesso em: 23 jan. 2012.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation antinociceptive, antiinflammatory and antiucerogetic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.93-100, 2004.

JUDD, W.S. **Sistemática vegetal: um enfoque Filogenético.** 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2009, p.632.

JULKUNEN-TIITO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p.213-217, 1985.

KALTER, D. Teratology in the 20th century Environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicology and Teratology**, v.25, p.131-282, 2003.

KATO, H.; MORISHIGE, W.K.; ROTCHILD, I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteus activity in pregnant rats. **Endocrinology**, v.105, p.846-50, 1979.

KILKUSKIE, R.E.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BODNER, A.; CHENG, Y.; LEE, K. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.2, n.12, p.1529-1534, 1992.

KOES, R.E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J.N.M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **Bioessays**, v.16, n.12, p.123-132, 1994.

LAPA, A.J. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões C.M.O. (Ed). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999 p.181-196.

LASZCZYK, M.N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medicinal**, 75:1549-1560, 2009.

LEMONICA, I.P. **Toxicologia da Reprodução**. In: OGA, S. et al. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Editora Atheneu, 3ªed., 2008. p. 101-113.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 17, p. 18-22, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarun, 2002, p. 427.

LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P.; BANDEIRA, M.A.M.; VERAS, H.N.H.; SILVA, A.H.; LEAL, L.K.A.M.; LOPES, A.A.; ALVES, V.C.C.; SILVA, G.S.; BRITO, G. A.; VIANA, G.B. Anti-inflammatory effects and posible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v.7, n.60, p. 1-11, 2010.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Do tannins in leaves of trees and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity? **Agroforest Systems**, v.40, p. 59-68, 1998.

MANSON, J.M.; KANG, Y.J. **Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology**. In: Hayes AW, editor. Principles and methods of toxicology. 3ª ed. New York: Raven Press; 1994. p.989-1034.

MARUO, V.M.; SOARES, M.R.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Embryotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits consumption during preimplantation and organogenesis in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p.627–631, 2003.

MEDEIROS, R.M.T.; FIGUEIREDO, A.P.M.; BENÍCIO, T.M.A.; DANTAS, F.P.M.; RIET-CORREA, F. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. **Toxicon**, v. 51, p. 316–319, 2008.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C. W.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v.559, n.2-3, p. 227-235, 2007.

MELLO, F.B. Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. 2001. 120f. Porto Alegre, RS. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P. Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MELLO, F.B.; JACOBUS, D.; CARVALHO, K.; MELLO, J.R.B. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. **Toxicol**, v.45, p. 459 - 466, 2005.

MODESTO, M.M.L.S. Aspectos ecológicos e sócio-econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. Janaguba da Chapada do Araripe. 1997. 55f. **Monografia** (Especialização em Botânica) - Universidade Regional do Cariri, Crato, 1997.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v.65, p. 171-175, 2002.

MOUSINHO, K.C.; OLIVEIRA, C.C.; BEZERRA, D.P.; FERREIRA, J.R.O.; MAGALHÃES, H.I.F.; RAMOS, M.V.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.C.; MORAES, M.O. Estudo da atividade antitumoral do *Himatanthus drasticus* em camundongos com sarcoma 180. III Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE Fortaleza-Ceará, Brazil, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NANA, P.; ASONGALEM, E.A.; FOYET, H.S.; FOLEFOC, G.N.; DIMO, T.; KAMTCHOUING, P. Maternal and developmental toxicity evaluation of *Acanthus montanus* leaves extract administered orally to Wistar pregnant rats during organogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 228–233, 2008.

NEVES, M.C.M. **Plantas medicinais: diagnóstico e gestão**. Brasília: IBAMA, v.35, 2001, p.52.

NICO, D. Análise da estrutura-função das saponinas purificadas QS21 de *Quillaja saponaria* Molina e CP05 de *Calliandra pulcherrima* Benth e dos seus potenciais adjuvantes na vacina FML contra a leishmaniose visceral murina. 2006. 125f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia “Prof. Paulo de Góes”, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V.P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, p.29–41, 1991.

OMS – Organización Mundial de la Salud, Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios. **Reseña Mundial**, 2000, 52 p.

ORNOY, A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. **Reproductive Toxicology**, v.24, p.31–41, 2007.

PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINE, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Japanese journal of applied physics**, v.1, p.7-12, 2003.

PERDUE, G.P.; BLOMSTER, R.N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.67, n.9, p.1322-1323, 1978.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**. v.111, n.3, p.553-559, 2007.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

PINTO, F.C.M. Estudo da Embriotoxicidade da Beta-ionona em Ratos. 2005. 81f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2005.

PINTO, V.M.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Avaliação Toxicológica de Preparação Fitoterápica Contendo *Piper methysticum* Forst Piperaceae (Kava Kava®) Sobre o Desenvolvimento Pré-Natal em Ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, n.6, p.818-24, 2007.

PIZARRO, A.P.B.; FILHO, A.M.O.; PARENTE, J.P.; MELO, M.T.V.; SANTOS, C.E.; LIMA, P.R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 23-29, 1999.

PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae) revisión taxonomique: bradea. **Boletim do Herbarium Bradeanu**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 1-20, 1991.

PRANCE, S.G.T., **Ethnobotany and Ethnomedicine of the Amazonian Indians**. In: Handbook of medicinal plants, Food Products Press: Haworth Medical Press: New York, 2005; 139-153.

RATTMAN, Y.D.; TERLUK, M.R.; SOUZA, W.M.; SANTOS, C.A.; BIAVATTI, M.W.; TORRES, L.B.; MESIA-VELA, S.; RIECK, L.; da SILVA-SANTOS, J.E.; MARQUES, M.C. Effects of alkaloids of *Himatnthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.268-275, 2005.

SANTIAGO, G.M.P.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y.B.M.;ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.3, p.187-190, 2005.

SANTOS, F.N. Imunoterapia contra a leishmaniose visceral experimental canina com a vacina Leishmune® enriquecida de saponina. 2007. 97f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia "Prof. Paulo de Góes", Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SATO, H.; GENET, C.; STREHLE, A.; THOMAS, C.; LOBSTEIN, A.; WAGNER, A.; MIOSKOWSKI, C.; AUWERX, J.; SALADIN, R. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5

agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.362, n.4, p.793-798, 2007.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, 30, 3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 711-740.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UESC. 2002, p. 301-330.

SCHULTES, R.E.; HOFMANN, A.; RÈATSCH, C., **Plants of the gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers**. Rev. and Expanded ed.; Healing Arts Press: Rochester, Vt., 2001, p. 208.

SHAHEEN, F.; AHMAD, M.; KHAN, M.T.; JALIL, S.; EJAZ, A.; SULTANKHODJAEV, M.N.; ARFAN, M.; CHOUDHARY, M.I.; ATTA-UR-RAHMAN. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities, **Phytochemistry**. v.66, p.935-940, 2005.

SHARAPIN, N. **Medicinal plants: pharmacopoeial prescriptions**. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 1999. n.71, p.295-298.

SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; PINHEIRO, M.L.B.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C.M.; BOLZANI, V.D. Ésters triterpênicos de *Himatanthus succuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**. v.21, p.702-704, 1998.

SIMÕES, C.M.O., MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1998, p.173

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRG/UFCS, 2004, p.1104.

SMITH, P.M. **The chemotaxonomy of plants**. Edward Arnold, Bristol, 313p 1976.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. vol.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, n.1-3, p.1-15. 1996.

SONAGLIO, D. Padronização do extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyroclines saturcordes* (LAM) D. C. Compositae (Marcela). 1987. 163f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Farmacêutica) - Curso de Pós-graduação em Ciência Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.O.; OLIVEIRA, M.G.M; MONTEIRO, M.G.; SILVEIRAFILHO, N.G.; BRAZ, S.; CARLINI, E.A.; J. Plantas Medicinais: cura segura? **Ethnopharmacology**, v.34, p.21, 1991.

SOUZA, M.S.; CORDEIRO, M.S.; ROSAS, E.C.; HENRIQUES, M.G.O.M.; SIANI, A.C. Inhibition of nitric oxide and interferon- γ production by iridoids and triterpenes from the roots do *Himatanthus sucuuba*. **Pharmacognosy Magazine**, v.2, p. 216-219, 2006.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira I, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, W.M. Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, APOCYNACEAE – (Agoniada). 2008. 152f. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

STAPLES, R.E., SCHENELL, V.L., Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for Fetal Bone, **Stain Technology**, v.39, p.61-63, 1964.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P.T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Pharmacology**. v.46, n.6, p.412-418, 2007.

SULLIVAN, R.J.; HAGEN, E.H., Psychotropic substance-seeking: evolutionary pathology or adaptation? **Addiction**, v.97, n.4, p.389-400, 2002.

TAYLOR, P. **Skeletal examination**. In: Practical Teratology, Great Britain, c.10, 1986.

WANG, M.; WEST, B.J.; JENSEN, C.J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A. K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, 2002.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Blackwell Scientific Publications**, 1994, p. 92-123.

WHO - **Organización Mundial de La Salud. Situación regulamentaria de los medicamentos**: uma reseña mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, p. 62, 2001.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.53, p.8093-8105, 2005.

WOOD, C.A.; LEE, K.;VAISBERG, A.J.; KINGSTON, D.G.; NETO, C.C.; HAMMOND, G.B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.1477-1478, 2001.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W; SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research**, v.11, p.446-450, 1997.

ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**. v.121, p. 335-365, 1983.



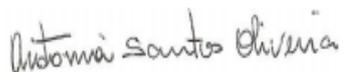
Universidade Estadual do Maranhão

COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *Himatanthus drasticus* (APOCYNACEAE) EM RATAS EM GESTAÇÃO**” foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal -CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Uema, conforme protocolo nº 031/2010, para a execução da pesquisa, pelo pós-graduando do Mestrado em Ciência Animal/UEMA, Verônica Saraiva César por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 879 de 15/02/2008

São Luís-Ma, 27 de fevereiro de 2012

pl 
Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA
(Matrícula 9357)